

Uloga proteina IqgC u regulaciji makropinocitoze u amebi *Dictyostelium discoideum*

Putar Brajković, Darija

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:491160>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Darija Putar Brajković

**Uloga proteina IqgC u regulaciji
makropinocitoze u amebi *Dictyostelium
discoideum***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Darija Putar Brajković

**The role of IqgC protein in the regulation
of macropinocytosis in amoeba
*Dictyostelium discoideum***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za staničnu dinamiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Vedrane Filić Mileta, više znanstvene suradnice IRB, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj rad je dijelom financiran Hrvatsko-švicarskim programom 2017-2023, a dijelom ga je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-1572, „Regulacija endocitoze na velikoj skali pomoću IQGAP proteinima srodnih proteina IqgC i IqgD.“

Životopis mentora

Vedrana Filić Mileta rođena je 1975. u Zagrebu. 1999. je diplomirala molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu je 2004. magistrirala, a 2008. obranila doktorsku disertaciju pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Webera. Od 2000.-2010. je zaposlena na mjestu znanstvenog novaka na Institutu Ruđer Bošković. Tijekom izrade doktorskog rada u tri navrata je boravila ukupno osam mjeseci u laboratoriju prof. dr. sc. Jana Faixa na Medicinskom fakultetu u Hannoveru. Od 2010.-2011. radi kao stručni specijalist u prodaji, a od 2011.-2013. prolazi poslijedoktorsko usavršavanje na Medicinskom fakultetu u Rijeci kod prof. dr. sc. Siniše Volarevića. Od 2013. ponovno je zaposlena na Institutu Ruđer Bošković; 2017. se zapošljava na mjestu znanstvenog suradnika, a od 2022. na mjestu višeg znanstvenog suradnika u Laboratoriju za staničnu dinamiku. Do sada je bila suradnica na velikom broju projekata, a trenutno je voditeljica četverogodišnjeg Istraživačkog projekta “Regulacija endocitoze na velikoj skali pomoću IQGAP proteinima srodnih proteina IqgC i IqgD”, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost. Mentorirala je 3 diplomska rada na PMF-u i trenutno je voditelj 2 diplomskih i 2 doktorskih rada. Do sada je objavila 22 znanstvena rada u časopisima indeksiranim u bazi podataka WoSCC koji su citirani preko 350 puta uz H-indeks 9. Dr. sc. Filić Mileta je sudjelovala na više od 50 međunarodnih znanstvenih skupova, od čega je održala 7 odabranih i pozvanih predavanja. Dobitnica je Državne nagrade za znanost Republike Hrvatske za 2019. za znanstveno otkriće i Nagrade Instituta Ruđer Bošković za najbolje znanstvene radove objavljene u 2019. Do sada je sudjelovala u organizaciji 2 znanstvena kongresa kao članica znanstvenih odbora, a bila je i suorganizatorica međunarodne konferencije *Annual International Dictyostelium Conference 2023* koja se održala u Opatiji. Članica je Hrvatskog mikroskopijskog društva i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju u kojem od 2021. obnaša funkciju članice Izvršnog odbora.

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Vedrani Filić Mileta na stručnom vodstvu, svim savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Puno Vam hvala na ukazanom povjerenju, podršci, strpljenju za sva moja pitanja i svemu što ste me naučili proteklih godina.

Hvala prof. dr. sc. Igoru Weberu na pruženoj prilici za rad u Laboratoriju za staničnu dinamiku i omogućenim sredstvima za istraživanje. Hvala Vam na svim savjetima i pomoći tijekom protekle četiri godine, kao i na sugestijama tijekom čitanja ovog rada.

Puno hvala Anji Čizmar, Luciji Mijanović i Mariji Šimić na priskakanju u pomoći, podršci, zaraznom optimizmu i predivnoj atmosferi u laboratoriju!

Zahvaljujem se i kolegama sa drugih zavoda Instituta Ruđer Bošković koji su uvijek bili spremni pružiti savjet ili uskočiti u pomoć, a posebno hvala dr.sc. Ani Smolko na savjetima za pročišćavanje proteina.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci, razumijevanju i ljubavi. Hvala vam što ste uvijek uz mene.

I na kraju Vladimiru, mom osloncu. Hvala ti što vjeruješ u mene, nasmijavaš me i daješ snage za nove izazove.

Uloga proteina IqgC u regulaciji makropinocitoze u amebi *Dictyostelium discoideum*

DARIJA PUTAR BRAJKOVIĆ

Institut Ruđer Bošković

Protein IqgC iz protista *D. discoideum* djeluje kao GAP (*GTPase activating protein*) prema GTPazi RasG, čime je deaktivira i tako suprimira makropinocitozu. Međutim, kako je makropinocitoza u akseničnim sojevima ovog organizma konstitutivno pojačana, delecija gena *iqgC* u akseničnom soju rezultirala je neznatnim pojačanjem makropinocitoze. U ovom radu pokazala sam da delecija gena *iqgC* ima znatno veću pozitivnu ulogu u regulaciji makropinocitoze u soju divljeg tipa čija makropinocitoza je uvelike suprimirana. Nadalje, ustanovila sam da je RasG neophodan za vezanje IqgC na membranu makropinosoma, dok interakcija IqgC s fosfoinozotidima doprinosi stabilizaciji vezanja. Pokazala sam također da IqgC izravno interagira s GTPazom Rab5A, ali ne utječe na njenu GTPaznu aktivnost, dok suvišak Rab5A inhibira GAP aktivnost IqgC prema RasG *in vitro*. Također, prekomjerna ekspresija Rab5A izaziva preuranjenu disocijaciju IqgC s makropinosoma. Dobiveni rezultati pokazuju da, osim interakcije proteina IqgC i RasG, interakcija IqgC i Rab5A također igra ulogu u regulaciji makropinocitoze.

(99 stranica, 23 slike, 4 tablice, 181 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: IqgC, RasG, Rab5, RasGAP, makropinocitoza, *Dictyostelium*

Mentor: dr. sc. Vedrana Filić Mileta, viša znanstvena suradnica, IRB

Ocjenjivači:

dr. sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica

prof. dr. sc. Igor Weber, naslovni redoviti profesor, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

prof. dr. sc. Biljana Balen, redovita profesorica u trajnom izboru

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

The role of IqqC protein in the regulation of macropinocytosis in amoeba *Dictyostelium discoideum*

DARIJA PUTAR BRAJKOVIĆ

Ruđer Bošković Institute

The *D. discoideum* protein IqqC is a RasG-specific GAP (*GTPase activating protein*) that negatively regulates macropinocytosis. However, deletion of *iqgC* in the axenic strain induced only a minor enhancement of macropinocytosis, as axenic cells already exhibit upregulated fluid uptake. Therefore, in this work, I deleted *iqgC* in the wild-type strain, whose macropinocytosis is largely suppressed, and demonstrated a more pronounced positive effect on fluid uptake upon IqqC depletion. Furthermore, I demonstrated that RasG is essential for IqqC recruitment to macropinosomes, while IqqC binding to phosphoinositides likely contributes to stabilization of the association. I showed that IqqC also interacts with GTPase Rab5A but does not affect its activity. Actually, an excessive amount of Rab5A inhibits the GAP activity of IqqC towards RasG *in vitro* and induces premature dissociation of IqqC from the macropinosome *in vivo*. These results suggest that interactions between IqqC and both GTPases play a regulatory role in macropinocytosis.

(99 pages, 23 figures, 4 tables, 181 references, original in Croatian)

Keywords: IqqC, RasG, Rab5, RasGAP, macropinocytosis, *Dictyostelium*

Supervisor: Vedrana Filić Mileta, Ph.D., senior research associate, RBI

Reviewers:

Maja Herak Bosnar, Ph.D., senior scientist

Igor Weber, Ph.D., senior scientist

Biljana Balen, Ph.D., full professor

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada.....	1
2. Literaturni pregled	3
2.1. Makropinocitoza.....	3
2.2. Modelni organizam <i>Dictyostelium discoideum</i>	5
2.3. Mehanizam stvaranja makropinosoma.....	7
2.4. Rano sazrijevanje makropinosoma.....	10
2.5. Regulacija proteina Ras.....	12
2.5.1. Proteini RasGAP.....	16
2.5.2. Proteini obitelji IQGAP i njima srodni proteini u stanicama <i>D. discoideum</i>	17
2.5.2.1. Protein IqgC.....	19
3. Materijali i metode	20
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA.....	20
3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj i transformaciju bakterija.....	25
3.1.2.1. Korišteni bakterijski sojevi.....	25
3.1.2.2. Hranjive podloge i antibiotici.....	25
3.1.3. Materijali korišteni za uzgoj, transfekciju i fiksaciju stanica <i>Dictyostelium discoideum</i> ...	27
3.1.3.1. Korišteni sojevi <i>D. discoideum</i>	27
3.1.3.2. Hranjive podloge, puferi i antibiotici.....	28
3.1.3.3. Fiksacija stanica.....	29
3.1.4. Materijali korišteni za izolaciju genomske DNA (gDNA) i analizu Southern.....	29
3.1.4.1. Materijali za izolaciju genomske DNA ekstrakcijom fenolom.....	29
3.1.4.2. Materijali i puferi za analizu Southern.....	30
3.1.5. Materijali korišteni za sustav dva hibrida u kvascu (engl. <i>Yeast two-hybrid assay</i> , Y2H). 31	
3.1.5.1. Korišteni soj kvasca za Y2H.....	31
3.1.5.2. Hranjive podloge i puferi za Y2H.....	31
3.1.5.3. Materijali za transfekciju kvasaca.....	32
3.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju.....	33
3.1.6.1. Materijali korišteni za afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavcima GST i His.....	33

3.1.6.2. Pufferi korišteni za testiranje proteinskih interakcija metodom <i>pull-down</i>	34
3.1.6.3. Materijali korišteni za testiranje proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije	35
3.1.6.4. Materijali i pufferi korišteni za točkasto bugaćenje lipida (engl. <i>lipid dot blot assay</i>).	35
3.1.6.5. Materijali korišteni za elektroforezu u denaturirajućem gelu i metodu Western	36
3.1.6.6. Materijali korišteni za testiranje aktivnosti GAP	39
3.2. Metode.....	40
3.2.1. Tehnike rekombinantne DNA.....	40
3.2.1.1. Vektor za isključivanje gena <i>iqgC</i> u stanicama <i>D. discoideum</i>	40
3.2.1.2. Vektori za ekspresiju proteina u divljem soju DdB stanica <i>D. discoideum</i>	41
3.2.1.3. Vektori za ekspresiju proteina u stanicama akseničnog soja AX2 <i>D. discoideum</i>	43
3.2.1.4. Vektori za sustav dva hibrida u kvascu	44
3.2.1.5. Vektori za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom His.....	45
3.2.2. Uzgoj bakterija	45
3.2.2.1. Uzgoj i transformacija bakterija <i>E. coli</i>	45
3.2.2.2. Uzgoj i priprema bakterija <i>K. aerogenes</i> kao izvora hrane za <i>D. discoideum</i>	46
3.2.3. Rad sa stanicama <i>D. discoideum</i> u kulturi.....	46
3.2.3.1. Uzgoj stanica <i>D. discoideum</i>	46
3.2.3.2. Transfekcija stanica <i>D. discoideum</i>	47
3.2.4. Isključivanje gena <i>iqgC</i> i selekcija klonova <i>iqgC</i>	47
3.2.4.1. Isključivanje gena <i>iqgC</i> u soju DdB i selekcija klonova metodama PCR i Western ..	47
3.2.4.2. Izolacija genomske DNA iz mutanata <i>iqgC</i>	48
3.2.4.3. Analiza Southern za potvrdu isključivanja gena <i>iqgC</i>	49
3.2.5. Fenotipizacija stanica <i>iqgC</i> u genetičkoj pozadini DdB	50
3.2.5.1. Ispitivanje rasta stanica soja <i>D. discoideum</i> DdB	50
3.2.5.2. Mjerenje kinetike unosa tekućine makropinocitozom.....	50
3.2.6. Fiksacija stanica <i>D. discoideum</i>	50
3.2.7. Sustav dva hibrida u kvascu	51
3.2.8. Proteinska biokemija	51
3.2.8.1. Afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavkom His.....	51
3.2.8.2. Afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavkom GST.....	52
3.2.8.3. Metoda <i>pull-down</i>	53
3.2.8.4. Metoda koimunoprecipitacije.....	53
3.2.8.5. Točkasto bugaćenje lipida	54
3.2.8.6. Metoda Western	55
3.2.8.7. Testiranje aktivnosti GAP	55

3.2.9. Konfokalna mikroskopija	56
3.2.10. Statistička obrada rezultata	58
4. Rezultati	59
4.1. Strategija i konstruiranje stanica deficitarnih za gen <i>iqgC</i> u genetičkoj pozadini soja DdB	59
4.2. Stanice <i>iqgC</i> u genetičkoj pozadini DdB imaju efikasniju makropinocitozu u odnosu na stanice divljeg tipa	61
4.3. Regrutacija IqgC na makropinocitotske čašice je ovisna o RasG	62
4.4. Vežanje IqgC na fosfoinozotide stanične membrane je ovisno o RasG	65
4.5. IqgC izravno veže malu GTPazu Rab5A tijekom makropinocitoze	66
4.6. Rab5A utječe na RasGAP aktivnost proteina IqgC prema GTPazi RasG	68
4.7. Prekomjerna ekspresija Rab5A korelira s preuranjenom disocijacijom IqgC sa zatvorenog makropinosoma	70
5. Rasprava.....	73
5.1. Protein IqgC ima značajnu ulogu u regulaciji makropinocitoze u prisutnosti proteina NF1	73
5.2. RasG regrutira IqgC na nastajuće makropinosome	74
5.3. IqgC izravno veže Rab5A, još jednu malu GTPazu iz superobitelji Ras koja je prisutna na makropinosomu	76
6. Zaključak	80
7. Popis literature	81
8. Prilozi.....	93
9. Popis kratica	97
10. Životopis	99

1. Uvod

Makropinocitoza je proces neselektivnog unosa velikih količina tekućine u stanicu koju, zajedno s procesom fagocitoze, unosom čestica u stanicu, nazivamo makroendocitoza ili endocitoza na velikoj skali (King i Kay, 2019.). To je evolucijski očuvani proces koji predstavlja drevni način staničnog hranjenja, sačuvan od jednostaničnih eukariota, poput amebe, do višestaničnih organizama, poput čovjeka. Međutim, s razvojem probavnog sustava makroendocitoza prestaje biti dominantni put unosa hranjivih tvari u stanicu te je u viših eukariota koriste specijalizirane stanice za obavljanje specifičnih funkcija, primjerice stanice imunološkog sustava u obrani od patogena. Protist *Dictyostelium discoideum* koristi makroendocitozu za hranjenje i, s obzirom da sadrži mnoge ortologe ljudskih gena, predstavlja odličan model za proučavanje tog procesa (Bozzaro, 2019.).

Makropinosomi se oblikuju iz izbočenja ili protruzija stanične membrane što zahtijeva opsežno remodeliranje aktinskog citoskeleta koje se odvija pod kontrolom malih GTPaza iz obitelji Ras i Rho (Buckley i King, 2017.). Makropinocitotske čašice nastaju iz regija stanične membrane koje su obogaćene aktivnim proteinima Ras i Rac, i fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfatom (PI(3,4,5)P₃). Važni pozitivni regulatori makropinocitoze u stanicama *D. discoideum* su proteini RasG i RasS koji aktivacijom fosfoinozimid 3-kinaza klase I potiču stvaranje PI(3,4,5)P₃ (Williams *i sur.*, 2019.). Za pravovremenu deaktivaciju proteina Ras odgovorni su proteini RasGAP (engl. *GTPase activating proteins*) koji potiču njihovu aktivnost hidrolize GTP-a i tako ih prevode u neaktivni oblik (Scheffzek i Ahmadian, 2005.).

Dictyostelium discoideum ima nekoliko proteina RasGAP uključenih u regulaciju makroendocitoze, a jedan od njih je protein IqgC koji specifično deaktivira RasG i negativno regulira procese makroendocitoze (Marinović *i sur.*, 2019.). Fluorescentni IqgC je lokaliziran na membrani nastajućih makropinosoma i, sa značajno slabijim intenzitetom, na membrani fagosoma. Usprkos tome, delecija gena *iqgC* značajno je povećala efikasnost fagocitoze u stanicama akseničnog (bez prisutnosti drugih organizama) soja *D. discoideum*, dok je pojačanje makropinocitoze bilo znatno slabije (Marinović *i sur.*, 2019.).

1.1. Cilj rada

Glavni cilj ovog doktorskog rada je razjasniti ulogu proteina IqgC u procesu makropinocitoze. Naime, kao što je već spomenuto, delecija gena *iqgC* imala je neznatni efekt na poboljšanje efikasnosti makropinocitoze u stanicama akseničnog soja. Poznato je da se

amebe divljeg tipa *D. discoideum* u prirodi hrane fagocitozom bakterija dok im je makropinocitoza suprimirana i nedovoljna za preživljavanje. Aksenični sojevi, najčešće korišteni u laboratorijima, imaju znatno pojačanu makropinocitozu zbog delecije gena *axeB* koji kodira za RasGAP neurofibromin 1 (NF1) (Bloomfield *i sur.*, 2015.). To rezultira povišenim razinama aktivnih GTPaza Ras koje su odgovorne za povećane makropinosome i konstitutivno aktiviranu makropinocitozu. S obzirom na to, pretpostavili smo da delecija gena za dodatni RasGAP ne može polučiti značajne efekte na proces koji je već ionako genetički unaprijeđen. Stoga mi je prvi cilj bio ispitati ima li protein IqgC značajniji utjecaj na makropinocitozu u divljem soju DdB u kojem je prisutan protein NF1. Zbog toga sam homolognom rekombinacijom isključila gen *iqgC* u genetičkoj pozadini soja DdB. Usporedila sam rast u tekućoj hranjivoj podlozi i efikasnost makropinocitoze tako dobivenih stanica *iqgC*⁻ i stanica divljeg tipa. Za utvrđivanje veličine makropinosoma kod tih stanica koristila sam konfokalnu mikroskopiju i digitalnu analizu mikroskopijskih slika.

Drugi cilj ovog rada bio je razjasniti mehanizam regrutacije i identificirati proteinske domene nužne za regrutaciju IqgC na makropinosome. Ekspimirala sam protein IqgC u stanicama *rasG*⁻ i njegove mutirane varijante u stanicama *iqgC*⁻, te sam konfokalnom mikroskopijom analizirala je li interakcija IqgC s RasG potrebna za regrutaciju IqgC na makropinosome. Sustavom dva hibrida u kvascu odredila sam domene proteina IqgC potrebne za interakciju s RasG. Ekspresijom skraćениh varijanti proteina IqgC u stanicama *iqgC*⁻ istražila sam koje su domene proteina IqgC potrebne za njegov smještaj na membranu makropinosoma.

S obzirom na to da je primjećeno zadržavanje proteina IqgC na internaliziranom makropinosomu nakon disocijacije probe za aktivni Ras s membrane makropinosoma (Marinović *i sur.*, 2019.), pretpostavili smo da je IqgC uključen i u funkcije tijekom sazrijevanja makropinosoma koje su neovisne o RasG. Stoga je treći cilj ovog rada bio ispitati postoje li dodatni proteinski i/ili fosfolipidni interaktori proteina IqgC koji ga zadržavaju na internaliziranom makropinosomu. Za testiranje potencijalnih fosfolipidnih interaktora koristila sam točkasto bugaćenje lipida, a za testiranje potencijalnih proteinskih interaktora koristila sam metode koimunoprecipitacije i *pull-down*. Nakon što sam utvrdila da je mala GTPaza Rab5A izravni interaktor proteina IqgC, pratila sam prostorno-vremensku raspodjelu oba proteina u živim stanicama konfokalnom mikroskopijom. Koristeći test za analizu aktivnosti GAP ispitala sam djeluje li protein IqgC kao GAP prema Rab5A. Također, ispitala sam utjecaj Rab5A na aktivnost GAP proteina IqgC prema RasG. Koristeći konfokalnu mikroskopiju testirala sam utjecaj koncentracije Rab5A na dinamiku proteina IqgC na zatvorenom makropinosomu u živim stanicama.

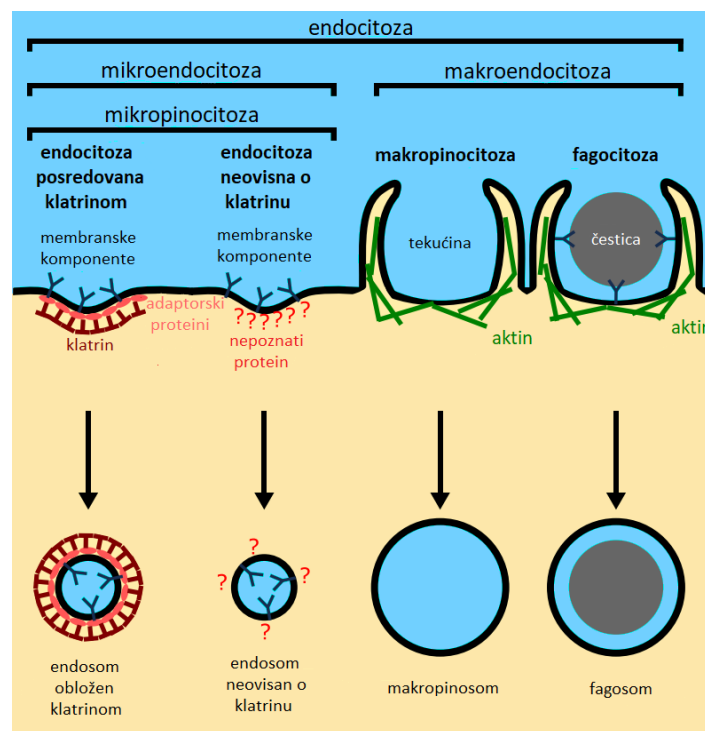
2. Literaturni pregled

2.1. Makropinocitoza

Makropinocitoza je proces neselektivnog unosa velikih volumena tekućine u stanicu. To je endocitotski proces ovisan o aktinu koji zajedno s fagocitozom nazivamo makroendocitoza (King i Kay, 2019.; Vines i King, 2019.). Za razliku od endocitoze posredovane klatrinom kod koje dolazi do invaginacije stanične membrane, makropinosomi i fagosomi značajno su veći i formiraju se iz izbočenja ili protruzija stanične membrane koje nastaju reorganizacijom aktinskog citoskeleta (Slika 2.1.) (Vines i King, 2019.). Proces makroendocitoze je evolucijski očuvan od protista do ljudi. Amebi *Dictyostelium discoideum* makroendocitoza služi za unos hranjivih tvari, dok je stanice sisavaca koriste za specijalizirane funkcije (King i Kay, 2019.). Stanice imunskog sustava poput makrofaga, dendritičkih stanica i neutrofila profesionalni su fagociti koji fagocitozom uklanjaju patogene i ostatake mrtvih stanica te održavaju homeostazu tkiva i organa (Conner i Schmid, 2003.). Dendritičke stanice uz to koriste i makropinocitozu za unos topivih antigena koje kasnije prezentiraju T limfocitima (Liu i Roche, 2015.). Neuron koriste makroendocitozu za recikliranje proteina i membrana sinaptičkih vezikula tijekom intenzivne sinaptičke aktivnosti (Clayton i Cousin, 2009.). Aktivirani T limfociti koriste makropinocitozu za unos izvanstaničnih aminokiselina kako bi mogli podržati aktivaciju kompleksa mTORC1 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*) koji promovira stanični rast (Charpentier *i sur.*, 2020.).

Osim za održavanje homeostaze organizma, makropinocitoza ima važnu ulogu i u nekim bolestima. Na primjer, patogeni poput bakterija, virusa i priona zloupotrebljavaju makropinocitozu kako bi ušli u stanicu (Bloomfield i Kay, 2016.). Brojne tumorske stanice imaju značajno pojačanu makropinocitozu kojom unose proteine iz izvanstaničnog okoliša, posebno albumin iz seruma uz kojeg se unose i masne kiseline i kolesterol vezani na albumin, ali i molekule adenozin-trifosfata (ATP), kako bi omogućile rast tumora (Commisso *i sur.*, 2013.; Commisso i Debnath, 2018.; Finicle *i sur.*, 2018.; Qian *i sur.*, 2014.). Zbog česte slabe prokrvljenosti tumora i nedostatne dostave glukoze i aminokiselina, tumorske stanice posežu za makromolekulama iz izvanstaničnog okoliša poput ostataka nekrotičnih stanica koji su izvor proteina, masnih kiselina i triglicerida, a posežu i za proteinima izvanstaničnog matriksa poput kolagena i fibronektina koje unose makropinocitozom (Davidson *i sur.*, 2017.; Kim *i sur.*, 2018.; Olivares *i sur.*, 2017.). Uloga makropinocitoze najviše je istraživana u tumorskim stanicama s pojačanom aktivnošću proteina Ras, poznatog onkoproteina. Prekomjerno

aktivirani Ras u tumorskim stanicama potiče aktivaciju signalnih puteva nizvodno od receptorskih tirozin-kinaza (RTK), prvenstveno aktivirajući fosfoinozimid 3-kinaze (PI3-kinaze ili PI3K) klase I te na taj način omogućuje tumorskoj stanici da se hrani i proliferira neovisno o faktorima rasta i aktivaciji receptora (Puccini *i sur.*, 2022.). Osim mutacija proteina Ras, delecija tumorskog supresora PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) ili mutacija metaboličkog senzora kinaze AMP (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) također izazivaju pojačanu makropinocitozu tumorskih stanica koja im omogućuje unos nutrijenata i rast u mikrookolišu siromašnom aminokiselinama i glukozom (Bloomfield i Kay, 2016.; Kim *i sur.*, 2018.). U posljednje vrijeme sve su brojnija istraživanja makropinocitoze u terapijske svrhe, kao puta za unos mRNA cjepiva i makromolekula u stanice tumora kojima bi se spriječio njihov daljnji rast (Bloomfield i Kay, 2016.; Kay, 2021.; Kranz *i sur.*, 2016.).



Slika 2.1. Vrste endocitoze u amebi *D. discoideum*. Podjela endocitoze na mikroendocitozu i makroendocitozu kod amebe *Dictyostelium discoideum* (prilagođeno prema Vines i King, 2019.).

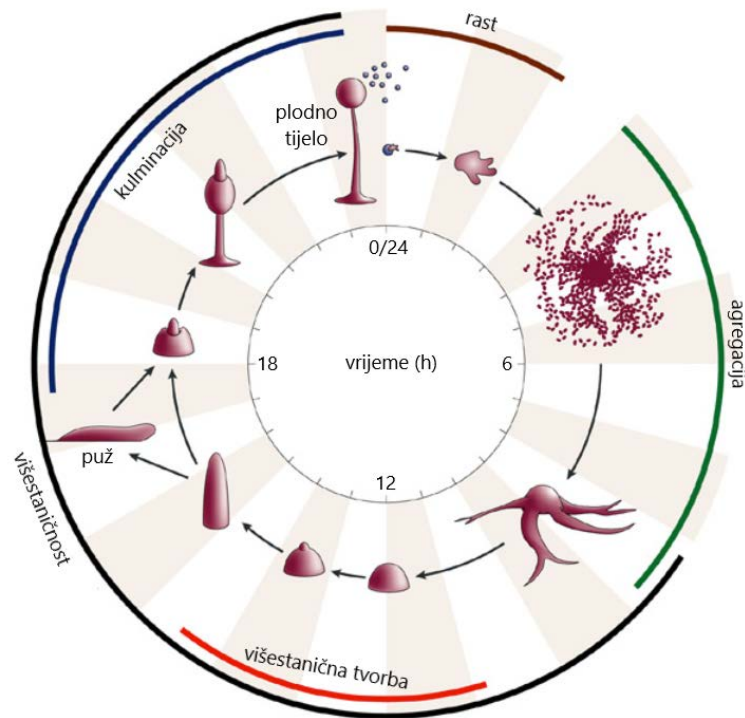
U stanicama sisavaca makropinocitoza može biti konstitutivna ili inducirana faktorima rasta. Dendritičke stanice, makrofagi i tumorske stanice makropinocitiraju konstitutivno (King i Kay, 2019.; Lin *i sur.*, 2020.). Kod dendritičkih stanica je pokazano da konstitutivna makropinocitoza ovisi o izvanstaničnom Ca^{2+} koji se veže na receptore osjetljive na kalcij koji aktiviraju proteine RhoGEF (engl. *guanine nucleotide exchange factors*) koji zatim aktiviraju proteine Rac. Aktivne GTPaze Rac potiču dendritičku polimerizaciju aktina koja je potrebna za protruziju stanične membrane i formiranje makropinosoma (Canton *i sur.*, 2016.; Lin *i sur.*,

2020.; Mylvaganam *i sur.*, 2021.). S druge strane, osim konstitutivnog stvaranja makropinosoma ovisnog o Ca^{2+} , makrofagi provode i induciranu makropinocitozu potaknutu faktorima rasta npr. CSF-1 (engl. *macrophage colony-stimulating factor 1*) i molekulama koje potječu od patogena, poput lipopolisaharida (Canton *i sur.*, 2016.; Condon *i sur.*, 2018.). Makropinosomi fibroblasta i endotelnih stanica također se formiraju nakon stimulacije faktorima rasta poput PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*), a mogu se inducirati i mikroinjektiranjem aktivne GTPaze Rac1 u stanicu (Mellström *i sur.*, 1988.; Ridley *i sur.*, 1992.; Wennström *i sur.*, 1994.). Kao što je već spomenuto, brojne tumorske stanice provode konstitutivnu makropinocitozu zbog pojačane aktivnosti proteina Ras, no razlog mogu biti i onkogene kinaze Src ili prekomjerno aktivan signalni put Wnt (Bar-Sagi i Feramisco, 1986.; Commisso *i sur.*, 2013.; Redelman-Sidi *i sur.*, 2018.; Veithen *i sur.*, 1996.). Stanice *D. discoideum*, slično kao i tumorske stanice, konstitutivno stvaraju makropinosome. Stvaraju se spontano, bez stimulacije vanjskim faktorima, najvjerojatnije zbog autoaktivacije proteina Ras koji aktivira PI3-kinaze klase I što vodi stvaranju $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, iako mehanizam inicijacije makropinocitoze nije razjašnjen (Bloomfield i Kay, 2016.; Buckley i King, 2017.).

2.2. Modelni organizam *Dictyostelium discoideum*

Protist *Dictyostelium discoideum* u prirodi živi u tlu kao jednostanični organizam te se hrani raznovrsnim bakterijama procesom fagocitoze. Međutim, život u tlu izlaže ove amebe i brojnim patogenima zbog čega su, uz efikasnu fagocitozu, razvili mehanizme obrane od patogena, od kojih su mnogi očuvani i kod makrofaga. Sve ovo je razlog da je *D. discoideum* izuzetno pogodan modelni organizam za istraživanje fagocitoze, mikrobnih infekcija te odnosa između domaćina i patogena (Bozzaro *i sur.*, 2008.). *D. discoideum* ima složen životni ciklus koji se sastoji od jednostanične i višestanične faze (Slika 2.2.). Tijekom vegetativnog rasta, amebe se aktivno kreću po podlozi i hrane fagocitozom. Kada u okolišu ponestane hrane inducira se faza višestaničnog razvoja. Izgladnjele stanice počinju izlučivati kemoatraktant ciklički adenozin monofosfat (cAMP) i kretati se koristeći kemotaksiju prema cAMP-u, izlučenom iz drugih stanica, što rezultira nakupljanjem stanica u agregate. Tijekom faze višestaničnog razvoja, te nakupine stanica poprimaju nekoliko morfološki različitih oblika. Taj proces kulminira formiranjem plodnog tijela koje se sastoji od stalka na bazalnom disku i sorokarpa sa sporama. Spore omogućuju protistu *D. discoideum* preživljavanje nepovoljnih uvjeta. Kada uvjeti u okolini ponovno postanu pogodni, iz spora se izlegnu vegetativne stanice te životni ciklus započinje iznova (Chisholm i Firtel, 2004.). Ova uvjetovana višestaničnost uz vrlo kratak životni ciklus (24 sata za amebe divljeg soja), čini *D. discoideum* odličnim modelom

za istraživanje kemotaksije i stanične pokretljivosti, međustanične adhezije, citokineze, autofagije i socijalne evolucije (Bozzaro, 2019.; Sussman, 1987.).



Slika 2.2. Životni ciklus protista *Dictyostelium discoideum* (prilagođeno prema Chisholm i Firtel, 2004.).

Genom *D. discoideum* ima 34 Mb i sastoji se od 6 kromosoma. Sadrži brojne ortologe ljudskih gena od kojih su neki uključeni u bolesti što omogućuje njegovo korištenje i u biomedicinskim istraživanjima i istraživanjima evolucijski očuvanih staničnih procesa (Eichinger *i sur.*, 2005.). Brzi rast (vrijeme diobe za divlje amebe je oko 4 sata, a za aksenične sojeve oko 8 sati), jednostavni uzgoj u laboratoriju i haploidni genom omogućuju korištenje brojnih staničnih i molekularno-bioloških metoda istraživanja te jednostavnu genetičku manipulaciju (Bozzaro, 2019.). Aksenični sojevi, koji uspješno rastu u tekućoj hranjivoj podlozi bez prisutnosti bakterija (engl. *axenic*), također predstavljaju veliku prednost u laboratorijskom radu.

Naime, kao što je spomenuto, divlji izolati *D. discoideum* preferencijalno se hrane fagocitozom bakterija, dok im je makropinocitoza suprimirana i nedovoljna za preživljavanje u tekućoj hranjivoj podlozi u odsutnosti bakterija. Međutim, 70-ih godina prošlog stoljeća izolati amebe *D. discoideum* iz prirode prilagođeni su rastu u tekućoj hranjivoj podlozi selekcijom akseničnih mutanata koji imaju značajno pojačanu makropinocitozu (Franke i Kessin, 1977.; Watts i Ashworth, 1970.) Kanije je otkriveno da je za nastanak akseničnog fenotipa odgovorno nekoliko gena, među kojima je najvažnija delecija gena *axeB* koji kodira protein RasGAP NF1

(Bloomfield *i sur.*, 2015.; North i Williams, 1978.; Williams *i sur.*, 1974.). NF1 je ortolog humanog proteina neurofibromina 1 koji je također RasGAP i igra ključnu ulogu u razvoju neurofibromatoze tipa 1, kompleksnog poremećaja kojeg karakterizira pojava neurofibroma. NF1 u amebi *D. discoideum* negativno regulira procese makropinocitoze i fagocitoze inhibirajući aktivnost proteina Ras. Delecija gena *axeB* omogućila je akseničnim sojevima uspješan rast u tekućoj hranjivoj podlozi zbog značajno pojačane makropinocitoze (Bloomfield *i sur.*, 2015.). S obzirom na ovo, *D. discoideum* je, uz stanice sisavaca u kulturi, postao glavni modelni organizam za proučavanje procesa makropinocitoze.

2.3. Mehanizam stvaranja makropinosoma

Stvaranje makropinosoma zahtijeva opsežno remodeliranje aktinskog citoskeleta koje uzrokuje protruziju stanične membrane na vanjskom rubu nastajuće makropinocitotske čašice uz istovremenu supresiju protruzije u njenoj bazi (Buckley i King, 2017.; Veltman *i sur.*, 2016.). Za razliku od formiranja fagosoma koji se oblikuju prema čestici koja se fagocitira, u makropinocitozi ne postoji kalup koji bi odredio oblik makropinocitotske čašice. Kompleksnu prostornu-vremensku regulaciju makropinocitoze kontroliraju male GTPaze iz superobitelji Ras poput Ras, Rac, Cdc42, Arf6 i Rab5, ali i fosfoinozitidi (PIP) koji regrutiraju različite efektorske proteine i time omogućuju raspoznavanje različitih faza endocitotskog procesa (Egami *i sur.*, 2014.; Vines i King, 2019.). Ključnu ulogu u formiranju makropinosoma u stanicama sisavaca i protista *D. discoideum* imaju regije stanične membrane bogate aktivnim proteinima Ras i fosfolipidom PI(3,4,5)P₃ (Dormann *i sur.*, 2004.; Hoeller *i sur.*, 2013.; Lin *i sur.*, 2020.; Recouvreux i Commisso, 2017.; Veltman *i sur.*, 2016.). Međutim, signalni putevi uključeni u stvaranje makropinosoma u određenoj se mjeri razlikuju ovisno o vrsti stanica.

Kod nezrelih dendritičkih stanica i makrofaga konstitutivna makropinocitoza potaknuta je izvanstaničnim Ca²⁺ koji aktivira receptore osjetljive na kalcij vezane za heterotrimerne G proteine (Lin *i sur.*, 2020.). Podjedinica G α G proteina aktivira PI3-kinaze klase I i potiče stvaranje PI(3,4,5)P₃ na staničnoj membrani. PI(3,4,5)P₃ regrutira fosfolipazu C koja hidrolizira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat PI(4,5)P₂ na diacilglicerol (DAG) i inozitol trifosfat (IP₃) (Bohdanowicz *i sur.*, 2013.). Diacilglicerolska kinaza nadalje fosforilira DAG čime nastaje fosfatidična kiselina koja potiče polimerizaciju aktina i nabiranje membrane regrutiranjem proteina GEF TIAM1 (engl. *T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*) koji aktivira GTPazu Rac koja zatim aktivira kompleks SCAR/WAVE (Bohdanowicz *i sur.*, 2013.; Lin *i sur.*, 2020.). PI(3,4,5)P₃ aktivira i GTPazu RhoG koja sudjeluje u aktivaciji proteina Rac, ali i sama aktivira kompleks SCAR/WAVE koji je potreban za aktivaciju kompleksa Arp2/3

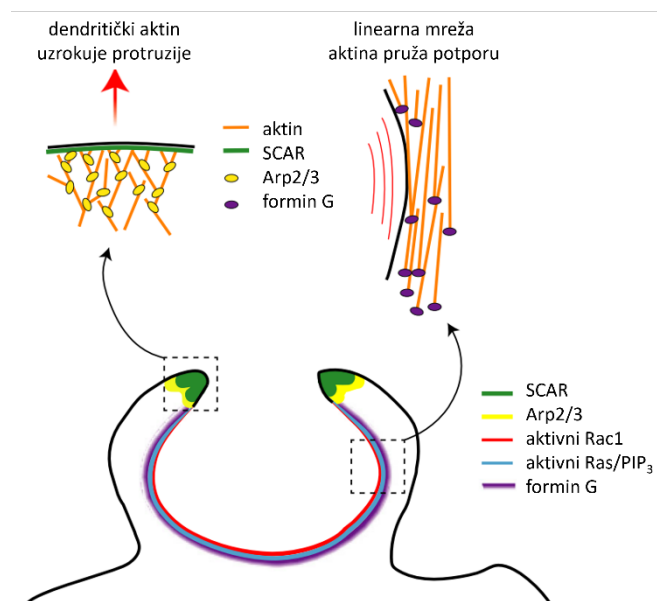
(Mylvaganam *i sur.*, 2021.). Arp2/3 je glavni nukleator dendritički razgranate polimerizacije aktina koja uzrokuje nabiranje membrane i stvaranje makropinosoma (Bohdanowicz *i sur.*, 2013.; Lin *i sur.*, 2020.; Mylvaganam *i sur.*, 2021.).

Kod inducirane makropinocitoze, faktori rasta poput EGF (engl. *epidermal growth factor*), PDGF i CSF-1 preko RTK stimuliraju nabiranje membrane aktivacijom PI3-kinaza klase I i proteina Ras, što aktivira Rac1 i Cdc42 te dovodi do stimulacije p21-aktivirane kinaze (Pak1) i kompleksa Arp2/3 kako bi se potaknula polimerizacija aktina (Recouvreux i Commisso, 2017.; Ridley *i sur.*, 1992.). Formiranje makropinocitotske čašice započinje lokaliziranim porastom koncentracije PI(4,5)P₂ na kružnom naboru membrane kojega prati još intenzivniji porast PI(3,4,5)P₃ netom prije zatvaranja makropinosoma, a podudara se s vrhom aktivacije proteina Rac1 (Araki *i sur.*, 2007.; Welliver i Swanson, 2012.; Yoshida *i sur.*, 2009.). U staničnoj liniji karcinoma pločastih stanica A431 koje imaju povišene razine receptora za faktor rasta EGF, inhibitori PI3-kinaza suprimiraju makropinocitozu iako ne inhibiraju polimerizaciju F-aktina i stvaranje nabora membrane potaknuto EGF-om, što ukazuje na to da je PI(3,4,5)P₃ kojeg stvaraju PI3-kinaze klase I nužan za formiranje makropinosoma (Araki *i sur.*, 2007.). Palm *i sur.*, 2017. potvrdili su ključnu ulogu PI3-kinaza u regulaciji makropinocitoze u mišjim embrionalnim fibroblastima. S druge strane, pokazali su da proteini H-Ras, K-Ras i N-Ras, iako potiču makropinocitozu, nisu nužni za stvaranje makropinosoma potaknutih faktorima rasta s obzirom da fibroblasti deficitarni za sva tri proteina Ras nisu imali defekte tijekom inducirane makropinocitoze (Palm *i sur.*, 2017.). U stanicama sisavaca, PI(4,5)P₂ je također važan u ranoj fazi formiranja makropinosoma jer regrutira proteine koji se vežu na aktinske filamente poput α -aktinina koji potiče međusobno povezivanje aktinskih filamenata, talina koji povezuje aktinske filamente sa staničnom membranom i vinkulina koji regulira interakciju aktinskih filamenata i drugih citoskeletnih proteina (Janmey i Lindberg, 2004.; Sechi i Wehland, 2000.). Također, za regulaciju makropinocitoze u stanicama sisavaca važna je i sekvencijalna defosforilacija fosfoinozitida, koja započinje već na kružnim naborima membrane, a ključna je za regrutaciju efektora specifičnih za svaku fazu procesa (Maekawa *i sur.*, 2014.). U stanicama A431 i mišjim makrofagima, fosfataze SHIP2 i SHIP1 defosforiliraju PI(3,4,5)P₃ u fosfatidilinozitol 3,4-bisfosfat (PI(3,4)P₂) (Maekawa *i sur.*, 2014.; Welliver i Swanson, 2012.). U stanicama A431 zatim dolazi do defosforilacije PI(3,4)P₂ u fosfatidilinozitol 3-fosfat (PI(3)P) pomoću fosfataze INPP4B, te konačno i defosforilacije PI(3)P u fosfatidilinozitol (PI) pomoću fosfataza MTMR6 i MTMR9 koje se regrutiraju u nabore membrane nakon stimulacije stanica EGF-om (Maekawa *i sur.*, 2014.). U mišjim makrofagima, sekvencijalna defosforilacija događa se malo kasnije pa se vrhunac akumulacije

PI(3,4)P₂ javlja tijekom zatvaranja makropinosoma, a razina PI(3)P raste nakon zatvaranja makropinosoma istovremeno s opadanjem razine PI(3,4)P₂ (Welliver i Swanson, 2012.).

Slično konstitutivnoj makropinocitozi tumorskih stanica u kojima je pojačana signalizacija Ras/PI3-kinaznog puta, makropinocitoza u akseničnim stanicama *D. discoideum* također je konstitutivna i autoregulirana. Dijelovi stanične membrane aktivirani za makropinocitozu bogati su aktivnim GTPazama iz obitelji Ras i fosfolipidom PI(3,4,5)P₃ koji na distalne dijelove tih regija regrutiraju prsten nukleatora aktina i služe kao kalup za formiranje makropinocitotskih čašica. Međutim, još uvijek nije jasno kako dolazi do lokalne aktivacije proteina Ras (Veltman *i sur.*, 2016.). Isključivanje gena *rasG* i *rasS* pokazalo je da su u stanicama *D. discoideum* RasG i RasS važni pozitivni regulatori makropinocitoze, s obzirom da su stanice deficijentne za ove proteine imale značajne defekte makropinocitoze (Hoeller *i sur.*, 2013.; Williams *i sur.*, 2019.). Time je pokazano da je uloga proteina iz obitelji Ras u makropinocitozi stanica *D. discoideum* značajno važnija od njihove uloge u regulaciji inducirane makropinocitoze u stanicama sisavaca, sudeći prema rezultatima dobivenim na mišjim embrionalnim fibroblastima (Palm *i sur.*, 2017.). U svojem aktivnom obliku u kojem su vezani na gvanozin-trifosfat (GTP), RasG i RasS aktiviraju PI3-kinaze klase I 1, 2 i 4 (PI3K1, PI3K2 i PI3K4), vežući se na njihovu domenu RBD (engl. *Ras-binding domain*), s time da je PI3K4 vjerojatno regulirana pretežito s RasS (Hoeller *i sur.*, 2013.). Delecija gena za PI3K1 i PI3K2 onemogućava formiranje regija stanične membrane obogaćenih fosfoinozotidom PI(3,4,5)P₃ i stvaranje makropinocitotskih čašica. S druge strane, delecija gena za PI3K4 inhibira zatvaranje makropinosoma (Hoeller *i sur.*, 2013.). Ubrzo nakon zatvaranja makropinosoma, PI-5 fosfataza Dd5P4 hidrolizira PI(3,4,5)P₃ u PI(3,4)P₂ (Dormann *i sur.*, 2004.; Li *i sur.*, 2018b.). Signalni putevi nizvodno od PI(3,4,5)P₃ i aktivnih proteina Ras slični su kao i tijekom inducibilne makropinocitoze u stanicama sisavaca. PI(3,4,5)P₃ regrutira proteine GEF i GAP koji reguliraju aktivnost malih GTPaza obitelji Ras i Rho. Rac aktivira kompleks SCAR/WAVE koji aktivacijom kompleksa Arp2/3 potiče polimerizaciju aktina na distalnim dijelovima nastajuće makropinocitotske čašice (Veltman *i sur.*, 2016.). Zanimljivo je da aktivni RasG i RasB, homolozi humanih proteina K-Ras i H-Ras, regrutiraju i aktiviraju protein formin G koji, nakon što je nukleacija aktina potaknuta kompleksom Arp2/3, produljuje linearne aktinske filamente u bazi makropinocitotske čašice pružajući joj time potporu (Junemann *i sur.*, 2016.) (Slika 2.3.). Junemann *i sur.*, 2016. uočili su značajno smanjenu efikasnost fagocitoze, ali ne i makropinocitoze, u stanicama deficijentnima za RasB. Stoga su predložili model prema kojem RasB aktivira i regulira formin G tijekom fagocitoze velikih čestica dok je RasG glavni regulator tijekom makropinocitoze. Kao što je već spomenuto,

aktivacija Rac1, koja se događa u regijama bogatim aktivnim Ras i PI(3,4,5)P₃, važna je za nukleaciju aktina i formiranje makropinocitotskih čašica i u stanicama *D. discoideum* i u stanicama sisavaca (Buckley i King, 2017.; Fujii *i sur.*, 2013.; Veltman *i sur.*, 2016.). S druge strane, pravovremena deaktivacija Rac1 važna je za zatvaranje makropinosoma (Buckley i King, 2017.; Dumontier *i sur.*, 2000.; Fujii *i sur.*, 2013.). Makropinocitotske čašice u stanicama *D. discoideum* počinju se zatvarati kada se regije stanične membrane bogate PI(3,4,5)P₃ prestanu širiti, a kontinuirana polimerizacija aktina na distalnim rubovima čašice preusmjeri se prema unutrašnjosti sve dok se čašica ne zatvori (Lutton *i sur.*, 2023.).



Slika 2.3. Shema formiranja makropinocitotske čašice u stanicama *D. discoideum*. Regije membrane aktivirane za makropinocitozu bogate PI(3,4,5)P₃ i aktivnim proteinima Ras i Rac na distalne dijelove nastajuće makropinocitotske čašice regrutiraju SCAR koji aktivacijom kompleksa Arp2/3 potiče polimerizaciju dendritičkog aktina i gura membranu prema van stvarajući protruziju. U bazi čašice Ras aktivira formin G koji promovira elongaciju linearnih aktinskih filamenata koji pružaju potporu i stabiliziraju oblik makropinocitotske čašice (prilagođeno prema Buckley i King, 2017.).

2.4. Rano sazrijevanje makropinosoma

Sudbina makropinosoma nakon zatvaranja i internalizacije ovisi o vrsti stanica u kojima se makropinocitoza odvija. Primjerice, većina internaliziranog sadržaja makropinosoma stanica A431 reciklira se natrag na membranu, dok makropinosomi makrofaga i nezrelih dendritičkih stanica prolaze kroz lizosomalnu degradaciju (Lim i Gleeson, 2011.). Tumorske stanice i stanice *D. discoideum* također imaju degradativne makropinosome koji omogućuju da se unešeni sadržaj razgradi na iskoristive hranjive tvari (Buckley i King, 2017.; Recouvreux i Commisso, 2017.).

Ubrzo nakon internalizacije makropinosoma, s njega se odvajaju aktinski filamenti, a makropinosomi se smanjuju zbog gubitka tekućine iz lumena osmozom, što dovodi do ugušćivanja njihova sadržaja (Freeman *i sur.*, 2020.; King i Kay, 2019.; Maniak, 2002.). Potom slijedi zakiseljavanje sadržaja makropinosoma te njihovo spajanje s drugim makropinosomima i ranim endosomima. Ovo sazrijevanje makropinosoma reguliraju GTPaze iz obitelji Rab i fosfoinozitidi regrutacijom efektornih proteina (Egami *i sur.*, 2014.; Vines i King, 2019.). Protein Rab5, etablirani biljeg ranih endosoma, prvi se regrutira na membranu makropinosoma još prije njegova zatvaranja. U stanicama A431, unutarstanične vezikule obogaćene proteinom Rab5 fuzioniraju se s naborima stanične membrane i otvorenim makropinocitotskim čašicama gdje Rab5, preko proteina adaptora APPL1, regrutira 5'-fosfataze Inpp5b i OCRL koje hidroliziraju PI(4,5)P₂ u fosfatidilinozitol 4-fosfat (PI(4)P) (Maxson *i sur.*, 2021.). Time Rab5 doprinosi depleciji PI(4,5)P₂ na membrani koja je ključna za zatvaranje makropinosoma. Fosfolipaza C također doprinosi smanjenju koncentracije PI(4,5)P₂ tako da ga hidrolizira na IP₃ i DAG. Pretpostavlja se da je aktivnost spomenutih fosfataza prostorno ili vremenski odvojena, tj. da je fosfolipaza C aktivna u ranijim fazama formiranja makropinosoma ili u bazi makropinocitotske čašice dok su Inpp5b i OCRL aktivne u kasnijim fazama ili na mjestima zatvaranja makropinosoma (Maxson *i sur.*, 2021.; Welliver i Swanson, 2012.). Iako se o Rab5 u *D. discoideum* zna vrlo malo, kao i u stanicama sisavaca Rab5 je smješten perinuklearno, na ranim endosomima i na staničnoj membrani (Bucci *i sur.*, 1992.; Chavrier *i sur.*, 1990.; Roberts *i sur.*, 2000.; Schnatwinkel *i sur.*, 2004.; Tu *i sur.*, 2022.). Međutim, za ralik u stanica sisavaca, u *D. discoideum* nije opažen porast PI(4,5)P₂ na naborima stanične membrane prije zatvaranja makropinosoma (King i Kay, 2019.). Aktivnost Rab5 važna je i tijekom ranog sazrijevanja makropinosoma. Među brojnim efektorima Rab5 regrutira i aktivira PI3-kinazu klase III Vps34, koja fosforilacijom PI doprinosi povećanju koncentracije PI(3)P na ranom makropinosomu (Buckley i King, 2017.; Christoforidis *i sur.*, 1999b.). PI(3)P, također biljeg ranih endosoma, regrutira svoje efektore putem njihovih domena za vezanje lipida FYVE ili PH, poput kinaze PIKfyve koja kasnije fosforilira PI(3)P u PI(3,5)P₂ (Buckley i King, 2017.; Cabezas *i sur.*, 2006.; Clarke *i sur.*, 2010.; Kim *i sur.*, 2014.).

Konstitutivna makropinocitoza rezultira unosom velike količine stanične membrane u citosol. Kako bi se uz konstantnu makropinocitozu održao integritet stanične membrane, membranski lipidi i proteini stanične membrane moraju se brzo reciklirati s membrane makropinosoma natrag na staničnu membranu, prije no što nastupi zakiseljavanje i proteolitička razgradnja (Buckley *i sur.*, 2016.). Za to su potrebni regulatorni kompleks WASH (engl. *Wiskott–Aldrich and SCAR homologue*) i sortirajući retromerski kompleks koji se regrutiraju

na makropinosom odmah nakon internalizacije i reguliraju recikliranje membranskih proteina u stanicama sisavaca i u stanicama *D. discoideum* (Buckley *i sur.*, 2016.; Seaman *i sur.*, 2013.). Sortirajući retromerski kompleks sastoji se od tri podjedinice Vps (Vps26, Vps29 i Vps35), koje prepoznaju sadržaj za recikliranje te heterodimera sortirajućih neksina (SNX1/SNX2 i SNX5/SNX6), koji potiču stvaranje tubularnih struktura koje se odvajaju od makropinosoma kako bi se njihov sadržaj reciklirao (Bonifacino i Hurley, 2008.). U stanicama sisavaca pokazano je da podjedinica Vps35 retromerskog kompleksa istovremeno veže podjedinicu FAM21 regulatornog kompleksa WASH i kompleks MAGE-L2-TRIM27-Ube20 koji, ubikvitinacijom proteina WASH, oslobađa njegovu domenu VCA te na taj način aktivira WASH (Hao *i sur.*, 2013.). WASH, slično kao i SCAR/WAVE, aktivira kompleks Arp2/3 i potiče lokaliziranu polimerizaciju aktina na endosomima, pa tako i na internaliziranom makropinosomu (Buckley *i sur.*, 2016.; Seaman *i sur.*, 2013.). Kompleks WASH svojom aktivnošću tj. stvaranjem regija bogatih aktinom sekvencira retromerski kompleks u diskretne membranske subdomene te stabilizira tubularne strukture i potiče njihovo odvajanje od makropinosoma (Buckley *i sur.*, 2016.; Seaman *i sur.*, 2013.).

Za razgradnju preostalog koncentriranog sadržaja smanjenih makropinosoma potrebno je zakiseliti lumen i dostaviti odgovarajuće enzime za digestiju. Na membranu makropinosoma vežu se vezikule koje dostavljaju vakuolarne H⁺ ATPaze (V-ATPaze), protonske pumpe koje se vežu na membranu makropinosoma i sudjeluju u zakiseljavanju njegova lumena (Clarke *i sur.*, 2002.). V-ATPaze se sastoje od dva podkompleksa: V₁ je periferni podkompleks i odgovoran je za hidrolizu ATP-a, a V₀ je podkompleks koji se integrira u membranu i omogućuje prijenos protona kroz membranu u lumen endosoma (Clarke *i sur.*, 2002.). Lokalizacija V-ATPaza podudara se s lokalizacijom PI(3)P (Clarke *i sur.*, 2010.).

Na internalizirani makropinosom se nakon Rab5 postepeno regrutiraju GTPaze Rab20 i Rab21 (Egami *i sur.*, 2014.). Faza ranog sazrijevanja završava padom aktivnosti Rab5 i konverzijom makropinosoma obogaćenih s Rab5 i PI(3)P u makropinosome obogaćene biljezima kasnih endosoma Rab7 i PI(3,5)P₂, nakon čega slijedi spajanje makropinosoma s lizosomima (Borchers *i sur.*, 2021.; Langemeyer *i sur.*, 2020.).

2.5. Regulacija proteina Ras

Superobitelj proteina Ras sadrži preko 150 malih GTPaza (engl. *guanosine triphosphatase*) koje se dijele u pet obitelji: Ras, Rho, Rab, Arf i Ran (Colicelli, 2004.; Wennerberg *i sur.*, 2005.). To su evolucijski očuvane, male monomerne GTPaze, koje zajedno sa svojim regulatorima i efektorima, reguliraju signalne puteve brojnih staničnih procesa, pri

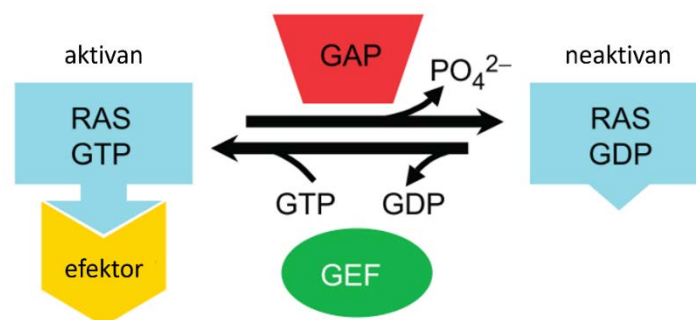
čemu se najviše istražuje uloga proteina iz obitelji Ras u razvoju tumora (Colicelli, 2004.; Cox i Der, 2010.). Tri gena kod ljudi kodiraju četiri proteina Ras koji posjeduju 82 do 90 % identičnosti u aminokiselinskom slijedu: H-Ras, N-Ras i K-Ras koji ima dvije izoforme, K-Ras4A i K-Ras4B (Cox i Der, 2010.). Već je 1982. godine otkriveno da mutirani konstitutivno aktivni Ras potiče rast tumorskih stanica (Der *i sur.*, 1982.). Ubrzo nakon toga pokazalo se da mikroinjektiranje proteina H-Ras u embrionalne fibroblaste štakora potiče nabiranje membrane i makropinocitozu (Bar-Sagi i Feramisco, 1986.). Također, K-Ras, uspješnije nego H-Ras, aktivira Rac čija aktivnost potiče nabiranje membrane, makropinocitozu i stanično kretanje (Walsh i Bar-Sagi, 2001.). Genom protista *D. discoideum* sadrži gene koji kodiraju 14 proteina obitelji Ras, no samo dio ih je istražen od čega je za njih nekoliko pokazano da imaju ulogu u makroendocitozi (Bolourani *i sur.*, 2010.; Chubb *i sur.*, 2000.; Hoeller *i sur.*, 2013.; Junemann *i sur.*, 2016.; Seastone *i sur.*, 1999.; Tuxworth *i sur.*, 1997.; Williams *i sur.*, 2019.). Genetički eksperimenti su pokazali da je RasB važan pozitivan regulator fagocitoze velikih čestica (Junemann *i sur.*, 2016.). Također, RasB je prisutan na makropinosomima, no stanice *rasB⁻* imaju neznatno slabiju efikasnost unosa tekućine te malo usporen rast u tekućoj hranjivoj podlozi u odnosu na stanice divljeg tipa (Junemann *i sur.*, 2016.; Williams *i sur.*, 2019.). RasC pozitivno regulira usmjereno kretanje i agregaciju stanica, a negativno regulira unos tekućine (Lim *i sur.*, 2001., 2005.). RasD je eksprimiran tijekom faze višestaničnog razvoja, a genetički eksperimenti su pokazali da je važan za fototaksiju i termotaksiju višestaničnog puža, ali i da prekomjerna ekspresija RasD može poništiti citokinetski defekt i defekt rasta vegetativnih stanica *rasG⁻* (Bolourani *i sur.*, 2010.; Wilkins *i sur.*, 2000.). RapA je važan pozitivan regulator stanične adhezije i pokretljivosti te pozitivno regulira fagocitozu, a negativno makropinocitozu (Jeon *i sur.*, 2007.; Seastone *i sur.*, 1999.). Za razliku od RapA, RapC je negativan regulator adhezije i pružanja stanica po podlozi, a uključen je i u regulaciju citokineze i višestaničnog razvoja (Park *i sur.*, 2018.). Već je spomenuto da RasG i RasS imaju ključnu ulogu u makropinocitozi. Delecija gena *rasG* i *rasS* uzrokuju usporen rast u tekućoj hranjivoj podlozi te smanjenu efikasnost makropinocitoze i fagocitoze, a delecija oba gena uzrokuje drastično smanjenu efikasnost makropinocitoze i smanjeno formiranje regija bogatih fosfolipidom PI(3,4,5)P₃ (Bolourani *i sur.*, 2010.; Chubb *i sur.*, 2000.; Hoeller *i sur.*, 2013.; Tuxworth *i sur.*, 1997.; Williams *i sur.*, 2019.). Stanice *rasG⁻* imaju i defekte u citokinezi i kretanju (Tuxworth *i sur.*, 1997.). Protein RasG najsličniji je ljudskim proteinima iz obitelji Ras. RasG je 71 % identičan proteinu K-Ras i 68 % proteinu H-Ras te je najjače eksprimiran protein iz obitelji Ras u vegetativnim stanicama *D. discoideum* (Robbins *i sur.*, 1989.; Tuxworth *i sur.*, 1997.).

Male GTPaze iz superobitelji Ras reguliraju brojne procese na staničnim membranama. Novosintetizirani proteini Ras su topivi citosolni proteini koji prolaze postranlacijsku lipidaciju kako bi se mogli umetnuti u staničnu membranu (Cox i Der, 2010.). Nascentni proteini iz obitelji Ras i Rho na C-kraju imaju motiv CAAX, tetrapeptid sastavljen od cisteina (C), dvije alifatske aminokiseline (A) i bilo koje aminokiseline (X) (Wennerberg *i sur.*, 2005.). Motiv CAAX prepoznaju prenil-transferaze koje kataliziraju dodatak farnezil- ili geranilgeranil-izoprenoida na cisteinski ostatak (Wennerberg *i sur.*, 2005.). Te prenilacije omogućuju umetanje proteina iz obitelji Ras i Rho u membranu endoplazmatskog retikuluma gdje se provode dodatne modifikacije: proteolitičko odcjepljivanje motiva AAX i karboksimetilacija terminalnog preniliranog cisteina (Ahearn *i sur.*, 2012.; Cox i Der, 2010.). Kako bi proteini iz obitelji Ras i Rho mogli biti stabilno povezani sa staničnom membranom, potreban je dodatni signal u vidu acilacije, a to je najčešće palmitoilacija cisteinskih ostataka uzvodno od karboksimetiliranog cisteina (npr. H-Ras, N-Ras, K-RasA, RhoB, TC10) (Ahearn *i sur.*, 2012.; Wennerberg i Der, 2004.). Drugi proteini iz obitelji Ras i Rho ne prolaze acilaciju (npr. K-RasB, RhoA, Cdc42), već sadrže polibazičnu regiju bogatu lizinima koja im omogućuje vezanje na membranu formiranjem elektrostatskih interakcija s negativno nabijenim polarnim „glavama“ fosfolipida na unutarnjoj strani stanične membrane (Ahearn *i sur.*, 2012.; Wennerberg i Der, 2004.). Nascentni proteini iz obitelji Rab imaju različite motive na C-kraju, poput CC, CCN, CNC, CCNN i CCNNN. Njih veže protein REP (engl. *Rab escort protein*) i omogućuje geranilgeranil transferazi II prepoznavanje C-kraja proteina Rab. Ovisno o C-terminalnom motivu određenog proteina Rab, geranilgeranil transferaza II dodaje jednu ili dvije geranilgeranil skupine na C-kraj, nakon čega Rab vezan s proteinom REP dolazi na ciljnu membranu gdje se REP odvaja od proteina Rab (Shinde i Maddika, 2018.).

Proteini obitelji Ras imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, stanične proliferacije, diferencijacije, apoptoze i adhezije (Cox i Der, 2010.; Wennerberg *i sur.*, 2005.). Proteini obitelji Rho reguliraju ekspresiju gena, stanični ciklus i organizaciju aktina važnu za staničnu pokretljivost, adheziju stanica i endocitozu (Heasman i Ridley, 2008.). Proteini obitelji Rab važni su regulatori endocitoze, vezikularnog transporta i transporta proteina (Grosshans *i sur.*, 2006.; Wandinger-Ness i Zerial, 2014.). Proteini obitelji Arf također su važni u regulaciji vezikularnog transporta, endocitoze i egzocitoze, metabolizma lipida, stanične pokretljivosti, diobe i apoptoze (Donaldson i Jackson, 2011.; Sztul *i sur.*, 2019.) Protein Ran važan je za transport RNA i proteina između jezgre i citoplazme, te regulira organizaciju diobenog vretena i udvostručivanje DNA (Boudhraa *i sur.*, 2020.; Li *i sur.*, 2003.). S obzirom na važnu ulogu malih GTPaza u brojnim staničnim procesima, njihova aktivnost mora biti strogo kontrolirana

(Cox i Der, 2010.; Milburn *i sur.*, 1990.; Vetter i Wittinghofer, 2001.). Male GTPaze superobitelji Ras u aktivnom obliku vezanom na GTP, imaju velik afinitet za vezanje efektorskih proteina i potiču nizvodnu signalizaciju. Hidrolizom vezanog GTP-a u gvanozin-difosfat (GDP) dolazi do konformacijskih promjena u regijama *switch I* i *II* zbog čega GTPaze gube afinitet za vezanje efektor i prelaze u neaktivan oblik vezan na GDP (Milburn *i sur.*, 1990.; Vetter i Wittinghofer, 2001.). Prijelaz između ovih stanja reguliraju proteini GEF i GAP (Slika 2.4.). Proteini GEF kataliziraju otpuštanje vezanog GDP-a te time omogućuju vezanje GTP-a i aktivaciju GTPaze. Iako GTPaze iz superobitelji Ras posjeduju intrinzičnu aktivnost hidrolize GTP-a, ona je kod većine članova te superobitelji vrlo slaba (Colicelli, 2004.). Stoga proteini GAP potpomažu hidrolizu GTP-a u GDP i deaktivaciju GTPaza Ras (Hennig *i sur.*, 2015.). Uz proteine GEF i GAP, GTPaze obitelji Rho i Rab dodatno reguliraju i proteini GDI (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) koji se vežu na neaktivne GTPaze i u tom obliku ih održavaju u citosolu (Garcia-Mata *i sur.*, 2011.; Seabra i Wasmeier, 2004.). Proteine obitelji Rab dodatno reguliraju još i proteini GDF (engl. *GDI displacement factors*) koji promoviraju odvajanje proteina GDI od GTPaza Rab i potiču njihovu regrutaciju na membranu, nakon čega slijedi aktivacija GTPaza posredovana proteinima GEF (Collins, 2003.).

Proteini iz obitelji Ras mutirani su u trećini svih humanih tumora (Li *i sur.*, 2018a.). Najčešće su točkaste mutacije kodona 12, 13 i 61 koje onemogućuju intrinzičnu aktivnost hidrolize GTP-a proteina Ras, kao i onu potpomognutu proteinima GAP, što rezultira njihovom kontinuiranom aktivnošću (Cox i Der, 2010.; Li *i sur.*, 2018a.). Prekomjerna aktivnost proteina iz obitelji Ras, osim nekontroliranog staničnog rasta i proliferacije, potiče i makropinocitozu za unos nutrijenata kako bi se podržao rast tumora (Recouvreux i Commisso, 2017.).



Slika 2.4. Shema regulacije aktivnosti GTPaze Ras. U aktivnom obliku vezanom na GTP GTPaza Ras veže efektorske proteine i omogućuje nizvodni prijenos signala. Proteini GAP potiču hidrolizu GTP-a u GDP i prevode GTPaze Ras u neaktivan oblik vezan na GDP. Proteini GEF potiču otpuštanje GDP-a te posljedično omogućuju vezanje GTP-a i aktiviraju GTPazu Ras (prilagođeno prema Colicelli, 2004.).

2.5.1. Proteini RasGAP

Proteini GAP specifični za GTPaze iz obitelji Ras (RasGAP) važni su za pravovremenu deaktivaciju proteina Ras odnosno dokidanje signalizacije odgovarajućih signalnih puteva. Proteini RasGAP su modularni proteini koje karakterizira katalitička domena RasGAP okružena manjim domenama koje su često uključene u određivanje unutarstanične lokalizacije i doprinose regulatornim karakteristikama proteina (Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.). Domena RasGAP odgovorna je za poticanje hidrolize GTP-a na aktivnom proteinu Ras (Scheffzek *i sur.*, 1997.). Za katalitičku aktivnost domene važan je očuvan argininski ostatak (R789 u humanom p120^{GAP}/RASA1, R1276 u NF1) tzv. argininski prst i aminokiselinski ostaci motiva FLR koji stabiliziraju argininski prst (Scheffzek *i sur.*, 1997.; Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.).

Humani genom kodira 14 proteina koji sadrže domenu RasGAP koji se dijele u šest grupa (Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.). Prve četiri grupe obuhvaćaju proteine s katalitički aktivnom domenom RasGAP koja regulira aktivnost GTPaza Ras. Prvu grupu čini jedan od najbolje istraženih proteina RasGAP kod čovjeka, p120^{GAP}/RASA1 (Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.). Mišji embrionalni fibroblasti deficijentni za p120^{GAP}/RASA1 pokazuju pojačanu aktivaciju signalnog puta Ras/MAPK u odgovoru na stimulaciju faktorima rasta praćenu blagim porastom stanične proliferacije (Koehler i Moran, 2001.). U drugu grupu spada već spomenuti neurofibromin 1 kojeg kodira gen za tumorski supresor *NF1* (Ballester *i sur.*, 1990.; Xu *i sur.*, 1990.). Mutacije koje uzrokuju gubitak funkcije NF1 uzrokuju neurofibromatozu tipa 1 koju karakteriziraju tumori središnjeg i perifernog živčanog sustava (Xu *i sur.*, 1990.). Istraživanja su pokazala da u stanicama raka, poput melanoma i raka dojke, također dolazi do mutacija *NF1* koje uzrokuju pretjeranu aktivaciju proteina Ras (Xia *i sur.*, 2014.). Obitelji proteina GAP1 i SynGAP čine treću i četvrtu grupu proteina RasGAP, ali za razliku od do sada spomenutih proteina RasGAP, ovi članovi uz Ras potiču i hidrolizu GTP-a na proteinima Rap (Hennig *i sur.*, 2015.; Pena *i sur.*, 2008.; Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.; Sot *i sur.*, 2010.). U petu grupu spadaju pleksini, transmembranski receptori koji vežu semaforine i sudjeluju u navođenju aksona tijekom neuronalnog razvoja, a njihova unutarstanična domena posjeduje aktivnost GAP samo prema proteinima Rap (Wang *i sur.*, 2012.). Šestu grupu čine proteini IQGAP koji vežu GTPaze iz obitelji Rho i čija domena RasGAP nema katalitičku aktivnost (vidi poglavlje 2.5.2.; Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.).

Stanice *D. discoideum* imaju 16 proteina koji sadrže domenu RasGAP (Xu *i sur.*, 2017., i IqgD). Kao i kod sisavaca, među njih spadaju i četiri proteina srodna proteinima IQGAP, od kojih je do sada za DGAP1 i GAPA pokazano da je njihova domena RasGAP katalički neaktivna (vidi poglavlje 2.5.2.). Od ostalih proteina RasGAP do sada ih je istraženo šest: NfaA

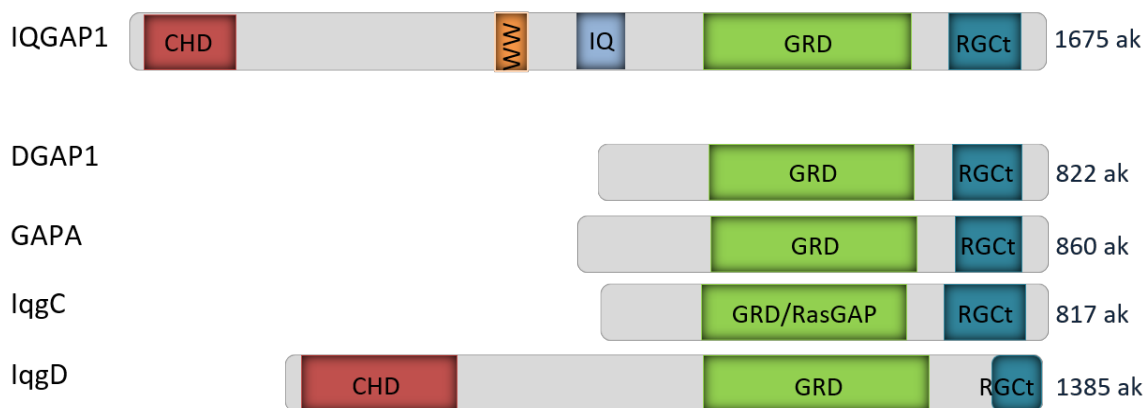
(Zhang *i sur.*, 2008.), NF1 (Bloomfield *i sur.*, 2015.), C2GAP1 (Xu *i sur.*, 2017.), C2GAP2 (Li *i sur.*, 2018b.; Xu *i sur.*, 2022.), IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.) i RGBARG (Buckley *i sur.*, 2020.). Od toga su četiri proteina uključena u regulaciju makroendocitoze: NF1 (vidi poglavlje 2.2.), IqgC (vidi poglavlje 2.5.2.1.), C2GAP2 i RGBARG. Objavljena istraživanja proteina C2GAP2, koji je u literaturi naveden i kao RasGAP2, dala su nekonzistentne rezultate po pitanju njegove uloge u regulaciji makroendocitoze (vidi poglavlje 5.1.; Li *i sur.*, 2018b.; Xu *i sur.*, 2022.). Protein RGBARG je bitan za efikasnu makroendocitozu jer ograničava veličinu i regulira oblik makroendocitotskih čašica (Buckley *i sur.*, 2020.). NfaA i C2GAP1 sudjeluju u regulaciji kemotaksije stanica putem regulacije aktivnosti proteina RasG, RasB i RasC (Xu *i sur.*, 2017.; Zhang *i sur.*, 2008.). Osim toga, NfaA je uključen i u regulaciju stanične diobe (Zhang *i sur.*, 2008.).

2.5.2. Proteini obitelji IQGAP i njima srodni proteini u stanicama *D. discoideum*

Osim proteina RasGAP u stanicama sisavaca postoje i proteini IQGAP koji, uz ponavljajuće motive IQ, imaju domenu koja posjeduje značajnu homologiju s domenom RasGAP (Shannon, 2012.). Međutim, ta domena, nazvana GRD (engl. *GAP-related domain*), nema katalitičku aktivnost poput domene proteina RasGAP, te stoga proteini iz obitelji IQGAP ne stimuliraju hidrolizu GTP-a na GTPazama iz obitelji Ras (Hart *i sur.*, 1996.; Weissbach *i sur.*, 1994.). Štoviše, proteini obitelji IQGAP u pravilu ne vežu GTPaze iz obitelji Ras već interagiraju s GTPazama iz obitelji Rho (Brill *i sur.*, 1996.; Hart *i sur.*, 1996.). IQGAP su veliki proteini koji, uz domene IQ i GRD, sadrže i dodatne domene, koje im omogućuju istovremenu interakciju s više veznih partnera (Fukata *i sur.*, 1997.; Hart *i sur.*, 1996.; Peng *i sur.*, 2021.; Roy *i sur.*, 2005.; Weissbach *i sur.*, 1994.). Stoga proteini iz obitelji IQGAP u stanici djeluju kao okosnice multimolekularnih kompleksa i integriraju različite signalne puteve (Shannon, 2012.). Kod čovjeka su prisutna tri proteina iz obitelji IQGAP: IQGAP1, IQGAP2 i IQGAP3, od kojih je najviše istražen IQGAP1. Od N- prema C-kraju proteina, svi sadrže domenu CHD (engl. *calponin homology domain*) koja se veže na aktinske filamente, specifična ponavljanja odgovorna za dimerizaciju, motiv WW, motive IQ za vezanje proteina koji vežu kalcij, domenu GRD koja veže GTPaze Rho, Rac1 i Cdc42, te domenu RGCt (engl. *Ras-GAP C-terminus*) specifičnu za proteine IQGAP (van Dam *i sur.*, 2011.; Shannon, 2012.). IQGAP1 ima više od 150 otkrivenih interaktora i sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih procesa poput ekspresije gena, stanične proliferacije, citokineze, dinamike aktinskog citoskeleta, stanične polarizacije, usmjerene migracije, endocitoze i transporta vezikula (Hedman *i sur.*, 2015.; Thines *i sur.*,

2023.). IQGAP1 može i modulirati signalizaciju malih GTPaza stabiliziranjem njihovog aktivnog oblika ili regrutiranjem njihovih regulatora (Peng *i sur.*, 2021.; Thines *i sur.*, 2023.).

D. discoideum ima 4 proteina srodna proteinima IQGAP: DGAP1/DdIQGAP1, GAPA/DdIQGAP2, IqgC/DdIQGAP3 i IqgD/DdIQGAP4 (Slika 2.5.) (Friedberg i Rivero, 2010.; Shannon, 2012.). Proteini DGAP1 i GAPA tipični su predstavnici obitelji IQGAP, nemaju aktivnost GAP, vežu GTPaze iz obitelji Rho i sudjeluju u regulaciji aktinskog citoskeleta (Adachi *i sur.*, 1997.; Faix *i sur.*, 1998., 2001.; Mondal *i sur.*, 2010.). Zanimljivo je da delecija gena *dgap1* uzorkuje povišenu razinu filamentoznog aktina u stanicama, dok delecija gena *gapA* snižava razinu filamentoznog aktina (Faix *i sur.*, 1998.; Mondal *i sur.*, 2010.). DGAP1 i GAPA lokalizirani su u stražnjem dijelu korteksa polariziranih vegetativnih stanica i u diobenoj brazdi tijekom citokineze (Faix *i sur.*, 2001.; Filić *i sur.*, 2012.; Mondal *i sur.*, 2010.). Aktivna GTPaza Rac1A veže DGAP1 i potiče formiranje tetramernih kompleksa s korteksilinima I, II ili III koji usnopljuju aktinske filamente i organiziraju ih u mreže (Faix *i sur.*, 2001.; Liu *i sur.*, 2014.). Pokazano je i da protein GAPA veže Rac1 i može potaknuti formiranje takvih tetramernih kompleksa koji su važni za formiranje funkcionalne diobene brazde tijekom citokineze (Faix *i sur.*, 2001.). Oba proteina sudjeluju u usmjerenom kretanju stanica. Delecija gena *dgap1* ili *gapA* uzrokuje smanjeno suprimiranje lateralnih pseudopodija, a delecija oba gena uzrokuje značajno smanjenje brzine kretanja te smanjenu polarnost i usmjerenost stanica (Lee *i sur.*, 2010.). No, DGAP1 i GAPA imaju različite efekte na staničnu diobu. Delecija *gapA* rezultira nastankom višejezgrenih stanica jer se stanice kćeri u posljednjoj fazi citokineze ne mogu razdvojiti (Adachi *i sur.*, 1997.). S druge strane, prekomjerna ekspresija DGAP1 u stanicama također dovodi do defekta u citokinezi i nastanka višejezgrenih stanica (Faix i Dittrich, 1996.). Zanimljivo je da delecija oba gena, *dgap1* i *gapA*, rezultira još izraženijim citokinetskim defektom nego onim opaženim u stanicama *gapA*⁻, nastankom izuzetno velikih, višejezgrenih stanica jer korteksilini više nisu smješteni u diobenoj brazdi (Faix *i sur.*, 2001.). Funkcije proteina IqgD za sada još nisu istražene.



Slika 2.5. Shematski prikaz humanog proteina IQGAP1 i *D. discoideum* proteina srodnih proteinima IQGAP. IQGAP1 je veliki protein koji sadrži domenu CHD, motive WW i domene IQ, GRD i RGCT. *D. discoideum* proteini su kraći i imaju samo domene GRD i RGCT te slabo očuvane motive IQ. Samo je protein IqgD duži i ima dvije domene CHD na N-kraju. IQGAP1, DGAP1 i GAPA imaju GRD koja nije katalitički aktivna i veže GTPaze Rho, dok je GRD proteina IqgC katalitički aktivna i veže RasG. Za GRD proteina IqgD još nije istraženo ima li aktivnost RasGAP.

2.5.2.1. Protein IqgC

Protein IqgC prema aminokiselinskom slijedu ubrajamo u proteine srodne proteinima IQGAP u amebi *D. discoideum*. Međutim, Marinović *i sur.*, 2019. su pokazali da je IqgC funkcionalni RasGAP koji specifično veže i regulira aktivnost GTPaze RasG. Njegova domena GRD pokazuje aktivnost GAP jer, kao i ostali proteini RasGAP, ima očuvan argininski prst i djelomično očuvan motiv FLR koji su dostatni za katalitičku aktivnost (Marinović *i sur.*, 2019.; Scheffzek *i sur.*, 1997.). IqgC posjeduje aktivnost GAP *in vitro* prema RasG kao i prema ljudskoj GTPazi H-Ras. Za razliku od proteina DGAP1 i GAPA, IqgC ne veže GTPaze iz obitelji Rho i ne nalazi se u stražnjim retraktivnim strukturama staničnog korteksa. IqgC je obogaćen na membrani nastajućih makropinocitotskih i fagocitotskih čašica gdje je kolokaliziran s probom za aktivni Ras, te se zadržava na internaliziranom makropinosomu nakon deaktivacije proteina Ras (Marinović *i sur.*, 2019.). Delecija gena *iqgC* u akseničnom soju AX2 ne utječe na rast stanica u suspenziji (Marinović *i sur.*, 2019.). Iako je IqgC snažnije lokaliziran na makropinosomima nego na fagosomima, stanice *iqgC*⁻ pokazuju značajno poboljšanje fagocitoze velikih čestica, dok je povećanje efikasnosti makropinocitoze znatno manje. Do blagog pojačanja makropinocitoze u stanicama *iqgC*⁻ dolazi zato jer te stanice stvaraju nešto veće makropinosome u odnosu na stanice divljeg tipa.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA

Za tehnike rekombinantne DNA korišteni su komercijalni kompleti navedeni u Tablici 3.1., enzimi u Tablici 3.2., vektori u Tablici 3.3. i početnice u Tablici 3.4.

Tablica 3.1. Korišteni komercijalni kompleti

Komercijalni kompleti	Upotreba
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> (Qiagen)	izolacija plazmidne DNA
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i> (Qiagen)	pročišćavanje PCR ¹ -produkata
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> (Qiagen)	pročišćavanje odsječaka DNA iz gela
<i>In-Fusion® HD Cloning Kit</i> (Takara Bio)	kloniranje neovisno o restrikciji
<i>Change-IT™ Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit</i> (Affymetrix)	mjesno-specifična mutageneza
<i>Q5 site-directed mutagenesis kit</i> (NEB)	mjesno-specifična mutageneza
<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i> (Roche)	obilježavanje probe za analizu Southern digoksinom

Tablica 3.2. Korišteni enzimi

Enzimi	Upotreba
polimeraza <i>Phusion High-Fidelity DNA</i> (NEB)	PCR
polimeraza <i>GoTaq G2</i> (Promega)	PCR
restrikcijske endonukleaze BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, NcoI, NgoMIV, PacI, Sall, SpeI, XbaI (NEB)	priprema ljepljivih krajeva vektora i inserata
alkalna fosfataza CIAP ² (Invitrogen)	defosforilacija lineariziranog vektora
DNA ligaza T4 (Invitrogen)	ligacija odsječaka DNA u linearizirani vektor

Tablica 3.3. Korišteni vektori

Korišteni vektori	Izrada
<i>Isključivanje gena iqqC homolognom rekombinacijom i stvaranje stanica iqqC</i>	
pDM1081_iquC_KO	ovaj rad
<i>Ekspresija proteina u stanicama D. discoideum</i>	
pDM1208_IqqC	ovaj rad

¹ lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

² engl. *calf intestinal alkaline phosphatase*

pDM1207_mRaf1_RBD	naš laboratorij
pDM1019_mRaf1_RBD	ovaj rad
pDM1208_IqgC_GFP-mRaf1_RBD	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pDM304_YFP-IqgC(R205A)	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC(L352G, R353A)	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC(N392A)	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_N-GRD	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_GRD	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_RGcT-C	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_RGcT	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_Δcentr	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_ΔGRD	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_ΔRGcT	ovaj rad
pDM304_YFP-RasG	Junemann <i>i sur.</i> , 2016.
pDM304_YFP-Rab5A	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab21	ovaj rad
pDM304_YFP-VatC	ovaj rad
pDM304_YFP-VatE	ovaj rad
pDM328_Rab5A	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A	ovaj rad
pDM323_golvesin(Δ76-118)	Weber <i>i sur.</i> , 2018.
pDM304_YFP-IqgC_mRFP-mRaf1_RBD	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pDM323_golvesin(Δ76-118)_mRFP-Rab5A	ovaj rad
pDM328_mRaf1_RBD	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pDM304_YFP-Rab5A_mRFP-mRaf1_RBD	ovaj rad
pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A(Y71A)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(S23N)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(F46A)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(W63A)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(R70E)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(Y71A)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(M77S)	ovaj rad
pDM304_YFP-Rab5A(R80E)	ovaj rad
pDM304_YFP-mRaf1_RBD	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pDM304_YFP-mRaf1_RBD_mRFP-Rab5A	ovaj rad
<i>Ekspresija proteina za sustav dva hibrida u kvascu</i>	
pGBKT7_RasG(Q61L)	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pGADT7_IqgC	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pGADT7_IqgC(R205A)	ovaj rad
pGADT7_IqgC(L352G, R353A)	ovaj rad
pGADT7_IqgC(N392A)	ovaj rad
pGADT7_IqgC_GRD	naš laboratorij
pGADT7_IqgC_RGcT	naš laboratorij
pGBKT7_Rab5A(wt)	ovaj rad
pGBKT7_Rab5A(Q68L)	ovaj rad
pGBKT7_Rab5A(S23N)	ovaj rad

Pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavcima GST i His

pGEX-6P-1_Rab5A(wt)	naš laboratorij
pGEX-6P-1_IqgC	Marinović <i>i sur.</i> , 2019.
pET28b_Rab5A(wt)	ovaj rad
pET28b_Rab5A(Q68L)	ovaj rad
pET28b_Rab5A(S23N)	ovaj rad
pGEX-6P-1_IqgC_GRD	naš laboratorij
pGEX-6P-1_IqgC_RGct	naš laboratorij
pGEX-6P-1_RasG(wt)	Faix <i>i sur.</i> , 1998.
pGEX-4T-1_EEA1 ⁽¹⁻²⁰⁹⁾	Tu <i>i sur.</i> , 2022.

Tablica 3.4. Korištene početnice

Konstrukt	Počelnica	Sekvenca 5'→3'
<i>Isključivanje gena iqqC homolognom rekombinacijom</i>		
<i>iqgC</i> -3'-fr	IqgC_3'-BglII-F1	ATTAGATCTCAAGAGGAATTCAAAGAGGC
	IqgC_3'-SpeI-R1	ATTACTAGTCATTTAAACGATCCTTGTTCC
<i>iqgC</i> -5'-fr	IqgC_5'-NgoMIV-F1	ATTGCCGCGCCGATTGTAGTTGTAGCAAAGG
	IqgC_5'-HindIII-R1	TCCAAGCTTCTGGTGAATTTTGTGCTTGAC
PCR za probir stanica <i>iqgC</i>	HygR_for_seq3	ACTCGTCCGGATCGGGAG
	IqgC_D1	GGAATCCCTCACTGACGTAG
proba Hyg za analizu Southern	HygR_probe-F1	GCTTTCAGCTTCGATGTAGGAG
	HygR_probe-R1	CCAGTCAATGACCGCTGTTATG
proba R za analizu Southern	R_probe-F1	TAGGTGGTTCAGTTGGTGGT
	R_probe-R1	CCAGTTGCTTTATCAGTGGAA
<i>Konstruiranje skraćениh varijanti proteina IqgC za ekspresiju u stanicama D. discoideum</i>		
IqgC_N-GRD	IqgC_BglII-F1	AATAGATCTATGTCAAATTTAAATATAAAT AGTCA
	IqgC_N_SpeI-R1	AATACTAGTTT TAGAAACGATTTGTGAGTTT
IqgC_GRD	IqgC_N_BglII-F1	AATAGATCTGATCATTATGGACAATTATT
	IqgC_N_SpeI-R1	AATACTAGTTT TAGAAACGATTTGTGAGTTT
IqgC_RGct-C	IqgC_C_BglII-F1	AATAGATCTGTAGATAACATTA AAAAAGAT ATT
	IqgC_SpeI-R1	AATACTAGTTTATGAAATAAATGTTTTATT TAAAAC
IqgC_RGct	IqgC_C_BglII-F1	AATAGATCTGTAGATAACATTA AAAAAGAT ATT
	IqgC_C_SpeI-R1	AATACTAGTTTATCTATCTTCTGGTACTT
IqgC_Δcentr	IqgC_1-510_598- 817_oligo1-F1	TACAAATCCGGACTCAGATCTATGTCAAAT TTAAATATAAATAGTC
	IqgC_1-510_598- 817_oligo2-R1	TGTTATCTACGAAACGATTTGTGAGTTTC
	IqgC_1-510_598- 817_oligo3-F2	AAATCGTTTCGTAGATAACATTA AAAAAGAT ATTGG

	IqgC_1-510_598-817_oligo4-R2	TAATTTATTTATTTAACTAGTTTATGAAATA AATGTTTTATTTAAA
IqgC_ΔGRD	IqgC_1-129_511-817_oligo1-F1 IqgC_1-129_511-817_oligo2-R1 IqgC_1-129_511-817_oligo3-F2 IqgC_1-129_511-817_oligo4-R2	TACAAATCCGGACTCAGATCTATGTCAAAT TTAAATATAAATAGTC GATCGGCAGCCCTTTGTGATTTATCCTTC ATCACAAAGGGCTGCCGATCATCATAAT TAATTTATTTATTTAACTAGTTTATGAAATA AATGTTTTATTTAAA
IqgC_ΔRGct	IqgC_1-597_748-817_oligo1-F1 IqgC_1-597_748-817_oligo2-R1 IqgC_1-597_748-817_oligo3-F2 IqgC_1-597_748-817_oligo4-R2	TACAAATCCGGACTCAGATCTATGTCAAAT TTAAATATAAATAGTC TGTTTGATCTAATATCTTGATTCTTATTGAG TG TCAAGATATTAGATCAAACATATTCTTCTC T TAATTTATTTATTTAACTAGTTTATGAAATA AATGTTTTATTTAAA
<i>Mutageneza proteina IqgC</i>		
IqgC(wt) u IqgC(R205A)	IqgC_R205A-F2 IqgC_R205A-R2	TTCAGTGTAGCTGCCAACACAGCATTGAC AC CCAATGGATGTTGCCTCTTTG
IqgC(wt) u IqgC(L352G, R353A)	IqgC_LR-GA_part-F2 IqgC_LR_352-353_GA-F1 IqgC_LR_352-353_GA-R1	TTTCTTCCTCCGTCCTTATATTAATCCC TTTCTTCCTCGGTGCTTATATTAATCCCGCC GTTGTC CCACCTATTAACCACAAG
IqgC(wt) u IqgC(N392A)	IqgC_N392A-F1 IqgC_N392A-R1	AAACCTTGCAGCTAATATCATGTTTGGTGG TGAAGCATTTTAGCGGGA
<i>Ekspresija proteina u stanicama D. discoideum</i>		
Rab5A	Rab5A_BamHI-F2 Rab5A_SpeI-R2	AATGGATCCATGAATAATAATAAATAAGAT ATTTTC AATACTAGTTTAGTTACAACATTTGTTTTTC
Rab21	Rab21_BamHI_F2 Rab21_SpeI_R2	AATGGATCCATGACAGATACTGAAAAAAG AATACTAGTTTAATTTGAACAACAACCTGG
VatC	VatC_BglIII_F1 VatC_SpeI_R1	AATAGATCTATGTCAGAAACACAAGAATTT TG AATACTAGTTTAATTTTCCCAATTCACTGA AAC
VatE	VatE_BglIII_F1 VatE_XbaI_R1	AATAGATCTATGGATGACACTCAAGTAAA C AATTCTAGATTAATCAAAGAATTTACGACT AGTAC

<i>Ekspresija rekombinantnog proteina Rab5A u kvascu</i>		
Rab5A_ΔCCN	Rab5A_Y2H_EcoRI_F1	AATGAATTCATGAATAATAATAAAGATA TTT
	Rab5A_Y2H_SalI_R1	AATGTCGACTTATTTGTTTTTCTTTCCAGT
<i>Mutageneza proteina Rab5A za sustav dva hibrida u kvascu</i>		
Rab5A(wt) u Rab5A(Q68L)	Rab5A_Q68L_F	GAAATTTGGGATACAGCTGGTCTAGAACGT TATCATAC
	Amp_REV_Primer	PO ₄ GTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA TCACTCATGG
Rab5A(wt) u Rab5A(S23N)	Rab5A_S23N_F1	CGTAGGCAAAAATTCTTTAGTATTG
	Rab5A_S23N_R1	GCTGCTTCGCCCAATAAT
<i>Ekspresija rekombinantnog proteina Rab5A obilježenog nastavkom His</i>		
Rab5A_ΔCCN	Rab5A_NcoI-F1	ATACCATGGTTATGAATAATAATAAGA TATTC
	Rab5A_delCCN_Hind III-R1	TATAAGCTTTTTGTTTTTCTTTCCAGTG
<i>Mutageneza proteina Rab5A</i>		
Rab5A(wt) u Rab5A(Q68L)	Rab5A_Q68L-F1	TACAGCTGGTCTAGAACGTTATC
	Rab5A_Q68L-R1	TCCCAAATTTCAAATTTAACTG
Rab5A(wt) u Rab5A(S23N)	Rab5A_S23N-F1	CGTAGGCAAAAATTCTTTAGTATTG
	Rab5A_S23N-R1	GCTGCTTCGCCCAATAAT
Rab5A(wt) u Rab5A(F46A)	Rab5A_F46A-F1	AGGTGCTGCAGCTTTAGCACAAAC
	Rab5A_F46A-R1	ATAGTACTTTCTTGATAATCTAAAAAG
Rab5A(wt) u Rab5A(W63A)	Rab5A_W63A-F1	ATTTGAAATTGCGGATACAGCTGGTC
	Rab5A_W63A-R1	TTAACTGTAGTATCATTTAAACAAAC
Rab5A(wt) u Rab5A(R70E)	Rab5A_R70E-F1	TGGTCAAGAAGAATATCATACATTAGCACC AATG
	Rab5A_R70E-R1	GCTGTATCCCAAATTTCAAATTTAAC
Rab5A(wt) u Rab5A(Y71A)	Rab5A_Y71A-F1	TCAAGAACGTGCTCATACATTAGCAC
	Rab5A_Y71A-R1	CCAGCTGTATCCCAAATTTTC
Rab5A(wt) u Rab5A(M77S)	Rab5A_M77S-F1	ATTAGCACCAAGCTATTATCGTGGTGC
	Rab5A_M77S-R1	GTATGATAACGTTCTTGAC
Rab5A(wt) u Rab5A(R80E)	Rab5A_R80E -F1	AATGTATTATGAAGGTGCACAAGCAG
	Rab5A_R80E-R1	GGTGCTAATGTATGATAAC

DNA-standardi:

100 pb DNA-standard (NEB), 1 kb DNA-standard (NEB), DNA bakteriofaga λ (Fermentas) porezana enzimom HindIII, DNA bakteriofaga λ (Fermentas) porezana enzimima EcoRI i HindIII, DIG-obilježen DNA-standard II (Roche)

Boja za nanošenje uzoraka DNA na gel, 10x

2,5 g/l ksilen-cijanol
2,5 g/l bromfenol plavo
0,625 % SDS³ (Roth)
62,5 % glicerol (Kemika)

Pufer TAE, 50x, pH 8,5

242 g/l Tris-baza (Roth)
57,1 ml/l octena kiselina (Kemika)
50 mM EDTA⁴ (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj i transformaciju bakterija

3.1.2.1. Korišteni bakterijski sojevi

E. coli, soj DH5 α , elektrokompetentne bakterije priređene u našem laboratoriju
E. coli, soj NEB 10-beta (NEB), derivat soja DH10B, kemijski kompetentne bakterije visoke transformacijske efikasnosti prikladne za kloniranje velikih vektora
E. coli, soj XL10-Gold (Agilent Technologies), kemijski ultrakompetentne bakterije visoke transformacijske efikasnosti prikladne za kloniranje velikih vektora
E. coli, soj Rosetta 2 (Novagen), derivat soja BL21 dizajniran za povećanu ekspresiju eukariotskih proteina u *E. coli*, rezistentan na kloramfenikol, priređene u našem laboratoriju
Klebsiella aerogenes, izvor hrane za divlji soj DdB stanica *D. discoideum*

3.1.2.2. Hranjive podloge i antibiotici

Hranjiva podloga LB (Luria-Bertani)

5 g/l ekstrakt kvasca (Biolife)
10 g/l tripton (Biolife)
5 g/l NaCl

³ natrijev dodecil-sulfat

⁴ etilendiamintetraoctena kiselina

*15 g/l agar (Roth) za krutu hranjivu podlogu

Obogaćena hranjiva podloga LB

8 g/l ekstrakt kvasca

16 g/l tripton

5 g/l NaCl

5 mM K-fosfatni pufer, pH 7,3

Hranjiva podloga SM

10 g/l pepton (Biolife)

10 g/l glukoza (Roth)

1 g/l ekstrakt kvasca

1 g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Kemika)

2,2 g/l KH₂PO₄ (Kemika)

1 g/l K₂HPO₄ (Kemika)

*15 g/l agar za krutu hranjivu podlogu

Hranjiva podloga SOC

5 g/l ekstrakt kvasca

20 g/l tripton

10 mM NaCl

10 mM MgCl₂ x 6 H₂O (Kemika)

2,5 mM KCl (Kemika)

20 mM MgSO₄ x 7 H₂O

20 mM glukoza

Hranjiva podloga NZY⁺, pH 7,5

10 g/l NZ amin (Fluka)

5 g/l ekstrakt kvasca

5 g/l NaCl

12,5 mM MgCl₂ (Kemika)

12,5 mM MgSO₄ (Kemika)

20 mM glukoza

Antibiotici:

100 µg/ml ampicilin (Sigma-Aldrich)

50 µg/ml kanamicin (Fluka)

35 µg/ml kloramfenikol (Sigma-Aldrich)

Otopine za izolaciju plazmidne DNA metodom alkalne lize:

1. Otopina za resuspendiranje bakterija

50 mM Tris-Cl, pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNaza A

2. Otopina za lizu stanica

200 mM NaOH

10 g/l SDS

3. Otopina za neutralizaciju

3 M K acetat, pH 5,5 (Kemika)

11,44 % octena kiselina

3.1.3. Materijali korišteni za uzgoj, transfekciju i fiksaciju stanica *Dictyostelium discoideum*

3.1.3.1. Korišteni sojevi *D. discoideum*

Roditeljski sojevi:

DdB, divlji soj koji se primarno hrani bakterijama, derivat soja NC4 izoliranog iz prirode, dar dr. sc. Roba Kaya (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK)

AX2, aksenični soj koji može rasti u odsutnosti bakterija (engl. *axenic*) zbog čega se jednostavno uzgaja u tekućoj hranjivoj podlozi u laboratoriju, derivat soja DdB, ima deleciju velikog dijela sekvence gena *axeB* što je jedan od razloga pojačane makropinocitoze

Sojevi deficijentni za određeni gen:

iqgC⁻ u DdB genetičkoj pozadini (soj IW023), proizveden za ovaj rad (Putar *i sur.*, 2024.)

iqgC⁻ u AX2 genetičkoj pozadini (soj IW013, DBS0351225) (Marinović *i sur.*, 2019.)

rasG⁻ u AX2 genetičkoj pozadini (DBS0236862) (Bolourani *i sur.*, 2006.)

rab5A⁻ u AX2 genetičkoj pozadini (soj IW031), proizveden za ovaj rad (Putar *i sur.*, 2024.)

Svi ostali sojevi dobiveni su transfekcijom navedenih sojeva odgovarajućim ekstrakromosomalnim vektorima iz Tablice 3.3.

3.1.3.2. Hranjive podloge, puferi i antibiotici

Tekuća hranjiva podloga HL5

22 g/l hranjiva podloga HL5 bez glukoze, obogaćena vitaminima i mikroelementima (Formedium)

18 g/l maltoza (Sigma-Aldrich)

*za određene eksperimente u tekuću hranjivu podlogu su dodavane sljedeće kemikalije:

10 % FBS⁵ (Gibco) za uzgoj stanica DdB u tekućoj hranjivoj podlozi

2,5 µg/ml dekstran obilježen fluoroforom Alexa Fluor 647 (Mr 10 kDa, Life Technologies) za praćenje kinetike makropinocitoze

0,1 % Na azid za sprječavanje egzocitoze

2 mg/ml dekstran obilježen fluorescentnom bojom TRITC⁶ (Mr 70 kDa, TdB Labs) za praćenje makropinocitoze konfokalnom mikroskopijom

kvasci obilježeni fluorescentnom bojom TRITC (pripremljeni u laboratoriju)

Pufer SorMC, pH 6,0

15 mM KH₂PO₄

2 mM Na₂HPO₄

50 µM MgCl₂

50 µM CaCl₂ (Kemika)

Antibiotici

50 µg/ml ampicilin

40 µg/ml streptomycin (Fluka)

100 µg/ml higromicin B (Sigma-Aldrich)

10 µg/ml geneticin (G418, Gibco)

Fosfatni pufer Sørensen, pH 6,0

0,3555 g/l Na₂HPO₄

1,99 g/l KH₂PO₄

*12 g/l agar za krutu podlogu

Pufer za elektroporaciju

10 mM K-fosfatni pufer, pH 6,1

⁵ fetalni goveđi serum

⁶ tetrametilrodamin-izotiocijanat-klorid

50 mM glukoza

Pufer H40 za elektroporaciju, pH 7,0

40 mM HEPES

1 mM MgCl₂

Otopina za oporavak stanica nakon elektroporacije

100 mM CaCl₂

100 mM MgCl₂

3.1.3.3. Fiksacija stanica

metanol (Kemika)

20 mM PIPES (Roth)

10x pufer PBS, pH 7,4

80 g/l NaCl

2 g/l KCl

14,2 g/l Na₂HPO₄

2,45 g/l KH₂PO₄

PBS-glicin

7,5 g/l glicina (Roth) u 1x puferu PBS

Pufer PBG

5 g/l BSA⁷ (Fluka) i 0,45 g/l želatine iz ribe (Sigma Aldrich) u 1x puferu PBS

DAPI (Sigma Aldrich)

Tekućina za uklapanje (Dako, Agilent Technologies)

3.1.4. Materijali korišteni za izolaciju genomske DNA (gDNA) i analizu Southern

3.1.4.1. Materijali za izolaciju genomske DNA ekstrakcijom fenolom

Pufer za lizu stanica

30 mM HEPES, pH 7,5 (Sigma-Aldrich)

15 mM Mg acetat x 4 H₂O (Kemika)

10 mM NaCl (Kemika)

⁷ albumin goveđeg seruma

100 g/l saharoza (Kemika)

2 % NP40 (Sigma)

Pufer TE/SDS

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

7 g/l SDS

20 mg/ml proteinaza K (Sigma-Aldrich)

RNaza A (Qiagen)

fenol (Roth)

kloroform (Carlo Erba)

izoamilni alkohol (Acros organics)

3 M Na acetat (Kemika)

apsolutni etanol (Kemika)

3.1.4.2. Materijali i puferi za analizu Southern

0,25 M HCl (Kemika)

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5

0,4 M NaOH (Kemika)

2x pufer SSC, pH 7,0 (3 mM NaCl, 30 mM Na citrat)

Hibridizacijski pufer

0,25 M fosfatni pufer, pH 7,2

1 mM EDTA, pH 8,0

200 g/l SDS

5 g/l blokirajući reagens (*DIG Luminescent Detection Kit*, Roche)

0,5 M fosfatni pufer, pH 7,2

28 % 0,5 M NaH₂PO₄ (Kemika)

72 % 0,5 M Na₂HPO₄ (Kemika)

Pufer za ispiranje

20 mM Na₂HPO₄

1 mM EDTA, pH 8,0

10 g/l SDS (Roth)

Pufer 1, pH 8,0

0,1 M maleinska kiselina (Roth)

3 M NaCl

0,3 % Tween 20 (Sigma)

Pufer 2

0,5 g/l blokirajućeg reagensa (*DIG Luminescent Detection Kit*, Roche) u puferu 1

Pufer 3

0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

0,1 M NaCl

Pufer za ispiranje (engl. *stripping buffer*)

0,2 M NaOH

1 g/l SDS

Pozitivno nabijena najlonska membrana (Roche)

Komplet za detekciju digoksinom-obilježenih proba (*DIG Luminescent Detection Kit*, Roche)

3.1.5. Materijali korišteni za sustav dva hibrida u kvascu (engl. *Yeast two-hybrid assay*, Y2H)

3.1.5.1. Korišteni soj kvasca za Y2H

Saccharomyces cerevisiae, soj AH109, genotip: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ

3.1.5.2. Hranjive podloge i puferi za Y2H

Kompletna hranjiva podloga (engl. *YPAD medium*)

10 g/l ekstrakt kvasca

20 g/l pepton

20 g/l glukoza

*16,67 g/l agar za krutu hranjivu podlogu

Sintetska nekompletna hranjiva podloga (engl. *synthetic complete drop out medium*), pH 5,6

6,67 g/l dušikova baza kvasca (Difco)

20 g/l glukoza

0,83 g/l smjesa sintetske nekompletne hranjive podloge (Sigma-Aldrich)

*16,67 g/l agar za krutu hranjivu podlogu

Smjesa sintetske nekompletne hranjive podloge

2 g adenin-hemisulfat

2 g L-arginin-hidroklorid

2 g L-histidin-hidroklorid

2 g L-izoleucin

2 g L-leucin

2 g L-lizin-hidroklorid

2 g L-metionin

3 g L-fenilalanin

6 g L-serin

3 g L-triptofan

2 g L-tirozin

1,2 g uracil

9 g L-valin

Određene aminokiseline se izostavljaju ovisno o selekciji koja se želi postići u hranjivoj podlozi.

Antibiotik

25 µg/ml kanamicin

3.1.5.3. Materijali za transfekciju kvasaca

10 mg/ml DNA sperme lososa (*carrier DNA*) (Sigma-Aldrich)

1 M DTT⁸ (Roth)

0,5 mM 3-AT⁹

⁸ ditiotreitol

⁹ 3-amino-1,2,4-triazol

Smjesa za nasađivanje

40 % polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich)
0,1 M litijev acetat (Sigma-Aldrich)
10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA

3.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju

3.1.6.1. Materijali korišteni za afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavcima GST i His

Pufer za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom GST¹⁰

1x PBS, pH 7,2
1 mM EGTA, pH 7,3
1 mM DTT
1 mM PMSF¹¹ (Sigma-Aldrich)
6,6 mM benzamidin (Sigma-Aldrich)
*za lizu bakterijskog taloga u pufer se dodaju:
0,2 mg/ml lizozim (Fluka)
1x smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete, Roche)

Puferi za afinitetnu kromatografiju i pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom His:

1. Pufer za lizu stanica

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
500 mM NaCl
10 mM imidazol (Roth)
5 mM MgCl₂
4 mM beta-merkaptoetanol (Fluka)
4 mM benzamidin
1 mM PMSF
*za lizu bakterijskog taloga u pufer se dodaju:
0,2 mg/ml lizozim
1x smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete)

¹⁰ glutation-S-transferaza

¹¹ fenilmetan-sulfonil-florid

2. Pufer za eluciju A

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
300 mM NaCl
10 mM imidazol
5 mM MgCl₂
4 mM beta-merkaptoetanol

3. Pufer za eluciju B

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
300 mM NaCl
300 mM imidazol
5 mM MgCl₂
4 mM beta-merkaptoetanol

Pufer za gel-filtraciju

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
2 mM DTT

Pufer za dijalizu

1x PBS, pH 7,3
1 mM MgCl₂
50 % glicerol

3.1.6.2. Puferi korišteni za testiranje proteinskih interakcija metodom *pull-down*

Pufer za *pull-down* s pročišćenim proteinima

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EGTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich)
40 mM NaCl
1 mM DTT
1 mM PMSF
6,6 mM benzamidin
0,5 % NP40
1x smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete)

Pufer za pull-down sa staničnim lizatima

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EGTA
40 mM NaCl
1 mM DTT
1 mM PMSF
6,6 mM benzamidin
0,5 % n-oktilpolioksietilen (Bachem)
1x smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete)

3.1.6.3. Materijali korišteni za testiranje proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije

Pufer za lizu stanica i koimunoprecipitaciju

30 mM Tris-HCl, pH 7,5
40 mM NaCl
1 mM EGTA¹², pH 8,0
2 mM DTT
0,5 % n-oktilpolioksietilen
1x smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete)

IPTG¹³ (Roth)

extran AP33 (Merck)

protein A sefaroza CL-4B (GE Healthcare)

glutation-agarozna (Thermo Scientific)

3.1.6.4. Materijali i puferi korišteni za točkasto bugačenje lipida (engl. *lipid dot blot assay*)

PIP Strip (Echelon Biosciences), hidrofobna membrana s nanešenim lipidima za testiranje interakcija između proteina i lipida, sadrži 15 različitih lipida nanešenih u količini od 100 pmola po točki: fosfatidilinozitol i svih sedam fosfoinozitida: fosfatidilinozitol 3-fosfat (PI(3)P), fosfatidilinozitol 4-fosfat (PI(4)P), fosfatidilinozitol 5-fosfat (PI(5)P), fosfatidilinozitol 3,4-bisfosfat (PI(3,4)P₂), fosfatidilinozitol 3,5-bisfosfat (PI(3,5)P₂), fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PI(4,5)P₂), fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PI(3,4,5)P₃);

¹² etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-tetraoctena kiselina

¹³ izopropil-β-D-tiogalaktozid

lizofosfatidična kiselina, lizofosfokolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, sfingozin 1-fosfat, fosfatidična kiselina, fosfatidilserin i prazna kontrola

PIP Array (Echelon Biosciences), hidrofobna membrana s nanešenim padajućim količinama (100 – 1,56 pmol po točki) fosfatidilinozitola i svih sedam fosfoinozitida za određivanje afiniteta proteina prema određenom fosfoinozitudu

Pufer za ispiranje, pH 7,2

1x PBS

0,1 % Tween 20

10x pufer PBS, pH 7,2

80 g/l NaCl

2 g/l KCl

14,2 g/l Na₂HPO₄

2,45 g/l KH₂PO₄

Otopina za blokiranje membrane

30 g/l BSA bez masnih kiselina (Sigma-Aldrich) u puferu za ispiranje

Pufer RIPA¹⁴ (Sigma-Aldrich) za lizu stanica

Smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (cOmplete, Roche)

3.1.6.5. Materijali korišteni za elektroforezu u denaturirajućem gelu i metodu Western

12 %-tni SDS poliakrilamidni gelovi:

Gel za razdvajanje:

41,5 % akrilamid/bisakrilamid 30 %/0,8 % (Roth)

0,38 M Tris/0,1 % SDS, pH = 8,8

1 mM EDTA, pH= 7,2

0,025 % TEMED¹⁵ (Fluka)

0,23 % APS¹⁶ (Roth)

¹⁴ engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*

¹⁵ N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

¹⁶ amonij-persulfat

Gel za sabijanje:

11,14 % akrilamid/bisakrilamid 30 %/0,8 %

0,12 M Tris/0,1 % SDS, pH = 6,8

1 mM EDTA, pH= 7,2

0,05 % TEMED

0,3 % APS

Proteinski standardi:

neoboijani: *PageRuler Unstained Broad Range* (Thermo-Fisher Scientific)

prethodno oboijani: *BLUeye Prestained* (Sigma-Aldrich), *PageRuler Plus Prestained* (Thermo-Fisher Scientific)

Membrana PVDF (GE Healthcare)

100 % metanol

Nitrocelulozna membrana (GE Healthcare)

10x pufer SDS za elektroforezu, pH 8,8

30,25 g/l Tris

142,5 g/l glicin (Roth)

10 g/l SDS

Pufer za prijenos

2,93 g/l glicin

5,81 g/l Tris

0,375 g/l SDS

20 % metanol

Kemiluminiscencijska detekcija:

Pufer za ispiranje

1x PBS

0,05 % Tween 20

Otopina za blokiranje

50 g/l BSA u puferu za ispiranje

Primarna antitijela

anti-IqgC, poliklonsko antitijelo proizvedeno u kuniću, 1:1000 (Marinović *i sur.*, 2019.)

anti-His₆ monoklonsko antitijelo proizvedeno u mišu, 1 µg/ml (Roche)

anti-GFP monoklonsko antitijelo proizvedeno u mišu, 1:1000 (Faix *i sur.*, 2001.)

anti-GFP poliklonsko antitijelo proizvedeno u kuniću, 1:2000 (Abcam)

Sekundarna antitijela

anti-rabbit, sekundarno antitijelo na kuničja antitijela IgG, proizvedeno u kozi, konjugirano s peroksidazom iz hrena (Bio-Rad), 1:5000

anti-mouse, sekundarno antitijelo na mišja antitijela IgG, proizvedeno u kozi, konjugirano s peroksidazom iz hrena (Bio-Rad), 1:5000

Supstrat za peroksidazu iz hrena za kemiluminiscentnu detekciju (*Clarity Western ECL Substrate*, Bio-Rad)

Kolorimetrijska detekcija:

10x pufer NCP, pH 8,0

12,1 g/l Tris-HCl

87 g/l NaCl

5 g/l Tween 20

Otopina za blokiranje

40 g/l BSA u 1x puferu NCP

Sekundarna antitijela

anti-rabbit, sekundarno antitijelo na kuničja antitijela IgG, proizvedeno u kozi, konjugirano s alkalnom fosfatazom (Sigma Aldrich), 1:30 000

Pufer za razvijanje

0,1 M Na₂CO₃, pH 10,0

Otopine za bojanje i odbojavanje proteinskih gelova i membrana:

Coomassie briljant plavo otopina za bojanje gelova

1 g/l *Brilliant blue G 250* (Roth)

1 g/l *Brilliant blue R 250* (Roth)

50 % metanol

10 % octena kiselina

Otopina za odbojavanje gelova

10 % etanol

7 % octena kiselina

Amido crno otopina za bojanje membrane

0,01 g/l boja amido crno

10 % metanol

2 % octena kiselina

Otopina za odbojavanje membrane

45 % metanol

7 % octena kiselina

3.1.6.6. Materijali korišteni za testiranje aktivnosti GAP

Komercijalni komplet *GTPase-GloTM Assay kit* (Promega)

IqgC, prethodno pročišćen protein u našem laboratoriju

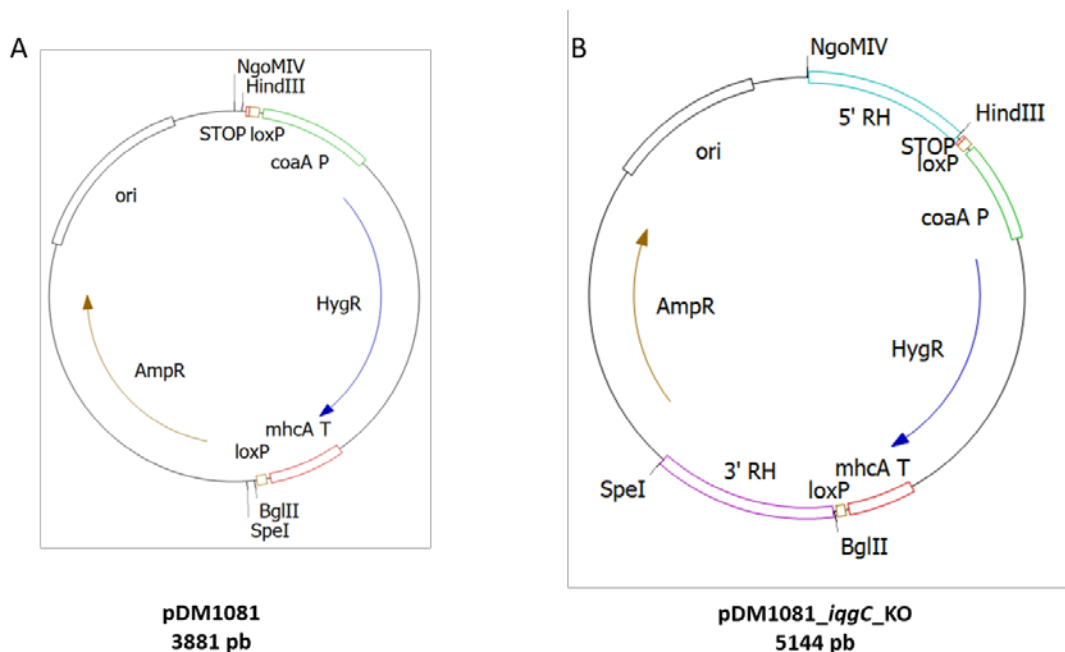
H-Ras (Calbiochem)

3.2. Metode

3.2.1. Tehnike rekombinantne DNA

3.2.1.1. Vektor za isključivanje gena *iqgC* u stanicama *D. discoideum*

Za isključivanje gena *iqgC* homolognom rekombinacijom u divljem soju DdB *D. discoideum* koristila sam vektor pDM1081_*iqgC*_KO. pDM1081 je vektor dizajniran za efikasno opetovano isključivanje gena u stanicama *D. discoideum* koristeći sustav Cre-loxP (Slika 3.1.A) (Faix *i sur.*, 2004.; Paschke *i sur.*, 2018.). Kako bih konstruirala vektor pDM1081_*iqgC*_KO (Slika 3.1.B), metodom PCR umnožila sam 5'- i 3'-regije gena *iqgC* pomoću početnica koje sadrže restrikcijska mjesta NgoMIV i HindIII za 5'-regiju homologije te restrikcijska mjesta BglIII i SpeI za 3'-regiju homologije (Tablica 3.4.). Dobivene PCR-produkte porezala sam s odgovarajućim restrikcijskim enzimima te sekvencijalno ugradila u porezan i defosforiliran vektor pDM1081 pomoću T4 DNA ligaze. Ligacijskim smjesama transformirala sam ultrakompetentne bakterije XL10-Gold, a klonove s ugrađenim odsječcima selektirala sam prema digestijama izoliranih plazmida. Slijed finalnog vektora pDM1081_*iqgC*_KO provjerila sam sekvenciranjem. Kako bih vektor pripremila za transfekciju stanica, porezala sam ga s restrikcijskim enzimima NgoMIV i SpeI, defosforilirala i pomoću kompleta za pročišćavanje odsječaka DNA iz gela pročistila odsječak koji sadrži regije homologije gena *iqgC* i ekspresijsku kazetu koja je odgovorna za rezistenciju na higromicin.

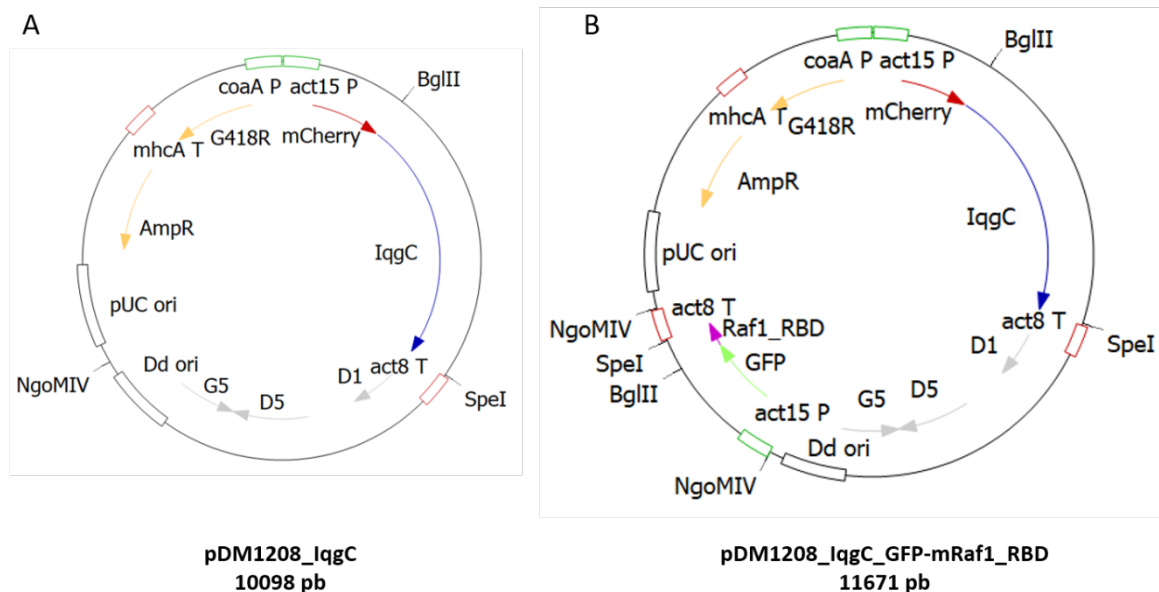


Slika 3.1. Shema vektora pDM1081 za isključivanje gena *iggC* u stanicama *D. discoideum*. A) Vektor pDM1081 sadrži ekspresijsku kazu za rezistenciju na higromicin, koja obuhvaća gen za higromicin fosfotransferazu (HygR) pod kontrolom promotora *coaA* (*coaA P*) i terminatora *mhca* (*mhca T*), a okružena je mjestima *loxP*. Ispred uzvodnog mjesta *loxP* nalaze se STOP-kodoni u sva tri okvira čitanja. Mjesta *loxP* prepoznaje rekombinaza Cre koja, ako se eksprimira u stanici s dodatnog vektora, izrezuje cijelu ekspresijsku kazu što omogućuje ponovno korištenje higromicinske rezistencije ukoliko je potrebno kreirati višestruke delecije gena unutar genoma. Izvan ekspresijske kazete na obje strane nalaze se restrikcijska mjesta za ukloniravanje regija homologije. B) Vektor pDM1081_iggC_KO za ciljano isključivanje gena *iggC* konstruiran je ukloniravanjem 5'-regije homologije (5' RH) gena *iggC* u pDM1081 pomoću restrikcijskih enzima NgoMIV i HindIII, te 3'-regije homologije (3' RH) pomoću restrikcijskih enzima BglII i SpeI. *ori* – izvorište replikacije u *E. coli*; AmpR – gen za β-laktamazu koji omogućuje rezistenciju na ampicilin.

3.2.1.2. Vektori za ekspresiju proteina u divljem soju DdB stanica *D. discoideum*

Za ekspresiju proteina u divljem soju DdB *D. discoideum*, koristila sam vektore pDM1208, za obilježavanje proteina na N-kraju s crvenim fluorescentnim proteinom mCherry, i pDM1207, za obilježavanje proteina na N-kraju sa zelenim fluorescentnim proteinom GFP (engl. *green fluorescent protein*, GFP) (Paschke *i sur.*, 2018.). Oba ova vektora sadrže promotor *coaA* koji omogućuje efikasnu transkripciju gena za rezistenciju na antibiotik u divljim sojevima amebe koje rastu u prisutnosti bakterija. Tako sam za ponovnu ekspresiju proteina IggC u stanicama *iggC*⁻ konstruirala vektor pDM1208_IggC s kojeg se eksprimira protein mCherry-IggC (Slika 3.2.A). Kodirajući slijed DNA za protein IggC izrezala sam pomoću restrikcijskih enzima BglII i SpeI iz vektora pDM304_YFP-IggC (Marinović *i sur.*, 2019.) i ugradila u pDM1208 porezan istim restrikcijskim endonukleazama. Kako bih usporedila veličinu makropinosoma stanica divljeg tipa i *iggC*⁻ u pozadini DdB, konstruirala sam vektor pDM1207_mRaf1_RBD koji sadrži kodirajući slijed DNA za domenu koja veže Ras (engl. *Ras*

binding domain, RBD) kinaze mRaf1 obilježenu s proteinom GFP na N-kraju. Kodirajući slijed domene RBD izrezala sam iz vektora pDM304_YFP-mRaf1_RBD (Junemann *i sur.*, 2016.) i ugradila u pDM1207 koristeći restriksijske enzime BglII i SpeI. Za praćenje veličine makropinosoma u stanicama *iqgC* s ekstrakromosomalnom ekspresijom proteina IqgC, u mjesto NgoMIV vektora pDM1208_IqgC ugradila sam ekspresijsku kazetu s GFP-mRaf1_RBD koju sam pripremila u pomoćnom vektoru pDM1019_mRaf1_RBD i izrezala pomoću restriksijskog enzima NgoMIV. Pomoćni vektor pDM1019 sadrži kazetu za ekspresiju proteina obilježenih proteinom GFP na N-kraju pod kontrolom promotora *act15* i terminatora *act8* koja je omeđena restriksijskim mjestima NgoMIV (Paschke *i sur.*, 2018.), a kodirajući slijed mRaf1_RBD u taj vektor ugradila sam koristeći restriksijske enzime BglII i SpeI. Dobiveni finalni vektor pDM1208_IqgC_GFP-mRaf1_RBD služi za koekspresiju dva fluorescentno obilježena proteina (Slika 3.2.B). Ligacijskim smjesama vektora transformirala sam kompetentne bakterije NEB 10-beta, osim u slučaju ligacijske smjese za pDM1019_mRaf1_RBD, kojom sam transformirala DH5 α . Pozitivne klonove sam selektirala digestijom s restriksijskim enzimima i slijedove odabranih klonova provjerila sekvenciranjem.



Slika 3.2. Shema ekstrakromosomalnih vektora za ekspresiju fluorescentno obilježenih proteina u soju DdB stanica *D. discoideum*. A) Vektor pDM1208_IqgC za ekspresiju proteina IqgC obilježenog fluorescentnim proteinom mCherry. B) Vektor pDM1208_IqgC_GFP-mRaf1_RBD za istovremenu ekspresiju proteina IqgC obilježenog fluorescentnim proteinom mCherry i probe za aktivni Ras obilježene fluorescentnim proteinom GFP. S obzirom da su ekspresijske kazete za IqgC i mRaf1_RBD pod kontrolom identičnih promotora *act15* (*act15 P*) i terminatora *act8* (*act8 T*), za očekivati je da je ekspresija tih proteina u stanici podjednaka. G418R - gen za neomicinsku transferazu koji omogućuje rezistenciju na G418, analog neomicina, njegova ekspresija je pod kontrolom promotora *coaA* (*coaA P*) i terminatora *mhcA* (*mhcA T*), a služi za selekciju u *D. discoideum*; AmpR - gen za β -laktamazu koji omogućuje rezistenciju na ampicilin za selekciju u *E. coli*; pUC ori - izvorište replikacije u *E. coli*; Dd ori – izvorište replikacije u *D. discoideum*; G5, D1 i D5 – skraćeni kodirajući slijedovi gena koji se prepisuju tijekom vegetativnog rasta (G5) i razvojne faze (D1 i D5) *D. discoideum* za efikasniju transfekciju i rast stanica tijekom selekcije antibiotikom.

3.2.1.3. Vektori za ekspresiju proteina u stanicama akseničnog soja AX2 *D. discoideum*

Za ekspresiju proteina u akseničnom soju AX2 *D. discoideum* konstruirala sam vektore koristeći vektor pDM304_N-YFP za obilježavanje proteina na N-kraju sa žutim fluorescentnim proteinom YFP (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP) (Junemann *i sur.*, 2016.). Za ekspresiju skraćenih varijanti proteina IqgC u stanicama *iqgC*, metodom PCR umnožila sam odgovarajuće kodirajuće slijedove DNA; IqgC_N-GRD (aminokiseline 1-510), IqgC_GRD (ak 130-510), IqgC_RGcT-C (ak 598-817) i IqgC_RGcT (ak 598-747), s vektora pDM304_YFP-IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.) pomoću početnica koje sadrže restriksijska mjesta BglII i SpeI (Tablica 3.4.). Dobivene PCR-produkte pročistila sam iz gela, porezala i ugradila u BglII-SpeI linearizirani i defosforilirani vektor pDM304_N-YFP. Za ekspresiju skraćenih varijanti proteina IqgC kojima nedostaje određena regija; IqgC_Δcentr (IqgC bez aminokiselina 511-597, Δ511-597), IqgC_ΔGRD (Δ130-510) i IqgC_ΔRGcT (Δ598-747) koristila sam metodu kloniranja koja je neovisna o restrikciji i ligaciji koristeći komplet *In-Fusion® HD Cloning Kit*. Pri tome sam kodirajuće slijedove IqgC umnožila u dva odječka koristeći specifične oligonukleotide (Tablica 3.4.) koji sadrže dijelove komplementarne dvama susjednim odsječcima u očekivanom konstrukt. Konkretno, za IqgC_Δcentr (Δ511-597) umnožila sam dva odsječka kodirajućeg slijeda IqgC koji obuhvaćaju aminokiseline 1-510 i 598-817, za IqgC_ΔGRD (Δ130-510) umnožila sam kodirajuće slijedove odsječaka koji obuhvaćaju aminokiseline 1-129 i 511-817, a za IqgC_ΔRGcT (Δ598-747) kodirajuće slijedove aminokiselina 1-597 i 748-817. Za svaki konstrukt nakon umnažanja imala sam po dva odsječka koji se međusobno djelomično preklapaju, ali se svaki od njih preklapa i s dijelom vektora pDM304_N-YFP. Pročišćene odsječke i BglII-SpeI linearizirani i defosforilirani vektor pDM304_N-YFP pomiješala sam u reakcijskoj smjesi kompleta *In-Fusion® HD Cloning Kit* prema uputama proizvođača. Kako bih eksprimirala mutirane varijante cjelovitog proteina IqgC, na vektoru pDM304_YFP-IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.) napravila sam ciljanu mutagenezu koristeći specifične početnice (Tablica 3.4.) i komercijalni komplet za mjesno-specifičnu mutagenezu prema uputama proizvođača. Za ekspresiju proteina Rab5A, Rab21, VatC i VatE obilježenih fluorescentnim proteinom YFP, metodom PCR umnožila sam kodirajuće slijedove za te proteine iz komplementarne DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) stanica AX2 pomoću početnica koje sadrže restriksijska mjesta BamHI i SpeI za Rab5A i Rab21, BglII i SpeI za VatC te BglII i XbaI za VatE. Dobivene PCR-produkte sam pročistila i porezala odgovarajućim enzimima te ugradila u BglII-SpeI porezan i defosforilirani vektor pDM304_N-YFP. Za koekspresiju proteina IqgC obilježenog fluorescentnim proteinom YFP i

proteina Rab5A obilježenog s crvenim fluorescentnim proteinom (engl. *monomeric red fluorescent protein*, mRFP) konstruirala sam vektor pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A. Prvo sam u BglIII-SpeI linearizirani i defosforilirani pomoćni vektor pDM328 ugradila BamHI-SpeI porezani i prethodno pripremljeni odsječak koji sadrži kodirajući slijed za Rab5A. Vektor pDM328 ima kazetu za ekspresiju proteina obilježenih s fluorescentnim proteinom mRFP na N-kraju, pod kontrolom promotora act15 i terminatora act8, a koja je omeđena restrikcijskim mjestima NgoMIV (Veltman *i sur.*, 2009.). Iz tako pripremljenog pomoćnog vektora pDM328-Rab5A izrezala sam ekspresijsku kazetu za mRFP-Rab5A pomoću restrikcijskog enzima NgoMIV, pročistila je iz gela pomoću odgovarajućeg kompleta za pročišćavanje te ugradila u NgoMIV linearizirani i defosforilirani vektor pDM304_YFP-IqgC. Na sličan način koekspimirala sam Rab5A s proteinom golvezinom kojem nedostaju aminokiseline 76-118, a služi kao marker Golgijevog aparata (Weber *i sur.*, 2018.). Vektor pDM323_golvezin(Δ 76-118) koji eksprimira GFP-golvezin (Δ 76-118) (Weber *i sur.*, 2018.), linearizirala sam pomoću restrikcijskog enzima NgoMIV te u njega ugradila već spomenutu ekspresijsku kazetu za mRFP-Rab5A. Kako bih koekspimirala Rab5A s probom za aktivni Ras, u prethodno pripremljeni, NgoMIV porezani i defosforilirani vektor pDM304_YFP-Rab5A ugradila sam ekspresijsku kazetu već spomenute probe mRFP-mRaf1_RBD, koja je pripremljena u pomoćnom vektoru pDM328_mRaf1_RBD. Ligacijskim smjesama navedenih vektora transformirala sam ultrakompetentne komercijalne bakterije XL10-Gold ili NEB 10-beta, pozitivne klonove selektirala sam digestijom s restrikcijskim enzimima, a slijedove odabranih klonova provjerila sekvenciranjem. Iznimno sam ligacijskim smjesama pomoćnih vektora transformirala elektrokompetentne bakterije DH5 α s obzirom na njihove manje veličine.

3.2.1.4. Vektori za sustav dva hibrida u kvascu

Kako bih testirala izravne interakcije proteina IqgC s proteinima RasG i Rab5A koristila sam *Matchmaker™ GAL4 549 Two-Hybrid System 3* (Clontech) sustav dva hibrida u kvascu. U tom sustavu koriste se vektori pGADT7, s kojeg se eksprimira protein fuzioniran s aktivacijskom domenom (engl. *activation domain*, AD), i pGBKT7 s kojeg se eksprimira protein fuzioniran s domenom koja veže DNA (engl. *binding domain*, BD) transkripcijskog faktora GAL4. U slučaju interakcije potencijalnih interaktora, Gal4 AD i BD dolaze fizički dovoljno blizu da rekonstituirani Gal4 potakne transkripciju reporterskog gena.

Kodirajuće slijedove svih varijanti proteina IqgC uklonirane su u vektor pGADT7, dok su testirane GTPaze Rab5A i RasG(Q61L) kodirane u vektoru pGBKT7. Za ekspresiju mutiranih varijanti IqgC (R205A; L352G,R353A; N392A) mutirala sam kodirajući slijed IqgC

u vektoru pGADT7_IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.) koristeći komercijalni komplet za mjesno-specifičnu mutagenezu i specifične početnice (Tablica 3.4.). Kako bih testirala koja domena proteina IqgC veže RasG(Q61L), koristila sam vektore sa skraćenim varijantama proteina IqgC; pGADT7_IqgC_GRD (ak 130-510) i pGADT7_IqgC_RGCt (ak 598-747). Za testiranje interakcije IqgC i Rab5A konstruirala sam vektor pGBKT7_Rab5A(wt). Metodom PCR umnožila sam kodirajući slijed Rab5A iz cDNA stanica AX2 koristeći početnice koje sadrže restriksijska mjesta EcoRI i SalI (Tablica 3.4.), ali bez motiva CCN, tri C-terminalne aminokiseline koje su važne za vezanje Rab5A na ciljane membrane. Dobiveni PCR-produkt sam pročistila, porezala i ugradila u EcoRI-SalI linearizirani i defosforilirani vektor pGBKT7. Kako bih pripremila konstitutivno aktivnu varijantu Rab5A(Q68L) i konstitutivno neaktivnu varijantu Rab5A(S23N), mutirala sam triplete baza odgovarajućih aminokiselina pomoću kompleta za mjesno-specifičnu mutagenezu na kalupu pGBKT7_Rab5A(wt) uz upotrebu specifičnih početnica (Tablica 3.4.). Transformirala sam ultrakompetentne bakterije XL10-Gold ili NEB 10-beta ligacijskim smjesama svih navedenih vektora, pozitivne klonove selektirala sam pomoću digestija, i slijedove odabranih klonova provjerila sekvenciranjem.

3.2.1.5. Vektori za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom His

Za pročišćavanje varijanti proteina Rab5A obilježenih nastavkom His iz bakterije *E. coli* koristila sam vektor pET28b (Novagen) koji omogućava ekspresiju proteina obilježenih sa šest uzastopnih histidinskih ostataka na N- ili C-kraju. Kodirajući slijed Rab5A bez motiva CCN na C-kraju umnožila sam pomoću specifičnih početnica (Tablica 3.4.), porezala s restriksijskim enzimima NcoI i HindIII i ugradila u NcoI-HindIII linearizirani vektor pET28b kako bi Rab5A bio fuzioniran s motivom His na C-kraju. Za mutirane varijante Rab5A(Q68L) i Rab5A(S23N), kodirajući slijed Rab5A u vektoru pET28b_Rab5A(wt) sam mutirala koristeći komercijalni komplet za mjesno-specifičnu mutagenezu i specifične početnice (Tablica 3.4.). Transformirala sam ultrakompetentne bakterije NEB 10-beta ligacijskim smjesama za navedene vektore, pozitivne klonove selektirala sam pomoću digestija, i slijedove odabranih klonova provjerila sekvenciranjem.

3.2.2. Uzgoj bakterija

3.2.2.1. Uzgoj i transformacija bakterija *E. coli*

Ultrakompetentne bakterije XL10-Gold i NEB 10-beta transformirala sam pripremljenim ligacijskim smjesama prema uputama proizvođača, izlažući bakterije 30 sekundi

temperaturnom šoku pri 42 °C. Nakon transformacije, bakterije sam nasadila na krutu selektivnu podlogu LB s odgovarajućim antibiotikom i inkubirala preko noći na 37 °C.

Za elektroporaciju bakterija DH5 α i Rosetta 2 uzela sam 40 μ l alikvota elektrokompetentnih bakterija, dodala im 2 μ l ligacijske smjese i prebacila u kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda od 2 mm (Biorad). Bakterije sam elektroporirala prema protokolu od 2,5 kV, 400 Ω i 25 μ F u elektroporatoru (Gene Pulser Xcell 53, BioRad). Odmah nakon elektroporacije smjesi sam dodala 1 ml tekuće hranjive podloge za oporavak SOC. Nakon inkubacije 1 sat pri 37 °C uz trešnju, bakterije sam nasadila kako je prethodno opisano.

3.2.2.2. Uzgoj i priprema bakterija *K. aerogenes* kao izvora hrane za *D. discoideum*

Za pripremu suspenzije *K. aerogenes*, 100 μ l prekonoćne kulture bakterija koje su narasle u tekućoj hranjivoj podlozi SM nasadila sam u 1 l svježe tekuće hranjive podloge SM i inkubirala preko noći pri 37 °C uz trešnju od 250 rpm. Bakterije sam skupila centrifugiranjem 20 minuta na 6000 g pri 4 °C. Zatim sam ih isprala u puferu SorMC i bakterijske suspenzije prilagodila na optičku gustoću OD₆₀₀=100 koristeći spektrofotometar (Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences) za mjerenje apsorbancije pri 600 nm. Pripremljenu suspenziju *K. aerogenes* čuvala sam pri 4 °C do upotrebe.

3.2.3. Rad sa stanicama *D. discoideum* u kulturi

3.2.3.1. Uzgoj stanica *D. discoideum*

S obzirom da se stanice *D. discoideum* divljeg soja DdB preferencijalno hrane bakterijama, kulturu stanica DdB održavala sam u puferu SorMC uz dodatak *K. aerogenes* konačne optičke gustoće OD₆₀₀=2 u Petrijevim posudama ili na krutoj hranjivoj podlozi SM s bakterijama *K. aerogenes* u inkubatoru pri 22 °C sa stalnim osvjetljenjem. Stanice soja AX2 uzgajala sam u tekućoj hranjivoj podlozi HL5 u Petrijevim posudama ili u Erlenmayerovim tikvicama u suspenziji uz trešnju od 150 rpm u inkubatoru pri 22 °C. Stanice soja DdB održavala sam u kulturi dva do tri tjedna, dok sam stanice soja AX2 održavala u kulturi tri do četiri tjedna jer imaju dulje vrijeme diobe i pazila sam da ne prerastu gustoću od 4×10^6 stanica po ml. Stanične sojeve dugoročno sam pohranjivala spremanjem spora u fosfatnom puferu Sørensen pri -80 °C. Spremljene spore koristila sam za nova pokretanja staničnih sojeva dodajući 200 μ l spora u pufer SorMC uz dodatak *K. aerogenes* za soj DdB ili dodajući spore u tekuću hranjivu podlogu HL5 za soj AX2 uz odgovarajuće antibiotike u Petrijevoj posudi.

3.2.3.2. Transfekcija stanica *D. discoideum*

Za transfekciju stanica soja DdB s odgovarajućim vektorima, skupila sam $3,5 \times 10^6$ stanica, centrifugirala 5 minuta na 1000 g pri 4 °C i isprala u hladnom puferu H40. Nakon ponovnog centrifugiranja stanice sam resuspendirala u 100 µl hladnog pufera H40. Zatim sam ih prebacila u ohlađenu kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda od 2 mm (Biorad), dodala 1 µg plazmidne DNA i elektroporirala koristeći protokol pravokutnih valova s dva pulsa od 350 V trajanja 8 ms odvojena intervalom od 1 s. Stanice sam prebacila u Petrijevu posudu u pufer SorMC s *K. aerogenes*. Stanicama transfeciranim s ekstrakromosomalnim vektorima dodala sam 10 µg/ml antibiotika G418 5 do 18 sati nakon transfekcije i konstantno ih održavala u kulturi uz antibiotik.

Za transfekciju stanica AX2 s ekstrakromosomalnim vektorima, skupila sam 5×10^6 stanica, centrifugirala 3 minute na 700 g pri 4 °C i isprala prvo u 30 ml hladnog Sørensen fosfatnog pufera, a zatim u 30 ml hladnog pufera za elektroporaciju. Nakon posljednjeg centrifugiranja, stanice sam resuspendirala u 700 µl hladnog pufera za elektroporaciju i prebacila u ohlađenu kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda od 4 mm (Biorad), dodala 2-3 µg plazmidne DNA i elektroporirala koristeći prethodno pohranjeni protokol za stanice *D. discoideum*: pravokutni valovi s dva pulsa od 1000 V u trajanju 1 ms odvojeni intervalom od 5 s, uz kapacitet od 10 µF. Nakon toga stanice sam prebacila u Petrijevu posudu, inkubirala 15 minuta uz trešnju od 100 rpm pri 22 °C. Zatim sam stanicama dodala otopinu za oporavak stanica u konačnoj koncentraciji 2 mM i nakon dodatnih 15 minuta inkubacije uz trešnju, stanicama sam dodala 10 ml tekuće hranjive podloge HL5 i prebacila u inkubator. Pet do 18 sati nakon transfekcije stanicama sam dodala 10 µg/ml antibiotika G418 i konstantno ih održavala u kulturi uz prisutnost antibiotika.

3.2.4. Isključivanje gena *iqgC* i selekcija klonova *iqgC*⁻

3.2.4.1. Isključivanje gena *iqgC* u soju DdB i selekcija klonova metodama PCR i Western

Stanice soja DdB transfecirala sam vektorom pDM1081_*iqgC*_KO za isključivanje gena *iqgC* homolognom rekombinacijom. Nakon elektroporacije stanice sam ostavila u puferu SorMC uz dodatak *K. aerogenes* i 100 µg/ml higromicina B za selekciju transfektanata. Nakon pet dana inkubacije stanice sam isprala i razrijedila te nasadila na krutu hranjivu podlogu SM uz dodatak 500 µl guste suspenzije *K. aerogenes* ($OD_{600}=100$). Nakon tri dana na podlozi s bakterijama pojavili su se plakovi nastali od pojedinačnih klonova transfeciranih stanica s vidljivim rubom na kojem su stanice u vegetativnoj fazi rasta. Kako bih selektirala zasebne klonove, koristeći sterilne čačkalice, vegetativne stanice s ruba pojedinačnih plakova prebacila

sam u bunariće na pločici s 24 bunarića u kojima sam pripremila po 1 ml pufera SorMC i *K. aerogenes* ($OD_{600}=2$). Kada su stanice u bunarićima narasle do konfluencije, prikupila sam ih i isprala od bakterija te lizirala. Preliminarno pretraživanje klonova u kojima se zbio rekombinacijski događaj provela sam metodom PCR na staničnim lizatima koristeći par početnica od kojih jedna hibridizira s kodirajućim slijedom higromicin fosfotransferaze, a druga na slijed gena *iqgC* nizvodno od 3'-regije homologije (Tablica 3.4.). Pozitivne klonove dalje sam testirala metodom Western koristeći antitijelo anti-IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.). Na nekoliko klonova koji nisu eksprimirali IqgC, provela sam analizu Southern kako bih potvrdila da se u genomu klonova *iqgC* dogodio jedinstveni rekombinacijski događaj na ciljanom mjestu.

3.2.4.2. Izolacija genomske DNA iz mutanata *iqgC*

Kako bih izolirala genomsku DNA iz potencijalnih mutanata *iqgC*, prikupila sam 2×10^8 stanica svakog klona, isprala ih od bakterija dva puta resuspendiranjem u puferu SorMC i centrifugiranjem 5 minuta na 1000 g pri 4 °C. Stanice u talogu zatim sam lagano resuspendirala u 10 ml hladnog pufera NP40 za lizu stalno ih držeći na ledu. Lizirane stanice centrifugirala sam 10 minuta na 7500 g pri 4 °C. Pažljivo sam odvojila supernatant i talog resuspendirala u 1 ml pufera TE/SDS. Suspenziju sam podijelila u dvije epurvete za centrifugiranje od 1,5 ml, dodala po 10 µl proteinaze K i inkubirala uzorke 2 sata pri 60 °C. Nakon kratkog hlađenja, u uzorke sam dodala 10 µl RNaze A i inkubirala ih 1 sat pri 37 °C. Nakon inkubacije, dodala sam 500 µl ohlađenog fenola pri 4 °C, centrifugirala 15 minuta na 15 000 g pri 4 °C i pažljivo prebacila gornju fazu u novu epurvetu za centrifugiranje od 1,5 ml ohlađenu na ledu. Zatim sam ponovila postupak dodavanjem ohlađene smjese fenola i kloroforma (1:1). Nakon uzimanja gornje faze ponovila sam postupak s ohlađenom smjesom kloroforma i izoamilnog alkohola (24:1). Nakon posljednjeg centrifugiranja, gornje faze sam spojila u čistu epurvetu, dodala 1/10 volumena uzorka apsolutnog etanola i dva volumena 3 M natrijevog acetata. Smjesu sam inkubirala preko noći pri -20 °C i sljedeće jutro istaložila gDNA centrifugiranjem 15 minuta na 15 000 g pri 4 °C. Talog DNA sam dva puta isprala s ohlađenim 70 %-tnim etanolom i ponovno centrifugirala. Kako bih uklonila zaostali etanol, talog sam sušila 10 minuta u uređaju za ugušćivanje uzoraka (Savant DNA SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific). Zatim sam talog nježno resuspendirala u 200 µl hladne vode bez nukleaza. Kako bi se gDNA u potpunosti otopila, uzorke sam preko noći inkubirala pri 4 °C. Uspješnost izolacije gDNA provjerila sam elektroforezom u gelu agaroze.

3.2.4.3. Analiza Southern za potvrdu isključivanja gena *iqgC*

Kako bih utvrdila je li kod mutanata *iqgC* došlo do jedinstvenog rekombinacijskog događaja na ciljanom mjestu u genomu koristila sam metodu Southern. 4 µg izolirane gDNA svakog uzorka porezala sam restriksijskim enzimom PacI te sam odsječke digestirane gDNA razdvojila elektroforezom u 0,8 %-tnom gelu agaroze (0,8 g agaroze/0,1 l pufera). Nakon elektroforeze, gel sam uz lagano potresanje inkubirala 10 minuta u 0,25 M HCl i dva puta po 15 minuta u 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5. Kako bih odvojene odsječke gDNA prenijela na pozitivno nabijenu najlonsku membranu lužnatim kapilarnim prijenosom, na most filter papira, čiji su krajevi umočeni u 0,4 M NaOH, složila sam stog koji je od dna prema vrhu sadržavao sljedeće: agarozni gel s gDNA, membranu, filter papir i debeli stog papirnatih ručnika s utegom na vrhu da potpomognem prijenos odsječaka DNA na membranu kapilarnim silama. Nakon prekonoznog prijenosa, membranu sam neutralizirala inkubirajući ju tri puta po 5 minuta u 2x puferu SSC. Zatim sam ju ostavila da se u potpunosti osuši i nakon toga sam fiksirala DNA na membranu izlažući je ultraljubičastom svjetlu valne duljine 254 nm u trajanju od 5 minuta. Za pripremu hibridizacije, membranu sam inkubirala u staklenom cilindru s prethodno zagrijanim hibridizacijskim puferom u hibridizacijskoj pećnici (OV1, Biometra). Zatim sam na membranu dodala hibridizacijski pufer s probom obilježenom digoksigeninom koja hibridizira s higromicinskom kazetom (proba Hyg) te hibridizirala preko noći pri 68 °C. Sljedeće jutro membranu sam isprala tri puta po 20 minuta s prethodno zagrijanim puferom za ispiranje u hibridizacijskoj pećnici pri 65 °C. Membranu sam zatim izvadila iz staklenog cilindra, inkubirala 5 minuta u puferu 1, nakon toga 1 sat u puferu 2 i 30 minuta u puferu 2 s antitijelom anti-DIG (1:10 000) uz lagano potresanje. Potom sam membranu isprala pet puta po 10 minuta u puferu 1 i inkubirala ju dva puta po 5 minuta u puferu 3. Kako bih vizualizirala vrpce DNA na koje je hibridizirala proba, membranu sam inkubirala s 2 ml pufera 3 s dodanim supstratom CSPD (1:100) za kemiluminiscencijsku detekciju u mračnoj sobi. Nakon što sam s membrane uklonila pufer sa supstratom, detektirala sam kemiluminiscentne hibridizacijske signale ekspozicijom membrane pomoću sustava za detekciju kemiluminiscentnih i fluorescentnih signala (Alliance Q9 mini, Uvitec Cambridge). Membranu sam zatim inkubirala u puferu za ispiranje dva puta po 15 minuta pri 42 °C i tri puta po 5 minuta u 2x puferu SSC na sobnoj temperaturi kako bih uklonila probu Hyg. Postupak hibridizacije ponovila sam s probom R koja hibridizira na odsječak gena *iqgC* nizvodno od mjesta homologne rekombinacije, pri temperaturi hibridizacije 60 °C.

3.2.5. Fenotipizacija stanica *iqgC*⁻ u genetičkoj pozadini DdB

3.2.5.1. Ispitivanje rasta stanica soja *D. discoideum* DdB

Za ispitivanje rasta stanica u tekućoj hranjivoj podlozi, stanice divljeg tipa i *iqgC*⁻ genetičke pozadine DdB isprala sam dva puta od bakterija resuspendiranjem stanica u puferu SorMC i centrifugiranjem 5 minuta na 1000 g. Prebacila sam 5×10^4 stanica u triplikatu za svaki dan u bunariće pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića u tekuću hranjivu podlogu HL5 s 18 g/l maltoze i 10 % FBS-a. Rast stanica pratila sam tijekom sedam dana brojeći stanice pomoću brojača za stanice CellDrop (DeNovix). Za praćenje rasta na krutoj podlozi s bakterijama, stanice sam razrijedila i nasadila na krutu hranjivu podlogu SM uz dodatak 500 μ l pripremljene guste suspenzije *K. aerogenes* ($OD_{600}=100$). Tako nasadene stanice održavala sam u inkubatoru pri 22 °C. Koristeći lupu (Discovery.V20, Zeiss) i program ImageJ (Schindelin *i sur.*, 2012.), nakon tri dana sam izmjerila promjer plakova koji su nastali od pojedinačnih *D. discoideum* stanica kako su se hranile bakterijama *K. aerogenes*.

3.2.5.2 Mjerenje kinetike unosa tekućine makropinocitozom

Kako bih usporedila efikasnost makropinocitoze stanica divljeg tipa, *iqgC*⁻ i *iqgC*⁻ s ekstrakromosomalnom ekspresijom *IqgC* u genetičkoj pozadini DdB, stanice sam 24 sata prije izvođenja eksperimenta isprala od bakterija i prebacila u tekuću hranjivu podlogu HL5 uz dodatak 10 % FBS-a i 50 μ g/ml ampicilina i 40 μ g/ml streptomicina kako bi se stanice prilagodile na unos hranjivih tvari makropinocitozom. Kinetiku unosa fluorescentno obilježene tekućine pratila sam kroz 180 minuta. Za svaku vremensku točku (0, 15, 30, 60, 120 i 180 minuta) inkubirala sam $2,5 \times 10^5$ stanica u 700 μ l tekuće hranjive podloge HL5 uz dodatak 10 % FBS-a i 2,5 μ g/ml dekstrana fluorescentno obilježenog fluoroforom *Alexa Fluor 647*. Za svaku vremensku točku stanice sam prikupljala centrifugiranjem 2 minute na 1500 g pri 4 °C, uklonila supernatant i isprala stanice u hladnoj tekućoj hranjivoj podlozi HL5 uz dodatak 0,1 % azida kako bih spriječila egzocitozu. Stanice sam držala na ledu do mjerenja fluorescencije na protočnom citometru (CytOFLEX S, Beckman Coulter), a rezultate sam analizirala koristeći program CytExpert. Od izmjerene vrijednosti fluorescencije za svaku vremensku točku oduzela sam vrijednost mjerenja u nultoj točki te je normalizirala u odnosu na maksimalnu vrijednost divljeg tipa.

3.2.6. Fiksacija stanica *D. discoideum*

Stanice iz kulture prebacila sam na pokrovno stakalce promjera 18 mm i pričekala 30 minuta da se stanice pričvrste za podlogu. Pokrovnice sam zatim nježno isprala u fosfatnom

puferu i stanice fiksirala naglim uranjanjem u ledeni metanol u kojem sam ih inkubirala 5 minuta pri -20 °C. Nakon ispiranja u otopini 10 mM PIPES-a, na stakalce sam dodala 500 µl PBS-glicina koji sam potom zamijenila 70 %-tnim etanolom u kojem su stanice permeabilizirane 1 minutu. Nakon toga sam stakalce isprala PBS-glicinom tri puta po 5 minuta pa zatim puferom PBG tri puta po 5 minuta. Zatim sam na stakalce dodala pufer PBG koji je sadržavao 1 µg/ml boje DAPI i stanice inkubirala u mraku 30 minuta. Ponovila sam ispiranja puferom PBG i ispiranja PBS-glicinom, nakon čega sam stakalce sa stanicama isprala u destiliranoj vodi te stanice uklopila na predmetno stakalce pomoću tekućine za uklapanje, štiteći ih od svjetla. Tako pripremljene preparate sam čuvala pri 4 °C zaštićene od svjetla.

3.2.7. Sustav dva hibrida u kvascu

Za testiranje izravnih interakcija između dva potencijalna interaktora sustavom dva hibrida u kvascu koristila sam soj kvasca AH109 koji sam istovremeno transformirala s vektorima pGBKT7 i pGADT7 (Tablica 3.3. i poglavlje 3.2.1.4.). Prvo sam kvasce nasadila u tekuću kompletnu hranjivu podlogu i inkubirala preko noći pri 30 °C uz trešnju od 200 rpm. Sljedeće jutro, kada su stanice narasle do optičke gustoće $OD_{600}=1 - 1,5$, za svaku transformaciju uzela sam 1 ml kulture, kratko centrifugirala i pažljivo dekantirala supernatant, ostavljajući talog kvasaca u otprilike 100 µl tekuće hranjive podloge. Zatim sam stanicama dodala 2 µl DNA sperme lososa i resuspendirala ih. Nakon toga sam dodala 1-2 µg plazmidne DNA za svaki vektor, 500 µl smjese za nasađivanje i 50 µl DTT-a. Priređenu smjesu sam inkubirala minimalno 6 sati na sobnoj temperaturi, a zatim sam ju izložila temperaturnom šoku pri 42 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon toga sam s dna epurvete izvukla oko 100 µl stanica te ih nasadila na selektivnu krutu hranjivu podlogu i inkubirala pri 30 °C dva do tri dana. Prisutnost oba plazmida u kvascu potvrdila sam rastom transformanata na krutoj hranjivoj podlozi bez leucina i triptofana. Interakcije između testiranih proteina testirala sam rastom transformanata na krutoj hranjivoj podlozi bez leucina, triptofana i histidina uz dodatak 0,5 mM 3-AT.

3.2.8. Proteinska biokemija

3.2.8.1. Afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavkom His

Za pročišćavanje varijanti proteina Rab5A obilježenih nastavkom His iz bakterija *E. coli* prvo sam transformirala bakterije soja Rosetta 2 modificiranim vektorima pET28b (Tablica 3.3. i poglavlje 3.2.1.5.). Zatim sam pojedinačne transformante inkubirala preko noći u tekućoj hranjivoj podlozi LB uz dodatak kloramfenikola i kanamicina pri 37 °C uz trešnju od 220 rpm.

Sljedeće jutro sam kulturu razrijedila 1:100 u 1 l obogaćene tekuće hranjive podloge LB uz antibiotike i Extran AP-33. Kada su bakterije narasle do optičke gustoće $OD_{600}=0,5 - 0,7$, dodala sam IPTG tako da mu konačna koncentracija bude 0,8 mM kako bih inducirala ekspresiju proteina obilježenih nastavkom His. Bakterije sam dalje inkubirala pri 21 °C uz trešnju od 150 rpm te sam ih nakon 3 sata skupila centrifugiranjem. Bakterijske taloge sam lizirala u puferu za lizu stanica uz dodatak 0,2 mg/ml lizozima i 1x smjese inhibitora proteaza te nakon inkubacije 10 minuta u hladnoj sobi na magnetnoj mješalici, lizate sam sonicirala dva puta po 3 minute hladeći ih cijelo vrijeme u ledenoj kupelji. Zatim sam proteine obilježene nastavkom His iz pripremljenih lizata pročistila afinitetnom kromatografijom koristeći HisTrap HP kolonu (GE Healthcare Europe GmbH) i sustav za kromatografiju Äkta FPLC (GE Healthcare Europe GmbH) prateći objavljeni protokol (Smith i Rittinger, 2002). Rab5A(wt) i Rab5A(Q68L) dodatno sam pročistila gel-filtracijom na koloni HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare Europe GmbH) koristeći sustav za kromatografiju Äkta pure (Cytiva, Global Life Sciences Solutions). Frakcije bogate proteinom Rab5A sam spojila, dijalizirala pomoću glicerola i spremila pri -20 °C. Čistoću pročišćenih proteina provjerila sam elektroforezom u 12 %-tnom poliakrilamidnom gelu koji sam nakon elektroforeze obojala bojom *Coomassie* briljant plavo.

3.2.8.2. Afinitetno pročišćavanje rekombinantnih proteina obilježenih nastavkom GST

Za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom GST iz bakterija *E. coli* prvo sam transformirala bakterije soja Rosetta 2 modificiranim vektorima pGEX-6P-1 (Tablica 3.3.). Zatim sam pojedinačne transformante inkubirala preko noći u tekućoj hranjivoj podlozi LB uz dodatak kloramfenikola i ampicilina i pripremila kulture za indukciju kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Ekspresiju proteina obilježenih nastavkom GST inducirala sam dodatkom IPTG-a tako da mu konačna koncentracija bude 0,75 mM (u slučaju GST-IqgC_RasGAP, GST-IqgC_RGcT i GST-Rab5A) i 0,3 mM (u slučaju GST-EEA1⁽¹⁻²⁰⁹⁾). Indukcija se odvijala preko noći pri 21 °C uz trešnju pri 150 rpm. Sutradan sam bakterije skupila centrifugiranjem te sam ih lizirala u puferu za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom GST uz dodatak 0,2 mg/ml lizozima i 1x smjese inhibitora proteaza. Lizate sam dodatno sonicirala tri puta po 1 minutu hladeći ih cijelo vrijeme u ledenoj kupelji. Nakon toga sam lizate centrifugirala 1 sat na 16 000 g pri 4 °C i supernatante prenijela na glutation-agarozu prethodno ispranu puferom za pročišćavanje. Smjese sam inkubirala 2 sata u hladnoj sobi na rotacijskoj mješalici kako bi se proteini obilježenih nastavkom GST vezali na glutation-agarozu. Za vezivanje proteina GST-IqgC i GST koji su prethodno pročišćeni u laboratoriju, proteine sam

dodala na ispranu glutation-agarozu i također inkubirala 2 sata na rotacijskoj miješalici u hladnoj sobi. Nakon vezivanja, glutation-agarozu s vezanim proteinima sam isprala pet puta u puferu za pročišćavanje proteina obilježenih nastavkom GST. Čistoću i prinos pročišćenih proteina provjerila sam elektroforezom i bojanjem kako je opisano u prethodnom poglavlju.

3.2.8.3. Metoda *pull-down*

Za testiranje proteinskih interakcija koristila sam metodu *pull-down*. Za testiranje izravne interakcije proteina IqgC i Rab5A biokemijskom metodom, koristila sam cjeloviti GST-IqgC ili skraćene varijante te pročišćene varijante Rab5A obilježene nastavkom His. Na 50 µl isprane glutation-agaroze s navezanim proteinom GST-IqgC dodala sam 1 ml hladnog pufera za *pull-down* s pročišćenim proteinima i oko 3,5 µg proteina Rab5A. Smjesu sam inkubirala u hladnoj sobi na rotacijskoj miješalici 2 sata i zatim sam zrnca agaroze isprala pet puta s hladnim puferom. Vezane proteine sam potom denaturirala kuhanjem 5 minuta u SDS puferu za nanošenje uzoraka na gel. Isti postupak napravila sam i s pročišćenim proteinom GST, kao negativnom kontrolom. Vezanje varijanti Rab5A obilježenih nastavkom His za GST-IqgC, odnosno GST, analizirala sam metodom Western koristeći antitijelo anti-His.

Za usporedbu količine aktivne GTPaze Rab5A u stanicama s različitom razinom ekspresije proteina IqgC koristila sam metodu GST-EEA1⁽¹⁻²⁰⁹⁾ *pull-down* s lizatima AX2 stanica divljeg tipa i *iqgC* koje eksprimiraju YFP-Rab5A. Skupila sam po 4 x 10⁷ stanica, isprala ih u hladnom fosfatnom puferu Sørensen i lizirala u 1,5 ml pufera za *pull-down* sa staničnim lizatima. Nakon kratke inkubacije na ledu, lizate sam centrifugirala 15 minuta na 16 000 g pri 4 °C. Supernatante sam pažljivo prebacila u čiste epruvete od 2 ml i dodala im 50 µl glutation-agaroze s navezanim GST-EEA1⁽¹⁻²⁰⁹⁾. Nakon 2 sata inkubacije na rotacijskoj miješalici u hladnoj sobi, uzorke sam pet puta isprala u hladnom puferu i vezane proteine denaturirala kuhanjem 5 minuta u SDS puferu za nanošenje uzoraka u gel. Rezultate sam analizirala metodom Western koristeći antitijelo anti-GFP. Na isti način sam napravila i GST-IqgC *pull-down* za testiranje afiniteta vezanja različitih mutanata Rab5A. *Pull-down* je rađen s lizatima stanica AX2 koje su eksprimirale mutirane varijante Rab5A obilježene proteinom YFP, a vezanje je analizirano pomoću antitijela anti-GFP.

3.2.8.4. Metoda koimunoprecipitacije

Kako bih testirala nalaze li se proteini Rab5A, Rab21, VatC i VatE u stanici u kompleksu s IqgC, koristila sam metodu koimunoprecipitacije pomoću antitijela anti-IqgC s lizatima stanica AX2 koje eksprimiraju Rab5A, Rab21, VatC i VatE obilježene proteinom YFP.

Za svaki uzorak koristila sam 50 μ l sefaroze s proteinom A koju sam prethodno isprala puferom za lizu. Za pripremu lizata uzela sam $1,2 \times 10^8$ stanica po uzorku, isprala ih hladnim fosfatnim puferom Sørensen i taloge stanica lizirala u hladnom puferu za lizu. Nakon 10 minuta inkubacije na ledu, lizate sam centrifugirala 10 minuta na 7179 g pri 4 °C i pažljivo odvojila supernatant. Na pripremljenu sefarozu sam zatim dodala antitijelo anti-IqgC i stanične lizate te sam ih inkubirala dva sata na rotacijskoj miješalici pri 8 °C u hladnoj sobi, nakon čega sam ih isprala pet puta puferom za lizu. Proteine vezane na antitijelo i sefarozu denaturirala sam kuhanjem 5 minuta u SDS puferu za nanošenje uzoraka u gel. Uzorke sam analizirala metodom Western koristeći antitijelo anti-GFP. Kao negativnu kontrolu napravila sam eksperiment bez antitijela.

3.2.8.5. Točkasto bugaćenje lipida

Za testiranje interakcija proteina IqgC s lipidima zastupljenima u staničnim membranama, koristila sam *PIP Strip* i *PIP Array* membrane s prethodno nanešenim lipidima na kružne površine ili „točke“ na membrani. Membrana *PIP Strip* sadrži fosfatidilinozitol, svih sedam fosfoinozitida i još sedam biološki važnih lipida, dok membrana *PIP Array* sadrži padajuće koncentracije fosfatidilinozitola i fosfoinozitida (vidi poglavlje 3.1.6.4.). Za pozitivnu kontrolu imunodetekcije, na dno suhe membrane prvo sam dodala kapljicu pročišćenog proteina IqgC i pričekala da se osuši. Membranu sam potom inkubirala sat vremena u otopini za blokiranje membrane uz lagano potresanje. Zatim sam na membranu dodala stanični lizat kojeg sam pripremila od 1×10^7 stanica za svaki soj, ispranjem stanica u hladnom fosfatnom puferu Sørensen i nakon centrifugiranja 3 minute na 700 g pri 4 °C, liziranjem taloga u 600 μ l pufera RIPA uz dodatak inhibitora proteaza. Nakon inkubacije lizata 45 minuta na ledu i centrifugiranja 20 minuta na 15 900 g pri 4 °C, supernatant sam prebacila u čistu epurvetu od 1,5 ml i dodala malo otopine za blokiranje prije prebacivanja uzorka na membranu. Nakon inkubiranja membrane 1 sat sa staničnim lizatom, membranu sam isprala pet puta po 5 minuta s puferom za ispiranje. Zatim sam membranu inkubirala sat vremena u otopini za blokiranje s primarnim antitijelom anti-IqgC i nakon ponovnog ispiranja pet puta, membranu sam inkubirala 40 minuta sa sekundarnim antitijelom u otopini za blokiranje. Nakon ispiranja šest puta s puferom za ispiranje, na membranu sam nanijela smjesu supstrata *Clarity Western ECL* zaštićenu od svjetla prema uputama proizvođača i rezultate dokumentirala pomoću sustava za detekciju kemiluminiscentnih i fluorescentnih signala (Alliance Q9 mini, Uvitec Cambridge).

U slučaju kada sam koristila pročišćeni protein IqgC za točkasto bugaćenje lipida, nakon blokiranja, na membranu sam dodala 1-2 μ g proteina u otopini za blokiranje i inkubirala 1 sat.

Nakon inkubacije s proteinom, membranu sam isprala par puta i daljnji postupak inkubacije s primarnim i sekundarnim antitijelima razrijeđenima u otopini za blokiranje i detekcija signala bili su isti kao u metodi Western s protokolom za kolorimetrijsku detekciju (vidi poglavlje 3.2.8.6.).

3.2.8.6. Metoda Western

Rezultate koimunoprecipitacije i metode *pull-down* analizirala sam metodom Western. Nakon vertikalne elektroforeze u denaturirajućem gelu, koristila sam sustav za polumokri elektroprijenos kako bih proteine s gela prenijela na membranu PVDF. Membranu sam aktivirala uranjanjem u metanol i zatim sam na donjoj ploči sustava za polumokri prijenos složila stog od filter-papira, membrane, gela te još jednog filter-papira, a sve sam prethodno dobro natopila puferom za prijenos. Nakon 1 sata i 15 minuta elektroprijenosa pod naponom od 12 V, membranu sam kratko ekvilibrirala u puferu za ispiranje i sat vremena inkubirala u otopini za blokiranje uz lagano potresanje. Nakon toga inkubirala sam membranu s primarnim antitijelom, razrijeđenim u otopini za blokiranje, jedan sat uz lagano potresanje. Membranu sam zatim pet puta isprala puferom za ispiranje i inkubirala sa sekundarnim antitijelom, razrijeđenim u puferu za ispiranje, jedan sat uz lagano potresanje. Zatim sam ponovno isprala membranu pet puta puferom za ispiranje i proteinske vrpce s vezanim antitijelom vizualizirala metodom kemiluminiscencije. Na membranu sam nanijela smjesu supstrata *Clarity Western ECL* zaštićenu od svjetla prema uputama proizvođača i rezultate dokumentirala pomoću sustava za detekciju kemiluminiscentnih i fluorescentnih signala (Alliance Q9 mini, Uvitec Cambridge).

U nekim slučajevima za imunodetekciju proteina koristila sam kolorimetrijsku metodu. Nakon elektroforeze u denaturirajućem gelu i polumokrog elektroprijenosa proteina pod istim uvjetima na nitroceluloznu membranu, blokirala sam membranu 2 sata i zatim je inkubirala s primarnim antitijelom razrijeđenom u 1x puferu NCP preko noći uz lagano potresanje. Nakon ispiranja, membranu sam inkubirala sa sekundarnim antitijelom konjugiranim s alkalnom fosfatazom razrijeđenom u 1x puferu NCP dva sata uz lagano potresanje. Nakon ponovnog ispiranja membrane, signale sam detektirala dodajući na membranu supstrate za alkalnu fosfatazu BCIP i NBT u puferu za razvijanje prema uputama proizvođača. Prateći razvijanje proteinskih vrpce, reakciju sam zaustavila ispiranjem membrane u destiliranoj vodi.

3.2.8.7. Testiranje aktivnosti GAP

Kako bih testirala aktivnost GAP proteina IqgC prema GTPazi Rab5A koristila sam komplet *GTPase-GloTM Assay kit* prema uputama proizvođača. Testiranje aktivnosti GAP se temelji na prevođenju GTP-a preostalog u GTPaznoj reakciji u ATP pomoću enzima nukleozid-

difosfatske kinaze uz dodatak ADP-a. Stvoreni ATP, uz dodatak luciferaze i njezinog substrata luciferina u reagensu za detekciju, pomaže oksidaciju luciferina i pojavu svjetla (Mondal *i sur.*, 2015.). Što je GTPazna aktivnost u uzorku veća, ostat će manje nehidroliziranog GTP-a koji se može prevesti u ATP i luminiscencija će biti niža. Drugim riječima, očitana luminiscencija uzorka je obrnuto proporcionalna hidrolizi GTP-a u uzorku. Potencijalni protein od interesa, u ovom slučaju IqgC, inkubirala sam s ciljanom GTPazom, konkretno Rab5A(wt). Prvo sam u bijele mikrotitarske pločice s 384 bunarića u triplikatu dodala 5 µl reakcijske smjese s 10 µM GTP-om i proteinom IqgC u padajućim koncentracijama (4,3 µM; 2,2 µM; 1,1 µM; 0,54 µM i 0,27 µM) u puferu GTPase/GAP. Zatim sam inicirala GTPaznu reakciju dodavanjem 5 µl reakcijske smjese s 1 mM DTT i 1 µM GTPazom Rab5A(wt) u puferu GTPase/GAP i inkubirala pločice 2 sata pri 22 °C. Zatim sam svakoj smjesi dodala 10 µl GTP-Glo reagensa s 10 mM ADP-om i inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi uz trešnju. Smjesama sam potom dodala po 20 µl detekcijskog reagensa i nakon 5-10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerila luminiscenciju pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Infinite 200, Tecan).

Zatim sam testirala utjecaj Rab5A na aktivnost GAP proteina IqgC prema GTPazama Ras, humanoj GTPazi H-Ras i *D. discoideum* GTPazi RasG. Za testiranje utjecaja Rab5A na aktivnost GAP proteina IqgC prema humanoj GTPazi H-Ras koristila sam 1 µM H-Ras i 2,2 µM IqgC kako je opisano ranije (Marinović *i sur.*, 2019.), sa i u odsutnosti 1 µM pročišćenog proteina Rab5A(Q68L). Za testiranje utjecaja Rab5A na aktivnost GAP proteina IqgC prema *D. discoideum* GTPazi RasG, afinitetno sam pročistila i imobilizirala GST-RasG(Q61L) na glutation-agarozu i tako pripremljen protein koristila u eksperimentu. U epurvetu od 0,5 ml dodala sam 50 µl GTPase/GAP pufera s 10 µM GTP-om, 0,14 µM IqgC i Rab5A(Q68L) (1 µM ili 2 µM). Zatim sam u smjesu dodala 15 µl glutation-agaroze s vezanim RasG(Q61L). Reakcijske smjese inkubirala sam 2 sata na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi i nakon kratkog centrifugiranja, raspodijelila reakcijske smjese u triplikatu u bijele pločice s 96 bunarića. Zatim sam dodala jednaki volumen reagensa GTPase Glo uz dodatak 10 mM ADP-a i inkubirala reakcijske smjese 30 minuta pri sobnoj temperaturi uz potresanje. Po završetku inkubacije dodala sam dva volumena detekcijskog reagensa i nakon 5-10 minuta inkubacije izmjerila luminiscenciju pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Infinite 200, Tecan).

3.2.9. Konfokalna mikroskopija

Za praćenje prostorno-vremenske raspodjele fluorescentnih proteina u živim i fiksiranim stanicama *D. discoideum* koristila sam fluorescencijski pretražni konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems). Kako bih pripremila stanice za

mikroskopiranje, u posudicu za stanične kulture promjera 35 mm sa staklenim dnom (MatTek) dodala sam 2 ml stanične kulture u tekućoj hranjivoj podlozi HL5 i ostavila ih 30 minuta pri 22 °C kako bi stanice adherirale za podlogu. Za vrijeme praćenja formiranja makropinosoma, stanice su se nalazile u tekućoj hranjivoj podlozi HL5, s ili bez dodanog 2 mg/ml dekstrana obilježenog fluorescentnom bojom TRITC (Mr 70 kDa, TdB Labs) koji je služio kao fluorescentni biljeg tekuće faze, dok sam za praćenje fagocitoze u tekuću hranjivu podlogu HL5 dodala kvasce obilježene fluorescentnom bojom TRITC koji su prethodno sonicirani. Ekscitacijske valne duljine i rasponi detekcija koje sam koristila tijekom mikroskopiranja bili su: 405 nm i 430-475 nm za DAPI, 488 nm i 498-550 nm za GFP, 511 nm i 520-565 nm za YFP, 565 nm i 575-650 nm za TRITC, 585 nm i 592-650 nm za mRFP. Za praćenje kolokalizacije Rab5A s IqgC ili probom za aktivni Ras (mRaf1_RBD) na makropinosomima snimala sam jednu te istu fokalnu ravninu uz brzinu snimanja od 1,72 s po slici. Na svakoj snimljenoj slici izmjeren je intenzitet signala na nekoliko lokacija duž membrane makropinosoma koristeći program ImageJ (Schindelin *i sur.*, 2012.). Rezultat za svaku sliku odnosno vremensku točku, dobila sam iz srednje vrijednosti intenziteta izmjerenih na svim lokacijama. Vrijeme t_0 označava trenutak zatvaranja makropinosoma. Sve dobivene vrijednosti normalizirane su dijeljenjem s konačnim dobivenim intenzitetom u t_0 radi usporedbe intenziteta kroz vremensku seriju.

Za mjerenje veličine makropinosoma u stanicama genetičke pozadine DdB i praćenje vremena zadržavanja proteina IqgC i probe za aktivni Ras na zatvorenim makropinosomima u stanicama AX2 koristila sam fluorescencijski konfokalni mikroskop s rotirajućim diskom Dragonfly (Andor, Oxford Instruments). Ekscitacijske valne duljine i rasponi detekcija koje sam koristila tijekom mikroskopiranja bili su: 488 nm i 502-540 nm za GFP, 514 nm i 523-590 nm za YFP. Za mjerenje veličine makropinosoma, stanice uzgajane u puferu SorMC s bakterijama sam dan ranije isprala i nasadila u posudicu sa staklenim dnom (MatTek) u tekućoj hranjivoj podlozi HL5 uz dodatak 10 % FBS-a kako bi se stanice naviknule na tekuću podlogu kao izvor hrane. Stanice koje eksprimiraju GFP-mRaf1_RBD snimala sam tijekom tri dana u načinu rada *xyzt* s prosječnom brzinom od 1,8 s po nizu optičkih sekcija (*z-stack*) s razmakom od otprilike 0,5 μm , dajući u prosjeku 8 z-sekcija po jednom nizu. Za određivanje vremena zadržavanja IqgC i probe za aktivni Ras na zatvorenom makropinosomu, stanice koje eksprimiraju YFP-IqgC ili GFP-mRaf1_RBD snimala sam u načinu rada *xyzt* pod istim uvjetima, također tijekom tri dana. Veličinu makropinosoma odredila sam mjereći duljinu najduže osi makropinosoma nakon zatvaranja pomoću programa ImageJ (Schindelin *i sur.*, 2012.). Vrijeme zadržavanja proteina IqgC i probe za aktivni Ras na makropinosomu definirano

je od trenutka zatvaranja makropinosoma (t_0) do trenutka kada proba više nije bila vidljiva na makropinosomu.

3.2.10. Statistička obrada rezultata

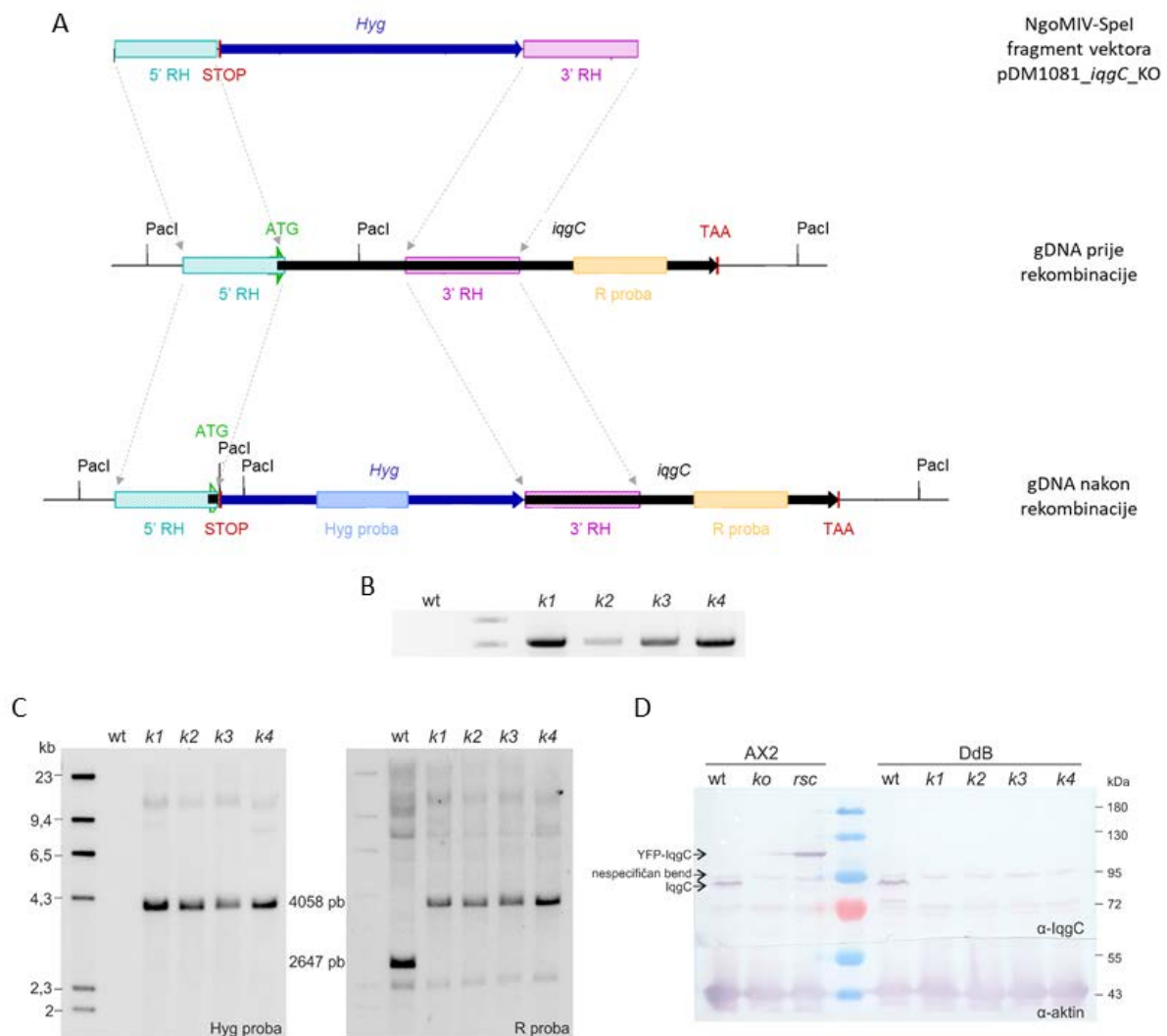
Za statističku usporedbu podataka za rast stanica u tekućoj hranjivoj podlozi i makropinocitozu između stanica divljeg tipa i *iqgC* koristila sam Welchov t-test. Kako bih usporedila veličine makropinosoma i vremena zadržavanja IqgC i probe za aktivni Ras koristila sam Kruskal-Wallisov test. Za statističku analizu rezultata analize aktivnosti GAP koristila sam jednosmjerni test ANOVA uz post-hoc Tukey-Kramerovu analizu. Statistička značajnost definirana je na razini $p < 0,05$ za sve analize.

4. Rezultati

4.1. Strategija i konstruiranje stanica deficijentnih za gen *iqgC* u genetičkoj pozadini soja DdB

IqgC je prisutan na membrani nastajućih makropinosoma te, djelujući kao RasGAP za malu GTPazu RasG, negativno regulira proces makropinocitoze. Međutim, isključivanje gena *iqgC* u akseničnom soju AX2 rezultiralo je vrlo malim povećanjem efikasnosti makropinocitoze, bez poboljšanja rasta stanica u tekućoj hranjivoj podlozi (Marinović *i sur.*, 2019.). Aksenični sojevi amebe *D. discoideum* su bili selektirani prema njihovoj sposobnosti rasta u tekućoj hranjivoj podlozi bez bakterija što ih razlikuje od divljih sojeva koji se u prirodi primarno hrane bakterijama, tj. procesom fagocitoze, dok im je makropinocitoza u velikoj mjeri suprimirana i nedostatna za preživljavanje u tekućoj hranjivoj podlozi (Williams i Kay, 2018.). Razlog tome je ekspresija proteina NF1 koji snažno inhibira aktivnost GTPaza iz obitelji Ras i time ograničava veličinu makropinosoma u divljim amebama. U akseničnim sojevima je došlo do delecije ovog gena što je uzrok konstitutivno pojačane makropinocitoze (Bloomfield *i sur.*, 2015.). Zbog toga smo pretpostavili da bi delecija gena *iqgC*, iako ima minimalne efekte na unos tekućine u akseničnom soju, mogla imati značajnije posljedice na makropinocitozu u divljem soju *D. discoideum*, u kojem makropinocitoza nije već pojačana zbog delecije gena NF1. Kako bih testirala ovu hipotezu, isključila sam gen *iqgC* u genetičkoj pozadini divljeg soja DdB. U tu svrhu konstruirala sam vektor za isključivanje gena *iqgC* homolognom rekombinacijom (Slika 3.1.), razgradila ga restrikcijskim enzimima NgoMIV i SpeI te defosforilirala. S tako pripremljenim vektorom transfecirala sam stanice *D. discoideum* soja DdB. Strategija isključivanja gena *iqgC* prikazana je na Slici 4.1.A. Preliminarni probir klonova s delecijom gena *iqgC* (stanice *iqgC*⁻), koji su selektirani prema rastu u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak higromicina, provela sam metodom PCR koristeći početnice komplementarne higromicinskoj kazeti i fragmentu gena *iqgC* nizvodno od 3'-regije homologije (Slika 4.1.B). Klonove s kojih sam uspješno umnožila PCR-produkt, dalje sam testirala analizom Southern. Koristila sam probu koja hibridizira s higromicinskom kazetom (proba Hyg) kako bih provjerila je li kod tih klonova došlo do jedinstvenog rekombinacijskog događaja (Slika 4.1.C). Potom sam membranu isprala i rehibridizirala s probom koja hibridizira s odsječkom gena *iqgC* nizvodno od mjesta homologne rekombinacije (proba R) kako bih dodatno potvrdila je li došlo do rekombinacije na ciljanom mjestu u genomu. Deleciju gena *iqgC* potvrdila sam i metodom

Western koristeći antitijelo anti-IqgC čime sam pokazala da u stanicama *iqgC*⁻ nema ekspresije proteina IqgC (Slika 4.1.D).



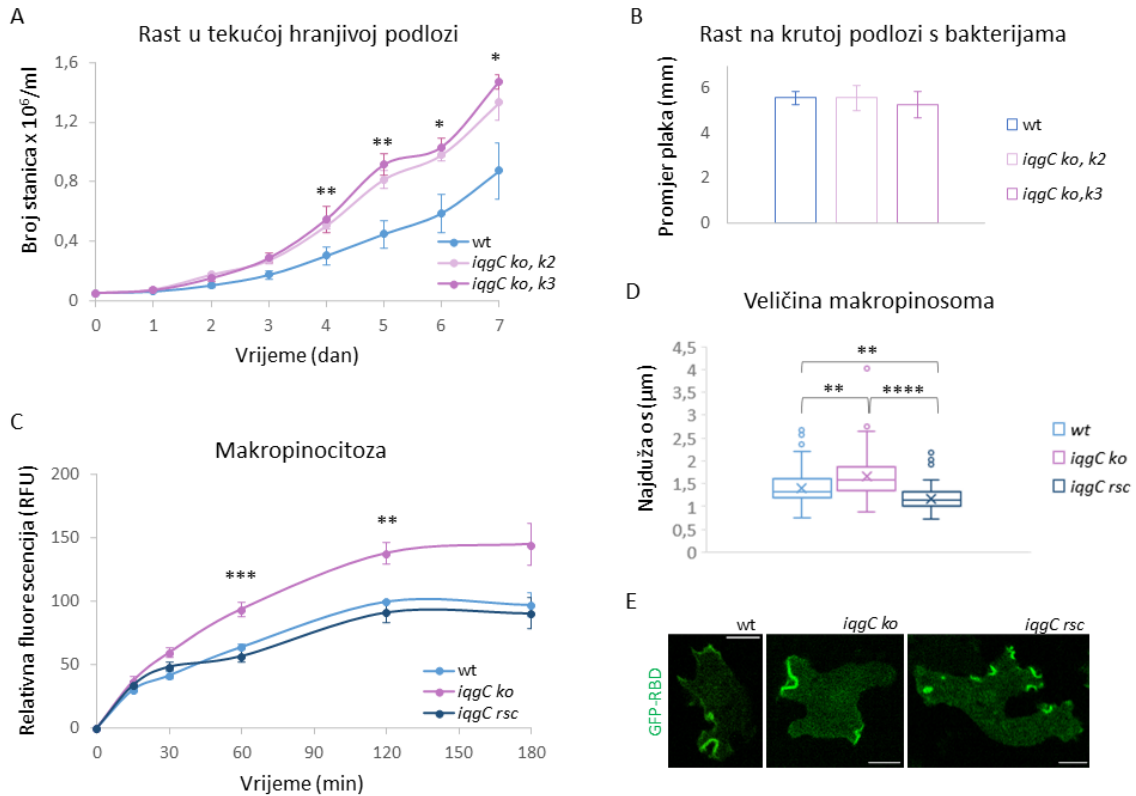
Slika 4.1. Uspješno isključivanje gena *iqgC* u soju DdB potvrđeno je metodama PCR, Southern i Western.

A) Strategija isključivanja gena *iqgC* prikazana je shemom homologne rekombinacije na ciljanom mjestu u genomu. Kazeta koja nosi rezistenciju na higromicin (Hyg) omeđena je 5'- (5' RH) i 3'- (3' RH) regijama homologije gena *iqgC*, a nakon 5'-regije homologije nalaze se STOP-kodoni u sva tri okvira čitanja. Homolognom rekombinacijom dolazi do zamjene dijela gena *iqgC* između regija homologije s higromicinskom kazetom te ugradnje STOP-kodona unutar kodirajućeg slijeda gena. Klonovi su selektirani uzgojem u tekućoj hranjivoj podlozi koja sadrži higromicin. **B)** Preliminarni probir stanica napravljen je metodom PCR koristeći početnice koje daju PCR-produkt veličine 1071 pb samo s gDNA klonova *iqgC* (*k1-k4*). **C)** Pozitivni klonovi dalje su provjeravani metodom Southern koristeći genomsku DNA porezanu restriksijskim enzimom PacI. Jedinstveni rekombinacijski događaj u klonovima *iqgC* potvrđen je upotrebom probe koja hibridizira s higromicinskom kazetom (proba Hyg) te daje 1 vrpcu veličine 4058 pb samo u klonovima u kojima je deletiran gen *iqgC* (*k1-k4*). Homologna rekombinacija na ciljanom mjestu u genomu dodatno je potvrđena probom koja hibridizira s odsječkom gena *iqgC* nizvodno od mjesta homologne rekombinacije (proba R) i daje vrpcu veličine 2647 pb s gDNA stanica divljeg tipa (wt) i vrpcu veličine 4058 pb s gDNA *iqgC* klonova (*k1-k4*). **D)** Metodom Western koristeći antitijelo anti-IqgC potvrđen je izostanak ekspresije proteina IqgC u klonovima *iqgC*. Kao kontrola su korištene stanice divljeg tipa (wt) sojeva AX2 i DdB te stanice *iqgC* (*ko*) i *iqgC* kojima je ekspresija proteina IqgC obnovljena s ekstrakromosomalnog vektora u AX2 genetičkoj pozadini (*rsc*).

4.2. Stanice *iqgC*⁻ u genetičkoj pozadini DdB imaju efikasniju makropinocitozu u odnosu na stanice divljeg tipa

Kako bih pokazala konzistentnost fenotipa između klonova *iqgC*⁻, usporedila sam rast dva neovisna klona u različitim uvjetima. Prvo sam usporedila rast klonova *iqgC*⁻ u tekućoj hranjivoj podlozi tijekom sedam dana pri čemu su stanice oba testirana klona pokazale značajno bolji rast u usporedbi sa stanicama divljeg tipa (Slika 4.2.A). Zatim sam usporedila rast klonova *iqgC*⁻ na krutoj podlozi s bakterijama i opet su oba klona pokazala usporedive brzine rasta, koje se, međutim pod ovim uvjetima, nisu razlikovale od brzine rasta stanica divljeg tipa (Slika 4.2.B). Stoga sam daljnje analize provodila s jednim klonom koji sam nazvala *iqgC*⁻.

S obzirom na hipotezu da IqgC ima značajan utjecaj na makropinocitozu u DdB genetičkoj pozadini te činjenicu da je brzina rasta stanica u tekućoj hranjivoj podlozi odraz efikasnosti unosa tekućine u stanicu, testirala sam unose li stanice *iqgC*⁻ više tekućine u jedinici vremena, odnosno izvode li makropinocitozu efikasnije. Praćenjem kinetike unosa tekućine kojoj je bio dodan fluorescentno obilježeni dekstran potvrdila sam da stanice *iqgC*⁻ značajno bolje makropinocitiraju u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 4.2.C). Kako bih potvrdila da je ovaj fenotip posljedica nedostatka proteina IqgC, u stanicama *iqgC*⁻ sam eksprimirala fluorescentno obilježeni protein IqgC s ekstrakromosomalnog vektora (Prilog 1.). Egzogen ekspresija proteina IqgC uspješno je revertirala fenotip stanica *iqgC*⁻ na fenotip stanica divljeg tipa (Slika 4.2.C). Ranije je pokazano da protein IqgC regulira veličinu makropinosoma u akseničnom soju AX2 (Marinović *i sur.*, 2019.). Kako bih provjerila utječe li IqgC na veličinu makropinosoma i u soju DdB, usporedila sam veličine makropinosoma u divljem tipu, stanicama *iqgC*⁻ i *iqgC*⁻ s eksprimiranim mCherry-IqgC, koristeći probu za aktivni Ras koja je lokalizirana na nascentnom makropinosomu. Zaista, stanice deficitarne za IqgC imale su značajno veće makropinosome u odnosu na stanice divljeg tipa, dok je ekstrakromosomalna ekspresija IqgC uzrokovala smanjenje makropinosoma na veličine statistički značajno manje čak i od onih u stanicama divljeg tipa (Slika 4.2.D). Iz ovih rezultata zaključujemo da protein IqgC ima značajnu negativnu ulogu u regulaciji makropinocitoze u stanicama soja DdB jer ograničava veličinu makropinosoma inhibirajući aktivnost proteina RasG. U skladu s time, na membrani stanica *iqgC*⁻ s ekstrakromosomalnom ekspresijom proteina IqgC primjećujemo brojne male makropinocitotske čašice obilježene probom za aktivni Ras (Slika 4.2.E).



Slika 4.2. Protein IqqC ima značajnu ulogu u regulaciji makropinocitoze u DdB genetičkoj pozadini. A) *iqqC* (*iqqC ko*) klonovi (*k2* i *k3*) bolje rastu u tekućoj hranjivoj podlozi s dodatkom 10% FBS-a u usporedbi sa stanicama divljeg tipa (wt). **B)** *iqqC* klonovi ne pokazuju razlike u brzini rasta na krutoj podlozi s bakterijama u odnosu na stanice divljeg tipa. **C)** *iqqC* stanice uspješnije makropinocitiraju u usporedbi sa stanicama divljeg tipa i stanicama *iqqC* koje ekspimiraju fluorescentno obilježeni protein IqqC (*iqqC rsc*). **D)** Mjerenje najduže osi makropinosoma (a) pokazuje da stanice *iqqC* stvaraju značajno veće makropinosome u usporedbi sa stanicama divljeg tipa i stanicama s ekstrakromosomalnom ekspresijom proteina IqqC: a(wt)=1,3 (1,2-1,6) μm , n=80; a(*iqqC ko*)=1,6 (1,4-1,9) μm , n=77; a(*iqqC rsc*)=1,1 (1,0-1,3) μm , n=81 (medijan, interkvartilni raspon). **E)** Reprezentativne slike stanica divljeg tipa, *iqqC* bez i s ekstrakromosomalnom ekspresijom proteina IqqC koje ekspimiraju probu za aktivni Ras. Razina značajnosti u A, C i D prikazana je kako slijedi: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Rezultati su dobiveni iz minimalno tri eksperimenta i prikazani kao srednja vrijednost \pm SD u A i B, ili kao srednja vrijednost \pm SEM u C. Veličina mjerila u E iznosi 5 μm .

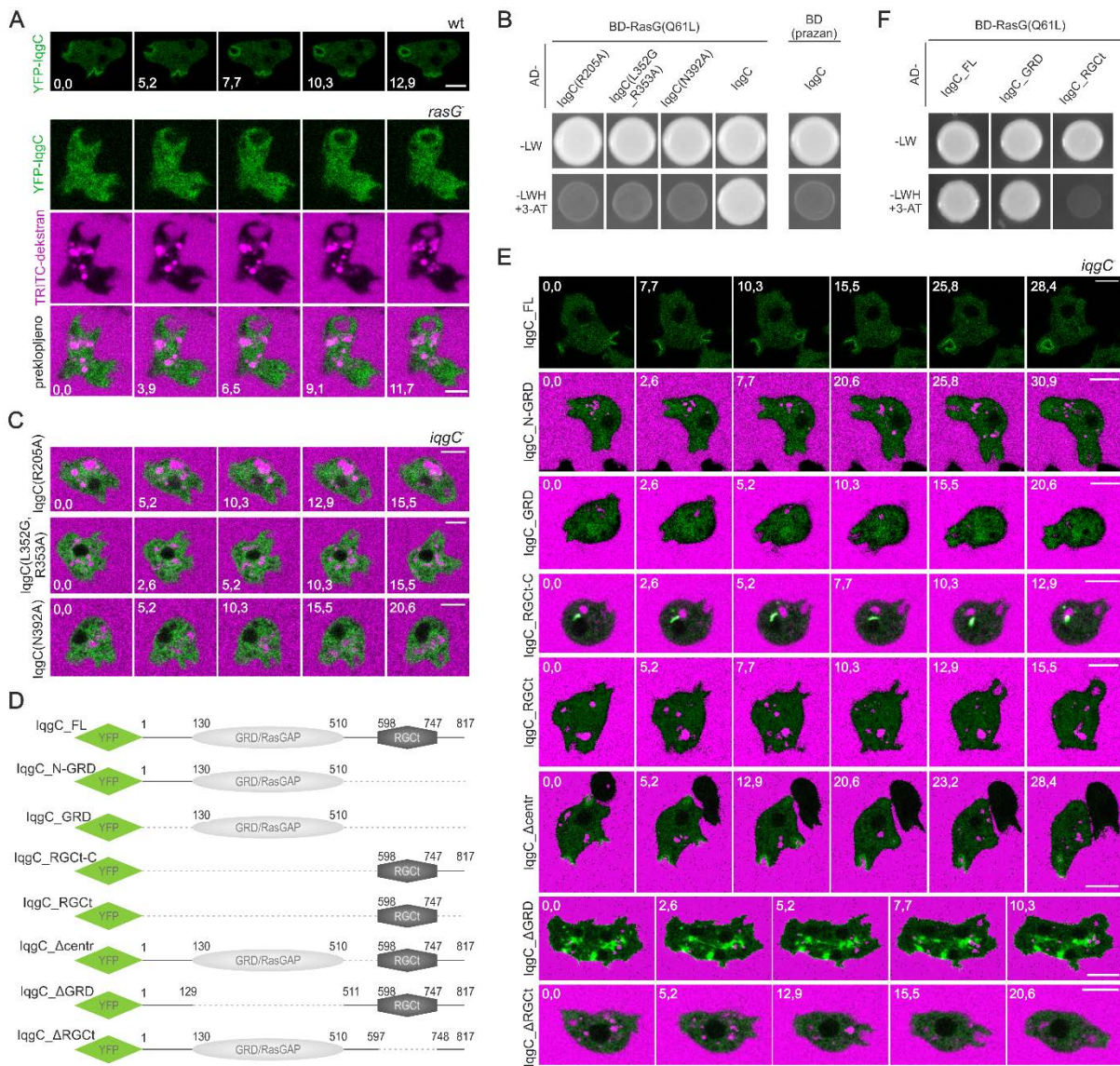
4.3. Regrutacija IqqC na makropinocitotske čašice je ovisna o RasG

Ranije istraživanje je pokazalo da, iako su IqqC i proba za aktivni Ras kolokalizirani na makropinosomu, IqqC ostaje na internaliziranoj vezikuli neko vrijeme nakon što je proba za aktivni Ras disocirala, odnosno, nakon što je došlo do deaktivacije GTPaza Ras (Marinović *i sur.*, 2019.). S obzirom na takvu dinamiku pretpostavili smo da je IqqC uključen u funkcije tijekom ranog sazrijevanja makropinosoma koje su neovisne o RasG. Međutim, do sada nije istraženo je li RasG potreban za regrutaciju IqqC na makropinocitotske čašice tijekom stvaranja makropinosoma. Kako bih to istražila, u stanicama deficitarnima za RasG ekspimirala sam fluorescentno obilježeni IqqC. Unos fluorescentno obilježene tekuće hranjive podloge pratila

sam konfokalnom mikroskopijom i opazila da IqgC nije lokaliziran na makropinosomima u odsutnosti proteina RasG (Slika 4.3.A). Zatim sam, sravnivanjem sljedova aminokiselina domena RasGAP proteina IqgC i humanog proteina p120^{GAP}/RASA1, identificirala amiokiseline u proteinu IqgC koje su odgovorne za interakciju s GTPazama iz obitelji Ras (Prilog 2.) (Scheffzek *i sur.*, 1997.). Mutirala sam triplete baza za spomenute aminokiselinske ostatke te sam, koristeći sustav dva hibrida u kvascu, pokazala da tako mutirane varijante proteina IqgC zaista ne stupaju u interakciju s proteinom RasG (Slika 4.2.B). Potom sam fluorescentno obilježene mutirane varijante proteina IqgC eksprimirala u stanicama *iqgC⁻* te pratila unos tekućine kako je ranije opisano. Analiza je pokazala da mutirani proteini IqgC nisu lokalizirani na nastajućim makropinosomima (Slika 4.3.C). Ovi rezultati su pokazali da je RasG neophodan za regrutaciju proteina IqgC na makropinocitotske čašice.

Kako bih razjasnila koje su regije proteina IqgC potrebne za njegovu regrutaciju na makropinocitotske čašice, konstruirala sam fluorescentno obilježene skraćene varijante proteina IqgC (Slika 4.3.D) i eksprimirala ih u stanicama *iqgC⁻*. Analiza lokalizacije skraćenih varijanti proteina IqgC (Slika 4.3.E) pokazala je da samo varijanta kojoj nedostaje regija između domena RasGAP i RGCT (IqgC_Δcentr) ima istu lokalizaciju kao i protein IqgC pune dužine (IqgC_FL). Zanimljivo je da je varijanta proteina IqgC bez domene RasGAP (IqgC_ΔGRD) lokalizirana duž cijele stanične membrane osim na nastajućim makropinosomima (Slika 4.3.E i Prilog 3.). Domena RasGAP odgovorna je za interakciju s RasG što sam također pokazala sustavom dva hibrida u kvascu (Slika 4.3.F). Ovi rezultati sugeriraju da su motivi odgovorni za vezanje IqgC na staničnu membranu raspoređeni duž cijelog polipeptidnog lanca IqgC, pri čemu je domena RasGAP ključna za usmjeravanje IqgC na membranu makropinosoma.

S obzirom na to da je poznato da je IqgC lokaliziran i na fagosomima (Marinović *i sur.*, 2019.), ispitala sam je li interakcija s RasG nužna i za regrutaciju IqgC na membranu fagosoma. Prvo sam analizirala lokalizaciju RasG tijekom fagocitoze. Pokazalo se da je fluorescentno obilježeni RasG lokaliziran na membrani nastajućeg fagosoma i nestaje ubrzo nakon njegova zatvaranja, ali i da je jednoliko raspoređen duž cijele stanične membrane (Prilog 4.A). Zatim sam istražila lokalizaciju fluorescentno obilježenog proteina IqgC u stanicama deficitarnima za RasG tijekom fagocitoze fluorescentno obilježenih kvasaca. Analiza je pokazala da, slično kao i s makropinosomima, IqgC nije lokaliziran na fagosomima u odsutnosti RasG, odnosno, da je RasG neophodan za lokalizaciju IqgC i na fagocitotske čašice (Prilog 4.B).

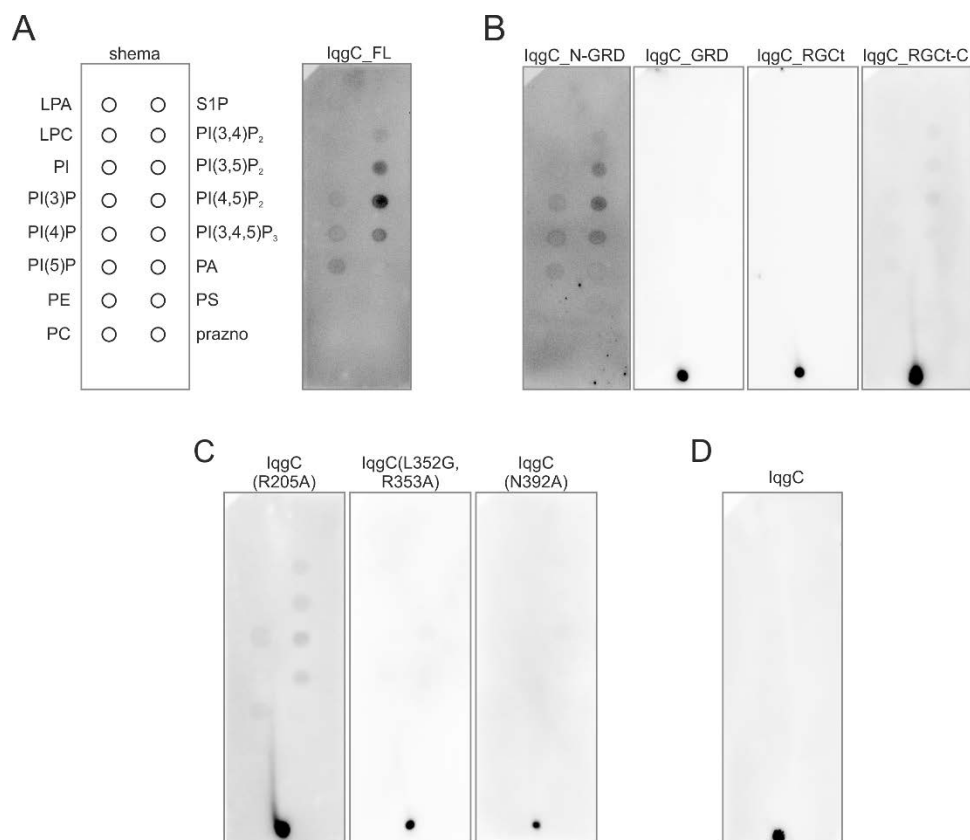


Slika 4.3. RasG je neophodan za lokalizaciju IqqC na makropinosome. **A)** Usporedba lokalizacije proteina YFP-IqqC u stanicama divljeg tipa (wt, gornji panel) i stanicama deficitarnim za RasG (*rasG⁻*, donji panel) pokazuje da IqqC nije lokaliziran na membrani makropinosoma u odsutnosti RasG. U slučaju stanica *rasG⁻* pratila sam unos tekuće hranjive podloge s dodanim dekstranom obilježenim fluorescentnom bojom TRITC. **B)** Mutirane varijante proteina IqqC (R205A, L352G-R353A, N392A) ne vežu RasG u sustavu dva hibrida u kvascu. Sekvence IqqC mutanata fuzionirane su s Gal4 aktivacijskom domenom (AD), dok je konstitutivno aktivni mutant RasG(Q61L) fuzioniran s Gal4 domenom koja veže DNA (BD). Uspješna transfekcija stanica kvasca s oba vektora potvrđena je rastom na selektivnoj podlozi bez leucina i triptofana (-LW). Interakcije su analizirane na podlozi bez leucina, triptofana i histidina u prisutnosti 0,5 mM 3-amino-1,2,4-triazola (-LWH + 3-AT). IqqC divljeg tipa koristila sam kao pozitivnu kontrolu za interakciju s RasG, a „BD (prazan)“ predstavlja test interakcije s praznim vektorom pGBKT7 kao negativna kontrola. **C)** Mutanti cjelovitog proteina IqqC (R205A, L352G-R353A, N392A) obilježeni fluorescentnim proteinom YFP nisu lokalizirani na membrani makropinosoma u stanicama *iqgC⁻*. **D)** Shema cjelovitog proteina IqqC (IqqC_FL) i njegovih skraćenih varijanti obilježenih proteinom YFP: N-terminalna regija s domenom RasGAP/GRD (IqqC_N-GRD), domena RasGAP proteina IqqC (IqqC_GRD), domena RGCT (RasGAP_C-terminus) s C-terminalnom regijom (IqqC_RGCT-C), domena RGCT proteina IqqC (IqqC_RGCT), protein IqqC bez regije između domena RasGAP i RGCT (IqqC_Δcentr), protein IqqC bez domene RasGAP (IqqC_ΔGRD), protein IqqC bez domene RGCT (IqqC_ΔRGCT). Brojevi označavaju pozicije aminokiselina u proteinu. **E)** Lokalizacije skraćenih varijanti proteina IqqC obilježenih proteinom YFP tijekom makropinocitoze fluorescentno obilježene tekuće hranjive podloge. **F)** IqqC veže RasG preko domene RasGAP (IqqC_GRD) u sustavu dva hibrida u kvascu. Cjeloviti protein IqqC (IqqC_FL) služi kao pozitivna kontrola za interakciju s RasG. Interakcije su testirane kako je navedeno u B. Veličina mjerila u A, C i E iznosi 5 μm, a vrijeme je dano u sekundama.

4.4. Vezanje IqqC na fosfoinozitide stanične membrane je ovisno o RasG

Kao što je već opisano, usporedba prostorno-vremenske raspodjele proteina IqqC i probe za aktivne GTPaze Ras navela nas je da pretpostavimo da je za zadržavanje proteina IqqC na internaliziranom makropinosomu odgovoran neki drugi interaktor koji ga veže na vezikuli nakon disocijacije probe za aktivni Ras, odnosno, nakon deaktivacije GTPaze RasG. Osim proteina, mogući interaktori proteina IqqC su i fosfoinozitidi u membrani makropinosoma za koje se zna da sudjeluju u fuzijama i fisijama internalizirane vezikule s komponentama endocitotskog puta (Levin *i sur.*, 2015.). Točkastim bugačenjem lipida testirala sam interakcije membranskih fosfolipida s proteinom IqqC iz staničnog lizata. Fluorescentno obilježeni protein IqqC pune dužine iz lizata stanica *iqgC*⁻ vezao je sve fosfoinozitide s najvećim afinitetom za PI(4,5)P₂ (Slika 4.4.A). Pokazalo se da se cjeloviti protein IqqC pročišćen iz bakterija veže malo drugačije tj. da pokazuje najveći afinitet prema PI-bisfosfatima (PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂) i prema PI(3)P (Prilog 5.A i B).

Kako bih odredila domene proteina IqqC važne za vezanje fosfoinozitida, točkastim bugačenjem lipida sam testirala skraćene varijante proteina IqqC eksprimirane u stanicama *iqgC*⁻. Pokazalo se da samo domena RasGAP uz prisutnost N-terminalne regije IqqC (IqqC_{N-GRD}) veže sve fosfoinozitide sličnim afinitetima kao i cjeloviti IqqC (Slika 4.4.B). Konačno, zanimalo nas je i je li prisutnost RasG u stanicama važna za interakciju IqqC s fosfoinozitudima. Prvo sam testirala mutirane varijante proteina IqqC koje ne vežu RasG (R205A, L352G-R353A, N392A) i pokazala da ni jedna od njih ne veže fosfoinozitide (Slika 4.4.C). Potom sam testirala i cjeloviti protein divljeg tipa IqqC ekspirmiran u stanicama deficitarnima za RasG. Ni u ovom slučaju nije došlo do vezanja IqqC na fosfoinozitide (Slika 4.4.D). Ovi rezultati pokazuju da je očuvana interakcija IqqC s RasG potrebna za vezanje IqqC na fosfoinozitide, pri čemu je, uz domenu RasGAP nužna i N-terminalna regija proteina IqqC.



Slika 4.4. RasG je potreban za interakciju IqgC s fosfoinozitudima membrane. **A)** Cjeloviti YFP-IqgC eksprimiran u stanicama *iqgC* veže sve fosfoinozitide s najvećim afinitetom prema PI(4,5)P₂. **B)** Od skraćenih varijantni proteina IqgC eksprimiranih u stanicama *iqgC*, samo konstrukt koji obuhvaća domenu RasGAP i 129 N-terminalnih aminokiselina (IqgC_N-GRD) pokazuje isti uzorak vezanja fosfoinozitida kao i cjeloviti protein. **C)** Od mutiranih varijanti cjelovitog proteina IqgC koji ne vežu RasG, eksprimiranih u stanicama *iqgC* samo IqgC(R205A) pokazuje slabo vezanje na fosfoinozitide. **D)** Cjeloviti IqgC eksprimiran u stanicama *rasG* ne veže membranske fosfolipide. Kratice: LPA – lizofosfatidilna kiselina, LPC – lizofoskokolin, PI – fosfatidilinozitol, PI(3)P – fosfatidilinozitol 3-fosfat, PI(4)P – fosfatidilinozitol 4-fosfat, PI(5)P – fosfatidilinozitol 5-fosfat, PE – fosfatidiletanolamin, PC – fosfatidilkolin, S1P – sfingozin 1-fosfat, PI(3,4)P₂ – fosfatidilinozitol 3,4-bisfosfat, PI(3,5)P₂ – fosfatidilinozitol 3,5-bisfosfat, PI(4,5)P₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, PI(3,4,5)P₃ – fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat, PA – fosfatidilna kiselina, PS – fosfatidilserin, prazno – negativna kontrola. Točka na dnu membrana u B, C i D je cjeloviti IqgC koji služi kao pozitivna kontrola za antitijelo anti-IqgC.

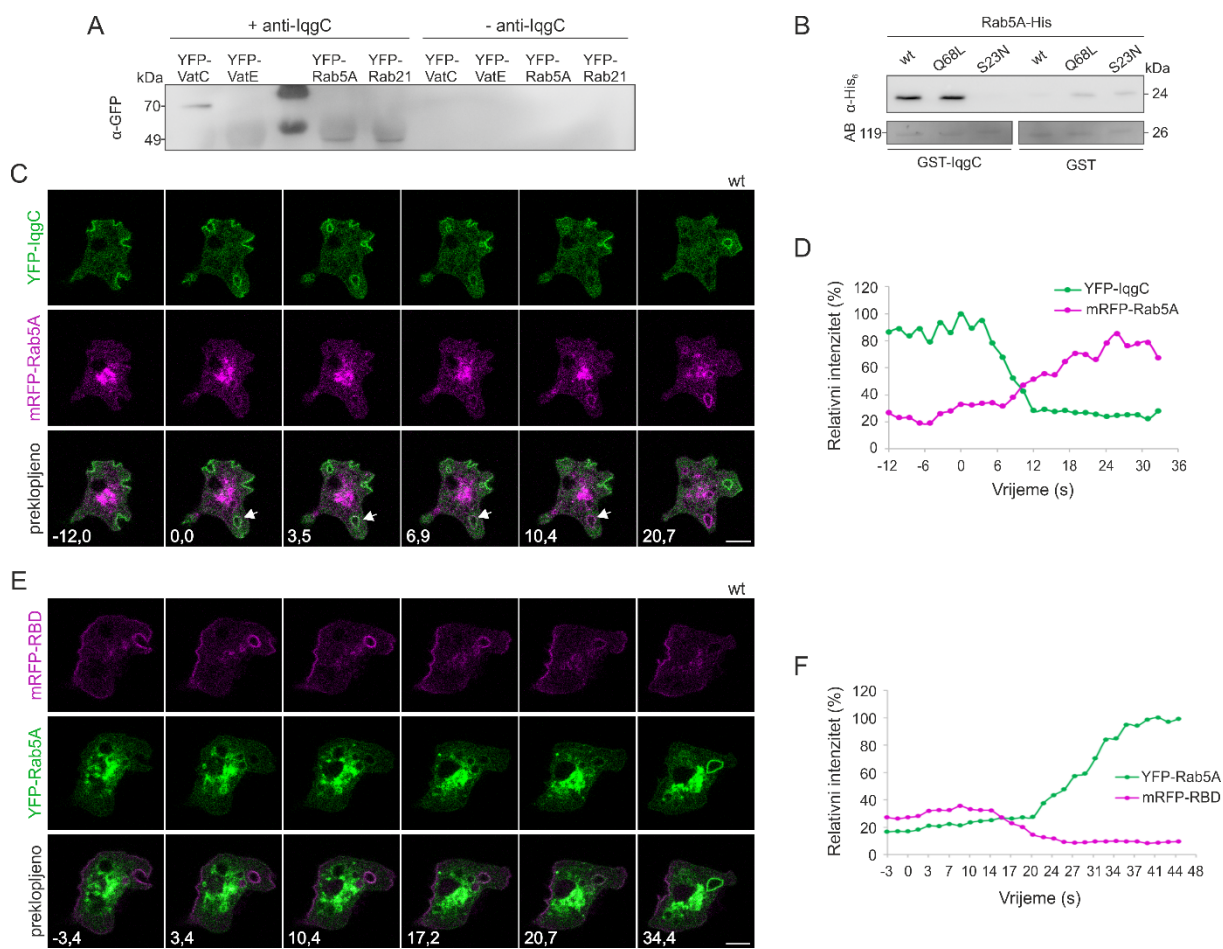
4.5. IqgC izravno veže malu GTPazu Rab5A tijekom makropinocitoze

S ciljem otkrivanja potencijalnih proteinskih interaktora proteina IqgC s kojima IqgC stupa u interakciju nakon deaktivacije GTPaze RasG na zatvorenom makropinosomu, ponovno smo pregledali prethodno objavljeni interaktom proteina IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.). Pažnju su nam privukla četiri proteina za koje se zna da su uključeni u rano sazrijevanje endosoma u stanicama sisavaca te da su lokalizirani na makropinosomima tijekom njihova sazrijevanja duž endocitotskog puta, konkretno dvije GTPaze iz obitelji Rab, Rab5A i Rab21, te dvije podjedinice V-ATPaze, VatC i VatE (Buckley i King, 2017.). Metodom koimunoprecipitacije pokazala sam da se proteini VatC, Rab5A i Rab21 obilježeni fluorescentnim proteinom YFP

ekspimirani u stanicama divljeg tipa AX2 nalaze u kompleksu s endogenim proteinom IqgC (Slika 4.5.A). Od ta tri testirana proteina, odlučili smo najprije istražiti interakciju s malom GTPazom Rab5A s obzirom na to da je poznato da je Rab5 glavni regulator sazrijevanja ranih endosoma u stanicama sisavaca (Borchers *i sur.*, 2021.). Osim toga, Rab5A se regrutira na internalizirani endosom prije Rab21 i V-ATPaze (Buckley i King, 2017.). Za testiranje izravne interakcije Rab5A i IqgC, koristila sam sustav dva hibrida u kvascu u kojem sam testirala vezanje IqgC za divlji tip (wt), konstitutivno aktivnu (Q68L) i konstitutivno neaktivnu (S23N) varijantu Rab5A (Prilog 6.A). Iz dobivenih rezultata nije se moglo zaključiti veže li IqgC Rab5A. Stoga sam izravnu interakciju IqgC i Rab5A pokušala dokazati korištenjem biokemijske metode GST-Rab5A *pull-down* (Prilog 6.B). IqgC pročišćen iz bakterija vezao se na GST-Rab5A. Međutim, s obzirom da se IqgC vezao i na sam GST, iako slabije nego na GST-Rab5A, interakciju smo odlučili testirati i na obrnuti način. Konkretno, iz bakterija sam pročistila varijante proteina Rab5A (wt, Q68L, S23N) obilježene nastavkom His i testirala njihovo vezanje na GST-IqgC metodom *pull-down*. Rezultati su pokazali da divlji tip i konstitutivno aktivna varijanta Rab5A(Q68L) izravno vežu IqgC, ali ne i konstitutivno neaktivna varijanta Rab5A(S23N) (Slika 4.5.B).

Nakon što sam pokazala da IqgC izravno veže Rab5A, fluorescentno obilježene proteine YFP-IqgC i mRFP-Rab5A koeksprimirala sam u stanicama divljeg tipa. Analiza konfokalnom mikroskopijom pokazala je da su IqgC i Rab5A kolokalizirani na makropinosomu, ali i da ti proteini imaju obrnutu prostorno-vremensku raspodjelu (Slika 4.5.C). Naime, IqgC se snažno eksprimira na staničnoj membrani tijekom formiranja makropinocitotske čašice i signal mu počinje opadati tek nakon zatvaranja makropinosoma. S druge strane, signal Rab5A je slabo vidljiv na staničnoj membrani i tijekom formiranja čašice te se počinje pojačavati tek nakon internalizacije makropinosoma (Slika 4.5.D). S obzirom da su IqgC i Rab5A kolokalizirani na makropinosomu, nije iznenađujuće da je YFP-Rab5A također kolokaliziran i s probom za aktivni Ras obilježenom s fluorescentnim proteinom mRFP (Slika 4.5.E) te da također pokazuju obrnutu prostorno-vremensku raspodjelu kao i Rab5A u odnosu na IqgC (Slika 4.5.F).

Osim lokalizacije na staničnu membranu i makropinosome, Rab5A je prisutan i na perinuklearnim strukturama (Prilog 7.A). Kako bih odredila o kojim je strukturama riječ, fluorescentno obilježeni protein Rab5A koeksprimirala sam s probom specifičnom za Golgijev aparat (Weber *i sur.*, 2018.). Analizom fiksiranih stanica pokazala sam da je Rab5A snažno lokaliziran na strukture Golgijevog aparata (Prilog 7.B).



Slika 4.5. IqgC i Rab5A se izravno vežu i kolokalizirani su na makropinocitotskim čašicama. A) Rezultati analize Western s antitijelom anti-GFP pokazuju da proteini VatC, Rab5A i Rab21 obilježeni fluorescentnim proteinom YFP iz staničnih lizata tvore kompleks s endogenim proteinom IqgC (+ *anti-IqgC*, lijevo). Kao negativnu kontrolu koristila sam test bez antitijela (- *anti-IqgC*, desno). **B)** Rezultati analize Western s antitijelom anti-His₆ pokazuju da Rab5A divljeg tipa (wt) i konstitutivno aktivna varijanta (Q68L) obilježeni nastavkom His izravno interagiraju s IqgC u metodi GST-IqgC *pull-down*. Kao negativnu kontrolu koristila sam GST *pull-down*. AB označava membranu pobojanu bojom amido crno. **C)** IqgC i Rab5A su kolokalizirani tijekom makropinocitoze, ali pokazuju obrnute dinamike regrutacije na makropinosomu. **D)** Kvantifikacija normaliziranog intenziteta signala YFP-IqgC i mRFP-Rab5A kroz vrijeme za reprezentativnu stanicu prikazanu pod C. Vrijeme 0 s odnosi se na trenutak zatvaranja makropinosoma. **E)** Proba za aktivni Ras, mRFP-RBD, i Rab5A su kolokalizirani na makropinosomu i imaju sličnu prostorno-vremensku dinamiku kao IqgC i Rab5A. **F)** Kvantifikacija normaliziranog intenziteta signala mRFP-RBD i YFP-Rab5A kroz vrijeme za reprezentativnu stanicu prikazanu pod E. Vrijeme 0 s odnosi se na trenutak zatvaranja makropinosoma. Veličina mjerila u C i E je 5 μ m, a vrijeme je dano u sekundama.

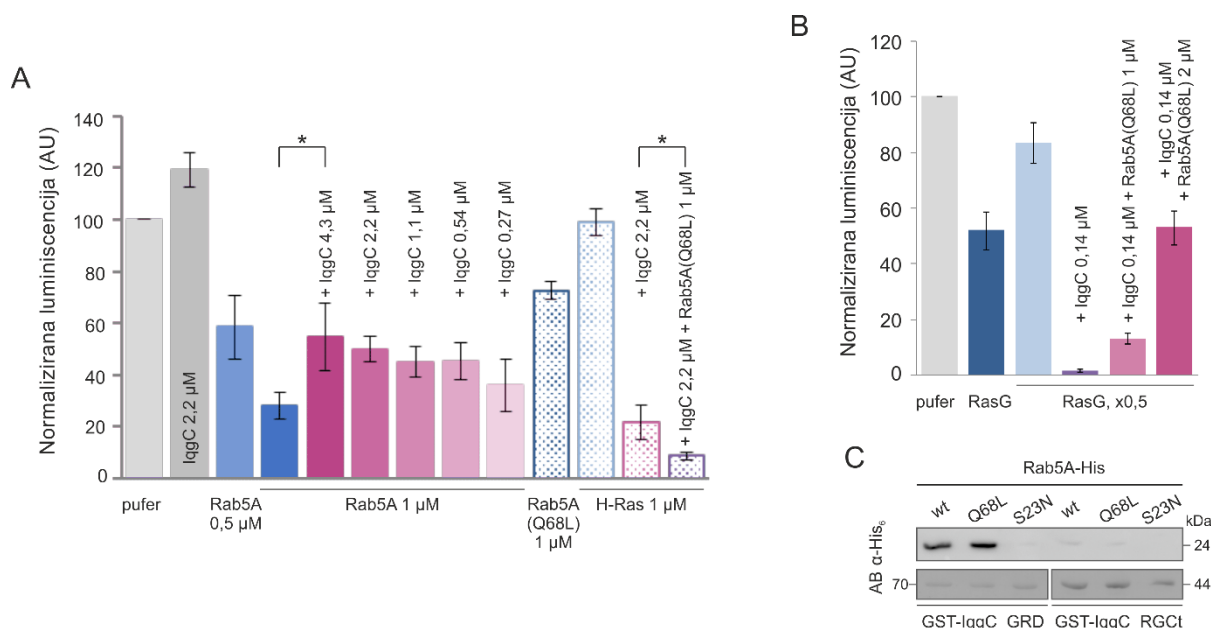
4.6. Rab5A utječe na RasGAP aktivnost proteina IqgC prema GTPazi RasG

S obzirom da sam potvrdila izravnu interakciju IqgC s malom GTPazom Rab5A i pokazala da su ti proteini kolokalizirani na makropinosomu, odlučila sam istražiti ima li IqgC utjecaja na GTPaznu aktivnost Rab5A. Naime, protein p120^{GAP}/RASA1 prisutan u stanicama sisavaca veže H-Ras i Rab5 i djeluje kao GAP za obje GTPaze (Liu i Li, 1998.). Mjerenjem aktivnosti hidrolize GTP-a pročišćenog proteina Rab5A(wt), bez i u prisutnosti proteina IqgC,

pokazala sam da IqgC ne potiče aktivnost hidrolize GTP-a Rab5A odnosno da ne djeluje kao njezin GAP (Slika 4.6.A). Štoviše, povećana luminiscencija u prisutnosti IqgC ukazuje na smanjenje intrinzične GTPazne aktivnosti Rab5A u prisutnosti IqgC. Međutim, ovaj rezultat treba uzeti s oprezom s obzirom na to da je povećana luminiscencija u prisutnosti IqgC vjerojatno, barem djelomično, odraz luminiscencije uzorka samog proteina IqgC (Slika 4.6.A, usporedi pufer i IqgC, 2,2 μ M).

Potom nas je zanimalo utječe li Rab5A na aktivnost GAP proteina IqgC prema GTPazi Ras. Najprije sam testirala utjecaj na humanu GTPazu H-Ras, za koju je ranije pokazano da je supstrat za RasGAP IqgC *in vitro* (Marinović *i sur.*, 2019.), i utvrdila da konstitutivno aktivna varijanta Rab5A(Q68L) ne inhibira aktivnost GAP proteina IqgC prema ovoj GTPazi (Slika 4.6.A). Prisutnost ekvimolarne količine Rab5A(Q68L) čak je smanjila razinu luminiscencije što bi upućivalo na to da Rab5A potiče aktivnost GAP proteina IqgC prema H-Ras. No, vjerojatnije je da konstitutivno aktivna varijanta Rab5A(Q68L) koja, iako „zaključana“ u obliku koji je vezan na GTP, ipak posjeduje slabu intrinzičnu GTPaznu aktivnost, uzrokuje dodatno smanjenje luminiscencije. Nakon toga sam testirala utjecaj Rab5A na GAP aktivnost IqgC prema njegovom endogenom interaktoru, GTPazi RasG iz *D. discoideum*. GST-obilježeni RasG sam afinitetno pročistila preko glutation-agaroze i tako imobiliziranu GTPazu koristila sam za testiranje aktivnosti GAP. Aktivnost GAP proteina IqgC prema RasG testirala sam bez i u prisutnosti Rab5A(Q68L). Rezultati su pokazali da Rab5A, ovisno o koncentraciji, inhibira aktivnost GAP proteina IqgC prema GTPazi RasG (Slika 4.6.B). Ovaj rezultat upućuje na to da Rab5A utječe na vezanje RasG na IqgC.

Zatim sam istražila vežu li se Rab5A i RasG na istu domenu proteina IqgC korištenjem metode *pull-down* s afinitetno pročišćenim domenama GST-RasGAP i GST-RGcT proteina IqgC s varijantama Rab5A obilježenim s nastavkom His. Divlji tip (wt) i konstitutivno aktivna varijanta (Q68L) Rab5A vežu samo domenu RasGAP proteina IqgC (Slika 4.6.C). Prethodno sam pokazala da RasG, također, veže samo RasGAP domenu IqgC (Slika 4.3.F). Ovi rezultati sugeriraju kompeticiju između Rab5A i RasG za vezanje na domenu RasGAP proteina IqgC. Također, vezanje IqgC na aktivni oblik Rab5A upućuje na to da je IqgC efektor GTPaze Rab5A.



Slika 4.6. IqgC nije GAP za Rab5A, a njegova aktivnost RasGAP se smanjuje u prisutnosti Rab5A. A-B) Rezultati testiranja aktivnosti GAP prikazani su kao histogrami u kojima je razina luminiscencije obrnuto proporcionalna hidrolizi GTP-a u uzorku. **A)** Jednolično pobjeđeni stupići odnose se na testiranje aktivnosti GAP s pročišćenim proteinima IqgC i Rab5A(wt). Usporedba luminiscencije uzorka 1 μM GTPaze Rab5A i Rab5A uz različite koncentracije proteina IqgC pokazuje da IqgC ne stimulira intrinzičnu GTPaznu aktivnost Rab5A. Točkasto pobjeđeni stupići odnose se na testiranje aktivnosti GAP s pročišćenim proteinima IqgC i H-Ras. Usporedba luminiscencije uzorka 1 μM GTPaze RasG i 2,2 μM proteina IqgC, bez i u prisutnosti 1 μM Rab5A(Q68L) pokazuje da Rab5A ne inhibira aktivnost GAP proteina IqgC prema humanom proteinu H-Ras. Tamno plavi stupić pokazuje da Rab5A(Q68L) posjeduje blagu intrinzičnu GTPaznu aktivnost. **B)** Testiranje aktivnosti GAP s GST-RasG iz *D. discoideum*, imobiliziranim na glutation-agarozu, i fiksnom koncentracijom IqgC. Usporedba luminiscencije uzorka RasG s 0,14 μM IqgC, bez i u prisutnosti 1 μM i 2 μM Rab5A(Q68L) pokazuje da Rab5A inhibira aktivnost RasGAP proteina IqgC prema RasG. Plavi stupići prikazuju intrinzičnu GTPaznu aktivnost imobiliziranog GST-RasG (tamno plava predstavlja 1 volumen, a svijetlo plava pola volumena zrnaca glutation-agaroze s imobiliziranim GST-RasG). **C)** Rezultati analize Western s antitijelom anti-His₆ pokazuju da aktivni oblik Rab5A stupa u interakciju s RasGAP/GRD, a ne domenom RGCT proteina IqgC u metodi *pull-down* s domenama RasGAP i RGCT proteina IqgC obilježenim s nastavkom GST. AB označava membranu pobjeđanu bojom amido crno. Razina značajnosti u A prikazana je kao * p < 0,05. Rezultati prikazani u A i B su dobiveni iz minimalno tri eksperimenta i prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

4.7. Prekomjerna ekspresija Rab5A korelira s preuranjenom disocijacijom IqgC sa zatvorenog makropinosoma

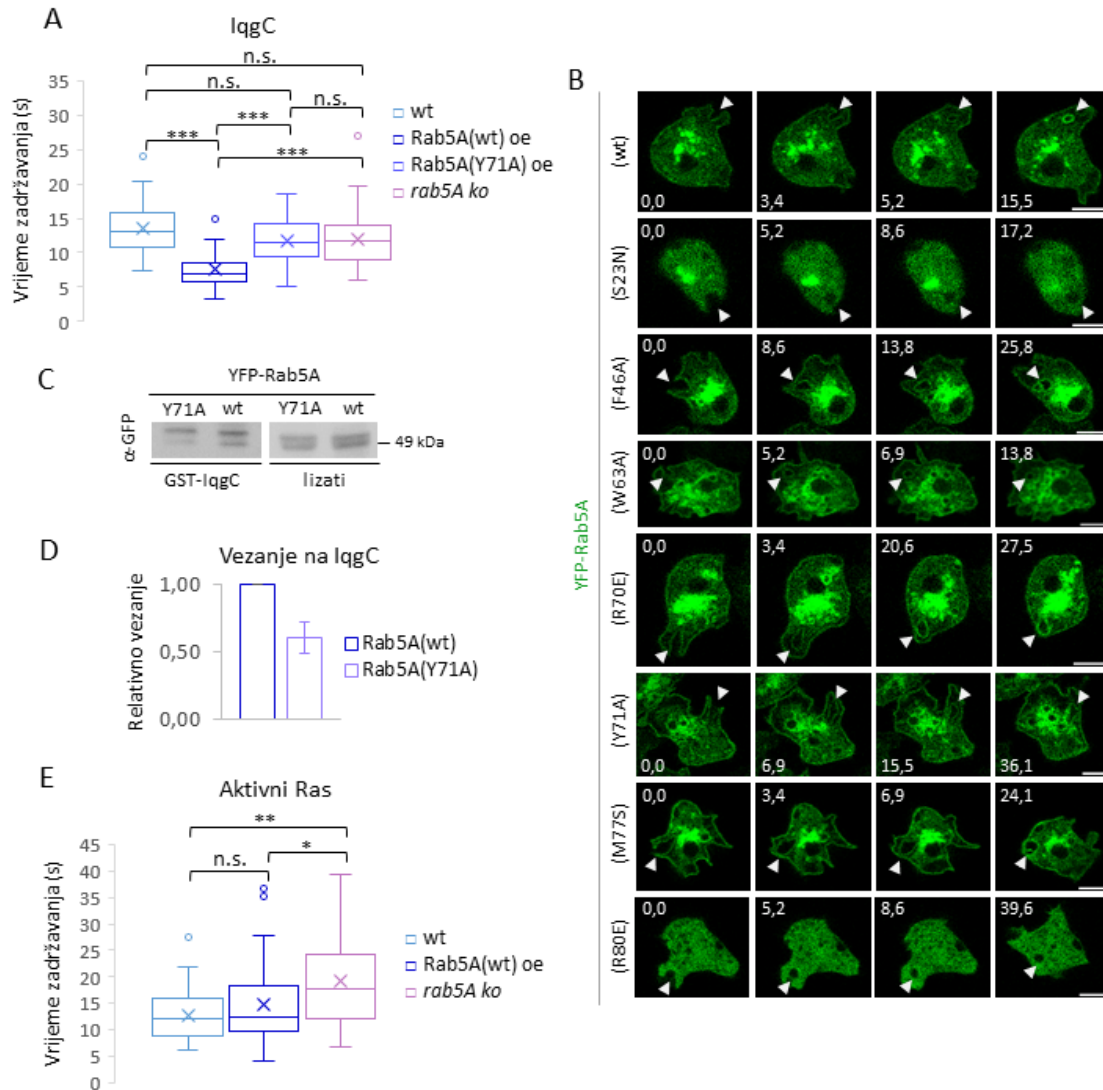
Prethodno istraživanje je pokazalo da proba za aktivni Ras disocira s makropinosoma prije IqgC (Marinović *i sur.*, 2019.). Međutim, prilikom analize vremena zadržavanja fluorescentno obilježenog proteina IqgC i probe za aktivni Ras na makropinosomu nakon njegova zatvaranja u divljem tipu stanica (wt), utvrdili smo blago produženo zadržavanje IqgC u usporedbi s probom za aktivni Ras koje nije statistički značajno: t(IqgC/wt)=13,0 (10,9-15,5) s, n=34, naspram t(Ras/wt)=12,0 (9,2-15,9) s, n=37 (medijan, interkvartilni raspon) (Slika 4.7.A i E, wt vrijednosti). Zanimljivo, kada sam u stanicama koeksprimirala IqgC i Rab5A, opazila

sam da je IqgC disocirao s vezikule značajno brže nego u stanicama s endogenom razinom Rab5A (Slika 4.7.A). Ovo je upućivalo na to da koncentracija Rab5A na zatvorenom makropinosomu utječe na disocijaciju IqgC. Kako bih ispitala ovu hipotezu, analizirala sam i vrijeme zadržavanja IqgC u stanicama deficitarnim za Rab5A. Suprotno očekivanjima, vrijeme zadržavanja IqgC na zatvorenom makropinosomu u stanicama *rab5A*⁻ nije se statistički značajno razlikovalo u usporedbi s divljim tipom stanica (Slika 4.7.A).

Kako bih dodatno ispitala utjecaj Rab5A na disocijaciju IqgC sa zatvorenog makropinosoma, osmislili smo drugačiji pristup. Odlučili smo testirati vrijeme zadržavanja IqgC u stanicama koje eksprimiraju mutirani Rab5A koji slabije veže IqgC. S tim ciljem sam kreirala mutirane varijante GTPaze Rab5A mutirajući triplete baza aminokiselina koje odgovaraju aminokiselinama Rab5 iz stanica sisavaca, a za koje je pokazano da su uključene u vezanje različitih efektorskih proteina (Prilog 8.) (Mishra *i sur.*, 2010.; Whitecross i Anderson, 2017.; Zhu *i sur.*, 2004.). Cilj je bio pronaći mutant Rab5A koji je lokaliziran na makropinosomima (Slika 4.7.B), ali ima slabiji afinitet za vezanje IqgC. Od nekoliko mutiranih proteina Rab5A, odabrali smo Rab5A(Y71A) zbog zadovoljavajuće razine ekspresije u stanici i značajno smanjenog vezanja na IqgC u usporedbi s divljim tipom Rab5A (Slika 4.7.C i D). Nakon koekspresije IqgC i Rab5A(Y71A) u stanicama divljeg tipa, vrijeme zadržavanja IqgC na makropinosomu produljilo se prema vrijednostima izmjerenim u divljem tipu stanica i značajno se razlikovalo od vremena zadržavanja u stanicama koje eksprimiraju divlji tip Rab5A(wt) (Slika 4.7.A).

Prekomjerna ekspresija Rab5A(wt) nije utjecala na zadržavanje probe za aktivni Ras na makropinosomu, no zanimljivo je primjetiti da se u stanicama deficitarnim za Rab5A proba za aktivni Ras značajno dulje zadržavala na vezikuli nakon zatvaranja makropinosoma (Slika 4.7.E).

S obzirom da IqgC veže aktivni oblik Rab5A, zanimalo nas je utječe li IqgC na GTPazni ciklus Rab5A. Koristeći metodu *pull-down* s GST-EEA1⁽¹⁻²⁰⁹⁾, poznatim efektorom Rab5 u stanicama sisavaca (Christoforidis *i sur.*, 1999a.), usporedila sam razine aktivnog Rab5A u stanicama divljeg tipa i stanicama deficitarnim za IqgC (Prilog 9.A). Denzitometrijskom analizom sam utvrdila da nema razlike u razini ukupnog aktivnog Rab5A između stanica divljeg tipa i stanica *iqgC*⁻ (Prilog 9.B).



Slika 4.7. U uvjetima prekomjerne ekspresije Rab5A, IqgC disocira s makropinosoma ranije nego u stanicama divljeg tipa. A Vrijeme zadržavanja IqgC na makropinosomu nakon zatvaranja određeno je za stanice divljeg tipa (wt), stanice s egzogenom ekspresijom Rab5A divljeg tipa (Rab5A(wt) oe), stanice s egzogenom ekspresijom Rab5A(Y71A) (Rab5A(Y71A) oe) i stanice *rab5A* (*rab5A ko*): $t(\text{IqgC}/\text{wt})=13,0$ (10,9-15,5) s, $n=34$; $t(\text{IqgC}/\text{Rab5A}(\text{wt}) \text{ oe})=6,8$ (5,8-8,3) s, $n=33$; $t(\text{IqgC}/\text{Rab5A}(\text{Y71A}) \text{ oe})=11,4$ (9,1-13,8) s, $n=36$; $t(\text{IqgC}/\text{rab5A} \text{ ko})=11,7$ (8,9-14,1) s, $n=67$ (medijan, interkvartilni raspon). **B** Lokalizacija mutanata Rab5A obilježenim fluorescentnim proteinom YFP ekspimiranih u divljem tipu stanica. Mutanti (F46A, W63A, R70E, Y71A i M77S) su lokalizirani na makropinosomima kao i divlji tip Rab5A, dok mutanti (S23N i R80E) pokazuju samo citosolnu lokalizaciju. **C** Rezultati primjera analize Western s antitijelom anti-GFP pokazuju vežanje Rab5A(wt) i Rab5A(Y71A) na GST-IqgC u metodi *pull-down* (lijevo). Analizu Western s lizatima stanica AX2 koje ekspimiraju Rab5A(wt) i Rab5A(Y71A) obilježene proteinom YFP koristila sam za denzitometriju (desno). **D** Denzitometrijska analiza relativnog vežanja Rab5A(wt) i Rab5A(Y71A) na GST-IqgC pokazuje da Rab5A(Y71A) slabije veže IqgC u usporedbi s divljim tipom Rab5A. **E** Vrijeme zadržavanja probe za aktivni Ras na makropinosomu nakon zatvaranja određeno je za stanice divljeg tipa (wt), stanice s egzogenom ekspresijom Rab5A divljeg tipa (Rab5A(wt) oe) i stanice *rab5A* (*rab5A ko*): $t(\text{Ras}/\text{wt})=12,0$ (9,2-15,9) s, $n=37$; $t(\text{Ras}/\text{Rab5A}(\text{wt}) \text{ oe})=12,4$ (9,7-18,3) s, $n=60$; $t(\text{Ras}/\text{rab5A} \text{ ko})=17,7$ (12,3-24,0) s, $n=40$ (medijan, interkvartilni raspon). Razina značajnosti u A i E prikazana je kako slijedi: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; n.s. nije značajno. Rezultati u D dobiveni su iz četiri neovisna eksperimenta i prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM. Veličina mjerila u E iznosi 5 μm , a vrijeme je dano u sekundama.

5. Rasprava

5.1. Protein IqgC ima značajnu ulogu u regulaciji makropinocitoze u prisutnosti proteina NF1

Mala GTPaza RasG važan je pozitivni regulator makropinocitoze u amebi *D. discoideum* (Williams *i sur.*, 2019.). IqgC kao njezin RasGAP ju deaktivira na makropinosomima i fagosomima te time negativno regulira procese endocitoze na velikoj skali (Marinović *i sur.*, 2019.). S obzirom na važnu ulogu proteina RasG u makropinocitozi, bilo je donekle iznenađujuće da delecija gena *iqgC* izaziva vrlo malo povećanje unosa tekućine koje stanicama *iqgC⁻* ne pruža selektivnu prednost za rast u hranjivoj suspenziji u usporedbi sa stanicama divljeg tipa (Marinović *i sur.*, 2019.). Međutim, ovi eksperimenti su napravljeni sa stanicama akseničnog soja AX2 koji već ima znatno pojačanu makropinocitozu zbog odsutnosti proteina NF1 koji je također RasGAP. S obzirom na to, pretpostavili smo da delecija još jednog proteina RasGAP, iako je negativni regulator GTPaze RasG, ne može imati snažan efekt na proces koji je već genetički pojačan u akseničnim sojevima i vjerojatno se odvija s gotovo maksimalnom efikasnošću. Stoga smo efekt delecije gena *iqgC* odlučili istražiti u divljem soju DdB, iz kojeg je proistekao aksenični soj AX2 (Bloomfield *i sur.*, 2008.). Nakon uspješne delecije gena *iqgC* u DdB genetičkoj pozadini (Slika 4.1.), ustanovili smo značajno poboljšanje rasta u tekućoj hranjivoj podlozi za stanice *iqgC⁻* kao rezultat povišene razine makropinocitoze (Slika 4.2.A i C). Pokazali smo da je bolji unos tekućine izravno povezan s povećanjem makropinosoma (Slika 4.2.D). Ovi rezultati pokazuju da je IqgC važan negativni regulator makropinocitoze u stanicama u kojima je prisutan i RasGAP NF1.

Iako i IqgC i NF1 negativno reguliraju makropinocitozu suprimiranjem aktivnosti GTPaza Ras, njihove uloge ipak nisu potpuno jednake što se vidi iz usporedbe veličine makropinosoma stanica *iqgC⁻* i *axeB⁻*. Dok i jedni i drugi mutanti u DdB pozadini stvaraju veće makropinosome u usporedbi sa stanicama divljeg tipa, 50 % makropinosoma u stanicama *axeB⁻* ima promjer veći od 2 μm (Bloomfield *i sur.*, 2015.), dok prosječni promjer makropinosoma u stanicama *iqgC⁻* iznosi 1,6 μm (Slika 4.2.D). Analiza efikasnosti unosa krutih čestica također ukazuje na razliku u ulogama proteina IqgC i NF1 u tom procesu. Stanice *iqgC⁻* nešto uspješnije unose čestice promjera 1 i 2 μm u usporedbi sa stanicama divljeg tipa, dok ni *iqgC⁻* ni divlji tip stanica ne mogu unositi čestice promjera 3 μm (Putar *i sur.*, 2024.). S druge strane, stanice *axeB⁻* mogu unositi i čestice promjera 4 μm (Bloomfield *i sur.*, 2015.). Najvjerojatniji razlog ovih razlika u funkcijama proteina IqgC i NF1 je njihov različiti afinitet prema GTPazama Ras.

Dok IqgC djeluje specifično na RasG, NF1 vjerojatno regulira više proteina iz obitelji Ras koji sudjeluju u procesu makropinocitoze, uključujući i RasG (Buckley *i sur.*, 2020.). Također, IqgC nema domenu za vezanje lipida stanične membrane i njegova regrutacija na makropinosome i fagosome ovisi isključivo o RasG (vidi poglavlje 4.3.). Kao što je već spomenuto, u stanicama *D. discoideum* postoje još dva proteina RasGAP koji su uključeni u regulaciju makroendocitoze: RasGAP2/C2GAP2 i RGBARG (Buckley *i sur.*, 2020.; Li *i sur.*, 2018b.; Xu *i sur.*, 2022.). RasGAP2/C2GAP2, kodiran genom *c2gapB*, lokaliziran je na membrani nascentnih makropinosoma i fagosoma (Li *i sur.*, 2018b.; Xu *i sur.*, 2022.). Međutim, istraživanja delecije ovog gena pokazuju oprečne rezultate. Li *i sur.*, 2018. su pokazali da stanice *c2gapB*⁻ imaju veliki dio stanične membrane obogaćen aktivnim proteinima Ras, no pokazuju smanjenu efikasnost makropinocitoze. S druge strane, Xu *i sur.*, 2022. su objavili da stanice *c2gapB*⁻ pojačano makropinocitiraju i fagocitiraju što definira C2GAP2 kao negativni regulator endocitoze na velikoj skali. RGBARG je dvojak GAP jer potiče hidrolizu GTP-a i na Ras i na Rap GTPazama, a lokaliziran je na protruzivnom rubu makropinocitotskih i fagocitotskih čašica (Buckley *i sur.*, 2020.). Stanice *RGBARG*⁻ imaju povećane regije stanične membrane aktivirane za makropinocitozu obogaćene aktivnim proteinima Ras i PI(3,4,5)P₃ u usporedbi sa stanicama divljeg tipa, ali stvaraju manje makropinosome i imaju značajno smanjen unos tekućine u AX2 genetičkoj pozadini. To je vjerojatno rezultat kombinacije povećane aktivnosti proteina Ras i smanjene aktivnosti proteina Rac, s obzirom na to da RGBARG sadrži i domenu RhoGEF za aktivaciju GTPaza Rac. Proteini Rac su važni za formiranje fagocitotskih i makropinocitotskih čašica, a ovdje se najvjerojatnije radi o RacG za kojeg je ranije pokazano da sudjeluje u regulaciji fagocitoze (Buckley *i sur.*, 2020.; Somesh *i sur.*, 2006.).

5.2. RasG regrutira IqgC na nastajuće makropinosome

IqgC je prolazno lokaliziran na staničnoj membrani kada se stanice izlože globalnoj stimulaciji folnom kiselinom (Marinović *i sur.*, 2019.), slično kao i probe za aktivni Ras, PI3-kinaze klase I i PI(3,4,5)P₃ (Srinivasan *i sur.*, 2013.). Kod stanica *D. discoideum* makropinocitotske čašice nastaju iz dijelova stanične membrane koje se aktiviraju za makropinocitozu i obogaćene su aktivnim GTPazama iz obitelji Ras i fosfoinozotidom PI(3,4,5)P₃ koji nastaje aktivacijom PI3-kinaze klase I (Veltman *i sur.*, 2016.). Lokalizacija IqgC se u potpunosti poklapa s lokalizacijom probe za aktivni Ras tijekom formiranja makropinocitotske čašice (Marinović *i sur.*, 2019.). Stoga sam najprije istražila je li RasG, izravan interaktor proteina IqgC potreban za regrutaciju IqgC na dijelove stanične membrane

iz kojih nastaju makropinosomi. Analizom lokalizacije proteina IqgC u stanicama *rasG*⁻ tijekom unosa fluorescentno obilježene tekuće hranjive podloge (Slika 4.3.A), kao i mutanata IqgC koji ne vežu RasG (Slika 4.3.B i C), pokazala sam da IqgC nije lokaliziran na nastajućim makropinosomima kada je dokinuta njegova interakcija s RasG. Isto sam pokazala i za regrutaciju IqgC na nastajuće fagocitotske čašice (Prilog 4.B). Zatim sam analizirala koje domene proteina IqgC posreduju njegovu lokalizaciju na makropinosome. S obzirom da je većina skraćenih varijanti proteina IqgC bila smještena u citosolu, zaključili smo da IqgC nema specifičnu domenu koja je odgovorna za vezanje na membranu već je njegova lokalizacija posredovana motivima koji su raspoređeni cijelom duljinom proteina. Ipak, skraćena varijanta IqgC kojoj nedostaje domena RasGAP (IqgC_ΔGRD), odgovorna za vezanje RasG, bila je lokalizirana na cijeloj staničnoj membrani osim na nastajućim makropinosomima (Slika 4.3.E i Prilog 3.). Ovaj rezultat dodatno potvrđuje da RasG regrutira IqgC upravo na membranu makropinosoma.

Zanimljivo je da su naši rezultati pokazali da mutacija argininskog prsta u domeni RasGAP proteina IqgC (R205A) onemogućuje interakciju s RasG (Slika 4.3.B) i regrutaciju IqgC na makropinocitotsku čašicu (Slika 4.3.C). To je suprotno prihvaćenom mišljenju da mutacija katalitički aktivnog argininskog ostatka značajno smanjuje aktivnost GAP proteina RasGAP, ali ne utječe na njihovo vezanje za Ras (Ahmadian *i sur.*, 1997.; Scheffzek i Ahmadian, 2005.). S druge strane, u nekim istraživanjima je opažena i znatno slabija interakcija s proteinom Ras nakon mutacije argininskog prsta (Miao *i sur.*, 1996.). Kod proteina RasGAP iz amebe *D. discoideum*, katalitički neaktivni mutanti argininskog prsta proteina C2GAP2 i C2GAP1 vežu Ras, a C2GAP1(R616A) se premješta na membranu u odgovoru na stimulaciju cAMP-om slično kao i divlji tip proteina (Xu *i sur.*, 2021., 2022.). Također, proteini NF1 i RGBARG iz *D. discoideum* s mutiranim argininskim prstom su lokalizirani na makropinocitotskim čašicama kao i odgovarajući divlji tip proteina iako ne mogu revertirati fenotip mutiranih (*knock-out*) stanica ovisan o njihovim aktivnostima RasGAP (Bloomfield *i sur.*, 2015.; Buckley *i sur.*, 2020.). Proteini RasGAP su modularni proteini koji, uz domenu RasGAP pomoću koje interagiraju s proteinima Ras, sadrže druge domene odgovorne za vezanje fosfolipida i proteina koje posreduju njihovu translokaciju na membranu (Scheffzek i Shivalingaiah, 2019.). No, za razliku od proteina RasGAP iz stanica sisavaca i NF1, RGBARG, C2GAP1 i C2GAP2 iz *D. discoideum*, IqgC ne sadrži tipičnu domenu za vezanje membranskih fosfolipida. Analiza vezanja skraćenih i mutiranih varijanti proteina IqgC pomoću točkastog bugaćenja lipida pokazala je da IqgC neselektivno veže sve fosfoinozitide, a najveći afinitet ima prema PI(4,5)P₂ (Slika 4.4.A). Iako nisam odredila minimalni motiv potreban za vezanje,

pokazala sam da su N-terminalni kraj od 129 aminokiselina i funkcionalna domena RasGAP potrebni za interakciju proteina IqgC s fosfoinozitudima (Slika 4.4.B i C). Uz to, IqgC eksprimiran u stanicama deficitarnima za RasG nije vezao ni jedan fosfoinozitud (Slika 4.4.D).

Na temelju ovih rezultata zaključujemo da je RasG esencijalan za regrutaciju IqgC na nastajuće makropinosome, dok interakcija IqgC s fosfoinozitudima membrane vjerojatno doprinosi stabilizaciji interakcije IqgC s RasG na membrani makropinosoma.

5.3. IqgC izravno veže Rab5A, još jednu malu GTPazu iz superobitelji Ras koja je prisutna na makropinosomu

S ciljem karakterizacije drugih signalnih puteva koji uključuju IqgC, uz njegovu ulogu u regulaciji aktivnosti RasG, identificirala sam Rab5A kao novi izravni interaktor proteina IqgC (Slika 4.5B, Prilog 6.B). Uloga Rab5A iz protista *D. discoideum* za sada nije sistematično istražena, no Rab5 u stanicama sisavaca dobro je proučen biljeg ranih endosoma koji ima važnu ulogu u njihovom sazrijevanju (Rink *i sur.*, 2005.). Regrutaciju Rab5 na membranu endosoma osiguravaju proteini GEF koji specifično aktiviraju Rab5 (Goody *i sur.*, 2017.). Tako je za usmjeravanje Rab5a na rane endosome nužna interakcija s Rab5 GEF-om Rabex-5, koji se i sam nalazi na membrani ranih endosoma (Blümer *i sur.*, 2013.). Nedavno je otkriveno da je za aktivaciju i regrutaciju Rab5a na makropinosome potreban protein ALDS2, još jedan GEF za Rab5 (Morishita *i sur.*, 2019.). Rab5 preko brojnih efektor utječe na različite funkcije na membrani ranih endosoma. Njegov rani efektor Rabaptin-5 veže Rabex-5, oslobađa ga autoinhibicije i sudjeluje u pozitivnoj povratnoj sprezi putem koje Rab5 regulira vlastitu aktivnost (Lippé *i sur.*, 2001.; Zhang *i sur.*, 2014.). Aktivacijom kinaze Vps34 i vezanjem molekula koje povezuju poput EEA1, Rab5 promovira fuziju primarnih endocitotskih vezikula, uključujući makropinosome, s ranim endosomima i homotipsku fuziju ranih endosoma (Barbieri *i sur.*, 1994.; Christoforidis *i sur.*, 1999b., 1999a.; Roberts *i sur.*, 2000.; Stenmark *i sur.*, 1994.). Rab5 također kontrolira sazrijevanje Rab5-pozitivnih ranih endosoma u Rab7-pozitivne kasne endosome potičući vlastitu deaktivaciju (Borchers *i sur.*, 2021.) tako što veže Rab7 GEF, kompleks Mon1-Ccz1, koji aktivira Rab7 i istiskuje Rabex-5 s membrane (Langemeyer *i sur.*, 2020.; Poteryaev *i sur.*, 2010.). *D. discoideum* Rab5A je identificiran kao dio vezikule LCV (engl. *Legionella-containing vacuole*), posebnog tipa fagocitotske vezikule koji se formira tijekom infekcije bakterijom *Legionella pneumophila* (Hoffmann *i sur.*, 2014.). Za sada u *D. discoideum* nisu pronađeni ortolozi proteina GEF ili efektor Rab5 iz stanica sisavaca. Nedavno je opisan Rab5 GAP TbcA koji, u kompleksu s PripA, deaktivira Rab5 i promovira „Rab5-u-Rab7“ sazrijevanje makropinosoma (Tu *i sur.*, 2022.).

Nakon što sam utvrdila da IqgC izravno veže Rab5A, konfokalnom mikroskopijom živih stanica pokazala sam da IqgC kolokalizira s Rab5A tijekom makropinocitoze, iako ta dva proteina imaju obrnutu dinamiku regrutacije (Slika 4.5.C i D). Točnije, IqgC signal, koji je snažan na makropinocitotskoj čašici i do zatvaranja makropinosoma, slabi početkom pojačane akumulacije Rab5A na nascentnom makropinosomu i ubrzo potpuno nestaje sa zatvorene vezikule. S obzirom na to da IqgC veže aktivni oblik Rab5A, zanimalo nas je utječe li IqgC na GTPaznu aktivnost Rab5A i je li GAP za Rab5A. Testirajući aktivnost GAP s pročišćenim proteinima, utvrdila sam da IqgC ne potiče GTPaznu aktivnost Rab5A (Slika 4.6.A). Štoviše, čini se da IqgC, ovisno o koncentraciji, inhibira intrinzičnu GTPaznu aktivnost Rab5A. Međutim, kao što je već spomenuto, pretpostavljamo da je barem za dio porasta luminiscencije u prisutnosti IqgC odgovoran sam uzorak proteina IqgC (Slika 4.6.A, usporedi uzorak IqgC, 2,2 μ M s puferom). S druge strane, moguće je da IqgC inhibira GTPaznu aktivnost Rab5A steričkim ometanjem hidrolize GTP-a. Humani protein p120^{GAP}/RASA1 je RasGAP koji interagira s aktivnim oblicima GTPaza H-Ras, Rap1 i Rab5 (Frech *i sur.*, 1990.; Liu i Li, 1998.; Trahey i McCormick, 1987.). Aktivni oblik Rap1 s velikim afinitetom veže p120^{GAP}/RASA1 i, iako ta interakcija ne stimulira GTPaznu aktivnost Rap1, kompetitivno inhibira p120^{GAP}/RASA1-stimuliranu GTPaznu aktivnost proteina Ras (Frech *i sur.*, 1990.). Zanimljivo je da IqgC također veže RapA iz *D. discoideum* i ne stimulira njegovu GTPaznu aktivnost (Mijanović *i sur.*, u pripremi). RasGAP domena proteina p120^{GAP}/RASA1 s visokim afinitetom veže i aktivni Rab5 te je također opažena kompeticija između proteina Rab i Ras. No, za razliku od interakcije s Rap1, ta interakcija stimulira hidrolizu GTP-a vezanog na Rab5 (Liu i Li, 1998.). Iako u našim eksperimentima do značajnog smanjenja aktivnosti RasGAP proteina IqgC prema RasG dolazi tek u prisutnosti velike koncentracije Rab5A *in vitro*, ti rezultati ipak sugeriraju moguću kompeticiju između RasG i Rab5A za vezanje na IqgC (Slika 4.6.B). Uz to, RasG i Rab5A se vežu na istu domenu proteina IqgC (Slike 4.3.F i 4.6.C).

Osim što je glavni regulator ranih endocitotskih puteva, Rab5 u stanicama sisavaca ima ključnu ulogu i tijekom formiranja makropinosoma (Barbieri *i sur.*, 1998.; Maxson *i sur.*, 2021.). Sukladno tome, osim lokalizacije na ranim endosomima, uključujući makropinosome, fagosome i vezikule obložene klatrinom, Rab5 je lokaliziran i na staničnoj membrani, točnije na otvorenim makropinocitotskim čašicama te njegova akumulacija prethodi nestanku PI(4,5)P₂ (Bucci *i sur.*, 1992.; Chavrier *i sur.*, 1990.; Maxson *i sur.*, 2021.; Porat-Shliom *i sur.*, 2008.; Roberts *i sur.*, 2000.; Schnatwinkel *i sur.*, 2004.; Welliver i Swanson, 2012.; Yoshida *i sur.*, 2009.). Lanzetti *i sur.*, 2004. predlažu da je Rab5 uključen u signalni put nizvodno od aktivacije RTK koji vodi do reorganizacije aktina i formiranja kružnih nabora stanične

membrane. S druge strane, nedavno istraživanje je pokazalo da Rab5 nije važan za nabiranje membrane, nego ima ključnu ulogu nizvodno od stvaranja membranskih nabora jer potiče defosforilaciju PI(4,5)₂ i zatvaranje makropinosoma (Maxson *i sur.*, 2021.). Rab5A u stanicama *D. discoideum* također je prisutan na staničnoj membrani prije zatvaranja makropinocitotske čašice, na nascentnim makropinosomima i fagosomima te perinuklearno na Golgijevom aparatu (Slika 4.5.C; Prilog 7.A i B; Tu *i sur.*, 2022.).

Prethodno istraživanje je pokazalo da IqqC ostaje na zatvorenom makropinosomu nakon disocijacije probe za aktivni Ras, odnosno deaktivacije RasG (Marinović *i sur.*, 2019.). Zbog toga smo prvotno pretpostavili da bi novootkriveni interaktor Rab5A, koji je prisutan na ranim endosomima u stanicama sisavaca, mogao biti vezujući partner IqqC koji ga zadržava na zatvorenom makropinosomu nakon deaktivacije RasG. Međutim, analiza vremena zadržavanja proteina IqqC i probe za aktivni Ras na internaliziranom makropinosomu nakon njegova zatvaranja nije pokazala značajnu razliku (Slika 4.7.A i E). Štoviše, u stanicama s egzogenom ekspresijom Rab5A(wt) opaženo je skraćeno zadržavanje IqqC u odnosu na stanice divljeg tipa što je sugeriralo da Rab5A potiče disocijaciju IqqC sa zatvorenog makropinosoma (Slika 4.7.A), a ne njegovo zadržavanje na makropinosomu nakon deaktivacije proteina RasG. Kako bismo detaljnije ispitali hipotezu o ulozi Rab5A u disocijaciji IqqC s makropinosoma, vrijeme zadržavanja IqqC na zatvorenom makropinosomu izmjerila sam u stanicama deficitarnim za Rab5A. Suprotno očekivanju, vrijeme zadržavanja IqqC nije bilo produljeno u odsutnosti Rab5A već je bilo slično vremenu u stanicama divljeg tipa (Slika 4.7.A). Međutim, kada sam vrijeme zadržavanja IqqC izmjerila u stanicama s egzogenom ekspresijom mutiranog Rab5A(Y71A), koji je lokaliziran na makropinosomima, ali slabije veže IqqC (Slika 4.7.B i D), vrijeme zadržavanja približilo se vrijednosti izmjerenoj u divljem tipu stanica i bilo je statistički značajno različito od vremena u stanicama s ekspresijom Rab5A(wt) (Slika 4.7.A). S obzirom na nekonzistentnost ovih rezultata, trenutno je nemoguće zaključiti je li opaženi efekt zaista posljedica interakcije IqqC i Rab5A ili se radi o poremećaju u endocitotskom sustavu uzrokovanom egzogenom ekspresijom proteina Rab5A. Također, ako Rab5A zaista potiče disocijaciju IqqC, tada tu ulogu vjerojatno dijeli ili se ona kompenzira djelovanjem nekog drugog interaktora proteina IqqC, s obzirom da u odsutnosti Rab5A, IqqC disocira s vezikule slično kao i u stanicama divljeg tipa (Slika 4.7.A).

Pretpostavili smo da će prerana disocijacija IqqC, u uvjetima prekomjerne ekspresije Rab5A(wt), biti praćena dužim vremenom zadržavanja probe za aktivni Ras zbog nepotpune deaktivacije RasG. No, upravo suprotno, vrijeme zadržavanja probe za aktivni Ras bilo je značajno produljeno na makropinosomima u odsutnosti Rab5A (Slika 4.7.E). U stanicama

sisavaca aktivni Ras regrutira Rab5 na makropinosome i tamo ga aktivira stupajući u interakciju s RIN1 koji je protein GEF za Rab5 (Porat-Shliom *i sur.*, 2008.; Roberts *i sur.*, 2000.; Tall *i sur.*, 2001.). Aktivacija proteina Ras doseže maksimum gotovo istovremeno s maksimalnom lokalizacijom Rab5 te Ras disocira s Rab5-pozitivnih vezikula, vjerojatno rutom brzog recikliranja, prije fuzije s drugim endocitotskim vezikulama (Porat-Shliom *i sur.*, 2008.; Welliver i Swanson, 2012.). Analogno tome, u stanicama *D. discoideum* deficitarnima za Rab5A, i homotipske i heterotipske fuzije makropinosoma s drugim vezikulama i/ili ranim endosomima mogle bi biti narušene, vodeći produljenom vremenu zadržavanja proteina Ras na makropinosomu kod kojeg je usporeno sazrijevanje.

Zaključno, u ovom radu smo pokazali da je interakcija IqgC s RasG neophodna za regrutaciju proteina IqgC na makropinocitotsku čašicu. Drugi identificirani izravni interaktor proteina IqgC, mala GTPaza Rab5A, slabo je vidljiva na formirajućoj makropinocitotskoj čašici i počinje se značajnije akumulirati na membrani makropinosoma tek nakon njegova zatvaranja, paralelno s postepenom disocijacijom IqgC i probe za aktivne GTPaze Ras. S obzirom na to da obje GTPaze vežu domenu RasGAP proteina IqgC te da Rab5A, kada je prisutan u suvišku, inhibira aktivnost GAP proteina IqgC prema RasG *in vitro*, vjerojatno je da RasG i Rab5A kompetiraju za vezanje na IqgC. Osim toga, prekomjerna ekspresija Rab5A u stanici vodi preuranjenom otpuštanju IqgC s makropinosoma, iako u stanicama deficitarnima za Rab5A nije opažen suprotan efekt. Stoga, na temelju ovih rezultata možemo samo pretpostaviti da akumulacija Rab5A na zatvorenom makropinosomu stvara dostatne količine Rab5A koji kompetira s RasG za vezanje na IqgC. Posljedično, disocijacija IqgC s RasG izaziva disocijaciju IqgC s makropinosoma. Ovaj model ipak zahtjeva dodatna istraživanja koja bi razjasnila fiziološki značaj interakcije IqgC i Rab5A.

6. Zaključak

Cilj ovog rada bio je razjasniti ulogu proteina IqgC u procesu makropinocitoze u amebi *Dictyostelium discoideum*. S obzirom na to da stanice *iqgC*⁻ kreirane u genetičkoj pozadini DdB značajno bolje rastu u tekućoj hranjivoj podlozi, imaju efikasniju makropinocitozu i stvaraju veće makropinosome u odnosu na stanice divljeg tipa, zaključujemo da IqgC igra važnu ulogu u negativnoj regulaciji makropinocitoze u prisutnosti RasGAP proteina NF1.

Iz lokalizacijskih studija proteina IqgC u odsutnosti GTPaze RasG te mutiranih varijanti proteina IqgC, koje ne vežu RasG, zaključujemo da je interakcija IqgC s RasG neophodna za regrutaciju IqgC na formirajući makropinosom. Pritom smo također pokazali da skoro sve skraćene varijante proteina IqgC gube unutarstaničnu lokalizaciju iz čega zaključujemo da su motivi važni za ciljanu lokalizaciju IqgC na membranu formirajućeg makropinosoma raspoređeni duž polipeptidnog lanca IqgC. Ipak, IqgC s delecijom funkcionalne domene RasGAP, koja je potrebna za interakciju s RasG, smješta se po cijeloj staničnoj membrani izuzev makropinocitotske čašice što nam ukazuje na važnost ove domene u navođenju IqgC specifično na regije membrane aktivirane za makropinocitozu.

Biokemijskim metodama smo identificirali malu GTPazu Rab5A kao novi interaktor proteina IqgC. Pokazali smo da IqgC izravno veže Rab5A u aktivnom obliku preko svoje domene RasGAP, ali da IqgC nije GAP za Rab5A što sugerira da bi mogao biti njezin efektor. Uz to, Rab5A prisutan u suvišku inhibira aktivnost GAP proteina IqgC prema RasG *in vitro*, a prekomjerna ekspresija Rab5A *in vivo* korelira s preuranjenom disocijacijom IqgC sa zatvorenog makropinosoma prije deaktivacije GTPaza Ras. Ipak, ovi rezultati nisu dovoljni da zaključimo da Rab5A potiče i odgovoran je za pravovremenu disocijaciju IqgC sa zatvorenog makropinosoma s obzirom na to da u stanicama deficitarnim za Rab5A nismo opazili produljeno zadržavanje IqgC na makropinosomu.

7. Popis literature

- Adachi H, Takahashi Y, Hasebe T, Shirouzu M, Yokoyama S, Sutoh K (1997). Dictyostelium IQGAP-related Protein Specifically Involved in the Completion of Cytokinesis. *J Cell Biol* **137**: 891–898.
- Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 39–51.
- Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* **4**: 686–689.
- Araki N, Egami Y, Watanabe Y, Hatae T (2007). Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp Cell Res* **313**: 1496–1507.
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, i sur. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* **63**: 851–859.
- Bar-Sagi D, Feramisco JR (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* **233**: 1061–1068.
- Barbieri MA, Kohn AD, Roth RA, Stahl PD (1998). Protein kinase B/akt and Rab5 mediate Ras activation of endocytosis. *J Biol Chem* **273**: 19367–19370.
- Barbieri MA, Li G, Colombo MI, Stahl PD (1994). Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis. *J Biol Chem* **269**: 18720–18722.
- Bloomfield G, Kay RR (2016). Uses and abuses of macropinocytosis. *J Cell Sci* **129**: 2697–2705.
- Bloomfield G, Tanaka Y, Skelton J, Ivens A, Kay RR (2008). Widespread duplications in the genomes of laboratory stocks of Dictyostelium discoideum. *Genome Biol* **9**: 1–9.
- Bloomfield G, Traynor D, Sander SP, Veltman DM, Pachebat JA, Kay RR (2015). Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in Dictyostelium. *Elife* **2015**: 1–25.
- Blümer J, Rey J, Dehmelt L, Maze T, Wu YW, Bastiaens P, i sur. (2013). RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J Cell Biol* **200**: 287–300.
- Bohdanowicz M, Schlam D, Hermansson M, Rizzuti D, Fairn GD, Ueyama T, i sur. (2013). Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Mol Biol Cell* **24**: 1700–1712.
- Bolourani P, Spiegelman G, Weeks G (2010). Ras Proteins Have Multiple Functions in Vegetative Cells of Dictyostelium. *Eukaryot Cell* **9**: 1728–1733.
- Bolourani P, Spiegelman GB, Weeks G (2006). Delineation of the roles played by RasG and

- RasC in cAMP-dependent signal transduction during the early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **17**: 4543–4550.
- Bonifacino JS, Hurley JH (2008). Retromer. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 427–436.
- Borchers AC, Langemeyer L, Ungermann C (2021). Who's in control? Principles of rab gtpase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *J Cell Biol* **220**: 1–15.
- Boudhraa Z, Carmona E, Provencher D, Mes-Masson AM (2020). Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis. *Front Cell Dev Biol* **8**: 345.
- Bozzaro S (2019). The past, present and future of dictyostelium as a model system. *Int J Dev Biol* **63**: 321–331.
- Bozzaro S, Bucci C, Steinert M (2008). Chapter 6 Phagocytosis and Host-Pathogen Interactions in *Dictyostelium* with a Look at Macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* **271**: 253–300.
- Brill S, Li S, Lyman CW, Church DM, Wasmuth JJ, Weissbach L, i sur. (1996). The Ras GTPase-Activating-Protein-Related Human Protein IQGAP2 Harbors a Potential Actin Binding Domain and Interacts with Calmodulin and Rho Family GTPases. *Mol Cell Biol* **16**: 4869–4878.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, i sur. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**: 715–728.
- Buckley CM, Gopaldass N, Bosmani C, Johnston SA, Soldati T, Insall RH, i sur. (2016). WASH drives early recycling from macropinosomes and phagosomes to maintain surface phagocytic receptors. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E5906–E5915.
- Buckley CM, King JS (2017). Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. *FEBS J* **284**: 3778–3790.
- Buckley CM, Pots H, Gueho A, Vines JH, Munn CJ, Phillips BA, i sur. (2020). Coordinated Ras and Rac Activity Shapes Macropinocytic Cups and Enables Phagocytosis of Geometrically Diverse Bacteria. *Curr Biol* **30**: 2912–2926.
- Cabezas A, Pattni K, Stenmark H (2006). Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1. *Gene* **371**: 34–41.
- Canton J, Schlam D, Breuer C, Gütschow M, Glogauer M, Grinstein S (2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat Commun* **7**: 1–12.
- Charpentier JC, Chen D, Lapinski PE, Turner J, Grigorova I, Swanson JA, i sur. (2020). Macropinocytosis drives T cell growth by sustaining the activation of mTORC1. *Nat Commun* **11**: 1–9.
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**: 317–329.
- Chisholm RL, Firtel RA (2004). Insights into morphogenesis from a simple developmental

- system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 531–541.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999a). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**: 621–625.
- Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, i sur. (1999b). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**: 249–252.
- Chubb JR, Wilkins A, Thomas GM, Insall RH (2000). The Dictyostelium RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J Cell Sci* **113**: 709–719.
- Clarke M, Köhler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerish G (2002). Dynamics of the vacuolar H⁺-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostellium cells. *J Cell Sci* **115**: 2893–2905.
- Clarke M, Maddera L, Engel U, Gerisch G (2010). Retrieval of the Vacuolar H⁺-ATPase from Phagosomes Revealed by Live Cell Imaging. *PLoS One* **5**: e8585.
- Clayton EL, Cousin MA (2009). The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem* **111**: 901–914.
- Colicelli J (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**: 1–31.
- Collins RN (2003). “Getting it on” - GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Mol Cell* **12**: 1064–1066.
- Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, i sur. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* **497**: 633–637.
- Commisso C, Debnath J (2018). Macropinocytosis fuels prostate cancer. *Cancer Discov* **8**: 800–802.
- Condon ND, Heddleston JM, Chew TL, Luo L, McPherson PS, Ioannou MS, i sur. (2018). Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages. *J Cell Biol* **217**: 3873–3885.
- Conner SD, Schmid SL (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37–44.
- Cox AD, Der CJ (2010). Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**: 2–27.
- Dam TJP van, Bos JL, Snel B (2011). Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases* **2**: 4–16.
- Davidson SM, Jonas O, Keibler MA, Hou HW, Luengo A, Mayers JR, i sur. (2017). Direct evidence for cancer-cell-autonomous extracellular protein catabolism in pancreatic tumors. *Nat Med* **23**: 235–241.
- Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kristen sarcoma

- viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 3637–3640.
- Donaldson JG, Jackson CL (2011). ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 362–375.
- Dormann D, Weijer G, Dowler S, Weijer CJ (2004). In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci* **117**: 6497–6509.
- Dumontier M, Höcht P, Mintert U, Faix J (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J Cell Sci* **113**: 2253–2265.
- Egami Y, Taguchi T, Maekawa M, Arai H, Araki N (2014). Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation: Gtpases and phosphoinositides in macropinocytosis. *Front Physiol* **5**: 374.
- Eichinger I, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, i sur. (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**: 43–57.
- Faix J, Clougherty C, Konzok A, Mintert U, Murphy J, Albrecht R, i sur. (1998). The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility. *J Cell Sci* **111**: 3059–3071.
- Faix J, Dittrich W (1996). DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett* **394**: 251–257.
- Faix J, Kreppel L, Shaulsky G, Schleicher M, Kimmel AR (2004). A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in Dictyostelium discoideum using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res* **32**: 1–7.
- Faix J, Weber I, Mintert U, Köhler J, Lottspeich F, Marriott G (2001). Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J* **20**: 3705–3715.
- Filić V, Marinović M, Faix J, Weber I (2012). A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J Cell Sci* **125**: 387–398.
- Finicle BT, Jayashankar V, Edinger AL (2018). Nutrient scavenging in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**: 619–633.
- Franke J, Kessin R (1977). A defined minimal medium for axenic strains of Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2157–2161.
- Frech M, John J, Pizon V, Chardin P, Tavitian A, Clark R, i sur. (1990). Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science* **249**: 169–171.
- Freeman SA, Uderhardt S, Saric A, Collins RF, Buckley CM, Mylvaganam S, i sur. (2020). Lipid-gated monovalent ion fluxes regulate endocytic traffic and support immune surveillance. *Science* **367**: 301–305.

- Friedberg F, Rivero F (2010). Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in *Dictyostelium discoideum*: An inventory. *Mol Biol Rep* **37**: 2853–2862.
- Fujii M, Kawai K, Egami Y, Araki N (2013). Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Sci Rep* **3**: 1–10.
- Fukata M, Kuroda S, Fujii K, Nakamura T, Shoji I, Matsuura Y, i sur. (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem* **272**: 29579–29583.
- Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K (2011). The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 493–504.
- Goody RS, Müller MP, Wu YW (2017). Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. *Biol Chem* **398**: 565–575.
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006). Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11821–11827.
- Hao Y-H, Doyle JM, Ramanathan S, Gomez TS, Jia D, Xu M, i sur. (2013). Regulation of WASH-Dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination. *Cell* **152**: 1051–1064.
- Hart MJ, Callow MG, Souza B, Polakis P (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J* **15**: 2997–3005.
- Heasman SJ, Ridley AJ (2008). Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 690–701.
- Hedman AC, Smith JM, Sacks DB (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Rep* **16**: 427–446.
- Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I (2015). Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem* **396**: 831–848.
- Hoeller O, Bolourani P, Clark J, Stephens LR, Hawkins PT, Weiner OD, i sur. (2013). Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. *J Cell Sci* **126**: 4296–4307.
- Hoffmann C, Finsel I, Otto A, Pfaffinger G, Rothmeier E, Hecker M, i sur. (2014). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* **16**: 1034–1052.
- Janmey PA, Lindberg U (2004). Cytoskeletal regulation: Rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 658–666.
- Jeon TJ, Lee D-J, Merlot S, Weeks G, Firtel RA (2007). Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J Cell Biol* **176**: 1021–1033.
- Junemann A, Filić V, Winterhoff M, Nordholz B, Litschko C, Schwellenbach H, i sur. (2016). A Diaphanous-related formin links Ras signaling directly to actin assembly in macropinocytosis and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E7464–E7473.

- Kay RR (2021). Macropinocytosis: Biology and mechanisms. *Cells Dev* **168**: 203713.
- Kim GHE, Dayam RM, Prashar A, Terebiznik M, Botelho RJ (2014). PIKfyve inhibition interferes with phagosome and endosome maturation in macrophages. *Traffic* **15**: 1143–1163.
- Kim SM, Nguyen TT, Ravi A, Kubiniok P, Finicle BT, Jayashankar V, i sur. (2018). PTEN deficiency and AMPK activation promote nutrient scavenging and anabolism in prostate cancer cells. *Cancer Discov* **8**: 866–883.
- King JS, Kay RR (2019). The origins and evolution of macropinocytosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **374**: 20180158.
- Koehler JA, Moran MF (2001). Regulation of extracellular signal-regulated kinase activity by p120 RasGAP does not involve its pleckstrin homology or calcium-dependent lipid binding domains but does require these domains to regulate cell proliferation. *Cell Growth Differ* **12**: 551–561.
- Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, i sur. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**: 396–401.
- Langemeyer L, Borchers AC, Herrmann E, Füllbrunn N, Han Y, Perz A, i sur. (2020). A conserved and regulated mechanism drives endosomal rab transition. *Elife* **9**: 1–20.
- Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Fiore PP Di (2004). Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* **429**: 309–314.
- Lee S, Shen Z, Robinson DN, Briggs S, Firtel RA (2010). Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol Biol Cell* **21**: 1810–1824.
- Levin R, Grinstein S, Schlam D (2015). Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1851**: 805–823.
- Li HY, Cao K, Zheng Y (2003). Ran in the spindle checkpoint: A new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol* **13**: 553–557.
- Li S, Balmain A, Counter CM (2018a). A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer* **18**: 767–777.
- Li X, Edwards M, Swaney KF, Singh N, Bhattacharya S, Borleis J, i sur. (2018b). Mutually inhibitory Ras-PI(3,4)P2 feedback loops mediate cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E9125–E9134.
- Lim CJ, Spiegelman GB, Weeks G (2001). RasC is required for optimal activation of adenylyl cyclase and Akt/PKB during aggregation. *EMBO J* **20**: 4490–4499.
- Lim CJ, Zawadzki KA, Khosla M, Secko DM, Spiegelman GB, Weeks G (2005). Loss of the Dictyostelium RasC protein alters vegetative cell size, motility and endocytosis. *Exp Cell Res* **306**: 47–55.
- Lim JP, Gleeson PA (2011). Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large

- gulps. *Immunol Cell Biol* **89**: 836–843.
- Lin XP, Mintern JD, Gleeson PA (2020). Macropinocytosis in different cell types: Similarities and differences. *Membranes* **10**: 1–21.
- Lippé R, Miaczynska M, Rybin V, Runge A, Zerial M (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* **12**: 2219–2228.
- Liu K, Li G (1998). Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to Rab5 and stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* **273**: 10087–10090.
- Liu X, Shu S, Yu S, Lee DY, Piszczek G, Gucek M, i sur. (2014). Biochemical and biological properties of cortexillin III, a component of Dictyostelium DGAP1-cortexillin complexes. *Mol Biol Cell* **25**: 2026–2038.
- Liu Z, Roche PA (2015). Macropinocytosis in phagocytes: Regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front Physiol* **6**: 1.
- Lutton JE, Coker HLE, Paschke P, Munn CJ, King JS, Bretschneider T, i sur. (2023). Formation and closure of macropinocytic cups in Dictyostelium. *Curr Biol* **33**: 3083-3096.
- Maekawa M, Terasaka S, Mochizuki Y, Kawai K, Ikeda Y, Araki N, i sur. (2014). Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc Natl Acad Sci* **111**.
- Maniak M (2002). Conserved features of endocytosis in Dictyostelium. *Int Rev Cytol* **221**: 257–287.
- Marinović M, Mijanović L, Šostar M, Vizovišek M, Junemann A, Fonović M, i sur. (2019). IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 1289–1298.
- Maxson ME, Sarantis H, Volchuk A, Brumell JH, Grinstein S (2021). Rab5 regulates macropinocytosis by recruiting the inositol 5-phosphatases OCRL and Inpp5b that hydrolyse PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci* **134**.
- Mellström K, Heldin CH, Westermark B (1988). Induction of circular membrane ruffling on human fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res* **177**: 347–359.
- Miao W, Eichelberger L, Baker L, Marshall MS (1996). p120 Ras GTPase-activating protein interacts with Ras-GTP through specific conserved residues. *J Biol Chem* **271**: 15322–15329.
- Milburn M V., Tong L, DeVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, i sur. (1990). Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins. *Science* **247**: 939–945.
- Mishra A, Eathiraj S, Corvera S, Lambright DG (2010). Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10866–10871.

- Mondal S, Burgute B, Rieger D, Müller R, Rivero F, Faix J, i sur. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton by an interaction of IQGAP related protein GAPA with Filamin and Cortexillin I. *PLoS One* **5**: e15440.
- Mondal S, Hsiao K, Goueli SA (2015). A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev Technol* **13**: 444–55.
- Morishita S, Wada N, Fukuda M, Nakamura T (2019). Rab5 activation on macropinosomes requires ALS2, and subsequent Rab5 inactivation through ALS2 detachment requires active Rab7. *FEBS Lett* **593**: 230–241.
- Mylvaganam S, Freeman SA, Grinstein S (2021). The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Curr Biol* **31**: R619–R632.
- North MJ, Williams KL (1978). Relationship between the axenic phenotype and sensitivity to omega-aminocarboxylic acids in *Dictyostelium discoideum*. *J Gen Microbiol* **107**: 223–230.
- Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, i sur. (2017). Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun* **8**: 1–14.
- Palm W, Araki J, King B, DeMatteo RG, Thompson CB (2017). Critical role for PI3-kinase in regulating the use of proteins as an amino acid source. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E8628–E8636.
- Park B, Kim H, Jeon TJ (2018). Loss of RapC causes defects in cytokinesis, cell migration, and multicellular development of *Dictyostelium*. *Biochem Biophys Res Commun* **499**: 783–789.
- Paschke P, Knecht DA, Silale A, Traynor D, Williams TD, Thomason PA, i sur. (2018). Rapid and efficient genetic engineering of both wild type and axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *PLoS One* **13**: e0196809.
- Pena V, Hothorn M, Eberth A, Kaschau N, Parret A, Gremer L, i sur. (2008). The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction. *EMBO Rep* **9**: 350–355.
- Peng X, Wang T, Gao H, Yue X, Bian W, Mei J, i sur. (2021). The interplay between IQGAP1 and small GTPases in cancer metastasis. *Biomed Pharmacother* **135**: 111243.
- Porat-Shliom N, Kloog Y, Donaldson JG (2008). A unique platform for H-ras signaling involving clathrin-independent endocytosis. *Mol Biol Cell* **19**: 765–775.
- Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**: 497–508.
- Puccini J, Badgley MA, Bar-Sagi D (2022). Exploiting cancer’s drinking problem: regulation and therapeutic potential of macropinocytosis. *Trends in Cancer* **8**: 54–64.
- Putar D, Čizmar A, Chao X, Šimić M, Šoštar M, Čutić T, i sur. (2024). IqgC is a potent regulator

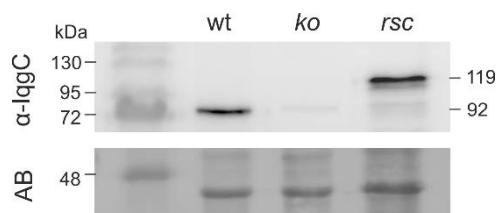
- of macropinocytosis in the presence of NF1 and its loading to macropinosomes is dependent on RasG. *Open Biol* **14**: 230372.
- Qian Y, Wang X, Liu Y, Li Y, Colvin RA, Tong L, i sur. (2014). Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells. *Cancer Lett* **351**: 242–251.
- Recouvreux MV, Commisso C (2017). Macropinocytosis: A metabolic adaptation to nutrient stress in cancer. *Front Endocrinol* **8**: 261.
- Redelman-Sidi G, Binyamin A, Gaeta I, Palm W, Thompson CB, Romesser PB, i sur. (2018). The Canonical Wnt Pathway Drives Macropinocytosis in Cancer. *Cancer Res* **78**: 4658–4670.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401–410.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**: 735–749.
- Robbins SM, Williams JG, Jermyn KA, Spiegelman GB, Weeks G (1989). Growing and developing Dictyostelium cells express different ras genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 938–942.
- Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, Stahl PD (2000). Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol* **68**: 627–632.
- Roy M, Li Z, Sacks DB (2005). IQGAP1 Is a Scaffold for Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Mol Cell Biol* **25**: 7940–7952.
- Scheffzek K, Ahmadian MR (2005). GTPase activating proteins: Structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**: 3014–3038.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, i sur. (1997). The Ras-RasGAP complex: Structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science* **277**: 333–338.
- Scheffzek K, Shivalingaiah G (2019). Ras-Specific GTPase-Activating Proteins—Structures, Mechanisms, and Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**: a031500.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682.
- Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Parton RG, i sur. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol* **2**: e261.
- Seabra MC, Wasmeier C (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 451–457.
- Seaman MNJ, Gautreau A, Billadeau DD (2013). Retromer-mediated endosomal protein sorting: All WASHed up! *Trends Cell Biol* **23**: 522–528.

- Seastone DJ, Zhang L, Buczynski G, Rebstein P, Weeks G, Spiegelman G, i sur. (1999). The small M(r) Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **10**: 393–406.
- Sechi AS, Wehland J (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P₂ influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* **113**: 3685–3695.
- Shannon KB (2012). IQGAP Family Members in Yeast, *Dictyostelium*, and Mammalian Cells. *Int J Cell Biol* **2012**: 1–14.
- Shinde SR, Maddika S (2018). Post translational modifications of Rab GTPases. *Small GTPases* **9**: 49–56.
- Smith SJM, Rittinger K (2002). Preparation of GTPases for structural and biophysical analysis. *Methods Mol Biol* **189**: 13–24.
- Somesh BP, Vlahou G, Iijima M, Insall RH, Devreotes P, Rivero F (2006). RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis. *Eukaryot Cell* **5**: 1648–1663.
- Sot B, Kötting C, Deaconescu D, Suveyzdis Y, Gerwert K, Wittinghofer A (2010). Unravelling the mechanism of dual-specificity GAPs. *EMBO J* **29**: 1205–1214.
- Srinivasan K, Wright GA, Hames N, Housman M, Roberts A, Aufderheide KJ, i sur. (2013). Delineating the core regulatory elements crucial for directed cell migration by examining folic-acid-mediated responses. *J Cell Sci* **126**: 221–233.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**: 1287–1296.
- Sussman M (1987). Cultivation and Synchronous Morphogenesis of *Dictyostelium* under Controlled Experimental Conditions. *Methods Cell Biol* **28**: 9–29.
- Sztul E, Chen PW, Casanova JE, Cherfils J, Dacks JB, Lambright DG, i sur. (2019). Arf GTPases and their GEFs and GAPs: Concepts and challenges. *Mol Biol Cell* **30**: 1249–1271.
- Tall GG, Barbieri MA, Stahl PD, Horazdovsky BF (2001). Ras-Activated Endocytosis Is Mediated by the Rab5 Guanine Nucleotide Exchange Activity of RIN1 membrane trafficking events early in the endocytic path-way (Gorvel et al After cargo-bearing endocytic vesicles have budded from the The functional interaction between the RA and Vps9p. *Dev Cell* **1**: 73–82.
- Thines L, Roushar FJ, Hedman AC, Sacks DB (2023). The IQGAP scaffolds: Critical nodes bridging receptor activation to cellular signaling. *J Cell Biol* **222**: 1–20.
- Trahey M, McCormick F (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**: 542–545.
- Tu H, Wang Z, Yuan Y, Miao X, Li D, Guo H, i sur. (2022). The PripA-TbcrA complex-centered Rab GAP cascade facilitates macropinosome maturation in *Dictyostelium*. *Nat*

- Commun* **13**: 1787.
- Tuxworth RI, Cheetham JL, Machesky LM, Spiegelmann GB, Weeks G, Insall RH (1997). Dictyostelium RasG is required for normal motility and cytokinesis, but not growth. *J Cell Biol* **138**: 605–614.
- Veithen A, Cupers P, Baudhuin P, Courtoy PJ (1996). v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J Cell Sci* **109**: 2005–2012.
- Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Haastert PJM Van (2009). A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid* **61**: 110–118.
- Veltman DM, Williams TD, Bloomfield G, Chen BC, Betzig E, Insall RH, i sur. (2016). A plasma membrane template for macropinocytic cups. *Elife* **5**: 24.
- Vetter IR, Wittinghofer A (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **294**: 1299–1304.
- Vines JH, King JS (2019). The endocytic pathways of dictyostelium discoideum. *Int J Dev Biol* **63**: 461–471.
- Walsh AB, Bar-Sagi D (2001). Differential Activation of the Rac Pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem* **276**: 15609–15615.
- Wandinger-Ness A, Zerial M (2014). Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a022616.
- Wang Y, He H, Srivastava N, Vikarunnessa S, Chen Y, Jiang J, i sur. (2012). Plexins Are GTPase-Activating Proteins for Rap and Are Activated by Induced Dimerization. *Sci Signal* **5**: ra6–ra6.
- Watts DJ, Ashworth JM (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J* **119**: 171.
- Weber S, Steiner B, Welin A, Hilbi H (2018). Legionella-Containing Vacuoles Capture PtdIns(4)P-Rich Vesicles Derived from the Golgi Apparatus. *MBio* **9**: 10–128.
- Weissbach L, Settleman J, Kalady MF, Snijders AJ, Murthy AE, Yan - YX, i sur. (1994). Identification of a human RasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem* **269**: 20517–20521.
- Welliver TP, Swanson JA (2012). A growth factor signaling cascade confined to circular ruffles in macrophages. *Biol Open* **1**: 754–760.
- Wennerberg K, Der CJ (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301–1312.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**: 843–846.
- Wennström S, Hawkins P, Cooke F, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M, i sur. (1994). Activation

- of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol* **4**: 385–393.
- Whitecross DE, Anderson DH (2017). Identification of the Binding Sites on Rab5 and p110beta Phosphatidylinositol 3-kinase. *Sci Rep* **7**: 16194.
- Wilkins A, Khosla M, Fraser DJ, Spiegelman GB, Fisher PR, Weeks G, i sur. (2000). Dictyostelium RasD is required for normal phototaxis, but not differentiation. *Genes Dev* **14**: 1407–1413.
- Williams KL, Kessin RH, Newell PC (1974). Parasexual genetics in Dictyostelium discoideum: mitotic analysis of acriflavin resistance and growth in axenic medium. *J Gen Microbiol* **84**: 59–69.
- Williams TD, Kay RR (2018). The physiological regulation of macropinocytosis during Dictyostelium growth and development. *J Cell Sci* **131**: jcs213736.
- Williams TD, Paschke PI, Kay RR (2019). Function of small GTPases in Dictyostelium macropinocytosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **374**: 20180150.
- Xia J, Jia P, Hutchinson KE, Dahlman KB, Johnson D, Sosman J, i sur. (2014). A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: A road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol Cancer Ther* **13**: 1918–1928.
- Xu G, O’Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, i sur. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**: 599–608.
- Xu X, Bhimani S, Pots H, Wen X, Jeon TJ, Kortholt A, i sur. (2021). Membrane Targeting of C2GAP1 Enables Dictyostelium discoideum to Sense Chemoattractant Gradient at a Higher Concentration Range. *Front Cell Dev Biol* **9**: 1–10.
- Xu X, Pots H, Gilsbach BK, Parsons D, Veltman DM, Ramachandra SG, i sur. (2022). C2GAP2 is a common regulator of Ras signaling for chemotaxis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Front Immunol* **13**: 1–14.
- Xu X, Wen X, Veltman DM, Keizer-Gunnink I, Pots H, Kortholt A, i sur. (2017). GPCR-controlled membrane recruitment of negative regulator C2GAP1 locally inhibits Ras signaling for adaptation and long-range chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E10092–E10101.
- Yoshida S, Hoppe AD, Araki N, Swanson JA (2009). Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages. *J Cell Sci* **122**: 3250–3261.
- Zhang S, Charest PG, Firtel RA (2008). Spatiotemporal Regulation of Ras Activity Provides Directional Sensing. *Curr Biol* **18**: 1587–1593.
- Zhang Z, Zhang T, Wang S, Gong Z, Tang C, Chen J, i sur. (2014). Molecular mechanism for Rabex-5 GEF activation by Rabaptin-5. *Elife* **3**: e02687.
- Zhu G, Zhai P, Liu J, Terzyan S, Li G, Zhang XC (2004). Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 975–983.

8. Prilozi

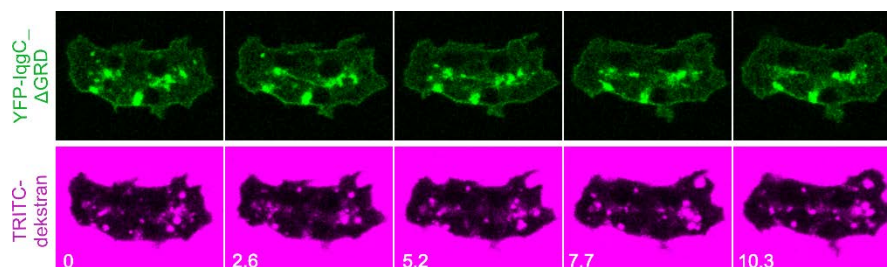


Prilog 1. Rezultati analize Western s antitijelom anti-IqgC na lizatima stanica divljeg tipa koje imaju endogeni IqgC (wt, 92 kDa), stanica *iqgC*^(ko) i stanica *iqgC*^(rsc) koje eksprimiraju fluorescentno obilježeni protein IqgC (*rsc*, 119 kDa) u DdB genetičkoj pozadini. Kratica AB označava bojanje membrane bojom amido crno radi vizualizacije ukupnih proteina u uzorcima.

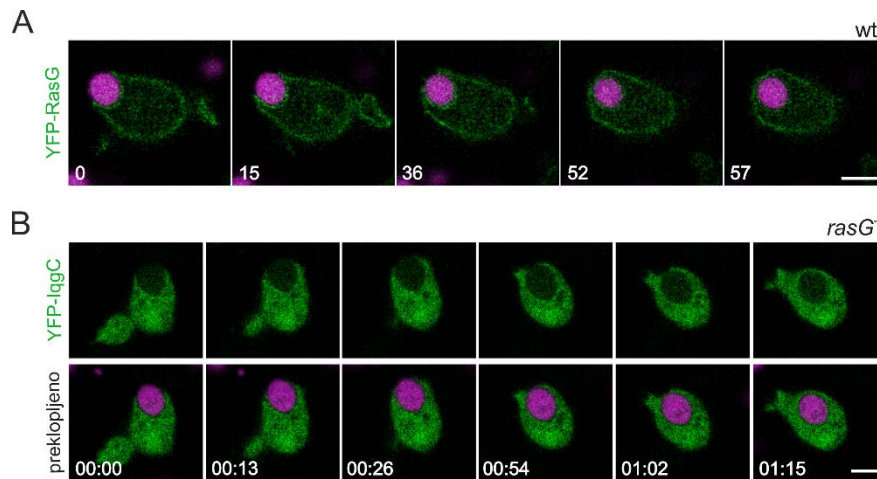
CLUSTAL O(1.2.4) sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci

p120GAP_domena-RasGAP	714	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALS--HVCQGDRLLASILLRIFL---HEKLESL	768
IqgC_domena-RasGAP	130	-----DHYGQLFYLL-QNNTYYIAQLAKLVKVGIEDNLLQTVMFTLYGNQYEEKEEHL	181
		:.*:.: * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		LLCTLN---DREISMEDEATLFRATTLASTLMEQYMKAT-ATQFVHHALKDSILKIM--	822
IqgC_domena-RasGAP		LLSMFQKVLQEEFKKATSIKSLRANALTRMMTTYTRRGGPQQYLYKQRLTKPLADITSN	241
		** : : : : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		-----ES-----KQSCELSPSKLEKNE-----VNTNLTHLLNLI	852
IqgC_domena-RasGAP		KDLILEVNPSTVYENYINEYETKTKGKPSPLKRVKVSPEECADNQNVDIIKPRIDKLEIG	301
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		SELVEKIFMASEILPPTLRYIYGCLQKSVQHKWPTNTTMR-TRVVSQVFLFLICPAILN	911
IqgC_domena-RasGAP		DQFLDSLSSVDAVPGIRWICKQIRELVKQKFPQATRAQTCGLIGGFFLLRYINPAVVT	361
	* : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		PRMFNII SDSFPIAARTLLVAKSVQNLALVVEFGA-KEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMF	970
IqgC_domena-RasGAP		PQAFMLVDAKLSNNTKRNLTFAKMLQNLALNIMFGGVKEFMFEPLNVFLDRNKDRLNDF	421
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		LDELGNVPELPDTTEHSRTDLR---DL---AALHEIC-----VAHSDELRL	1010
IqgC_domena-RasGAP		LES LTDVESLS DHLQLDKYLAMAKTSDITINITLNEMYFVHSLLEQHINSLAPQNDPLR	481
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
p120GAP_domena-RasGAP		TLSENERGAQQHVLKLLAI TELLLQQKQNYTKTNDVR	1047
IqgC_domena-RasGAP		VI LNDLGAAPPQLSR TENANVEL-KLTNR-----	510
		..* : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

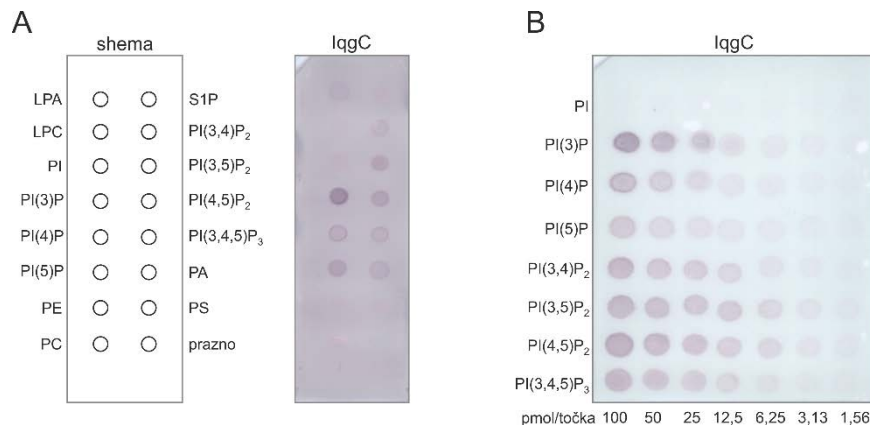
Prilog 2. Prikaz sravnjivanja aminokiselinskih slijedova domena RasGAP humanog proteina p¹²⁰GAP/RASA1 i *D. discoideum* proteina IqgC programom Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). U proteinu IqgC mutirala sam triplete baza označenih aminokiselina odgovornih za interakciju s GTPazama Ras. Magenta bojom označen je arginin na 205. mjestu mutiran u alanin (R205A), žutom bojom označeni su leucin i arginin na 352. i 353. mjestu mutirani u glicin i alanin (L352G, R353A), a zelenom bojom označen je asparagin na 392. mjestu mutiran u alanin (N392A).



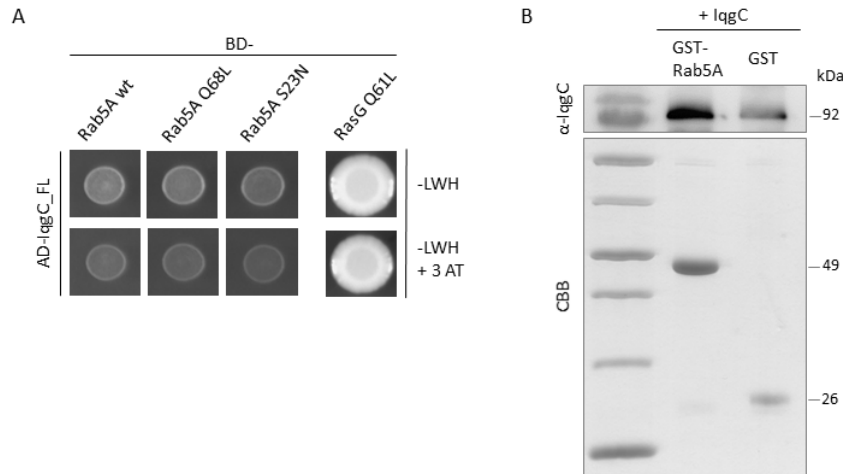
Prilog 3. Odvojeni kanali pokazuju lokalizaciju skraćene varijante proteina IqgC bez domene RasGAP obilježene fluorescentnim proteinom YFP (YFP-IqgC_ΔGRD) tijekom makropinocitoze tekuće hranjive podloge s dodanim dekstranom obilježenim fluorescentnom bojom TRITC. YFP-IqgC_ΔGRD je lokaliziran duž cijele stanične membrane, osim na nastajućem makropinosomu. Snažan unutarstanični signal vidljiv u YFP kanalu vjerojatno je posljedica prekomjerne ekspresije ovog krnjeg proteina. Veličina mjerila iznosi 5 μm, a vrijeme je dano u sekundama.



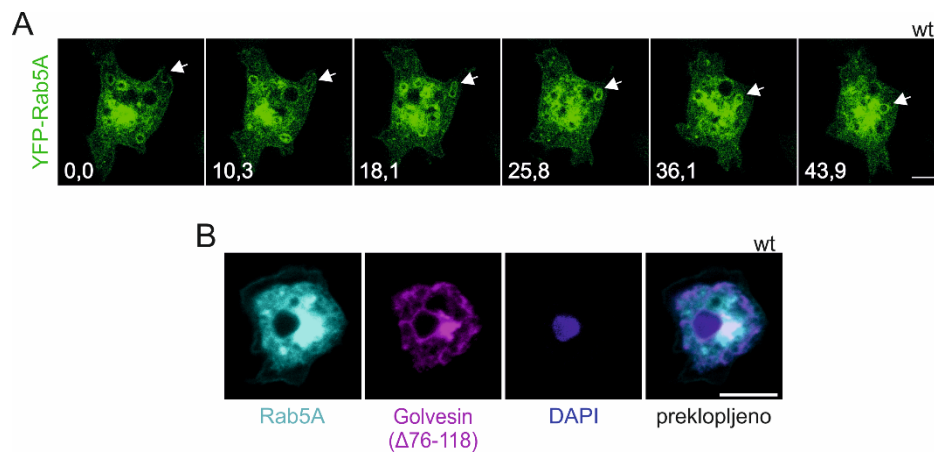
Prilog 4. A) YFP-RasG (zeleno) je lokaliziran na staničnoj membrani i nascentnim fagocitotskim čašicama tijekom unosa kvasaca obilježenih fluorescentnom bojom TRITC (magenta). **B)** YFP-IqgC nije lokaliziran na fagocitotskim čašicama u stanicama *rasG* tijekom unosa kvasaca obilježenih fluorescentnom bojom TRITC. Veličina mjerila iznosi 5 μ m. U panelu A vrijeme je prikazano u sekundama, a u B u formatu minute:sekunde.



Prilog 5. Točkasto bugaćenje lipida s bakterijski eksprimiranim i pročišćenim proteinom IqgC. **A)** Cjeloviti IqgC pročišćen iz bakterijskih stanica neselektivno veže fosfoinozitide s najvećim afinitetom prema PI(3)P. **B)** Membrana *PIP array* s istim proteinom IqgC i padajućim koncentracijama fosfatidilinozitola i svih fosfoinozitida pokazuje snažno vezanje prema PI(3)P i PI-bisfosfatima. Kratice: LPA – lizofosfatidna kiselina, LPC – lizofosfokolin, PI – fosfatidilinozitol, PI(3)P – fosfatidilinozitol 3-fosfat, PI(4)P – fosfatidilinozitol 4-fosfat, PI(5)P – fosfatidilinozitol 5-fosfat, PE – fosfatidiletanolamin, PC – fosfatidilkolin, S1P – sfingozin 1-fosfat, PI(3,4)P₂ – fosfatidilinozitol 3,4-bisfosfat, PI(3,5)P₂ – fosfatidilinozitol 3,5-bisfosfat, PI(4,5)P₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, PI(3,4,5)P₃ – fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat, PA – fosfatidna kiselina, PS – fosfatidilserin, prazno – negativna kontrola.



Prilog 6. GTPaza Rab5A je interaktor proteina IqgC. **A)** Sustavom dva hibrida u kvascu testirala sam izravnu interakciju IqgC s divljim tipom (wt), konstitutivno aktivnom (Q68L) i konstitutivno neaktivnom (S23N) varijantom GTPaze Rab5A. Iz rezultata se ne može potvrditi interakcija Rab5A i IqgC. Interakciju IqgC i konstitutivno aktivne GTPaze RasG(Q61L) koristila sam kao pozitivnu kontrolu. **B)** Rezultati testa GST-Rab5A pull-down s pročišćenim proteinom IqgC pokazuju da IqgC izravno veže Rab5A. Analiza Western napravljena je s antitijelom anti-IqgC (gornji panel). GST pull-down koristila sam kao negativnu kontrolu. SDS-PA gel pobojan bojom *Coomassie* briljant plavo (CBB) pokazuje količinu proteina vezanih na glutation-agarozu u oba pull-down-a (donji panel).



Prilog 7. Lokalizacija Rab5A u stanici. **A)** YFP-Rab5A u živim stanicama je lokaliziran na staničnoj membrani, membrani makropinosoma i preinuklearnim strukturama. Intenzitet signala na makropinosomu postepeno se povećava nakon zatvaranja makropinosoma. **B)** mRFP-Rab5A je kolokaliziran s GFP-golgesinom(Δ76-118), probom za Golgijev aparat, u fiksiranim stanicama. Veličina mjerila je 5 μm, a vrijeme je dato u sekundama.

9. Popis kratica

3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
AD	engl. <i>activation domain</i>
ATP	adenozin-trifosfat
BD	engl. <i>binding domain</i>
BCIP	5-brom-4-klor-3-indolifosfat p-toluidin
BSA	albumin govedeg seruma
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CHD	engl. <i>calponin homology domain</i>
DTT	ditiotretitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EEA1	engl. <i>early endosome antigen 1</i>
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
EGTA	etilen glikol-bis(β -aminoetil eter)-tetraoctena kiselina
FBS	fetalni goveđi serum
GAP	engl. <i>GTPase activating proteins</i>
GDP	gvanozin-difosfat
GEF	engl. <i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
GRD	engl. <i>GAP-related domain</i>
GST	glutation-S-transferaza
GTP	gvanozin-trifosfat
GTPaza	engl. <i>guanosine triphosphatase</i>
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
NF1	neurofibromin 1
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza
PI	fosfatidilinozitol
PI(3)P	fosfatidilinozitol 3-fosfat
PI(4)P	fosfatidilinozitol 4-fosfat
PI(5)P	fosfatidilinozitol 5-fosfat

PI(3,4)P ₂	fosfatidilinozitol 3,4-bisfosfat
PI(3,5)P ₂	fosfatidilinozitol 3,5-bisfosfat
PI(4,5)P ₂	fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
PI(3,4,5)P ₃	fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat
PIP	fosfoinozitidi
PMSF	fenilmetan-sulfonil-florid
RBD	engl. <i>Ras-binding domain</i>
RGct	engl. <i>Ras-GAP C-terminus</i>
RTK	receptori tirozin-kinaze
SDS	natrijev dodecil-sulfat
TRITC	tetrametilrodamin-izotiocijanat-klorid
V-ATPaza	vakuolarna H ⁺ ATPaza
Y2H	engl. <i>yeast two-hybrid</i>
YFP	engl. <i>yellow fluorescent protein</i>

10. Životopis

Darija Putar Brajković rođena je u Varaždinu 1995. godine. Završila je Opću gimnaziju u Ivancu te preddiplomski i diplomski studij na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Tijekom studija bila je aktivna članica Udruge studenata biologije BIUS. Diplomirala je 2018. godine eksperimentalnu biologiju, modul Fiziologija i imunologija, a istraživanje za diplomski rad provela je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga pod vodstvom prof. dr. sc. Nataše Jovanov Milošević. Nakon završenog studija provela je tri mjeseca na Erasmus+ stručnoj praksi pod vodstvom Stefana Barakata, Ph.D., M.D., na Zavodu za kliničku genetiku Erasmus kliničkog centra u Nizozemskoj. Od kolovoza 2019. zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković kao asistent u Laboratoriju za staničnu dinamiku prof. dr. sc. Igora Webera, gdje započinje izradu doktorskog rada pod mentorstvom dr. sc. Vedrane Filić Mileta. U listopadu 2019. upisuje Poslijediplomski studij biologije PMF-a u Zagrebu. U rujnu 2021. provela je mjesec dana na znanstvenom usavršavanju u laboratoriju prof. dr. sc. Pierra Cossona u Ženevi u Švicarskoj, u sklopu Hrvatsko-švicarskog programa. Sudjelovala je na 6 međunarodnih i domaćih konferencija gdje je predstavila rezultate svog doktorskog istraživanja s pet posterskih priopćenja i jednim predavanjem na *Dictyostelium* International Conference Dicty2023. Za sudjelovanje na 4. Hrvatskom mikroskopijskom kongresu 2022. osvojila je nagradu za najbolji poster. Članica je Hrvatskog mikroskopijskog društva i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Publikacije:

Putar D, Čizmar A, Chao X, Šimić M, Šoštar M, Ćutić T, Mijanović L, Smolko A, Tu H, Cosson P, Weber I, Cai H, Filić V (2024). IqgC is a potent regulator of macropinocytosis in the presence of NF1 and its loading to macropinosomes is dependent on RasG. *Open Biol* **14**: 230372.

Filić V, Mijanović L, Putar D, Talajić A, Ćetković H, Weber I (2021). Regulation of the Actin Cytoskeleton via Rho GTPase Signalling in *Dictyostelium* and Mammalian Cells: A Parallel Slalom. *Cells* **10**: 1592.

Perenthaler E, Nikoncuk A, Yousefi S, Berdowski WM, Alsagob M, Capo I, van der Linde HC, van den Berg P, Jacobs EH, Putar D i sur. (2020). Loss of UGP2 in brain leads to a severe epileptic encephalopathy, emphasizing that bi-allelic isoform-specific start-loss mutations of essential genes can cause genetic diseases. *Acta Neuropathol* **139**.