

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Apolena Zounarová

Mechanismy regulace funkce komplexu adaptorového proteinu 2 v průběhu endocytózy
Mechanisms regulating the function of adaptor protein 2 complex during endocytosis

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze dne 1. května 2021

Poděkování

Poděkování patří mé školitelce, Mgr. Marii Macůrkové, Ph.D., za věnovaný čas, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vedení práce.

Abstrakt

Komplex adaptorového proteinu 2 (AP2) zprostředkovává vazbu klatrinu na plazmatickou membránu, a umožňuje tak sestavení klatrinového obalu endocytického váčku. AP2 však zodpovídá také za výběr proteinového karga, a to buď přímou interakcí s endocytickými motivy YxxΦ a [DE]xxxL[LI] na cytosolických doménách karga, nebo prostřednictvím dalších adaptorových proteinů, z nichž nejznámější jsou β-arrestin a ARH. Vazebná místa pro endocytické motivy se nacházejí v core komplexu AP2 a stejně jako vazebné místo pro klatrin jsou v neaktivní cytosolické formě AP2 blokována autoinhibičním mechanismem. Vazbě endocytických motivů a klatrinu proto musí předcházet změna konformace komplexu AP2, která je indukována membránovými fosfatidylinositol-4,5-bisfosfáty a výrazně usnadněna fosforylací na Thr156 kinázou AAK1. AP2 je důležitý také v regulaci pozdějších fází endocytózy, při kterých rekrutuje proteiny indukující zakřivení membrány, odštěpení váčku, a nakonec i rozložení klatrinového obalu. Opětovné asociaci AP2 s plazmatickou membránou je zabráněno proteinem NECAP, avšak přesný mechanismus inaktivace je stále neznámý.

Klíčová slova: adaptorový protein 2, endocytóza, AAK1, rozpoznání karga, klatrin, endocytóza zprostředkovaná klatrinem, regulace endocytózy

Abstract

Adaptor protein complex 2 (AP2) mediates the interaction of clathrin with the plasma membrane and thus enables the clathrin-coated vesicle formation. AP2 is also responsible for cargo recognition and it recognizes cargo either directly using endocytic motifs YxxΦ or [DE]xxxL[LI] in the cytosolic domains of cargo or indirectly via additional adaptor proteins from which β-arrestin and ARH are the best-known. The binding sites for endocytic motifs are located in the core of AP2 complex and, similarly to the clathrin-binding site, they are blocked by autoinhibitory mechanism in the inactive cytosolic form of AP2. Therefore, binding of endocytic motifs and clathrin must be preceded by conformational change of AP2 complex which is triggered by membrane-bound phosphatidylinositol-4,5-bisphosphates and greatly facilitated by phosphorylation at Thr156 by AAK1 kinase. AP2 is also important for later stages of endocytosis during which it recruits proteins responsible for membrane curvature, fission, and eventual disassembly of clathrin coat. Repeated association of AP2 with the plasma membrane is prevented by the protein NECAP, but the mechanism of inactivation is still poorly understood.

Key words: adaptor protein 2, endocytosis, AAK1, cargo recognition, clathrin, clathrin-mediated endocytosis, regulation of endocytosis

Seznam použitých zkratk

β 2AR	β 2-adrenergic receptor
μ -HD	μ -homology domain
AAK1, AAK1L	adaptor-associated kinase, adaptor-associated kinase long
AID	α -adaptin interacting domain
AP, AP2	adaptor protein, adaptor protein 2
APP	amyloid precursor protein
Arf1	ADP-ribosylation factor 1
ARH	autosomal recessive hypercholesterolemia
AT1R	angiotensin II type 1 receptor
ATP	adenosine triphosphate
BAR, F-BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs, Fer/Cip4 homology Bin/Amphiphysin/Rvs
BIKE/BMP2K	BMP-2-inducible kinase
CALM	clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CCP	clathrin-coated pit
CD4	cluster of differentiation 4
CLASP	clathrin-associated sorting proteins
CME	clathrin-mediated endocytosis
COP, COP-I	coatamer protein, coatamer protein complex I
COVID-19	coronavirus disease 2019
Dab2	Disabled-2
DEP	Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin
Dyrk1A	dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase
EAP	endocytic accessory proteins
EGF, EGFR	epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor
EH	Eps15 homology
Eps15	epidermal growth factor receptor substrate 15
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCHo1/2	Fer/Cip4 homology domain-only proteins 1/2
GAK	cyclin G-associated kinase
GGA	Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology, Arf-binding proteins
GLUT8	glucose transporter 8

GPCR	G protein-coupled receptors
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GTP	guanosine triphosphate
Hsc70	heat-shock protein 70 kDa
IGF-1, IGF-1R	insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor 1 receptor
IR	insulin receptor
IRS1/2	insulin receptor substrate 1/2
LDL, LDLR	low-density lipoprotein, low-density lipoprotein receptor
LECA	last eukaryotic common ancestor
M1-M4	muscarinic 1-4
MAP	mitogen-activated protein
MCC	mitotic checkpoint complex
Mdm2	mouse double minute 2
NAK	Numb-associated kinase
NECAP	adaptin-ear-binding coat-associated protein
PAR1	protease-activated receptor 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PTB	phosphotyrosine-binding
PtdIns(3,4,5)P ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PtdIns(4,5)P ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PtdIns3P, PtdIns4P	phosphatidylinositol-3-phosphate, phosphatidylinositol-4-phosphate
RTK	receptor tyrosine kinase
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SEL-5	suppressor/enhancer of lin-12
SH3	Src homology 3
SHP2	SH2 domain-containing phosphatase-2
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
SNX9	sorting nexin-9
SPG11/15	spastic paraplegia 11/15
TfR	transferrin receptor
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
UIM	ubiquitin-interacting motif
Wnt	wingless/integrated

Obsah

Úvod.....	1
1 Heterotetramerní adaptorové proteiny	3
1.1 Charakteristika rodiny a význam jednotlivých členů	3
1.2 Evoluce heterotetramerních adaptorových proteinů	5
1.3 Rozdíly v aktivaci komplexů AP1 a AP2	7
2 Struktura a mechanismus funkce AP2.....	8
2.1 Struktura AP2.....	8
2.1.1 Velké podjednotky: α -adaptin a β 2-adaptin.....	8
2.1.2 Podjednotka μ 2	10
2.1.3 Podjednotka σ 2	11
2.2 Aktivace AP2 vazbou PtdIns(4,5)P ₂ a vazba endocytického motivu Yxx Φ	11
2.3 Interakce AP2 s klatrinem	12
2.4 Další endocytické adaptory.....	14
2.5 Inaktivace AP2	15
3 Fosforylace Thr156.....	17
3.1 AAK1.....	17
3.2 GAK.....	19
3.3 Další místa fosforylací.....	20
4 Endocytické motivy rozpoznávané přímo komplexem AP2.....	21
4.1 Kooperace motivů	21
4.2 Tyrosinový motiv	21
4.3 Dileucinový motiv	23
5 Interakce s kargem zprostředkovaná dalšími adaptory.....	24
5.1 β -arrestin a endocytóza receptorů spřažených s G-proteinem.....	24
5.2 ARH a receptor pro nízkodenzitní lipoprotein.....	26
5.3 Endocytóza receptorových tyrosinkináz.....	26
Závěr	29
Seznam použité literatury	30

Úvod

Endocytóza zprostředkovaná klatrinem (clathrin-mediated endocytosis, CME) je hlavním mechanismem, kterým je zajištěn transport molekul z plazmatické membrány do endozomálního systému (Mettlen et al., 2018). Endocytóza však může probíhat také celým souborem mechanismů nezávislých na klatrinu, mezi něž patří například kaveolární endocytóza, fagocytóza a makropinocytóza (Thottacherry et al., 2019). Endocytózou je regulován příjem živin a distribuce receptorů na povrchu buňky, a je tedy klíčovým dějem pro udržování homeostázy na buněčné i organismální úrovni a pro regulaci mezibuněčné signalizace (Kirchhausen et al., 2014; Mettlen et al., 2018; Thottacherry et al., 2019). Živiny, které jsou příliš velké pro přenos membránovými transportéry, jsou přijímány endocytózou v komplexu se svými receptory. Tyto receptory jsou konstitutivně internalizovány a s vysokou účinností recyklovány zpět na plazmatickou membránu (Antonescu et al., 2014). Internalizovaný receptor však může být cílen také do lyzozómu, kde je následně degradován, což je běžné například u receptorových tyrosinkináz aktivovaných růstovými faktory (Goh & Sorkin, 2013). U receptorů signálních kaskád je internalizace nezbytná nejen pro tlumení signalizace a zeslabení odpovědi, ale také pro propagaci signálu. Příkladem takové signalizace je MAP kinázová dráha (Antonescu et al., 2014; Pascolutti et al., 2019). Redistribuce integrinů a dalších adhezivních molekul na plazmatické membráně je klíčová pro migraci buněk během vývoje a imunitních reakcí a pro buněčnou diferenciaci. Endocytóza se významně podílí také na určování buněčné polarity a na recyklaci synaptických váčků při neurotransmisí (Kirchhausen et al., 2014; Thottacherry et al., 2019).

Endocytóza zprostředkovaná klatrinem je nejlépe charakterizovaným mechanismem endocytózy a jak již její název napovídá, tvorba endocytického váčku je při ní zajištěna polymerujícím klatrinem (Mettlen et al., 2018; Thottacherry et al., 2019). Klatrin je složen ze tří lehkých a tří těžkých řetězců, které jsou uspořádány do tvaru triskelionu. Tento charakteristický tvar umožňuje klatrinovým molekulám asociovat do nejčastěji pětiúhelníkových a šestiúhelníkových polí, ze kterých je vytvářen obal váčku, tzv. klatrinová klec. Pětiúhelníková pole přispívají k zakřivení klatrinové klece, zatímco šestiúhelníková pole vedou ke vzniku spíše ploché struktury (Kirchhausen et al., 2014). Klatrin není schopen přímé

vazby na membránu a jeho vazbu zprostředkovávají adaptorové proteiny. Adaptorové proteiny jsou rekrutovány na membránu specifickými interakcemi s fosfatidylinositoly, endocytickými signály transmembránového karga a také nejrůznějšími interakcemi mezi sebou (Traub & Bonifacino, 2013). Hlavním adaptorovým proteinem účastnícím se endocytózy je heterotetramerní komplex adaptorového proteinu 2 (AP2), který je po samotném klatrinu druhým nejzastoupenějším proteinem v endocytickém váčku (Kirchhausen et al., 2014).

Tvorba endocytického váčku trvá přibližně 1 minutu (Cocucci et al., 2012) a lze ji rozdělit na několik fází: iniciaci, stabilizaci, maturaci a odštěpení (Mettlen et al., 2018). Polymerace klatrinu je zahájena navázáním komplexu AP2 a klatrinu na plazmatickou membránu (Cocucci et al., 2012; Kadlecova et al., 2017). AP2 kromě klatrinu zachytává také transmembránové kargo a interaguje s dalšími adaptorovými a regulačními proteiny, které stabilizují vznikající klatrinovou jamku (clathrin-coated pit, CCP) a v součinnosti s klatrinem zakřivují membránu. Patří mezi ně například FCHO1/2, epsin, Eps15 nebo SNX9 (Cocucci et al., 2012; Kirchhausen et al., 2014; Mettlen et al., 2018). Okolo krčku vznikajícího váčku poté polymeruje GTPáza dynamin, která následně krček zaškrcuje a za hydrolýzy GTP odštěpuje váček od membrány (Mettlen et al., 2018). Endocytický váček následně putuje do časného endozómu. Aby bylo možné splynutí membrány váčku s membránou endozómu, musí být nejprve odstraněn proteinový obal váčku, k čemuž dochází za spotřeby ATP pomocí Hsc70 (Kirchhausen et al., 2014; Mettlen et al., 2018). Plazmatická membrána však není jediným místem, kde vznikají klatrinové váčky. Klatrinem jsou obaleny také váčky vznikající na membráně *trans*-Golgi network (TGN) a na endozómech a transport mezi těmito membránami probíhá podobným způsobem za účasti ostatních členů rodiny heterotetramerních adaptorových proteinů (Hirst et al., 2011; Traub & Bonifacino, 2013).

Ve své práci jsem se zaměřila na význam komplexu AP2 pro úspěšný průběh endocytózy a na mechanismy, které ovlivňují jeho funkci. Těmto obecně platným dějům je věnována většina práce. Poslední dvě kapitoly se zabývají hlavními principy rozpoznání proteinového karga včetně příkladů receptorů vázaných prostřednictvím dalších adaptorových proteinů. Tento krátký přehled však představuje pouze malý vzorek ohromující diverzity interakcí, které se podílejí na internalizaci transmembránových receptorů a určení jejich dalšího osudu.

1 Heterotetramerní adaptorové proteiny

1.1 Charakteristika proteinové rodiny a význam jednotlivých členů

Heterotetramerní adaptorové proteiny jsou skupinou adaptorových proteinů regulujících váčkový transport mezi TGN, endozomálním systémem a plazmatickou membránou (Hirst et al., 2011; Traub & Bonifacino, 2013). Heterotetramerní adaptorové proteiny neboli komplexy adaptorových proteinů (AP) se skládají ze čtyř podjednotek: dvou velkých označovaných jako adaptiny, jedné střední a jedné malé (viz Obr. 1; Traub & Bonifacino, 2013). Rodina komplexů AP čítá 5 členů: AP1 (γ - β 1- μ 1- σ 1), AP2 (α - β 2- μ 2- σ 2), AP3 (δ - β 3- μ 3- σ 3), AP4 (ϵ - β 4- μ 4- σ 4) a AP5 (ζ - β 5- μ 5- σ 5; Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011). V závorkách je uvedeno složení komplexů ve výše uvedeném pořadí podjednotek. Podjednotky do jednotlivých komplexů segregují specificky (Page & Robinson, 1995) a jejich poměry v rámci jednoho typu komplexu AP jsou v buňce dobře regulovány (Dell'Angelica et al., 1999; Hirst et al., 2015). U savců jsou mnohé podjednotky kódovány více geny a diverzita komplexů AP je dále zvýšena alternativním sestřihem. Jak míra exprese různých variant genů, tak alternativní sestřih mohou být tkáňově specifické (Boehm & Bonifacino, 2001).

Komplexy AP mají jednotnou strukturu. Jsou tvořeny kompaktním core, které zodpovídá za vazbu karga a nasměrování komplexů na příslušnou membránu, a pohyblivými přívěskovými doménami, které jsou zodpovědné za interakci s dalšími proteiny. Přívěskové domény jsou spojeny s core flexibilními pantovými oblastmi (Traub & Bonifacino, 2013). Délka pantových oblastí je velmi variabilní, pohybuje se od 46 do 410 aminokyselin (Boehm & Bonifacino, 2001). Komplex AP5 pantové oblasti zcela postrádá a chybí u něj také jedna z přívěskových domén (Hirst et al., 2011). Komplexy AP1, AP2 a AP3 vážou do pantové oblasti β -adaptinů klatrin: AP1 a AP2 využívají pro vazbu motiv LLNLD a u AP3 se uplatňuje velmi podobný motiv LLDLL (Shih et al., 1995; Ter Haar et al., 2000). Komplexy AP4 a AP5 jsou asociovány s jinými než klatrinovými váčky a klatrin nevážou (Hirst et al., 1999, 2011).

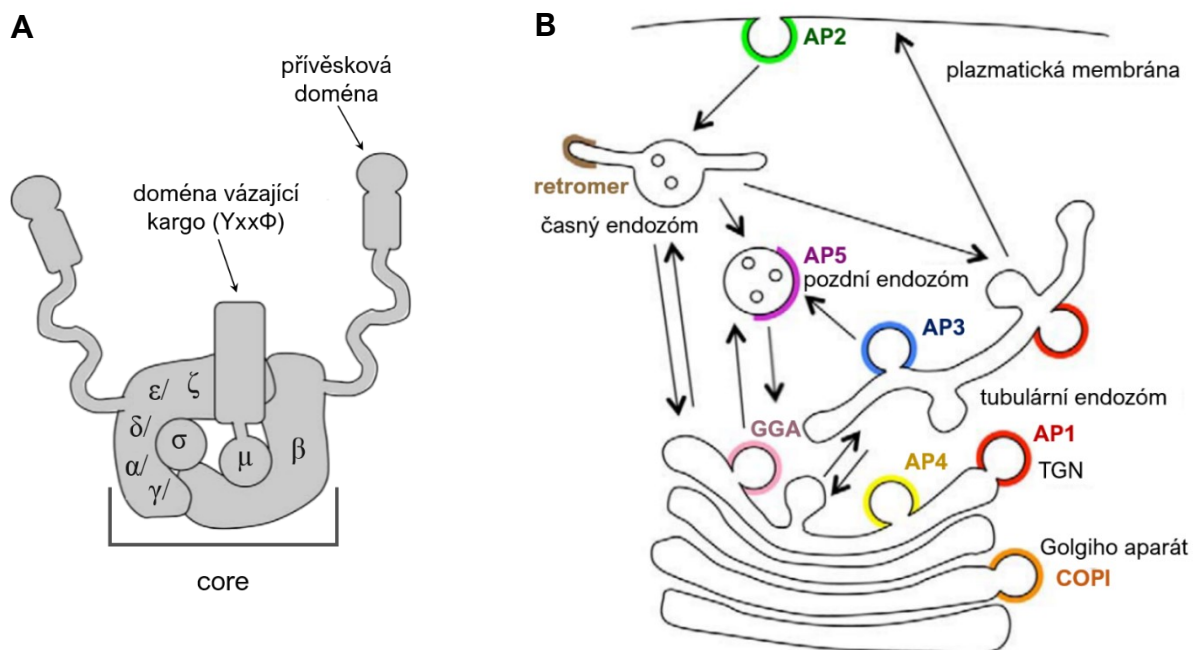
Komplex AP2 rozpoznává na transmembránových proteinech dva kanonické endocytické motivy: tyrosinový motiv (Υ xx Φ , Φ značí velkou hydrofobní aminokyselinu; Collawn et al., 1990) a motiv založený na dvou leucinech ([DE]xxxL[LI]; Doray et al., 2007).

Varianty těchto motivů jsou různě silně rozpoznávány i dalšími komplexy AP. Tyrosinový motiv je rozpoznáván všemi komplexy AP s výjimkou AP5 (Hirst et al., 1999, 2011) a dileucinový motiv rozpoznávají také komplexy AP1 a AP3 (Doray et al., 2007; Heldwein et al., 2004; Mattera et al., 2011).

Jednotlivé komplexy AP jsou asociovány s určitými směry váčkového transportu (viz Obr. 1) a defekty transportu způsobené nedostatečnou funkcí komplexů AP jsou popsány v souvislosti s poruchami pigmentace a neurodegenerativními onemocněními (Burgos et al., 2010; Dell'Angelica et al., 1999; Hirst et al., 2015; Moreno-De-Luca et al., 2011). Komplexy AP1 a AP2 jsou dva nejčastější heterotetramerní adaptory (Beck et al., 2011). AP1 je asociován s anterográdním transportem z TGN do endozómů a na plazmatickou membránu (Traub & Bonifacino, 2013), ale také s retrográdním transportem z endozómů zpět do TGN (Hirst et al., 2012). AP2 se účastní endocytózy (Traub & Bonifacino, 2013). Poškození některé z podjednotek AP1 nebo AP2 je přinejmenším u živočichů embryonálně letální (Boehm & Bonifacino, 2001). Komplex AP3 reguluje transport z tubulárních (recyklačních) endozómů do pozdních endozómů a lyzozómů (Hirst et al., 2011). Funkce AP3 je narušena u některých pacientů se syndromem Heřmanského-Pudlákova projevujícím se okulokutánním albinismem a nedostatkem krevních destiček (Dell'Angelica et al., 1999). Komplex AP4 lokalizuje na TGN a podílí se na transportu do endozómů (Hirst et al., 1999). Deficience AP4 je popsána jako jedna z příčin patologie Alzheimerovy choroby (Burgos et al., 2010) a také jako možná příčina mikrocefalie a poruch intelektu u pacientů s dětskou mozkovou obrnou (Moreno-De-Luca et al., 2011). Posledním nalezeným komplexem je AP5, který je lokalizován na pozdních endozómech a lyzozómech. AP5 funguje v paralelní dráze k retromeru a uplatňuje se především při zvýšených nárocích na retrográdní transport, které mají například dlouhé axony (Hirst et al., 2011, 2018). S poruchou komplexu AP5 je spojena spastická paraplegie. AP5 se na rozdíl od ostatních komplexů AP vyskytuje jako heterohexamer AP5/SPG11/SPG15 (spastic paraplegia 11/15) a názvy dalších dvou asociovaných podjednotek souvisejí právě s touto patologií (Hirst et al., 2011, 2015).

Komplexům AP je vzdáleně příbuzný také subkomplex F-COPI (β - γ - δ - ζ). F-COPI tvoří podobnou strukturu heterotetrameru a je součástí heteroheptameru COPI, který obaluje váčky

putující z Golgiho aparátu do endoplazmatického retikula. Zbylé tři podjednotky (označované jako subkomplex B-COPI) s podjednotkami komplexů AP příbuzné nejsou (Boehm & Bonifacino, 2001; Schledzewski et al., 1999). Domény homologické s doménami komplexů AP lze nalézt také u monomerních adaptorů GGA a stoninů. GGA (Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology, Arf-binding proteins) obsahují doménu homologickou s γ -adaptinem a doprovázejí komplex AP1 při anterográdním transportu z TGN do endozómů (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2012). Stoniny mají doménu homologickou s podjednotkou μ (μ -homology domain, μ -HD) a spolupracují s komplexem AP2 při recyklaci synaptických váčků (Boehm & Bonifacino, 2001). μ -HD s velmi nízkou identitou mají také dimerní adaptory FCHo1/2, které se stejně jako stoniny podílejí na endocytóze (Traub & Bonifacino, 2013).



Obr. 1. **Heterotetramerní adaptorové komplexy ve vnitrobuněčném transportu.** (A) Obecné schéma heterotetramerních komplexů AP. (B) Schéma transportu mezi TGN, endozómy a plazmatickou membránou a role komplexů AP v jednotlivých cestách (převzato z Hirst et al., 2011 a upraveno podle Hirst et al., 2018).

1.2 Evoluce heterotetramerních adaptorových proteinů

Komplexy AP a subkomplex F-COPI vznikly sérií koordinovaných genových duplikací. Tyto duplikace refletovaly vývoj endomembránového systému a nutnost specifického transportu mezi jeho součástmi a proběhly již na úrovni společného předka všech eukaryot

(last eukaryotic common ancestor, LECA; Hirst et al., 2011; Schledzewski et al., 1999). Ačkoliv jsou komplexy AP1-AP5 původně přítomny u všech eukaryot, u některých taxonů došlo k druhotným ztrátám některých podjednotek nebo i celých komplexů (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011). AP4 i AP5 chybí například u modelových organismů *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011, 2018).

Společným předkem komplexů AP a F-COPI byl heterodimerní komplex tvořený velkou a malou podjednotkou. Duplikací heterodimeru byl vytvořen základ heterotetramerního komplexu tvořeného dvěma velkými podjednotkami, jednou střední a jednou malou, přičemž střední podjednotka má původ v jednom z duplikátů malé podjednotky (Boehm & Bonifacino, 2001; Schledzewski et al., 1999). U AP2 původním heterodimerům odpovídají hemikomplexy $\alpha/\sigma 2$ a $\beta 2/\mu 2$ (a analogicky tomu je u ostatních komplexů) a u *C. elegans* byla prokázána jejich částečně nezávislá funkce (Gu et al., 2013). Druhá duplikace již proběhla na úrovni heterotetrameru a oddělila linie vedoucí ke vzniku subkomplexu F-COPI a komplexů AP, která je reprezentována komplexem označovaným pre-AP (Schledzewski et al., 1999). Tato duplikace pravděpodobně proběhla souběžně s funkčním rozrušením Golgiho aparátu a hybridní organely primordiálního endozómu/TGN. Další vývoj v rámci komplexů AP souvisí s pozdější expanzí endozomálního systému a osamostatněním TGN (Hirst et al., 2011). Z komplexu pre-AP postupně vznikly komplexy AP3, AP5 a AP4 v uvedeném pořadí (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011; Schledzewski et al., 1999). Relativně recentní je duplikace vedoucí ke vzniku dvou nejprozkoumanějších komplexů: AP1 a AP2. Během této duplikace však nebyl duplikován β -adaptin (Schledzewski et al., 1999). Evolučně původní stav, kdy jsou β -adaptiny komplexů AP1 a AP2 kódovány jediným genem, se vyskytuje například u *C. elegans*, *D. melanogaster* nebo *Arabidopsis thaliana* (Boehm & Bonifacino, 2001; Gu et al., 2013). Ke vzniku $\beta 1$ -adaptinu a $\beta 2$ -adaptinu došlo až u savců (Schledzewski et al., 1999), není tedy překvapivé, že β -adaptiny jsou mezi komplexy AP1 a AP2 nejkonzervovanějšími podjednotkami (Heldwein et al., 2004). Evoluční blízkost této události může vysvětlovat, proč jsou $\beta 1$ -adaptin a $\beta 2$ -adaptin schopné vazby jak na AP1, tak na AP2 (Page & Robinson, 1995; Schledzewski et al., 1999). Rozlišený $\beta 1$ -adaptin a $\beta 2$ -adaptin byl nalezen také u *S. cerevisiae* a k dodatečné duplikaci β -adaptinu pravděpodobně došlo vícekrát (Boehm & Bonifacino, 2001).

S objevem heterohexamerního komplexu AP5/SPG11/SPG15 byla formulována hypotéza, že komplexy AP a subkomplex F-COPI mohly být ve skutečnosti odvozeny nikoliv od společného heterotetrameru, ale od heterohexameru. Podjednotka SPG11 je vysoce homologická s těžkým klatrinovým řetězcem a s podjednotkou β' COP, která je součástí subkomplexu B-COPI. Stejně jako β' COP by tedy zbylé podjednotky heterohexameru mohly tvořit vnější vrstvu obalu váčku (Hirst et al., 2011).

1.3 Rozdíly v aktivaci komplexů AP1 a AP2

Nejbližším příbuzným komplexu AP2 je komplex AP1 a jejich evolučnímu vztahu odpovídá vysoká sekvenční a strukturní identita obou komplexů (Heldwein et al., 2004; Hirst et al., 2011; Schledzewski et al., 1999). Ačkoliv spolu AP1 a AP2 mnoho vlastností sdílejí, podstatně se liší v mechanismu vazby na membránu a aktivace.

Komplex AP1 lokalizuje na TGN, zatímco komplex AP2 se váže na plazmatickou membránu. Membránová lokalizace je dána γ -adaptinem u AP1, respektive α -adaptinem u AP2. Ačkoliv se jedná o homologické adaptiny, každý z nich rozpoznává jiné fosfatidylinositoly. AP2 díky α -adaptinu váže fosfatidylinositol-4,5-bisfosfáty (PtdIns(4,5)P₂) označující na plazmatické membráně místo budoucí endocytózy (Beck & Keen, 1991), zatímco AP1 do odpovídajícího místa na γ -adaptinu váže fosfatidylinositol-4-fosfáty (PtdIns4P) nabohacené na membráně TGN (Heldwein et al., 2004). Komplex AP2 dále váže PtdIns(4,5)P₂ podjednotkou μ 2, ale komplex AP1 v oblasti odpovídající tomuto místu postrádá kladně nabitá rezidua (Beck & Keen, 1991; Heldwein et al., 2004). Interakce s PtdIns4P je pro vazbu AP1 na membránu příliš slabá, a tak AP1 pro svou aktivitu vyžaduje ještě GTPázu Arf1, která se stejně jako PtdIns4P nachází na membráně TGN (Stamnes & Rothman, 1993; Traub et al., 1993). Podstatou aktivační funkce Arf1 je zprostředkování dimerizace komplexů AP1 (Ren et al., 2013). Arf1 je vyžadována také komplexy F-COPI, AP3 a AP4, ne však AP2 a AP5 (Collins et al., 2002; Hirst et al., 1999, 2011; Ren et al., 2013). Ačkoliv byla u komplexu AP2 dimerizace pozorována (Kovtun et al., 2020), role v jeho aktivaci jí přikládána není. Aktivita komplexu AP2 je mimo jiné regulována fosforylací linkeru podjednotky μ 2 na Thr156 (Olusanya et al., 2001). Tomuto místu u komplexu AP1 odpovídá Thr154, jehož fosforylace je také možná, ale nemá pro aktivitu AP1 tak velký význam (Fingerhut et al., 2001; Henderson & Conner, 2007).

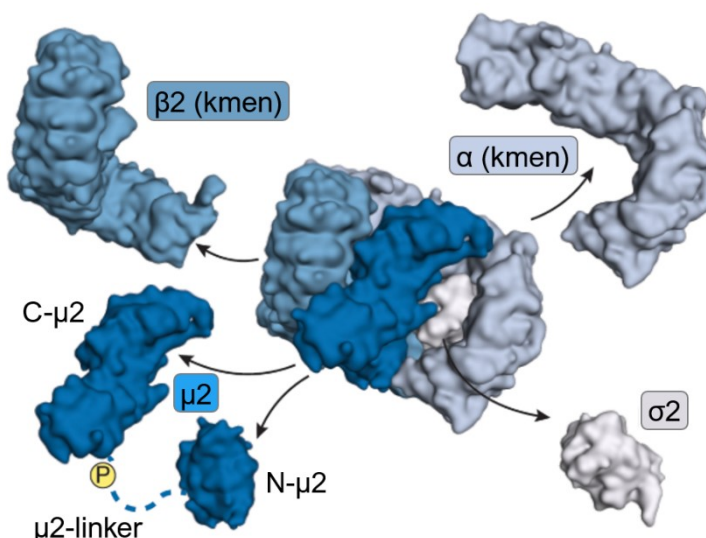
2 Struktura a mechanismus funkce AP2

2.1 Struktura AP2

2.1.1 Velké podjednotky: α -adaptin a β 2-adaptin

Komplex AP2 obsahuje dvě velké podjednotky nazývané α -adaptin a β 2-adaptin (~100 kDa). Adaptiny se skládají ze dvou domén. N-koncová kmenová doména neboli kmen („trunk“) je součástí core komplexu AP2, zatímco C-koncová přívěsková doména neboli přívěsek („appendage“) je volně pohyblivá (Collins et al., 2002).

Kmenové domény (70 kDa) α -adaptinu a β 2-adaptinu spolu s podjednotkami σ 2 a μ 2 tvoří core komplexu AP2 (viz Obr. 2; Collins et al., 2002; Kirchhausen et al., 1989). Core je velké 200 kDa a svým tvarem připomíná misku. Okraje této misky jsou tvořeny zahnutými kmenovými doménami α -adaptinu a β 2-adaptinu a uvnitř misky leží C-koncová doména podjednotky μ 2 (Collins et al., 2002; Kelly et al., 2008). Na kmenových doménách obou adaptinů se nacházejí místa bohatá na kladně nabitá rezidua (především Lys), která jsou klíčová pro vazbu membránových $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, a tedy interakci AP2 s plazmatickou membránou (Gaidarov et al., 1996; Jackson et al., 2010).



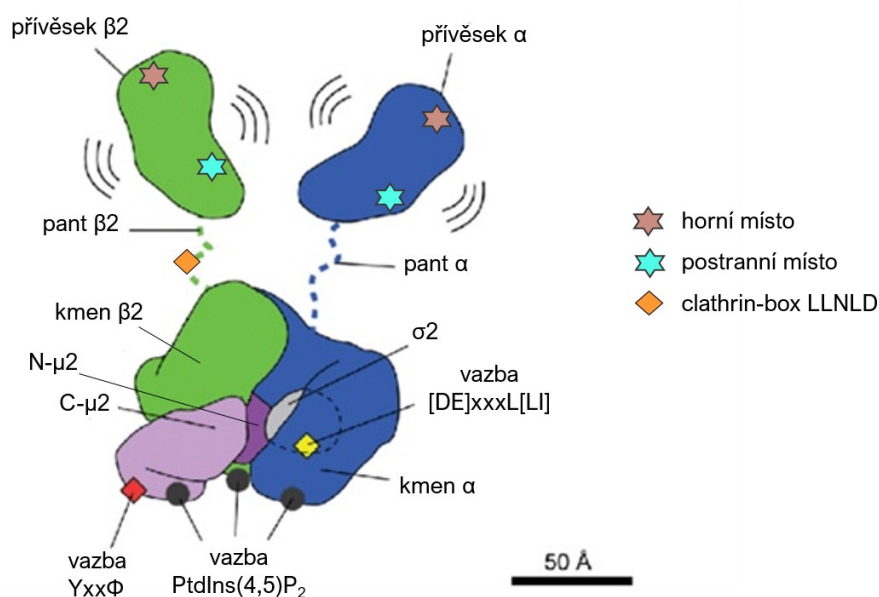
Obr. 2. **Struktura core AP2.** Podjednotka μ 2 se skládá ze dvou domén propojených linkerem znázorněným přerušovanou čarou, na kterém se nachází místo fosforylace – Thr156. PDB: 4UQI (převzato z Beacham et al., 2019 a upraveno).

Přívěskové domény adaptinů (~30 kDa) jsou připojeny ke kmenovým doménám flexibilními pantovými oblastmi dlouhými přibližně 100 aminokyselin. Toto připojení umožňuje přívěskovým doménám vysokou pohyblivost, která je důležitá pro interakci s dalšími proteiny (viz Obr. 3; Collins et al., 2002; Zaremba & Keen, 1985). Pantová oblast β 2-adaptinu je kromě flexibilního spojení domén důležitá také pro vazbu klatrinu. Klatrin se zde váže na clathrin-box představovaný sekvencí LLNLD (Shih et al., 1995; Ter Haar et al., 2000). Správné orientaci klatrinu by mělo napomáhat neesenciální vazebné místo na přívěsku β 2 (Owen, 2000), podle nejnovější strukturní studie je ale orientace dána spíše sterickými parametry než specifickými interakcemi. Na jeden AP2 se mohou navázat ještě další dva klatriny, a to dvěma různými místy v ohybu těžkých klatrinových řetězců (Kovtun et al., 2020).

Přívěskové domény jsou nepostradatelné pro interakci komplexu AP2 s přídatnými endocytickými proteiny (endocytic accessory proteins, EAP; Praefcke et al., 2004; Schmid et al., 2006). EAP řídí průběh endocytózy a uplatňují se při celé řadě procesů od sestavování klatrinového obalu až po jeho pozdější rozložení (Mettlen et al., 2018). Funkce těchto proteinů jsou krátce popsány později. EAP se přednostně vážou na přívěsek α -adaptinu, jehož odstranění vede k poklesu počtu produktivních CCP (Aguet et al., 2013). Na přívěskové doméně α -adaptinu i β 2-adaptinu se nacházejí dvě vazebná místa označována jako horní místo a postranní místo („top site“ a „side site“; Owen, 2000) a mnohé EAP jsou díky kombinaci vazebných motivů schopny vazby na vícero z nich (Edeling et al., 2006; Schmid et al., 2006). Na horní i postranní místo přívěsku α -adaptinu se rozdílnými motivy může vázat inositolfosfatáza synaptojanin (Praefcke et al., 2004). Na horní místo se dále prostřednictvím motivu DPF vážou kinázy AAK1 a GAK (Conner & Schmid, 2002; Owen et al., 1999; Umeda et al., 2000). Motiv DP[FW] se uplatňuje také u epsinu a Eps15, přičemž síla vazby koresponduje s počtem kopií motivu (Owen et al., 1999). Vazebná místa na přívěskové doméně β 2-adaptinu se mírně liší jak umístěním, tak mechanismem funkce (Schmid et al., 2006). Typickými ligandy horního místa přívěsku β 2 jsou adaptory β -arrestin a ARH (Edeling et al., 2006). Specifická vazba a význam β -arrestinu a ARH jsou přiblíženy v 5. kapitole. Horní místo se zde nachází v blízkosti neesenciálního klatrinového místa na přívěsku β 2-adaptinu a na dostupnost obou míst současně existují různé názory (Edeling et al., 2006; Kovtun et al., 2020; Owen, 2000; Schmid et al., 2006).

2.1.2 Podjednotka $\mu 2$

V rámci střední podjednotky $\mu 2$ (50 kDa) jsou taktéž rozlišovány dvě domény: C-koncová doména C- $\mu 2$ a N-koncová doména N- $\mu 2$. C-koncová doména (30 kDa) obsahuje další místo pro vazbu PtdIns(4,5) P_2 (Collins et al., 2002), nedávno však bylo pozorováno, že je v kontaktu s PtdIns(4,5) P_2 hned ve dvou místech (Kovtun et al., 2020). Doména C- $\mu 2$ dále rozpoznává proteinové kargo prostřednictvím kanonického endocytického motivu Yxx Φ (Boll et al., 1996; Ohno et al., 1995), v cytosolické formě je však afinita komplexu AP2 k motivu Yxx Φ velmi nízká, jelikož je vazebné místo blokováno rezidui Glu364-Val406 na kmeni $\beta 2$ (Collins et al., 2002; Jackson et al., 2010). N-koncová doména N- $\mu 2$ leží uvnitř core komplexu AP2 a plní stabilizační funkci. S C- $\mu 2$ je propojena nestrukturovaným, 23 aminokyselin dlouhým linkerem nacházejícím se na povrchu core (Collins et al., 2002). Na $\mu 2$ -linkeru se nachází klíčové místo fosforylace: Thr156, který je fosforylován kinázou AAK1 (Conner & Schmid, 2002).



	konzensus	příklady	reference
horní místo α	DP[FW] FxDxF	AAK1 epsin synaptojanin	Conner & Schmid, 2002 Owen et al., 1999 Praefcke et al., 2004
postranní místo α	WVxF	synaptojanin	Praefcke et al., 2004
horní místo $\beta 2$	$[DE]_n X_{1-2} Fxx[FL]xxxR$	β -arrestin, ARH	Edeling et al., 2006
postranní místo $\beta 2$	$[F/L]xxGFxDF$	Eps15	Schmid et al., 2006

Obr. 3. Přehled vazebných míst komplexu AP2. Schéma převzato z Kovtun et al., 2020 a upraveno dle zdrojů uvedených v textu.

2.1.3 Podjednotka $\sigma 2$

Malá podjednotka $\sigma 2$ (17 kDa) je strukturně i funkčně velmi podobná doméně N- $\mu 2$ (Collins et al., 2002), ale kromě stabilizace komplexu AP2 umožňuje také vazbu druhého kanonického endocytického motivu, [DE]xxxL[LI] (Doray et al., 2007). Dileucinový motiv se váže do blízkosti vazebného místa pro PtdIns(4,5)P₂ na α -adaptinu a α -adaptin se na vazbě dileucinového motivu částečně podílí. Podobně jako místo pro tyrosinový motiv na podjednotce $\mu 2$ je i zde v cytosolické formě vazba blokována $\beta 2$ -adaptinem, konkrétně rezidui Tyr6 a Phe7 (Kelly et al., 2008).

2.2 Aktivace AP2 vazbou PtdIns(4,5)P₂ a vazba endocytického motivu Yxx Φ

Komplex AP2 se v cytosolu vyskytuje v uzavřené, neaktivní konformaci, kdy se pantová oblast $\beta 2$ -adaptinu obsahující clathrin-box nachází uvnitř core. Je tak bráněno předčasnému sestavování klatrinového obalu. K aktivaci komplexu AP2 a iniciaci tvorby klatrinového váčku je dostačující přítomnost PtdIns(4,5)P₂ a endocytického motivu Yxx Φ (Collins et al., 2002; Kelly et al., 2014). K vazbě PtdIns(4,5)P₂ a motivu Yxx Φ dochází ve dvou krocích (Höning et al., 2005; Kadlecova et al., 2017).

Interakce AP2 s plazmatickou membránou je zajištěna vazbou membránových PtdIns(4,5)P₂ do dostupného vazebného místa na kmeni α -adaptinu (Beck & Keen, 1991; Höning et al., 2005; Jackson et al., 2010). Bylo popsáno také vazebné místo na kmeni $\beta 2$ -adaptinu (Jackson et al., 2010), jeho role v aktivaci AP2 je však sporná. Některá pozorování ukazují, že pro plnou aktivaci komplexu AP2 a začátek tvorby váčku je nezbytné obsazení obou těchto míst (Jackson et al., 2010; Kadlecova et al., 2017), jiná naopak vazbu PtdIns(4,5)P₂ na kmen $\beta 2$ vyvracejí (Kovtun et al., 2020).

Vazebná místa pro kanonické endocytické motivy Yxx Φ a [DE]xxxL[LI] jsou blokována kmenem $\beta 2$ a před vazbou klatrinu a proteinového karga je nejprve nutná výrazná změna konformace komplexu AP2 (viz Obr. 4; Collins et al., 2002; Jackson et al., 2010). Během této změny dochází ke kolapsu miskovité struktury core a ke změně interakcí mezi podjednotkami. Přechod do otevřené konformace uvolňuje pantovou oblast $\beta 2$ z core komplexu AP2 a umožňuje navázání klatrinu (Jackson et al., 2010). Doména C- $\mu 2$ se přesouvá z centra misky

na povrch core a exponuje vazebná místa pro endocytický motiv $Yxx\Phi$ a pro další $PtdIns(4,5)P_2$. Všechna místa pro vazbu $PtdIns(4,5)P_2$ a $Yxx\Phi$ se tak stávají koplánárními, čímž je zvýšena avidita komplexu AP2 k plazmatické membráně. Po obsazení těchto vazebných míst je komplex stabilizován v plně otevřené konformaci (Collins et al., 2002; Höning et al., 2005; Jackson et al., 2010). Přetrvání vazeb na $PtdIns(4,5)P_2$ a endocytický motiv $Yxx\Phi$ je nutné pro další fáze tvorby klatrinového váčku (Kadlecova et al., 2017). Ke stabilizaci otevřené konformace přispívá také μ_2 -linker, který se současně s přesunem domény C- μ_2 dostává do žlábků mezi podjednotkami β_2 a μ_2 . Žlábek je v uzavřené konformaci neobsazený. Struktura μ_2 -linkeru se mění na helikální a může být stabilizována fosforylovaným Thr156 a jeho interakcí s bazickými rezidui Arg138 a Lys139 na β_2 -adaptinu (Jackson et al., 2010). Fosforylace Thr156 kinázou AAK1 výrazně usnadňuje změnu konformace, asociace s membránou je však schopný i nefosforylovaný komplex (Höning et al., 2005).

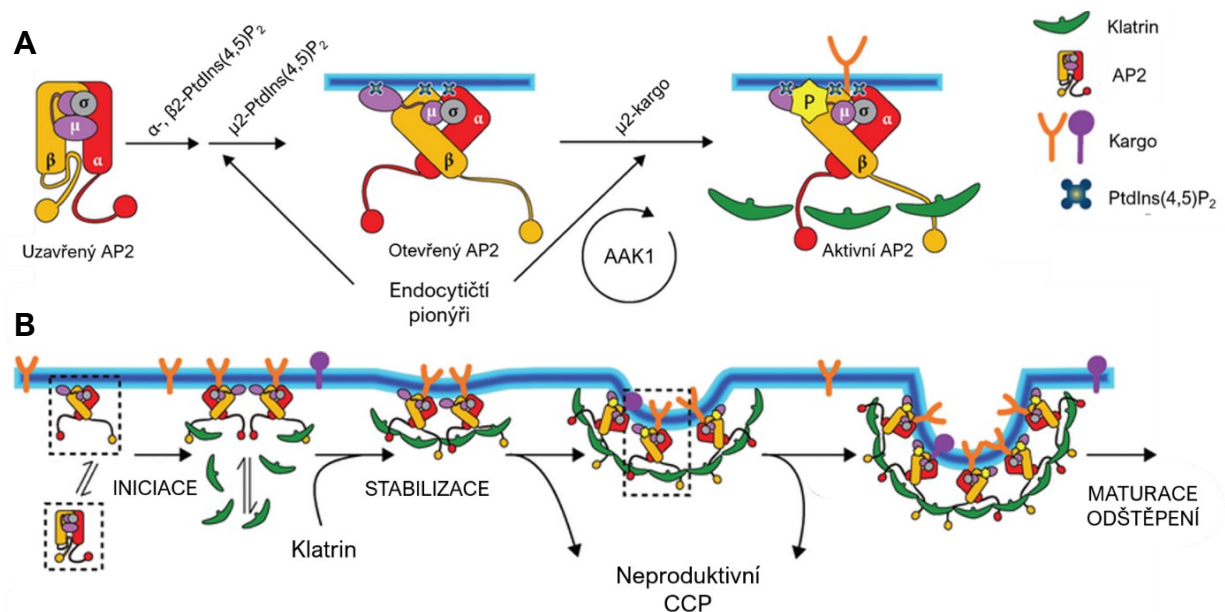
Intermediátem může být tzv. odblokovaná struktura („unlatched structure“), ve které dochází pouze k pootevření komplexu AP2 a posunu N-konce β_2 z vazebného místa pro motiv $[DE]xxxL[LI]$, který ale na rozdíl od $Yxx\Phi$ nemá ve vztahu k endocytóze globální charakter (Kadlecova et al., 2017; Kelly et al., 2008). Vazba $Yxx\Phi$ ani $PtdIns(4,5)P_2$ na podjednotku μ_2 v tomto stavu umožněna není. Struktura je velmi nestabilní a působením $PtdIns(4,5)P_2$ na C- μ_2 brzy dochází k úplnému otevření komplexu (Jackson et al., 2010).

2.3 Interakce AP2 s klatrinem

K asociaci komplexů AP2 s $PtdIns(4,5)P_2$ v plazmatické membráně dochází náhodně (Kadlecova et al., 2017). Interakce s $PtdIns(4,5)P_2$ je sice dostatečná pro specifitu vazby AP2, ale nikoliv pro vznik stabilního CCP a náhodně asociovaný AP2 z membrány za méně než 1 sekundu opět disociuje (Cocucci et al., 2012). Pro vznik produktivního CCP jsou proto nutné další mechanismy stabilizace, na kterých spolupracuje více komplexů AP2. Významnou molekulou pro stabilizaci CCP je klatrin (Cocucci et al., 2012; Jackson et al., 2003). Klatrin se dostává do místa endocytózy ve stejný čas jako AP2 a váže se na některý z náhodně asociovaných AP2 (viz Obr. 4). Interakce jednoho komplexu AP2 a jedné molekuly klatrinu je však pro tvorbu stabilního nukleačního centra stále příliš slabá, proto se musí klatrin zároveň ukotvit ještě přes druhý komplex AP2. Vzniká tak stabilní tříčlenný klastr, který je nejmenší

jednotkou schopnou iniciovat tvorbu CCP. Méně často na membráně koordinovaně přibývají klastry složené ze dvou klatrinových triskelionů a čtyř AP2. Interakce mezi molekulami klatrinu zvyšují rezidenční čas jak AP2, tak dalšího klatrinu, čímž je výrazně zvýšena pravděpodobnost vazby karga (Cocucci et al., 2012). Vazebná místa pro klatrin a endocytický motiv $Yxx\Phi$ jsou z podstaty konformační změny AP2 zpřístupněna ve stejnou dobu (Kelly et al., 2014). K nejefektivnější vazbě klatrinu dochází až po stabilizaci AP2 asociací s motivem $Yxx\Phi$, nicméně klatrin může být aktivovaným AP2 slabě vázán už před touto vazbou (Kadlecova et al., 2017; Kelly et al., 2014). Bylo ovšem pozorováno i opačné chování AP2, totiž že komplexy AP2 bez vazby na klatrin endocytický motiv nevážou. Toto pozorování může souviset s typem endocytovaných receptorů, některé jsou totiž preferenčně zachytávány v preiniciovaných CCP, místo aby vznik CCP samy iniciovaly (Cocucci et al., 2012).

Ve chvíli, kdy je inkorporováno přibližně 70 % z celkového množství klatrinu v budoucím obalu, se poměr AP2:klatrin mění na 1:1, čímž je podpořeno zakřivování membrány (Bucher et al., 2018). Klatrin pravděpodobně AP2 nijak neorganizuje, komplexy AP2 jsou distribuovány nerovnoměrně a bez pravidelných struktur (Kovtun et al., 2020).



Obr. 4. Aktivace komplexu AP2 a tvorba CCP. (A) Změna konformace komplexu AP2. Při přechodu do otevřené konformace C- $\mu 2$ opouští core komplexu AP2 a umožňuje vazbu PtdIns(4,5)P₂ a karga. Ke stabilitě otevřené konformace a tvorbě CCP přispívají endocytičtí pionýři a fosforylace kinázou AAK1. (B) Interakce AP2 s klatrinem a tvorba CCP. Struktury v rámečcích odpovídají schématu aktivace AP2 nahoře (převzato z Mettlen et al., 2018 a upraveno).

Spekuluje se o mechanismu a významu dimerizace AP2. V přítomnosti endocytického motivu $Yxx\Phi$ byla u 20 % komplexů AP2 pozorována dimerizace prostřednictvím helixů na N-konci podjednotky $\beta 2$. V přítomnosti motivu $Yxx\Phi$ i $[DE]xxxL[LI]$, tedy obou kanonických motivů zároveň ale k dimerizaci nedošlo (Kovtun et al., 2020)

2.4 Další endocytické adaptory

Komplex AP2 interaguje s mnohými přídatnými endocytickými proteiny (endocytic accessory proteins, EAP), které se podílejí na celém procesu tvorby klatrinového váčku a na stabilizaci klastrů AP2, pro samotnou iniciaci endocytózy jsou však postradatelné (Cocucci et al., 2012; Traub, 2019). Kromě vazby na přívěskové domény AP2, se tyto proteiny typicky vážou také na klatrin a na $PtdIns(4,5)P_2$ v plazmatické membráně. Proteiny, které jsou navíc schopny interagovat s transmembránovým kargem, jsou označovány jako třídící proteiny asociované s klatrinem (clathrin-associated sorting proteins, CLASP) a představují významné rozšíření vazebných možností AP2 i mimo receptory s kanonickými endocytickými motivy (Traub & Bonifacino, 2013). Nejznámějšími příklady CLASP jsou β -arrestin a ARH nebo Dab2, které se uplatňují při endocytóze receptorů spřažených s G-proteinem, respektive receptoru pro nízkodenzitní lipoprotein. Tyto děje jsou představeny v 5. kapitole.

Do místa endocytózy se spolu s AP2 dostávají tzv. endocytičtí pionýři, nebo také pionýrské proteiny, mezi které patří FCHo1/2, Eps15, epsin nebo CALM. Pionýrské proteiny jsou rekrutovány jako multimery provázané nízkoafinitními interakcemi jak mezi sebou, tak s AP2, což vysvětluje jejich vysokou funkční redundanci a flexibilitu (Mettlen et al., 2018). Přestože jsou mnohé funkce endocytických proteinů známy, hierarchie, s jakou se uplatňují při CME, je stále nejasná. Eps15 (epidermal growth factor receptor substrate 15) a epsin navíc obsahují motiv pro vazbu ubikvitinylovaného karga (Hawryluk et al., 2006). FCHo1/2 (Fer/Cip4 homology domain-only protein 1/2), člen rodiny muniscinů, obsahuje doménu homologickou s podjednotkou $\mu 2$ komplexu AP2 (μ -homology domain, μ -HD) a také doménu F-BAR (Fer/Cip4 homology Bin/Amphiphysin/Rvs; Mettlen et al., 2018; Traub & Bonifacino, 2013). Mezi proteiny s doménou BAR patří také amfifysiny, endofiliny a SNX9 (sorting nexin-9). Homodimerizací proteinů s doménou BAR vzniká symetrická molekula banánovitého tvaru, která svým kladně nabitým konkávním povrchem interaguje se záporně

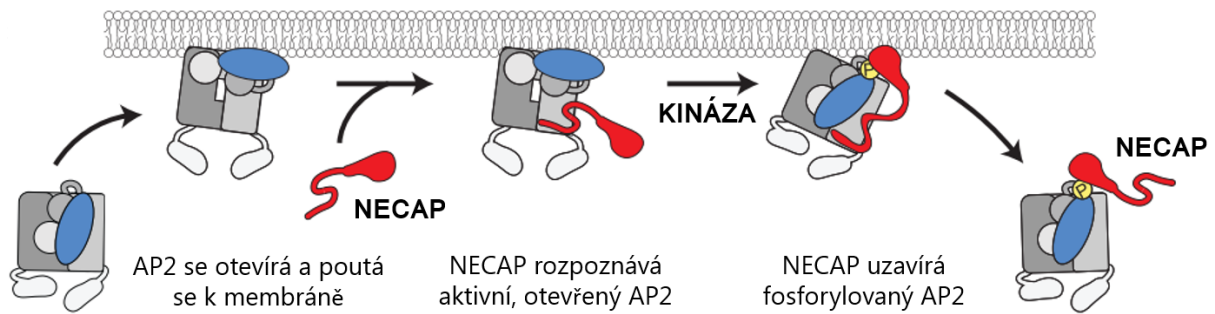
nabitou membránou a indukuje její zakřivení. Amfifysiny a endofiliny prostřednictvím SH3 domény vážou dynamin a inositolfosfatázu synaptojanin. Synaptojanin má 2 fosfatázové domény, jednu defosforyluje PtdIns(4,5)P₂ nebo PtdIns(3,4,5)P₃ na pozici 5' inositolového kruhu a druhou PtdIns3P nebo PtdIns4P. Defosforylace fosfatidylinositolů má význam v signalizaci a v případě PtdIns(4,5)P₂ snižuje afinitu AP2 k již odštěpenému váčku (Kirchhausen et al., 2014). CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia) a jeho izoforma AP180 nabohacená v neuronech fungují jako adaptory pro SNARE, které musí být do váčku inkorporovány pro splynutí s cílovou membránou (Mettlen et al., 2018).

2.5 Inaktivace AP2

Endocytický váček je oddělen od membrány GTPázou dynaminem. U obratlovců existují tři izoformy dynaminu. Za odštěpení je zodpovědný dynamin 2, zatímco dynamin 1, který je spolu s dynaminem 3 nabohacen v neuronech, se uplatňuje při tvorbě zakřivení a signalizaci (Mettlen et al., 2018). Aby bylo umožněno splynutí váčku s membránou akceptorového kompartmentu, musí být odstraněn proteinový obal. K tomu dochází za spotřeby ATP pomocí heat-shock proteinu Hsc70 (Chappell et al., 1986), který je aktivován auxilinem, specifickým pro nervové tkáně, nebo jeho homologem GAK (auxilin 2), který má navíc serin/threonin kinázovou aktivitu (Greener et al., 2000; Ungewickell et al., 1995). Na rozdíl od klatrinu jsou pro inaktivaci AP2 kromě Hsc70 vyžadovány ještě další faktory (Hannan et al., 1998).

Oproti aktivaci AP2 je o jeho inaktivaci známo poměrně málo. V současnosti se studuje úloha proteinu NECAP (adaptin-ear-binding coat-associated protein), který se váže na AP2 v otevřené konformaci a brání mu v opětovné asociaci s plazmatickou membránou (viz Obr. 5; Beacham et al., 2018; Wrobel et al., 2019). NECAP nejprve detekuje otevřený komplex AP2 a naváže se doménou NECAP_{Ex} na β2-adaptin. Po fosforylaci komplexu AP2 na μ2-linkeru pak rezidua domény NECAP_{PHear} přímo interagují s fosforylovaným Thr156 a komplex AP2 je prostřednictvím μ2-podjednotky uzavřen ve stavu neschopném aktivace („clamped structure“), a to i při současném působení aktivačního signálu z membrány. Z vazebných míst pro PtdIns(4,5)P₂ zůstává přístupné pouze místo na kmeni α-adaptinu. Fosforylace na Thr156 tak může označovat komplexy AP2 pro inaktivaci (Partlow et al., 2019). Dříve bylo publikováno, že NECAP se váže k přívěsku α-adaptinu unikátním motivem WVQF

na doméně NECAP_{Tail} (Ritter et al., 2003), ta je ale málo konzervovaná a výše uvedený mechanismus předpokládající spolupráci dvou domén, který byl popsán u *C. elegans*, je pravděpodobně evolučně původní (Partlow et al., 2019). U obratlovců má NECAP dva paralogy: NECAP1 bohatý především v mozku a NECAP2 přítomný ve všech tkáních (Ritter et al., 2003).



Obr. 5. **Inaktivace AP2 proteinem NECAP.** Nejprve je doménou NECAP_{Ex} rozpoznána otevřená konformace AP2. Po fosforylaci Thr156 se naváže také doména NECAP_{PHear} a komplex je následně uzavřen do stavu neschopného aktivace (převzato z Partlow et al., 2019 a upraveno).

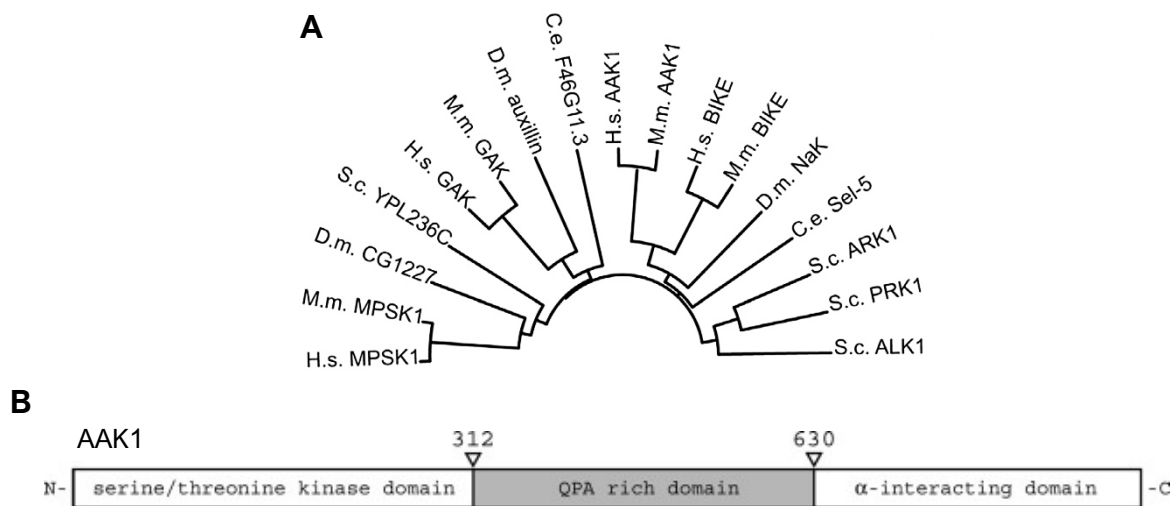
Jak je funkce NECAP řízena, stále není známo. V případě, že inaktivace následuje ihned po fosforylaci komplexu AP2, může být aktivita NECAP řízena aktivitou kinázy AAK1 (Partlow et al., 2019). NECAP se dostává do CCP současně s klatrinem a rekrutuje molekuly řídící pozdní fáze endocytózy, jako je například SNX9 a amfifysin (Wrobel et al., 2019). Předpokládá se, že NECAP usnadňuje změnu konformace nebo defosforylaci AP2, kterými je obnovena neaktivní cytosolická forma AP2, která je připravena pro další cykly endocytózy. U *C. elegans* je tak vyvažováno například aktivační působení FCHo, které je u tohoto modelového organismu pro aktivaci AP2 nepostradatelné (Beacham et al., 2018; Hollopeter et al., 2014). Dosud není jasné, zda NECAP inaktivuje pouze nestabilizované komplexy AP2 a zamezuje tak tvorbě neproduktivních CCP, nebo zda se uplatňuje až po odštěpení vaku a zabraňuje AP2 v opětovné asociaci s membránou a tvorbě nových CCP. Není znám ani mechanismus odstranění NECAP – zda musí nejprve proběhnout defosforylace AP2, nebo je právě defosforylace Thr156 zodpovědná za odstranění NECAP (Partlow et al., 2019).

3 Fosforylace Thr156

3.1 AAK1

Pro efektivní průběh endocytózy je nezbytná fosforylace komplexu AP2 na Thr156 nacházejícím se na μ 2-linkeru (Olusanya et al., 2001). Za tuto fosforylaci je zodpovědná kináza AAK1 (adaptor-associated kinase 1) rozeznávající sekvenci IxxQxTG (Conner & Schmid, 2002). Fosforylace stabilizuje otevřenou konformaci komplexu AP2, a zvyšuje tak pravděpodobnost vazby endocytického motivu Yxx Φ (Jackson et al., 2010; Olusanya et al., 2001). Endocytóza však probíhá i bez fosforylace AP2, ačkoliv ve značně omezené míře (Conner & Schmid, 2003; Motley et al., 2006). Fosforylace Thr156 může kompenzovat defekt ve vazbě PtdIns(4,5)P₂ nebo karga na podjednotku μ 2, jejichž vliv na stabilitu komplexu AP2 je s působením AAK1 srovnatelný. Při zablokování vazby PtdIns(4,5)P₂ na μ 2 klesá úspěšnost maturace CCP. Zhoršení maturace je vyrovnáváno častějšími iniciacemi a právě vyšší aktivitou AAK1, a tedy vyšším podílem komplexů AP2 stabilizovaných fosforylací (Kadlecova et al., 2017). Kompenzace v opačném směru, tedy vazbou PtdIns(4,5)P₂ na podjednotku μ 2 při absenci fosforylace μ 2-linkeru, zdaleka není tak účinná (Motley et al., 2006).

AAK1 patří do rodiny serin/threoninových kináz NAK (Numb-associated protein kinases; viz Obr. 6). Tato rodina dále obsahuje například blízce příbuznou kinázu BIKE/BMP2K (BMP-2-inducible kinase), a také kinázy NAK (Numb-associated kinase) a SEL-5 (suppressor/enhancer of lin-12), což jsou homology AAK1 a BIKE u *Drosophila melanogaster*, respektive u *Caenorhabditis elegans*. Do rodiny NAK patří také kináza GAK (cyclin G-associated kinase; Sorrell et al., 2016). Kromě AAK1 byla fosforylace Thr156 popsána také u GAK a BIKE (Pu et al., 2020; Zhang et al., 2005). Kinázová doména je v rámci rodiny evolučně konzervována a nachází se blízko N-konce, ostatní části jsou velmi variabilní (Sorrell et al., 2016). Kinázová doména AAK1 je následována doménou bohatou na glutamin, prolin a alanin a na C-konci se nachází doména interagující s α -adaptinem (α -adaptin interacting domain, AID), která dále obsahuje motivy vázající klatrin a doménu EH (Eps15 homology; Conner & Schmid, 2002). V mozku dominuje izoforma AAK1L, která je prodloužena na C-konci. Toto prodloužení obsahuje 5 dalších motivů pro interakci s klatrinem a obdobně jsou prodlouženy také izoformy exprimované v játrech a srdci (Henderson & Conner, 2007).



Obr. 6. (A) **Fylogenetický strom rodiny NAK.** C.e. = *Caenorhabditis elegans*, D.m. = *Drosophila melanogaster*, H.s. = *Homo sapiens*, M.m. = *Mus musculus*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*. MPSK1 je známa také jako STK16 (Sorrell et al., 2016). (B) **Schéma AAK1.** Kinázová doména je v rámci proteinové rodiny konzervována (převzato z Conner & Schmid, 2002).

Zásadní význam pro regulaci aktivity AAK1 má klatrin. AAK1 se hojně vyskytuje v CCP, kde s klatrinem a komplexem AP2 kolokalizuje (Conner et al., 2003). Pro asociaci komplexu AP2 s membránou nemá fosforylace Thr156 význam a aktivita AAK1 je před zahájením tvorby CCP na bazální hladině. K výraznému nárůstu aktivity AAK1 dochází se začátkem polymerace klatrinu, která reguluje AAK1 mechanismem pozitivní zpětné vazby (Jackson et al., 2003; Kadlecova et al., 2017). Současně komplex AP2 dosahuje maximální vazby karga (Jackson et al., 2003). Polymerace klatrinu odráží množství iniciací a růst CCP. Míra fosforylace komplexu AP2 se tak zvyšuje spolu s růstem CCP, což odpovídá představě, že fosforylace označuje AP2 k inaktivaci proteinem NECAP (Kadlecova et al., 2017; Wrobel et al., 2019). AAK1 je atypickou kinázou, podíl fosforylovaných AP2 totiž není závislý na koncentraci AP2, ale na koncentraci AAK1, respektive na její asociaci s AP2. Právě klatrin je faktorem, který asociaci AP2 a AAK1 ovlivňuje (Conner et al., 2003).

Nadměrná exprese AAK1 paradoxně snižuje míru endocytózy. Pro mozkovou izoformu AAK1L je možným vysvětlením vazba na klatrin. Vazebné motivy, které má AAK1L navíc oproti AAK1, se totiž vážou na klatrin ve stejném místě jako komplex AP2, a tím vazbu AP2 na klatrin blokují (Henderson & Conner, 2007). Vazby klatrinu a AP2 na AAK1 se však

nevyklučují (Conner et al., 2003). V případě AAK1 může být za snížení endocytózy zodpovědné narušení rovnováhy mezi fosforylovanými a defosforylovanými komplexy AP2, která je podstatou cyklické aktivity AP2 (Conner & Schmid, 2002).

AAK1 je nabohacena na místech vysoce aktivních v endocytóze, především na presynaptických zakončeních neuronů, kde jsou endocytózou recyklovány synaptické váčky, a na vedoucím okraji migrujících buněk, vyskytuje se však také na endozómech (Conner & Schmid, 2002; Shi et al., 2014). AAK1 je silně exprimována v motorických neuronech vybíhajících z předních rohů míšních, kde je její deregulace a následná deplece synaptických váček součástí patologie pokročilého stádia dědičné formy amyotrofní laterální sklerózy (Shi et al., 2014). K patologiím pochopitelně nevede pouze nedostatečná aktivita synapsí. Přílišná aktivita sensorických drah vedoucích do zadních rohů míšních se projevuje neuropatologickou bolestí. Potlačení spontánní aktivity neuronů inhibicí AAK1 specifickým inhibítorem, který zároveň nezasahuje funkci motorických drah, je v tomto případě naopak potenciálním způsobem léčby (Kostich et al., 2016).

AAK1 se kromě endocytózy uplatňuje také v endozomálním transportu. Při recyklaci receptorů AAK1 méně výrazně, avšak podobným mechanismem ovlivňuje podjednotku $\mu 1$ komplexu AP1 (Fingerhut et al., 2001; Henderson & Conner, 2007). Substrátem AAK1 je také endocytický adaptor Numb (Sorensen & Conner, 2008). Numb se motivem DPF váže na přívěsek α -adaptinu a zprostředkovává interakci AP2 s receptorem Notch (Santolini et al., 2000). Nefosforylovaný Numb takto cílí Notch k degradaci, po fosforylaci kinázou AAK1 je však přesunut na perinukleární endozómy, a tím je inaktivován (Gupta-Rossi et al., 2011).

3.2 GAK

Kináza GAK (cyclin G-associated kinase) má podobnou specifitu jako AAK1. Taktéž fosforyluje komplexy AP2 a AP1, ale pro fosforylaci $\mu 2$ je postradatelná. Během endocytózy je hlavní funkcí GAK rozložení klatrinového obalu, které zajišťuje navázáním Hsc70 prostřednictvím své C-koncové domény J (Zhang et al., 2005). GAK se od AAK1 liší také lokalizací. Zatímco AAK1 se vyskytuje u plazmatické membrány v místech aktivní endocytózy (Conner & Schmid, 2002), GAK je převážně cytosolická. Nejčastěji se vyskytuje

v perinukleární oblasti, především v blízkosti TGN, kde kolokalizuje s AP1 a klatrinem (Greener et al., 2000).

GAK je homologem auxilinu, který stimuluje Hsc70 v nervových buňkách, proto je známa také pod názvem auxilin 2 (Greener et al., 2000; Ungewickell et al., 1995). GAK a auxilin mají vysokou identitu s výjimkou kinázové domény, která u auxilinu chybí. V nervových buňkách se auxilin vyskytuje v mnohem větším množství než GAK v ostatních buňkách, což pravděpodobně souvisí s nutností rychlé endocytózy při synaptické transmissi (Greener et al., 2000).

3.3 Další místa fosforylací

Kromě fosforylace Thr156 na μ 2-linkeru mohou funkci AP2 za určitých okolností méně významně ovlivňovat také fosforylace na α -adaptinu a β 2-adaptinu (Fingerhut et al., 2001). Adaptiny jsou substrátem pro kinázu Dyrk1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase). Fosforylace Dyrk1A byla studována na izoformách AP2 izolovaných z mozku potkana a jako potenciální místa fosforylace se ukázala rezidua Ser179 a Ser518 na α -adaptinu. Místa se nacházejí uvnitř komplexu AP2, a k jejich fosforylaci tedy dochází pouze v otevřené konformaci AP2. Fosforylace je inhibiční, způsobuje disociaci β 2-adaptinu a rozpad komplexu AP2 (Murakami et al., 2012). Aktivace receptoru AT1R (angiotensin II type 1 receptor) vede k fosforylaci Tyr737 na β 2-adaptinu kinázou c-Src (Fessart et al., 2007). AT1R patří mezi receptory spřážené s G-proteinem, pro jejichž internalizaci je klíčová interakce AP2 s β -arrestinem (Laporte et al., 1999). Tyr737 se nachází na přívěskové doméně β 2-adaptinu, kam se β -arrestin váže (Edeling et al., 2006) a fosforylace se po internalizaci receptoru podílí na uvolnění β -arrestinu z AP2 (Fessart et al., 2007). Vazba β -arrestinu a ARH, druhého významného adaptoru využívajícího horní místo na β 2-adaptinu, je dále regulována fosforylací Tyr888 (Chakraborty et al., 2014). Při stimulaci receptoru pro EGF se na opačném konci β 2-adaptinu vyskytuje fosforylace Tyr6, která vede k odblokování vazebného místa pro dileucinový motiv. Dileucinový motiv ale není pro internalizaci receptoru esenciální a zda má tato fosforylace funkční význam, není známo (Huang et al., 2003). Kinázy a fosfatázy asociované s Tyr888 a Tyr6 zatím nebyly popsány. Endocytóza EGFR je stejně jako vazba β -arrestinu a ARH podrobněji rozebrána v 5. kapitole.

4 Endocytické motivy rozpoznávané přímo komplexem AP2

4.1 Kooperace motivů

Výběr transmembránových proteinů pro endocytózu zprostředkovanou klatrinem je založen na endocytických signálech, které jsou představovány lineárními motivy, konformačními determinantami nebo kovalentními modifikacemi, jako je například fosforylace nebo ubikvitinylace, v cytosolických doménách endocytovaných proteinů. Signály jsou rozpoznávány různými adaptorovými proteiny a komplex AP2 přímo rozpoznává dva kanonické lineární motivy: tyrosinový motiv $Yxx\Phi$ a motiv založený na dvou leucinech $[DE]xxxL[LI]$ (Traub & Bonifacino, 2013). Z analyzovaného souboru 3705 transmembránových receptorů obsahovalo 33 % pouze tyrosinový motiv, zatímco jen 7 % pouze dileucinový. Takto nerovnoměrná distribuce může souviset s faktem, že pouze tyrosinový motiv je pro endocytózu vyžadován všeobecně (Kadlecova et al., 2017). Vazba obou motivů vede k silnější vazbě komplexu AP2 a pokud to umožňují sterické parametry, mohou být na jeden komplex AP2 navázána dvě různá karga (Jackson et al., 2010). Dileucinový motiv se obecně váže slaběji než tyrosinový a in vivo může kargo využívající dileucinový motiv profitovat ze stabilizace CCP tyrosinovými motivy okolních proteinů (Höning et al., 2005). Oba motivy zároveň byly nalezeny u 23 % transmembránových receptorů (Kadlecova et al., 2017), většina z nich se však váže pouze jedním z motivů, jelikož je mezi motivy jen vzácně dosaženo dostatečně velké vzdálenosti (Jackson et al., 2010).

4.2 Tyrosinový motiv

Konsenzem pro tyrosinový motiv je sekvence $Yxx\Phi$ (Boll et al., 1996; Collawn et al., 1990). Na poslední pozici motivu se nachází velké hydrofobní reziduum, jako je Leu, Ile, Met nebo Phe, přičemž leucin je silně preferován (Boll et al., 1996). Komplex AP2 váže tyrosinový motiv podjednotkou $\mu 2$ (Ohno et al., 1995). Původně se předpokládalo, že tyrosinový motiv má strukturu β -ohybu (Boll et al., 1996; Collawn et al., 1990), později se však ukázalo, že se na komplex AP2 váže jako natažený řetězec (Owen & Evans, 1998). Vazebné místo je tvořeno dvěma hydrofobními kapsami, přičemž do první se váže tyrosin a do druhé hydrofobní aminokyselina na pozici Y+3 (Owen & Evans, 1998). Fosforylace tyrosinu vazbě motivu brání a u některých receptorů je tato skutečnost využívána při regulaci endocytózy (Choi et al., 2019;

Owen & Evans, 1998). V uzavřené konformaci komplexu AP2 je vazebné místo pro motiv nedostupné a k membráně se dostává až po úplné změně konformace AP2 (Collins et al., 2002; Jackson et al., 2010). Pro vazbu je dále nutné, aby byl tyrosinový motiv oddělen od transmembránového regionu receptoru přinejmenším 7 aminokyselinami (Collawn et al., 1990). Možným mechanismem zvýšení avidity komplexu AP2 k transmembránovým proteinům je dimerizace. V přítomnosti motivu YxxΦ byla u části komplexů AP2 pozorována dimerizace prostřednictvím β2-adaptinů (Kovtun et al., 2020) a již dříve byly pozorovány krystalizované dimery podjednotek μ2 (Owen & Evans, 1998).

Typickým příkladem receptoru s tyrosinovým motivem je transferinový receptor (TfR), na kterém komplex AP2 rozpoznává sekvenci YTRF (Boll et al., 1996; Collawn et al., 1990). TfR představuje pro buňku hlavní způsob příjmu železa. Železité kationty jsou přepravovány glykoproteinem transferinem, který se váže na TfR a receptorem zprostředkovanou endocytózou se dostává do endozómu. V endozómu jsou železité kationty uvolněny a prázdný transferin je spolu s TfR recyklován zpět na plazmatickou membránu, kde ztrácí afinitu k TfR a disociuje (Antonescu et al., 2014). TfR cykluje mezi plazmatickou membránou a endozómy neustále, a z tohoto důvodu je v experimentech často používán jako měřítko endocytózy (Cocucci et al., 2012; Scarselli & Donaldson, 2009; Schmidt et al., 2006).

Prostřednictvím kanonického tyrosinového motivu, konkrétně motivu YHEL, se na komplex AP2 váže také protein Dishevelled 2, který funguje jako adaptor pro receptor Frizzled 4. Internalizace aktivovaného receptoru Frizzled 4 je součástí nekanonické signalizace Wnt probíhající na časném endozómu a neméně důležitá je i pro následnou degradaci Frizzled 4, a tedy utlumení signálu. Dishevelled 2 pro vazbu na AP2 zároveň využívá svou doménu DEP (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin), kterou se váže do blízkosti vazebného místa pro tyrosinový motiv (Yu et al., 2010).

Zvláštním případem internalizace díky kanonickým tyrosinovým motivům je receptor PAR-1 (protease-activated receptor 1), který je proteolyticky aktivován koagulačním faktorem trombinem. PAR-1 patří mezi receptory asociované s G-proteiny, se kterými sdílí mechanismus desenzitizace pomocí β-arrestinu, internalizován je však zcela odlišným způsobem. Cytosolická doména PAR-1 obsahuje dva různě fungující tyrosinové motivy

(YKKL a YSIL), a pro správnou funkci druhého z nich je navíc nezbytná palmitoylace receptoru (Canto & Trejo, 2013).

Tyrosinový motiv je třeba rozšířit ještě o nekanonickou sekvenci YxxGΦ, která byla nalezena u iontového kanálu P2X4 řízeného ATP. Motiv YxxGΦ při vazbě na komplex AP2 nahrazuje kanonický tyrosinový motiv YxxΦ, který se sice u P2X4 také nachází, ale není pro vazbu AP2 dostupný. Motiv YxxGΦ se váže do stejného místa na podjednotce $\mu 2$ jako motiv YxxΦ, odlišná je pouze orientace hydrofobního rezidua, jejíž změna je umožněna flexibilitou glycinu (Royle et al., 2005).

4.3 Dileucinový motiv

Méně rozšířeným kanonickým motivem je dileucinový motiv, který je představován sekvencí [DE]xxxL[LI]. Ve srovnání s tyrosinovým motivem je dileucinový motiv více variabilní a AP2 je k jeho různým variantám tolerantnější než AP1 (Doray et al., 2007; Kadlecova et al., 2017). Vazebné místo pro dileucinový motiv se skládá ze dvou přilehlých hydrofobních kapes na podjednotce $\sigma 2$. Kyselé reziduum na pozici L-4 se váže do kladně nabitě oblasti AP2, na jejíž tvorbě se kromě podjednotky $\sigma 2$ podílí také α -adaptin (Kelly et al., 2008). Pro studium dileucinového motivu je často používán receptor CD4 nacházející se na povrchu pomocných T buněk. Endocytóza CD4 je regulována fosforylací serinu, který v případě CD4 dileucinovému motivu bezprostředně předchází. Endocytický signál CD4 je aktivní pouze v případě fosforylace tohoto serinového rezidua (Kelly et al., 2008; Pitcher et al., 1999). Motiv odpovídající konsenzu nese také glukózový transportér GLUT8, který však podle dalších výsledků téže práce interaguje s přívěskovou doménou $\beta 2$ -adaptinu, nikoliv s podjednotkou $\sigma 2$ (Schmidt et al., 2006).

5 Interakce s kargem zprostředkovaná dalšími adaptory

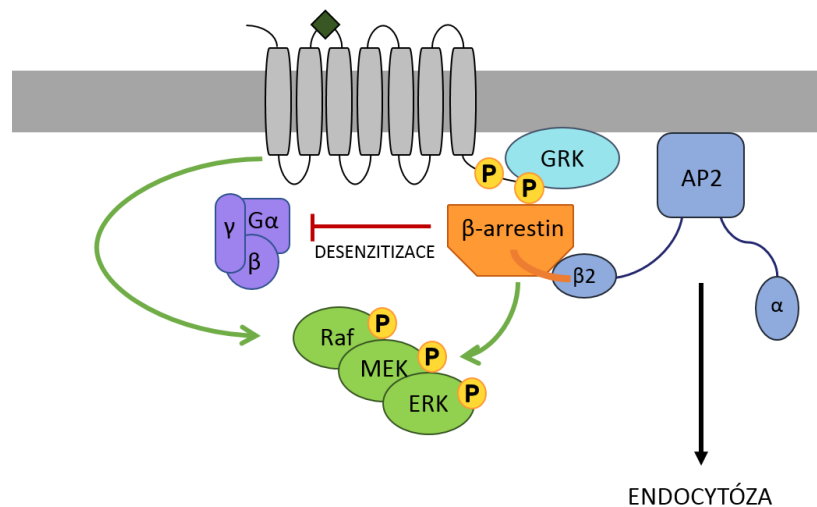
5.1 β -arrestin a endocytóza receptorů spřažených s G-proteinem

Receptory spřažené s G-proteinem (G-protein-coupled receptors, GPCR) jsou největší skupinou receptorů. Mají široké spektrum funkcí a mnohé z nich jsou významnými cíli farmakologické léčby (Schmidt et al., 2020). V souvislosti s endocytózou jsou často studovány například adrenergní receptor β_2 pro adrenalin (β_2 AR), receptor pro angiotensin II (AT1R) nebo muskarinové receptory pro acetylcholin (M1-M4; Luttrell et al., 2018; Scarselli & Donaldson, 2009; Takenouchi et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Jedním z regulačních mechanismů GPCR je tzv. endocytóza zprostředkovaná agonistou. Receptor aktivovaný vazbou agonisty je označen adaptorovým proteinem β -arrestinem, který je následně rozpoznán komplexem AP2 (viz Obr. 7). V některých případech je interakce komplexu AP2 a β -arrestinu nezbytná pro přesun receptoru do CCP (Laporte et al., 1999, 2000), jiné receptory jsou ovšem schopny ovlivňovat složení membrány ve svém okolí a modulovat maturaci CCP ještě před asociací s AP2 (Weinberg & Puthenveedu, 2019). Kromě dlouho známé desenzitizace GPCR, tedy jejich odpřažení od trimerního G-proteinu, a internalizace se β -arrestin uplatňuje také při signalizaci. GPCR významně ovlivňují MAP kinázovou dráhu, tedy aktivitu kinázy ERK, která je asociována s postupem buněčným cyklem, proliferací a transkripcí genů pro přežití, a β -arrestin může zprostředkovat jak tlumení signalizace prostřednictvím degradace GPCR, tak její aktivaci (Luttrell et al., 2018; Takenouchi et al., 2018; Weinberg & Puthenveedu, 2019)

Vazba β -arrestinu na komplex AP2 je v mnohém specifická. Na rozdíl od ostatních vazebných míst pro adaptory, která fungují na principu zvyšování afinity opakovaním vazebných motivů, je vazebné místo pro β -arrestin založeno na vysoce specifické a relativně silné interakci. Klíčovým vazebným motivem β -arrestinu je $[DE]_nX_1-2FXX[FL]XXXR$. Motiv se nachází uvnitř β -arrestinu a pro komplex AP2 je zpřístupněn až po navázání β -arrestinu na aktivovaný GPCR. Vazba β -arrestinu na GPCR je doprovázena konformační změnou, při které se vazebný motiv vyklápí z core β -arrestinu a zaujímá α -helikální strukturu (Edeling et al., 2006). Ve vazebném místě na komplexu AP2 se nachází evolučně konzervované

reziduum Tyr888 (u AP1 jako Tyr897), jehož fosforylace blokuje vazbu β -arrestinu, a reguluje tak obsazenost vazebného místa (Chakraborty et al., 2014). Kinázy a fosfatázy asociované s Tyr888 zatím nejsou známy. Stejným mechanismem jako β -arrestin s komplexem AP2 běžně interaguje také adaptorový protein ARH při endocytóze LDLR. Motiv byl nalezen také u epsinu 1, jeho afinita k vazebnému místu je však výrazně nižší. Regulace endocytózy prostřednictvím změny konformace je z uvedených adaptorů popsána pouze u β -arrestinu (Edeling et al., 2006).



Obr. 7. **Princip rozpoznání receptorů spřažených s G-proteinem určených k endocytóze.** Aktivovaný receptor je fosforylován kinázami GRK a označen pro endocytózu β -arrestinem, který je rozpoznáván komplexem AP2. Kromě desenzitizace a internalizace receptoru může být β -arrestinem zprostředkována také aktivace MAP kinázové dráhy (podle Luttrell et al., 2018).

Některé GPCR jsou před vazbou β -arrestinu ubikvitinylovány a v takovém případě jsou navíc rozpoznávány epsinem 1. Vazba epsinu 1 zde slouží jako další stupeň kontroly před internalizací receptoru. Aktivní GPCR jsou na různých místech fosforylovány kinázami spřaženými s G-proteinem (G protein-coupled receptor kinases, GRK), tyto fosforylace však mají význam spíše pro následný transport endozomálním systémem a konkrétně je o nich známo jen velmi málo (Weinberg & Puthenveedu, 2019). Nezávisle na fosforylaci a β -arrestinu mohou být receptory konstitutivně internalizovány i mechanismy nezávislými na klatrinu a většina GPCR je schopna se mezi různými cestami rozhodovat podle kontextu (Schmidt et al., 2020; Scarselli & Donaldson, 2009; Zhang et al., 2020). Diverzita způsobů endocytózy a jejich vzájemná zastupitelnost představuje značnou komplikaci při studiu těchto procesů.

5.2 ARH a receptor pro nízkodenzitní lipoprotein

Nízkodenzitní lipoprotein (low-density lipoprotein, LDL) se do buňky podobně jako transferin dostává v komplexu s konstitutivně internalizovaným receptorem. Endocytickým signálem receptoru pro LDL (LDLR) je motiv FDNPVY (Antonescu et al., 2014). Tento motiv odpovídá konsenzu [FY]xNPx[YF], který se nachází také u prekursoru amyloidního proteinu (amyloid precursor protein, APP) nebo u integrinu β 1. Interakce motivu [FY]xNPx[YF] s AP2 je zprostředkována monomerními adaptory s doménou PTB (phosphotyrosin-binding), jako je například ARH, Dab2 a Numb. Endocytická doména PTB na rozdíl od déle známé signalizační domény PTB preferuje nefosforylované tyrosiny. Fosfotyrosiny se ze sterických důvodů na endocytickou doménu PTB nevážou (Traub & Bonifacino, 2013).

ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia protein) se váže na AP2 v horním místě na β 2-adaptinu vazebným motivem [DE]_nx₁₋₂Fxx[FL]xxxR, tedy stejným způsobem jako β -arrestin (Edeling et al., 2006). Fosforylace Tyr888 ve vazebném místě však ve srovnání s GPCR nemá na endocytózu LDLR tak velký dopad. To lze vysvětlit přítomností dalších adaptorových proteinů, například Dab2 (Disabled-2), které taktéž rozpoznávají endocytický motiv na LDLR, ale s AP2 interagují jiným způsobem (Chakraborty et al., 2014). Dab2 interaguje s AP2 prostřednictvím motivů DPF vázajících se na přívěsek α -adaptinu (Morris & Cooper, 2001). Na rozdíl od vzdáleně příbuzného ARH je funkcí Dab2 spíše přesun receptorů do CCP než jejich následná internalizace. Díky schopnosti vázat také PtdIns(4,5)P₂ a klatrin, což je typickou vlastností adaptorových proteinů, je Dab2 schopen internalizovat receptor nezávisle na AP2, i když přirozeně spolu pravděpodobně kooperují. Naopak ARH pro svou funkci komplex AP2 vyžaduje (Maurer & Cooper, 2006).

5.3 Endocytóza receptorových tyrosinkináz

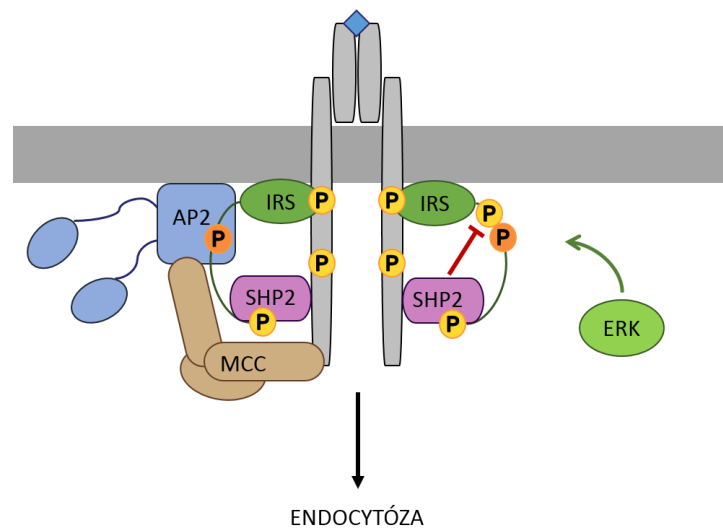
Známými příklady receptorových tyrosinkináz (receptor tyrosine kinases, RTK) jsou receptory pro růstové faktory, jako je například EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), PDGF (platelet-derived growth factor), nebo receptor pro inzulin. Obecným schématem signalizace RTK je jejich dimerizace indukovaná vazbou ligandu, která je následována vzájemnou fosforylací a aktivací cytosolických kinázových domén. Mnohé RTK se však od tohoto schématu odchyľují (Thottacherry et al., 2019).

U RTK byly nalezeny oba kanonické endocytické motivy. Dileucinový motiv u EGFR může s nízkou afinitou interagovat s AP2, jeho význam je však nejasný a minimálně pro internalizaci receptoru se zdá být nepodstatným (Huang et al., 2003). V případě tyrosinového motivu YRAL byla dokonce jeho důležitost pro endocytózu zprostředkovanou klatrinem prokázána, endocytóza EGFR je ovšem v menší míře možná i nezávisle na tomto motivu (Nesterov et al., 1999; Sorkin et al., 1996). To lze vysvětlit tím, že RTK jsou podobně jako GPCR endocytovány také mechanismy nezávislými na klatrinu, a tedy i nezávisle na komplexu AP2. Různé mechanismy endocytózy se liší způsobem, jakým ovlivňují osud receptorů a sílu signalizace, obecně však lze říci, že endocytóza zprostředkovaná klatrinem favorizuje recyklaci receptorů, zatímco endocytóza nezávislá na klatrinu spíše jejich degradaci (Pascolutti et al., 2019; Thottacherry et al., 2019).

Charakteristickou modifikací RTK je ubikvitinylace, za kterou je zodpovědných mnoho E3-ubikvitinligáz, jako je například Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) nebo Mdm2 (mouse double minute 2). Asociace Mdm2 s IGF-1R je překvapivě zprostředkována β -arrestinem, adaptorovým proteinem známějším ve spojitosti s GPCR (Goh & Sorkin, 2013). Polyubikvitinové řetězce na EGFR specificky rozpoznává epsin 1 a Eps15 tandemově řazenými motivy UIM (ubiquitin-interacting motif; Hawryluk et al., 2006). Právě adaptory epsin 1 a Eps15 jsou zodpovědné za pozorovanou reziduální endocytózu EGFR při poškození komplexu AP2 (Pascolutti et al., 2019).

Zajímavým způsobem je zprostředkována internalizace inzulinového receptoru (IR; viz Obr. 8). IR podobně jako EGFR disponuje dileucinovým motivem, klíčový je pro něj však motiv NPEY, díky kterému při aktivaci inzulinem váže adaptor IRS1/2 (insulin receptor substrate 1/2). IRS1/2 obsahuje kanonické tyrosinové motivy následované serinem (Yxx Φ S), kterými interaguje s komplexem AP2. Tyrosinové motivy jsou fosforylovány aktivovaným IR, čímž je rekrutována fosfatáza SHP2 (SH2 domain-containing phosphatase-2). SHP2 spouští signální kaskády vedoucí mimo jiné k aktivaci kinázy ERK, která poté fosforyluje seriny následující za tyrosinovými motivy. Fosforylace serinů umožňuje SHP2 tyrosinové motivy defosforylovat, což je nezbytné pro jejich vazbu na komplex AP2. ERK tak negativní zpětnou vazbou reguluje signalizaci IR. S mechanismem využívajícím IRS1/2 kooperuje také

mechanismus využívající komplex proteinů mitotického kontrolního bodu (mitotic checkpoint complex, MCC; Choi et al., 2019).



Obr. 8. Princip rozpoznání inzulínového receptoru určeného k endocytóze. Vazba receptoru na komplex AP2 je zprostředkována IRS a komplexem mitotického kontrolního bodu (MCC). IRS musí být před vazbou na AP2 fosforylován na serinu kinázou ERK a defosforylován na tyrosinu fosfatázou SHP2. Oranžově jsou značeny fosforylace na serinech, žlutě fosforylace na tyrosinech (podle Choi et al., 2019).

Podobná funkce IRS1, ne však komplexu mitotického kontrolního bodu, byla nalezena také u IGF-1R. IGF-1R ovlivňuje růst a proliferaci, ale na rozdíl od IR není internalizován ihned po stimulaci ligandem. V případě IGF-1R vazba IRS1 na komplex AP2 inhibuje internalizaci receptoru a právě adaptoru IRS1 je přikládán podíl na udržení aktivovaného receptoru na plazmatické membráně (Yoneyama et al., 2018). Jak je zajištěna specifita internalizace IR a IGF-1R dosud není jasné. Detaily signálních kaskád RTK jsou stále nedostatečně prozkoumané, podobně, jako proces jejich endocytózy a putování buňkou, a uvedené příklady regulace představují pouze zlomek interakcí, které tyto složité děje doprovázejí.

Závěr

Komplex adaptorového proteinu 2 (AP2) je nejčastějším a také nejlépe popsáním endocytickým adaptorem a jeho struktura je již dlouho známa jak v neaktivním cytosolickém stavu, tak v aktivním stavu asociovaném s plazmatickou membránou. Mnohými studii byly odhaleny a podrobně popsány interakce AP2 s klatrinem, ale i mnoha dalšími komponentami CME, které ovlivňují celý proces endocytózy včetně aktivity komplexu AP2 samotného. Inaktivace komplexu AP2 je ovšem ve srovnání s jeho aktivací poměrně neprozkoumaná, ačkoliv je pro cyklickou aktivitu AP2 neméně důležitá. Je však znám protein, který ji pravděpodobně řídí a na odhalení funkčního mechanismu inaktivace AP2 se nyní pracuje.

Vazba transmembránových receptorů na komplex AP2 je zajišťována rozsáhlým souborem nejrůznějších peptidových motivů, kovalentních modifikací a dalších adaptorových proteinů, z nichž nejvýznamnější byly v práci představeny. Regulace množství receptorů na povrchu buňky je významná nejen fyziologicky, ale také farmakologicky. Porozumění specifickým mechanismům, kterými AP2 rozpoznává konkrétní receptory, je důležité pro léčbu nejrůznějších patologických stavů, kdy mohou být komponenty těchto drah cíli terapeutických prostředků. Konkrétním příkladem může být léčba poruch senzitivity k inzulinu úpravou endocytózy inzulinového receptoru (Choi et al., 2019; Hall et al., 2020), endocytózou jsou ale modulovány také nejrůznější děje na nervových synapsích, a to jak na presynaptické, tak na postsynaptické membráně. Mnohé viry využívají receptorem zprostředkovanou endocytózu pro vstup do buňky, a proto je endocytická mašinerie také cílem nejrůznějších antivirotik (Bekerman et al., 2017; Wang et al., 2019). Mezi tyto viry patří také SARS-CoV-2, původce onemocnění COVID-19, a jedním ze směrů při hledání účinné léčby se staly inhibitory kinázy AAK1 (Sayed et al., 2020; Stebbing et al., 2020), která přímo ovlivňuje aktivitu AP2, a tedy cestu virionů do buňky. I přes poměrně široké praktické využití procesu endocytózy jsou konkrétní mechanismy její regulace známy jen u velmi malého počtu receptorů a ani známé způsoby typické pro některé receptorové rodiny nejsou sdíleny všemi jejich členy. Stále jsou však objevovány nové a mnohdy překvapivé interakce vedoucí k vazbě transmembránových receptorů na komplex AP2 a jejich následné endocytóze.

Seznam použité literatury

Aguet, F., Antonescu, C. N., Mettlen, M., Schmid, S. L., & Danuser, G. (2013). Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Developmental Cell*, 26(3), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.019>

Antonescu, C. N., McGraw, T. E., & Klip, A. (2014). Reciprocal regulation of endocytosis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), a016964. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016964> (*)

Beacham G. M., Partlow E. A., & Hollopeter G. (2019). Conformational regulation of AP1 and AP2 clathrin adaptor complexes. *Traffic*, 20(10), 741-751. <https://doi.org/10.1111/tra.12677> (*)

Beacham, G. M., Partlow, E. A., Lange, J. J., & Hollopeter, G. (2018). NECAPs are negative regulators of the AP2 clathrin adaptor complex. *ELife*, 7, e32242. <https://doi.org/10.7554/eLife.32242>

Beck, K. A., & Keen, J. H. (1991). Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4442–4447. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1847920/>

Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J., & Aebersold, R. (2011). The quantitative proteome of a human cell line. *Molecular Systems Biology*, 7, 549. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.82>

Bekerman, E., Neveu, G., Shulla, A., Brannan, J., Pu, S. Y., Wang, S., Xiao, F., Barouch-Bentov, R., Bakken, R. R., Mateo, R., Govero, J., Nagamine, C. M., Diamond, M. S., De Jonghe, S., Herdewijn, P., Dye, J. M., Randall, G., & Einav, S. (2017). Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *Journal of Clinical Investigation*, 127(4), 1338–1352. <https://doi.org/10.1172/JCI89857>

Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins: The final recount. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 2907–2920. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2907>

Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L. C., Bonifacino, J. S., & Kirchhausen, T. (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO Journal*, 15(21), 5789–5795. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00965.x>

Bucher, D., Frey, F., Sochacki, K. A., Kummer, S., Bergeest, J. P., Godinez, W. J., Kräusslich, H. G., Rohr, K., Taraska, J. W., Schwarz, U. S., & Boulant, S. (2018). Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nature Communications*, 9(1), 1109. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03533-0>

Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L. P., Prabhu, Y., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2010). Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Developmental Cell*, 18(3), 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.015>

Canto, I., & Trejo, J. A. (2013). Palmitoylation of protease-activated receptor-1 regulates adaptor protein complex-2 and -3 interaction with tyrosine-based motifs and endocytic sorting. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15900–15912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469866>

Chakraborty, S., Umasankar, P. K., Preston, G. M., Khandelwal, P., Apodaca, G., Watkins, S. C., & Traub, L. M. (2014). A phosphotyrosine switch for cargo sequestration at clathrin-coated buds. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17497–17514. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556589>

Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., & Rothman, J. E. (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90532-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90532-5)

Choi, E., Kikuchi, S., Gao, H., Brodzik, K., Nassour, I., Yopp, A., Singal, A. G., Zhu, H., & Yu, H. (2019). Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nature Communications*, 10(1), 1473. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09318-3>

Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., & Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 150(3), 495–507. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.047>

Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S., & Tainer, J. A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, 63(5), 1061–1072. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90509-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90509-D)

Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109(4), 523–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00735-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00735-3)

Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2002). Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 156(5), 921–929. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108123>

Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 773–779. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304069>

- Conner, S. D., Schröter, T., & Schmid, S. L. (2003). AAK1-mediated μ 2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin. *Traffic*, 4(12), 885–890. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9219.2003.0142.x>
- Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A., & Bonifacino, J. S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Molecular Cell*, 3(1), 11–21. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80170-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80170-7)
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G., & Kornfeld, S. (2007). The γ/σ 1 and α/σ 2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5), 1887–1896. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-01-0012>
- Edeling, M. A., Mishra, S. K., Keyel, P. A., Steinhauser, A. L., Collins, B. M., Roth, R., Heuser, J. E., Owen, D. J., & Traub, L. M. (2006). Molecular switches involving the AP-2 β 2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly. *Developmental Cell*, 10(3), 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.016>
- Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdan, F. F., Wiseman, P. W., Bouvier, M., & Laporte, S. A. (2007). Src-dependent phosphorylation of β 2-adaptin disassociates the β -arrestin-AP-2 complex. *Journal of Cell Science*, 120(10), 1723–1732. <https://doi.org/10.1242/jcs.03444>
- Fingerhut, A., Von Figura, K., & Höning, S. (2001). Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5476–5482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009516200>
- Gaidarov, I., Chen, Q., John, R., Falck, Reddy, K. K., & Keen, J. H. (1996). A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 α subunit. Implications for the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20922–20929. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20922>
- Goh, L. K., & Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), a017459. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017459> (*)
- Greener, T., Zhao, X., Nojima, H., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2000). Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1365–1370. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1365>
- Gu, M., Liu, Q., Watanabe, S., Sun, L., Hollopeter, G., Grant, B. D., & Jorgensen, E. M. (2013). AP2 hemicomplexes contribute independently to synaptic vesicle endocytosis. *ELife*, 2013(2), e00190. <https://doi.org/10.7554/eLife.00190>

- Gupta-Rossi, N., Ortica, S., Meas-Yedid, V., Heuss, S., Moretti, J., Olivo-Marin, J. C., & Israël, A. (2011). The adaptor-associated kinase 1, AAK1, is a positive regulator of the notch pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18720–18730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190769>
- Hall, C., Yu, H., & Choi, E. (2020). Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(6), 911–920. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0456-3>
- Hannan, L. A., Newmyer, S. L., & Schmid, S. L. (1998). ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for hsc70. *Molecular Biology of the Cell*, 9(8), 2217–2229. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.8.2217>
- Hawryluk, M. J., Keyel, P. A., Mishra, S. K., Watkins, S. C., Heuser, J. E., & Traub, L. M. (2006). Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic*, 7(3), 262–281. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00383.x>
- Heldwein, E. E., Macia, E., Wang, J., Yin, H. L., Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (2004). Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14108–14113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406102101>
- Henderson, D. M., & Conner, S. D. (2007). A novel AAK1 splice variant functions at multiple steps of the endocytic pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2698–2706. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-09-0831>
- Hirst, J., Borner, G. H. H., Antrobus, R., Peden, A. A., Hodson, N. A., Sahlender, D. A., & Robinson, M. S. (2012). Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the “knocksideways” system. *Current Biology*, 22(18), 1711–1716. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.012>
- Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B., & Robinson, M. S. (1999). Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Molecular Biology of the Cell*, 10(8), 2787–2802. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2787>
- Hirst, J., D. Barlow, L., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N. J., Dacks, J. B., & Robinson, M. S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biology*, 9(10), e1001170. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001170>
- Hirst, J., Edgar, J. R., Esteves, T., Darios, F., Madeo, M., Chang, J., Roda, R. H., Dürr, A., Anheim, M., Gellera, C., Li, J., Züchner, S., Mariotti, C., Stevanin, G., Blackstone, C., Kruer, M. C., & Robinson, M. S. (2015). Loss of AP-5 results in accumulation of aberrant endolysosomes: Defining a new type of lysosomal storage disease. *Human Molecular Genetics*, 24(17), 4984–4996. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv220>

- Hirst, J., Itzhak, D. N., Antrobus, R., Borner, G. H. H., & Robinson, M. S. (2018). Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLoS Biology*, *16*(1), e2004411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004411>
- Hollopeter, G., Lange, J. J., Zhang, Y., Vu, T. N., Gu, M., Ailion, M., Lambie, E. J., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., Florens, L., & Jorgensen, E. M. (2014). The membrane-associated proteins FCHO and SGIP are allosteric activators of the AP2 clathrin adaptor complex. *ELife*, *3*, e03648. <https://doi.org/10.7554/eLife.03648>
- Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Späte, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., & Owen, D. J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Molecular Cell*, *18*(5), 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.019>
- Huang, F., Jiang, X., & Sorkin, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of the β 2 subunit of clathrin adaptor complex AP-2 reveals the role of a di-leucine motif in the epidermal growth factor receptor trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43411–43417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306072200>
- Jackson, A. P., Flett, A., Smythe, C., Hufton, L., Wetten, F. R., & Smythe, E. (2003). Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor μ 2 kinase. *Journal of Cell Biology*, *163*(2), 231–236. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304079>
- Jackson, L. P., Kelly, B. T., McCoy, A. J., Gaffry, T., James, L. C., Collins, B. M., Höning, S., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell*, *141*(7), 1220–1229. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.006>
- Kadlecova, Z., Spielman, S. J., Loerke, D., Mohanakrishnan, A., Reed, D. K., & Schmid, S. L. (2017). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *Journal of Cell Biology*, *216*(1), 167–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>
- Kelly, B. T., Graham, S. C., Liska, N., Dannhauser, P. N., Höning, S., Ungewickell, E. J., & Owen, D. J. (2014). AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science*, *345*(6195), 459–463. <https://doi.org/10.1126/science.1254836>
- Kelly, B. T., McCoy, A. J., Späte, K., Miller, S. E., Evans, P. R., Höning, S., & Owen, D. J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, *456*(7224), 976–979. <https://doi.org/10.1038/nature07422>
- Kirchhausen, T., Nathanson, K. L., Matsui, W., Vaisberg, A., Chow, E. P., Burne, C., Keen, J. H., & Davis, A. E. (1989). Structural and functional division into two domains of the large (100- to 115-kDa) chains of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(8), 2612–2616. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2612>

- Kirchhausen, T., Owen, D., & Harrison, S. C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a016725. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016725> (*)
- Kostich, W., Hamman, B. D., Li, Y. W., Naidu, S., Dandapani, K., Feng, J., Easton, A., Bourin, C., Baker, K., Allen, J., Savelieva, K., Louis, J. V., Dokania, M., Elavazhagan, S., Vattikundala, P., Sharma, V., Das, M. L., Shankar, G., Kumar, A., ... Albright, C. F. (2016). Inhibition of AAK1 kinase as a novel therapeutic approach to treat neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(3), 371–386. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.235333>
- Kovtun, O., Dickson, V. K., Kelly, B. T., Owen, D. J., & Briggs, J. A. G. (2020). Architecture of the AP2/clathrin coat on the membranes of clathrin-coated vesicles. *Science Advances*, 6(30), eaba8381. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8381>
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23120–23126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002581200>
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S. G., Caron, M. G., & Barak, L. S. (1999). The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3712–3717. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3712>
- Luttrell, L. M., Wang, J., Plouffe, B., Smith, J. S., Yamani, L., Kaur, S., Jean-Charles, P. Y., Gauthier, C., Lee, M. H., Pani, B., Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, S., Reiter, E., Bouvier, M., Shenoy, S. K., Laporte, S. A., Rockman, H. A., & Lefkowitz, R. J. (2018). Manifold roles of β -arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Science Signaling*, 11(549), eaat7650. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat7650>
- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y., & Bonifacino, J. S. (2011). Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2022–2030. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197178>
- Maurer, M. E., & Cooper, J. A. (2006). The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *Journal of Cell Science*, 119(20), 4235–4246. <https://doi.org/10.1242/jcs.03217>
- Mettlen, M., Chen, P.-H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 871–896. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012644> (*)

Moreno-De-Luca, A., Helmers, S. L., Mao, H., Burns, T. G., Melton, A. M. A., Schmidt, K. R., Fernhoff, P. M., Ledbetter, D. H., & Martin, C. L. (2011). Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *Journal of Medical Genetics*, 48(2), 141–144. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.082263>

Morris, S. M., & Cooper, J. A. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic*, 2(2), 111–123. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.020206.x>

Motley, A. M., Berg, N., Taylor, M. J., Sahlender, D. A., Hirst, J., Owen, D. J., & Robinson, M. S. (2006). Functional analysis of AP-2 α and μ 2 subunits. *Molecular Biology of the Cell*, 17(12), 5298–5308. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-05-0452>

Murakami, N., Bolton, D. C., Kida, E., Xie, W., & Hwang, Y.-W. W. (2012). Phosphorylation by dyrk1A of clathrin coated vesicle-associated proteins: Identification of the substrate proteins and the effects of phosphorylation. *PLoS ONE*, 7(4), e34845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034845>

Nesterov, A., Carter, R. E., Sorkina, T., Gill, G. N., & Sorokin, A. (1999). Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant μ 2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO Journal*, 18(9), 2489–2499. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2489>

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., & Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232), 1872–1875. <https://doi.org/10.1126/science.7569928>

Olusanya, O., Andrews, P. D., Swedlow, J. R., & Smythe, E. (2001). Phosphorylation of threonine 156 of the μ 2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Current Biology*, 11(11), 896–900. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00240-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00240-8)

Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E. M., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the α - adaptin appendage domain. *Cell*, 97(6), 805–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80791-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80791-6)

Owen, D.J. (2000). The structure and function of the beta2-adaptin appendage domain. *The EMBO Journal*, 19(16), 4216–4227. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4216>

Owen, D. J., & Evans, P. R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 282(5392), 1327–1332. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1327>

- Page, L. J., & Robinson, M. S. (1995). Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *Journal of Cell Biology*, 131(3), 619–630. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.619>
- Partlow, E. A., Baker, R. W., Beacham, G. M., Chappie, J. S., Leschziner, A. E., & Hollopeter, G. (2019). A structural mechanism for phosphorylation-dependent inactivation of the AP2 complex. *ELife*, 8, e50003. <https://doi.org/10.7554/eLife.50003>
- Pascolutti, R., Algisi, V., Conte, A., Raimondi, A., Pasham, M., Upadhyayula, S., Gaudin, R., Maritzen, T., Barbieri, E., Caldieri, G., Tordonato, C., Confalonieri, S., Freddi, S., Malabarba, M. G., Maspero, E., Polo, S., Tacchetti, C., Haucke, V., Kirchhausen, T., ... Sigismund, S. (2019). Molecularly distinct clathrin-coated pits differentially impact EGFR fate and signaling. *Cell Reports*, 27(10), 3049–3061. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.017>
- Pitcher, C., Höning, S., Fingerhut, A., Bowers, K., & Marsh, M. (1999). Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, 10(3), 677–691. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.3.677>
- Praefcke, G. J. K., Ford, M. G. J., Schmid, E. M., Olesen, L. E., Gallop, J. L., Peak-Chew, S. Y., Vallis, Y., Babu, M. M., Mills, I. G., & McMahon, H. T. (2004). Evolving nature of the AP2 α -appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *EMBO Journal*, 23(22), 4371–4383. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600445>
- Pu, S., Schor, S., Karim, M., Saul, S., Robinson, M., Kumar, S., Prugar, L. I., Dorosky, D. E., Brannan, J., Dye, J. M., & Einav, S. (2020). BIKE regulates dengue virus infection and is a cellular target for broad-spectrum antivirals. *Antiviral Research*, 184, 104966. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104966>
- Ren, X., Farías, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2013). Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell*, 152(4), 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.042>
- Ritter, B., Philie, J., Girard, M., Tung, E. C., Blondeau, F., & McPherson, P. S. (2003). Identification of a family of endocytic proteins that define a new α -adaptin ear-binding motif. *EMBO Reports*, 4(11), 1089–1093. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400004>
- Royle, S. J., Qureshi, O. S., Bobanović, L. K., Evans, P. R., Owen, D. J., & Murrell-Lagnado, R. D. (2005). Non-canonical YXXG Φ endocytic motifs: Recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *Journal of Cell Science*, 118(14), 3073–3080. <https://doi.org/10.1242/jcs.02451>
- Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C., & Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *Journal of Cell Biology*, 151(6), 1345–1351. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1345>

Sayed, A. M., Khalaf, A. M., Abdelrahim, M. E. A., & Elgendy, M. O. (2020). Repurposing of some anti-infective drugs for COVID-19 treatment: A surveillance study supported by an in silico investigation. *International Journal of Clinical Practice*, 00, e13877. <https://doi.org/10.1111/ijcp.13877>

Scarselli, M., & Donaldson, J. G. (2009). Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3577–3585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806819200>

Schledzewski, K., Brinkmann, H., & Mendel, R. R. (1999). Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatomer COPI. *Journal of Molecular Evolution*, 48(6), 770–778. <https://doi.org/10.1007/PL00006521>

Schmid, E. M., Ford, M. G. J., Burtsey, A., Praefcke, G. J. K., Peak-Chew, S. Y., Mills, I. G., Benmerah, A., & McMahon, H. T. (2006). Role of the AP2 β -appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biology*, 4(9), 1532–1548. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040262>

Schmidt, J. H., Perslev, M., Bukowski, L., Stoklund, M., Herborg, F., Herlo, R., & Lindegaard Madsen, K. (2020). Constitutive internalization across therapeutically targeted GPCRs correlates with constitutive activity. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 126(S6), 116–121. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13274>

Schmidt, U., Briese, S., Leicht, K., Schürmann, A., Joost, H. G., & Al-Hasani, H. (2006). Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the β 2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2321–2331. <https://doi.org/10.1242/jcs.02943>

Shi, B., Conner, S. D., & Liu, J. (2014). Dysfunction of endocytic kinase AAK1 in ALS. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22918–22932. <https://doi.org/10.3390/ijms151222918>

Shih, W., Gallusser, A., & Kirchhausen, T. (1995). A clathrin-binding site in the hinge of the β 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 31083–31090. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.31083>

Sorensen, E. B., & Conner, S. D. (2008). AAK1 regulates Numb function at an early step in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, 9(10), 1791–1800. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00790.x>

Sorkin, A., Mazzotti, M., Sorkina, T., Scotto, L., & Beguinot, L. (1996). Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13377–13384. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13377>

- Sorrell, F. J., Szklarz, M., Abdul Azeez, K. R., Elkins, J. M., & Knapp, S. (2016). Family-wide structural analysis of human Numb-associated protein kinases. *Structure*, 24(3), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.015>
- Stamnes, M. A., & Rothman, J. E. (1993). The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, 73(5), 999–1005. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90277-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90277-w)
- Stebbing, J., Krishnan, V., Bono, S., Ottaviani, S., Casalini, G., Richardson, P. J., Monteil, V., Lauschke, V. M., Mirazimi, A., Youhanna, S., Tan, Y., Baldanti, F., Sarasini, A., Terres, J. A. R., Nickoloff, B. J., Higgs, R. E., Rocha, G., Byers, N. L., Schlichting, D. E., Nirula, A., Cardoso, A., Corbellino, M. (2020). Mechanism of baricitinib supports artificial intelligence-predicted testing in COVID-19 patients. *EMBO Molecular Medicine*, 12(8), e12697. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012697>
- Takenouchi, O., Yoshimura, H., & Ozawa, T. (2018). Unique roles of β -arrestin in GPCR trafficking revealed by photoinducible dimerizers. *Scientific Reports*, 8(1), 677. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19130-y>
- Ter Haar, E., Harrison, S. C., & Kirchhausen, T. (2000). Peptide-in-groove interactions link target proteins to the β -propeller of clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1096–1100. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1096>
- Thottacherry, J. J., Sathe, M., Prabhakara, C., & Mayor, S. (2019). Spoiled for choice: Diverse endocytic pathways function at the cell surface. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35, 55–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062710> (*)
- Traub, L. M., Ostrom, J. A., & Kornfeld, S. (1993). Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *Journal of Cell Biology*, 123(3), 561–573. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.3.561>
- Traub, L. M. (2019). A nanobody-based molecular toolkit provides new mechanistic insight into clathrin-coat initiation. *ELife*, 8, e41768. <https://doi.org/10.7554/eLife.41768>
- Traub, L. M., & Bonifacino, J. S. (2013). Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a016790. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016790> (*)
- Umeda, A., Meyerholz, A., & Ungewickell, E. (2000). Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *European Journal of Cell Biology*, 79(5), 336–342. [https://doi.org/10.1078/S0171-9335\(04\)70037-0](https://doi.org/10.1078/S0171-9335(04)70037-0)
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E. H., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martini, B., Greene, L. E., & Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378(6557), 632–635. <https://doi.org/10.1038/378632a0>

Wang, C., Wang, J., Shuai, L., Ma, X., Zhang, H., Liu, R., Chen, W., Wang, X., Ge, J., Wen, Z., & Bu, Z. (2019). The serine/threonine kinase AP2-associated kinase 1 plays an important role in rabies virus entry. *Viruses*, *12*(1), 45. <https://doi.org/10.3390/v12010045>

Weinberg, Z. Y., & Puthenveedu, M. A. (2019). Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic*, *20*(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/tra.12628> (*)

Wrobel, A. G., Kadlecova, Z., Kamenicky, J., Yang, J. C., Herrmann, T., Kelly, B. T., McCoy, A. J., Evans, P. R., Martin, S., Müller, S., Sroubek, F., Neuhaus, D., Honing, S., & Owen, D. J. (2019). Temporal ordering in endocytic clathrin-coated vesicle formation via AP2 phosphorylation. *Developmental Cell*, *50*(4), 494–508. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.017>

Yoneyama, Y., Lanzerstorfer, P., Niwa, H., Umehara, T., Shibano, T., Yokoyama, S., Chida, K., Weghuber, J., Hakuno, F., & Takahashi, S. I. (2018). IRS-1 acts as an endocytic regulator of IGF-I receptor to facilitate sustained IGF signaling. *ELife*, *7*, e32893. <https://doi.org/10.7554/eLife.32893>

Yu, A., Xing, Y., Harrison, S. C., & Kirchhausen, T. (2010). Structural analysis of the interaction between Dishevelled2 and clathrin AP-2 adaptor, a critical step in noncanonical Wnt signaling. *Structure*, *18*(10), 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.07.010>

Zaremba, S., & Keen, J. H. (1985). Limited proteolytic digestion of coated vesicle assembly polypeptides abolishes reassembly activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, *28*(1), 47–58. <https://doi.org/10.1002/jcb.240280108>

Zhang, C. X., Engqvist-Goldstein, Å. E. Y., Carreno, S., Owen, D. J., Smythe, E., & Drubin, D. G. (2005). Multiple roles for cyclin G-associated kinase in clathrin-mediated sorting events. *Traffic*, *6*(12), 1103–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00346.x>

Zhang, X., Zheng, M., & Kim, K. M. (2020). GRK2-mediated receptor phosphorylation and Mdm2-mediated β -arrestin2 ubiquitination drive clathrin-mediated endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *533*(3), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.030>

Přehledové články jsou označeny (*).