

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Úloha aktin-asociovaného proteinu Sla2  
v endocytickém komplexu *Saccharomyces cerevisiae***

Iveta Bartoňová

Školitel: Ing. Jiří Hašek, CSc.

**2008 / 2009**

*Chtěla bych poděkovat Ing. Jiřímu Haškovi, CSc. za jeho odbornou pomoc při sepsání této bakalářské práce a za čas, který mi věnoval.*

## Obsah

1. Abstrakt.....	4
2. Úvod.....	5
3. Aktinový cytoskelet kvasinky <i>S. cerevisiae</i> .....	7
4. Endocytóza u kvasinek.....	8
4.1. Vytvoření endocytického váčku.....	8
4.2. Proteiny endocytického pláště.....	11
4.2.1 Protein Sla2 .....	13
4.2.2 Sla2 - interakční protein Sla1 .....	15
4.2.3 Struktura proteinu Sla1 a Sla2.....	16
5. Kontrola dynamiky endocytického pláště .....	18
5.1 Protein Pan1 .....	18
5.2 Synaptojaniny .....	20
6. Proteinové agregáty.....	22
6.1 Agrezóm a priony .....	22
6.2 Endocytický komplex a dynamika proteinových agregátů .....	24
7. Závěr .....	26
8. Seznam použité literatury .....	27

## 1. Abstrakt

Endocytóza je důležitým procesem pro příjem živin, recyklaci komponentů cytoplazmatické membrány, regulaci množství receptorů a metabolismu u všech eukaryot. Jednobuněčná pučící kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je atraktivním eukaryotickým mikroorganizmem pro tyto studie. To je také proto, že existuje mnoho zdrojů (například kolekcí specifických mutantů či kmenů produkujících GFP - značené proteiny), které jsou dostupné vědcům z celého světa. V této práci je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* představena jako modelový systém pro analýzu úlohy aktinového cytoskeletu a přidružených proteinů v klatrinem - řízené endocytóze. Zejména je diskutována úloha aktin - asociovaného proteinu Sla2 a jeho interakčních partnerů při tvorbě endozómů a proteinových agregátů.

The process of endocytosis is traditionally known to function in internalization of nutrients and recycling plasma membrane components for down - regulation of receptors and metabolism in all eukaryotic cells. The unicellular budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* serves as an attractive eukaryotic microorganism for these studies. This is also because of many resources (e.g. specific mutants or strains expressing GFP labeled proteins) which are accessible to any researches all over the world. In this work, yeast *Saccharomyces cerevisiae* is introduced as a model system to analyze the role of actin cytoskeleton and associated proteins in clatrin - driven endocytosis. Mainly, the importance of the actin - associated protein Sla2 and its interacting proteins for the formation of endosomes and functional links between endocytosis and protein aggregation are discussed.

### Klíčová slova

Endocytóza, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, aktinový cytoskelet, protein Sla2, proteinové agregáty, endozóm.

### Key words

Endocytosis, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, actin cytoskeleton, protein Sla2, protein aggregation, endosome.

## 2. Úvod

Cílem této práce bylo shrnout současné poznání o komponentách zapojených v procesu endocytózy u kvasinky. Zvláštní pozornost byla věnována aktin - asociovanému proteinu Sla2. Tento protein kvasinky *S. cerevisiae*, známý pod synonymy Sla2/End4/Mop2 je totiž nejen důležitý pro nukleaci aktinových mikrofilament při endocytóze a pro distribuci některých důležitých proteinů cytoplazmatické membrány, nýbrž je také zapojen v kontrole dynamiky proteinových agregátů vznikajících ve stresovaných buňkách kvasinek. Vzhledem k tomu, že Sla2p patří mezi evolučně velmi konzervované proteiny (lidský ortholog je známý pod jménem HIP1 – huntigtin interacting protein), lze očekávat, že funkční analýza Sla2p v kvasinkách významně přispěje k objasnění i funkcí jeho orthologů u vyšších eukaryot.

Kvasinka *S. cerevisiae* patří mezi nejlépe prostudovaná eukaryota. Je velmi užívaným modelovým systémem a byl prvním eukaryotickým mikroorganizmem, u kterého byla zjištěna úplná sekvence nukleotidů v genomové DNA a v němž mechanismy řady životních dějů jsou analogické s mechanismy procesů probíhajících v savčí buňce. Celkový počet genů kódujících proteiny však zatím není jasný. Podle posledních odhadů se v sekvenci nachází asi 6000 otevřených čtecích rámců, avšak u více než třetiny jejich genových produktů je funkce zatím neznámá. Kvasinka *S. cerevisiae* je heterotrofním mikroorganizmem o velikosti 3–15 µm, který se asexuálně rozmnožuje pučením. Haploidní jádro kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje 16 chromozómů různé velikosti (nejmenší je chromozóm I o velikosti 230 kb a největší chromozóm IV o velikosti 1532 kb). Existuje především v jednobuněčné formě, avšak za určitých podmínek může tvořit mycelia, která lze považovat za jeho vícebuněčnou formu. Tím, že kvasinky také existují v haploidním stavu, je umožněna snadná příprava mutantních kmenů pomocí sexuálního křížení. Nenáročná manipulace, rychlá kultivace a snadné získání genomově homologních kmenů umožňuje buňky *S. cerevisiae* s úspěchem využívat nejen v mnoha průmyslových odvětvích, ale také v oblastech biochemie, genetiky a fyziologie jako modelový systém ke studiu biologických procesů na molekulové úrovni.

Endocytózou nazýváme esenciální buněčný proces zodpovědný za koordinaci molekulárního transportu vysokomolekulárních sloučenin, který probíhá ve všech eukaryotických buňkách. Kromě transportu proteinů ukotvených v cytoplazmatické membráně a jejich obměně má endocytóza také vliv na přenos signálů do buňky a adsorpci živin či patogenů na buněčný povrch. V kvasince *S. cerevisiae* nejsou proteiny

cytoplazmatické membrány rozmístěny rovnoměrně, ale nacházejí se ve zřetelně vymezených oblastech. V poslední době se zjistilo, že některé komponenty endocytického aparátu mají též další funkce, které přímo nesouvisí s obnovou membránových proteinů. Proces endocytózy se u kvasinek v principu podobá endocytóze savčích buněk, nicméně endocytóza u savců je odlišná zejména v pohybu endocytického váčku podél mikrotubulů, zatímco u kvasinek se váček pohybuje podél svazků aktinových vláken.

### 3. Aktinový cytoskelet kvasinky *S. cerevisiae*

U kvasinky *S.cerevisiae* mají při endocytóze významnou roli aktinová vlákna/mikrofilamenta, která se účastní zejména počátečních fázích vytváření váčku. Aktinový cytoskelet u kvasinek *S. cerevisiae* je složen ze čtyř biochemicky a morfologicky různých struktur: kortikálních aktinových patches, svazků aktinových vláken, cytokinetického prstence aktinových vláken a čepičky aktinových vláken ve vrcholu pupene (Moseley et al., 2006). Všechny tyto struktury mají své specifické funkce a podílejí se na polarizovaném růstu kvasinek.

Hlavní podjednotkou aktinových vláken je vysoce konzervativní protein G - aktin, který polymerizuje v dlouhá mikrofilamenta, tzv. F - aktin. Aktinová vlákna jsou dynamické struktury, které mají plus a minus konec. Rostou rychleji na plus konci, kde dochází k rychlejšímu přidávání aktinových monomerů. Na dynamice kvasinkového aktinu a jeho polymerizaci, např. při endocytóze, se podílí více než jeden multiproteinový komplex obsahující proteiny Sla1, Sla2, Abp1, End3 a Pan1. Tyto aktin - vázající proteiny dodávají aktinovým vláknům dostatečnou pevnost a stálost. Zejména typ aktin-vázajícího proteinu určuje, jaký typ aktinového útvaru se vytvoří (Moseley et al., 2006).

Úloha aktinových patches spočívá v zakoncentrování aktinových vláken ve vznikajícím pupenu. Aktinové patches se účastní dynamiky aktinu a jsou zodpovědné za endocytózu a pozměňování tvaru buněčné stěny (Nefsky et al., 1992). Aktinová vlákna ve formě patches jsou zřejmě důležitou strukturou aktinového cytoskeletu také u jiných eukaryotických organizmů, neboť se jedná o velmi dynamickou strukturu, která se pohybuje, skládá a rozpadá v průběhu několika minut (Young et al., 2004). Čepička je místem ukotvení svazků aktinových vláken, díky níž jsou z mateřské buňky transportovány membránové složky a organely do rostoucího pupene. Další její funkcí je polarizovaná akumulace regulačních a cytoskeletárních proteinů ve vrcholu pupene (Pruyne et al., 2000).

## 4. Endocytóza u kvasinek

Endocytóza je složitý buněčný proces zahrnující zejména invaginaci cytoplazmatické membrány, dále pak tvorbu, odškrcování a transport vytvořených váčků/endozómů. Určitá látka, která je takto transportována do buňky pomocí membránových váčků, je postupně uzavřena do malé části cytoplazmatické membrány, která nejprve vypučí dovnitř a potom se odškrtní a vytvoří malý endocytický váček. Ten na své cestě z povrchu buňky fúzuje s již vytvořenými endozómy, které pak vstupují do lysozomu či vakuoly, kde odevzdají svůj náklad. Pro vytvoření endocytického váčku je zejména důležité protein - lipidové složení cytoplazmatické membrány (Kaksonen et al., 2005).

Oblast na cytoplazmatické membráně, ve které se shromažďují proteiny endocytického komplexu, považujeme za endocytická místa. Bylo prokázáno, že u kvasinky *S. cerevisiae* jsou místem endocytózy kortikální aktinové patches (Engqvist-Goldstein a Drubin, 2003). Tato aktivní místa jsou složena z více než 30 proteinů. V těchto specifických místech dochází k tzv. klatrinem - řízené endocytóze, což je nejznámější typ endocytózy u kvasinek. Na povrchu cytoplazmatické membrány kvasinky *S. cerevisiae* se například vyskytuje receptor-protein Ste2, který váže náklad - feromon ( $\alpha$ -faktor) (Toshima et al., 2006). Komplex receptor - náklad se poté sestavuje na endocytických místech a funguje jako signál pro internalizaci (Engqvist-Goldstein a Drubin, 2003).

### 4.1. Vytvoření endocytického váčku

Aby došlo k vytvoření endocytického váčku, nejdříve se v endocytickém místě (patches) objeví protein klatrin (Newpher et al., 2005) a dále pak proteiny endocytického pláště (viz Obr.1, krok 1). Klatrin je složen z těžkého a lehkého řetězce, které vytvářejí síť v okolí endocytického místa (Toshima et al., 2006). Proteiny pláště endocytického váčku Las17, Sla1, Sla2 a Pan1 jsou dopravovány k aktinovým patches tak, aby napomáhaly deformovat cytoplazmatickou membránu procesem zvaným invaginace. Vytváří se plášť váčku (viz Obr.1, krok 1).

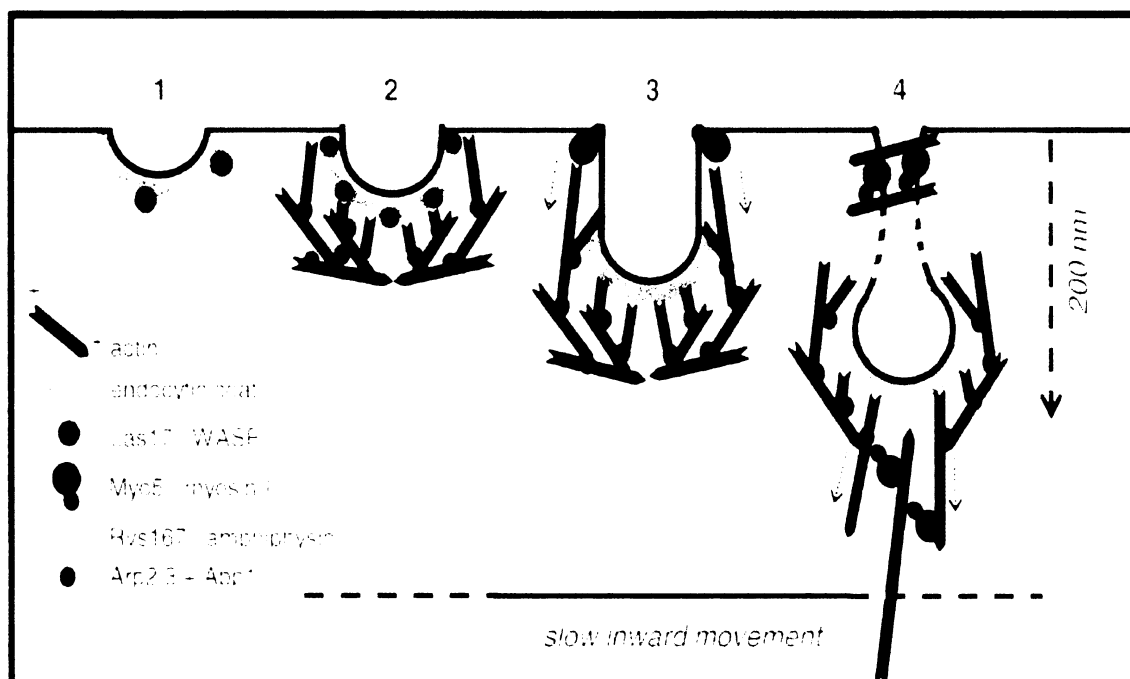


V dalším kroku dochází v okolí invaginace k tvorbě aktinové sítě (viz Obr.1, krok 2). Aktinová polymerizace začíná v aktinových patches v přítomnosti Arp2/3 komplexu, čepičkujících/capping proteinů (Cap1/Cap2), proteinu Abp1 a fimbrinu/Sac6 (Gheorghe et al., 2008; Kim et al., 2006). Arp2/3 komplex umožňuje přidávání aktinových monomerů k aktinovému vláknu pod určitým úhlem (Galletta et al., 2008). Tvorba větvené sítě aktinových mikrofilament je tak závislá na funkci Arp 2/3 komplexu. Proteiny Las17, Myo3, Myo5, Pan1 a Abp1 se vážou na Arp2/3 komplex a tím ho aktivují (Weaver et al., 2003).

Tvořící se aktinová mikrofilamenta následně pohánějí membránovou invaginaci a tlačí formující váčky obsahující Sla1p, Sla2p a Pan1p pryč z cytoplazmatické membrány (Merrifield et al., 2002). To ukazuje, že aktinová polymerizace je nezbytná k řízení prodlužování vychlípeniny cytoplazmatické membrány na počátku membránové invaginace. Polymerizace aktinu je poháněna mechanickou silou aktinového motoru Myo5 (myozin typu I), který se nachází v endocytických místech (Sun et al., 2006) (viz Obr 1, krok 3). Za předpokladu polarity aktinových mikrofilament a lokalizace Myo5 by aktinový motor Myo5 mohl přispívat k přemístění aktinových mikrofilament směrem od cytoplazmatické membrány a tím tlačít vychlípeninu endocytického pláště do cytoplazmy (review Girao et al., 2008). Bylo zjištěno, že aktinová mikrofilamenta jsou nukleována na povrchu tvořících se váček během invaginace a po jejím ukončení (Galletta et al., 2008).

Následně po polymerizaci aktinu jsou aktinová mikrofilamenta k sobě svázána pomocí proteinu Sac6, který je kvasinkovým fimbrinem. Bez přítomnosti proteinu Sac6, aktin polymerizuje na místech endocytózy, ale nedochází v těchto místech k internalizaci vytvořené vychlípeniny (Kaksonen et al., 2005). Na konci procesu tvorby váčku se k aktinu vážou čepičkující/capping proteiny, které stabilizují aktinové vlákno. V dalším kroku musí být aktinová mikrofilamenta depolymerizována tak, aby mohlo dojít k odštěpení váčku. Jedním z proteinů, které depolymerizují aktinová mikrofilamenta je kofilin (Okreglak et al., 2007).

Po vytvoření dostatečně velkého endocytického váčku dochází k jeho odštěpení od cytoplazmatické membrány (viz Obr. 1, krok 4). Štěpení se účastní dva kvasinkové proteiny a to amphiphysiny Rvs161p a Rvs167p. Tyto proteiny obsahují BAR (Bin – Amphiphysin - Rvs) domény, které vážou a stáčí membrány (Peter et al., 2004). Amphiphysiny se hromadí v krčku endocytického váčku a ke štěpení dochází, jakmile dojde k prodloužení tubulárního profilu. Amphiphysiny se vážou k velkému počtu proteinů endocytického komplexu jako jsou například Las17p, Sla1p a Sla2p, a také k aktinu samotnému (Lombardi et al., 2001).



Obr. 1: Čtyři hlavní kroky vytvoření endocytického váčku.

- 1) vytvoření komplexu endocytického pláště, 2) vytvoření aktinové sítě v okolí invaginace,
- 3) kontrola dynamiky aktinu, 4) odštěpení endocytického váčku.

Převzato ze Girao (2008).

Následně po odštěpení váčku dochází k jeho pohybu již bez endocytického pláště do cytosolu, kde zfúzuje s časným endozómem (Kaksonen et al., 2003; Toshima et al., 2006). Protein Sla2 již není součástí váčku. Z časného endozómu může být náklad recyklován zpět k cytoplazmatické membráně nebo může být dopraven dále do pozdního endozómu. Na konci endocytické dráhy dochází k degradaci/štěpení nákladu ve vakuole.

Současný model ukazuje, že se váčky pohybují kupředu podél svazků aktinových vláken (Toshima et al. 2006). Tento transport probíhá buď anterográdně (směrem k mateřské buňce), nebo retrográdně (směrem k pupenu). Myoziny typu V (Myo2 a Myo4), které se pohybují podél aktinových vláken jsou zodpovědné za přenos váčků směrem k pupenu (retrográdně) a zde je endocytický náklad recyklován (Pruyne et al., 2004). Molekulové motory typu myozinů hrají důležitou úlohu při rozmístování membránových

organel a váčků na požadována místa v buňce. Detaily interakce váčku s aktinem a asociovanými proteiny nejsou zatím plně známy. Na povrchu pozdních endozómů a vakuol probíhá nukleace aktinové polymerizace, která může přispívat k pohybu těchto organel (Chang et al., 2003).

Proteiny Las17, myozin typu I (Myo5) a amphiphysiny zůstávají na cytoplazmatické membráně (nejsou součástí endocytického váčku) v průběhu pohybu endocytického váčku do cytosolu (Sun et al., 2006, Kaksonen et al., 2003). Oproti tomu, aktin vázající proteiny, jako jsou například Abp1, fimbrin, kofilin a capping/čepičkující proteiny spolu s Arp2/3 komplexem, zůstávají asociovány s endocytickým váčkem i v průběhu jeho transportu do nitra buňky (Kaksonen et al., 2005, Okreglak et al., 2007). Protein pláště Sla2 je součástí váčku a zmizí, jakmile dojde k rozpadu pláště v cytoplazmě.

Inhibitorem endocytózy je droga latrunculin, která depolymerizuje aktin. Po jejím působení aktinové patches nejsou viditelné a endocytóza je kompletně zrušena (Ayscough et al., 1997, Morton et al., 2000).

#### **4.2. Proteiny endocytického pláště**

K selekci a k vytvoření místa endocytózy je využito proteinů, kterým říkáme proteiny endocytického pláště (viz Obr 2). Tento komplex obsahuje mnoho proteinů, jenž vykazují různou funkci. U kvasinky *S. cerevisiae* rozdělujeme tyto proteiny endocytického pláště do čtyř skupin.

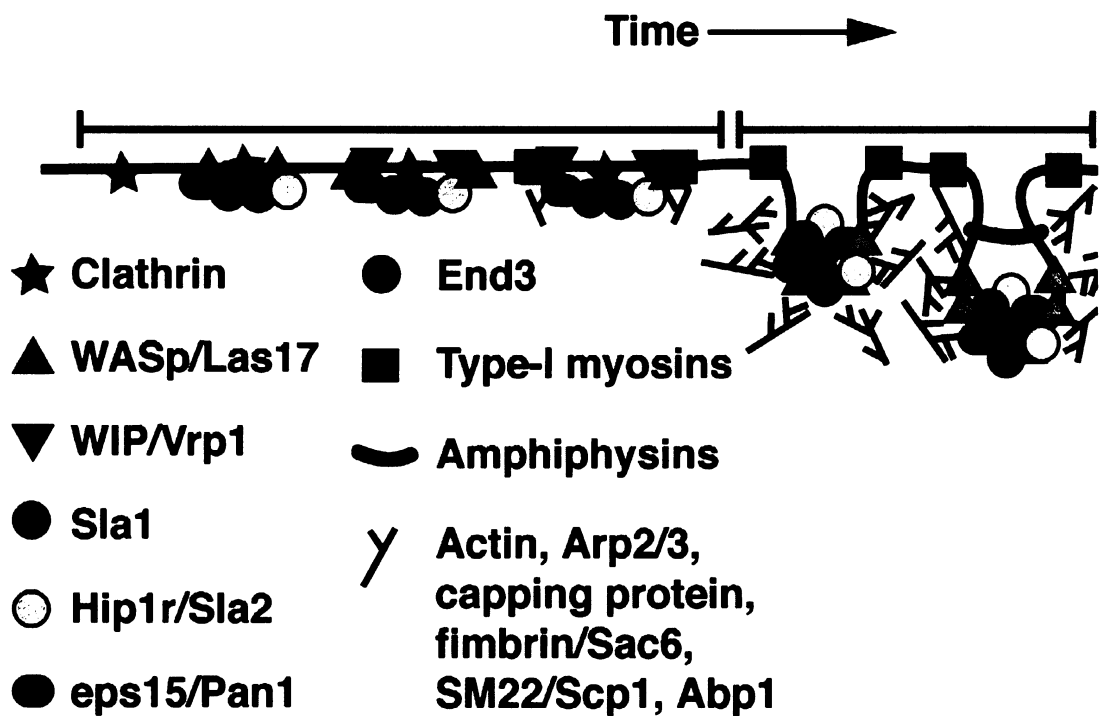
První skupina zahrnuje Sla1p, Pan1p, End3p a Sla2p. Protein Sla2 dorazí na místo endocytózy o něco dříve než Sla1p, což je důležité pro organizaci klatrinu (Newpher et al., 2006).

Druhou skupinou proteinů endocytického pláště jsou aktin - asociované proteiny Cap1/2 (capping proteiny), Sac6, Abp1 a Arp2/3 komplex. Tyto proteiny pomáhají vytvářet síť aktinových mikrofilament.

Třetí skupina zahrnuje WASP (Wiskott - Aldrich syndrome protein)/myo proteiny Las17, Myo5 a Bcp1. Tyto WASP proteiny aktivují Arp2/3 komplex, vedoucí k místní nukleaci aktinu (Sun et al., 2006). Místní nukleace aktinu a růst aktinových mikrofilament a jejich svazků vede k polarizovanému růstu kvasinek.

Čtvrtou skupinou jsou amphiphysiny Rvs161p a Rvs167p, které se vyskytují v endocytických místech po aktinové polymerizaci. Tyto proteiny pomáhají řídit invaginaci membrány nebo štěpení váčku.

Molekuly klatrinu najdeme ve všech endocytických místech již při prvních fázích endocytózy. Klatrin u kvasinek není esenciálním proteinem endocytózy, ale je nezbytný pro správný příjem pozdních endocytických proteinů do aktinových patches (Kaksonen et al., 2005). Potom se na endocytických místech (patches) shromažďuje komplex tvořený těmito proteiny: Las17, Sla1, Pan1, End3 a Sla2. Umístění těchto proteinů do míst endocytózy není závislé na aktinu (Kaksonen et al., 2003). Dále proteiny Sla2 a Pan1 již vážou vytvořená aktinová mikofilamenta k plášti (Kaksonen et al., 2003). Proteiny WASP zůstanou na cytoplazmatické membráně v místech, kde aktin začíná polymerizovat. Jakmile se plášťové proteiny začínají pohybovat, tak aktin, Abp1 a komplex Arp2/3 dorazí na endocytická místa. Na rozdíl od Sla2p lokalizace, Abp1p lokalizace je závislá na aktinu. Jako poslední přicházejí amphiphysiny Rvs161p a Rvs167p (Lombardi et al., 2001). Avšak funkce těchto proteinů vyžaduje další analýzy.



Obr. 2: Účast proteinů endocytického pláště při tvorbě endocytického váčku v průběhu endocytózy. Komponenty endocytického pláště jsou shromážděny v pupenu během invaginace.

Upraveno podle Galletta (2009).

#### 4.2.1 Protein Sla2

Protein Sla2 (Synthetic Lethal s *ABP1*) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je nezbytný pro nukleaci aktinových mikrofilament při endocytóze a pro distribuci některých důležitých proteinů cytoplazmatické membrány (Wesp et al., 1997). Aktin - asociovaný protein Sla2 patří mezi evolučně konzervované proteiny (např. savčí homolog je známý jako huntingtin interakční protein HIP1). Homolog Sla2p byl také rozpoznán u hlístic kmene Nematoda, u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* a u myši (Kalchman et al., 1997; Yang et al. 1999).

Protein Sla2 byl nejdříve identifikován v testu na syntetickou letalitu proti deletované alele genu *ABP1* (kóduje protein Abp1 vázající aktin a ovlivňující regulaci cytoskeletu,

endocytózu). Sla2p je také známý pod synonymy End4p a Mop2p a je jedním z komponentů kortikálního aktinového cytoskeletu kvasinek (Holtzman et al., 1993).

Gen *SLA2* kóduje protein, jehož molekulová hmotnost je 109 kDa a je složený z 968 aminokyselin. Delece genu *SLA2* vede k neschopnosti kvasinkového kmene růst při teplotě 37°C, k morfologickým defektům a delokalizaci kortikálního aktinového cytoskeletu (Holtzman et al., 1993).

Další studium kortikálního aktinového cytoskeletu u kvasinek odhalilo schopnost Sla2p stimulovat polymeraci aktinu *in vitro* (Li et al., 1995). Kromě toho byla alela *SLA2* izolována jako teplotně senzitivní mutanta (*end4 - 1*) podílející se na iniciaci endocytózy (Raths et al., 1993). Podrobné analýzy ukázaly, že Sla2p se vyskytuje jako dimer *in vivo* (Yang et al., 1999). Centrální coiled - coil oblast proteinu zprostředkovává dimerizaci Sla2p (Yang et al., 1999).

Protein Sla2 se nachází jak na cytoplazmatické membráně, tak v cytoplazmě. Je periferálním membránovým proteinem obsahujícím řadu specifických domén, které ovlivňují jeho interakce. Sla2p se váže na polymerní formu aktinu (F - aktin) *in vitro* přes talin - podobnou doménu a částečně kolokalizuje s F - aktinem v kortikálních aktinových patches. Je zajímavé, že Sla2p lokalizuje do buněčného kortexu i v přítomnosti latrunculinu - A (inhibitor polymerizace aktinu), což naznačuje, že signál pro lokalizaci do kortexu není závislý na aktinu (Yang et al., 1999).

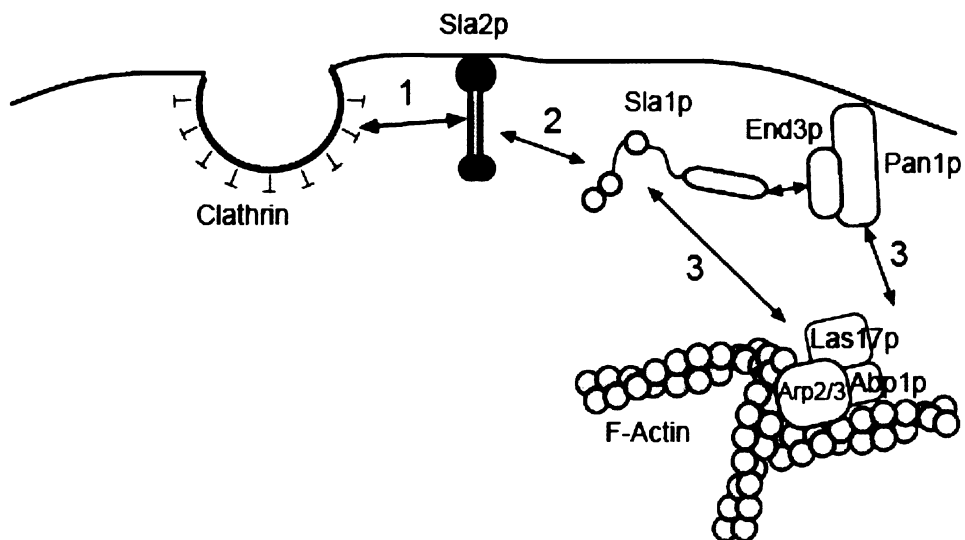
Funkce Sla2p byla ukázána v endocytóze, distribuci membránových proteinů a váčků. Také při proteinové degradaci a mRNA rozpadu (Kaksonen et al., 2003). Ve *sla2Δ* buňkách je inhibován pohyb aktinových patches do cytoplazmy a tím i proces endocytózy. Oproti normálním aktinovým patches proto vznikají tzv. aktin „comet tails“ asociované s buněčným kortexem (Kaksonen et al., 2003).

Bylo také zjištěno, že Sla2p fyzicky interaguje s proteinem eIF3a/Rpg1, esenciální podjednotkou translačního iniciačního faktoru eIF3. Bylo prokázáno, že aminokyselinové zbytky 318 - 373 v molekule Sla2p jsou nezbytné pro interakci s Rpg1 v systému dvojitého hybridu. N - koncová oblast Rpg1p je nezbytná a dostatečná pro interakci s proteinem Sla2 (Paleček et al., 2001). Funkce Sla2 - Rpg1 interakce není přímo vázána na úlohu Rpg1/eIF3a v iniciaci translace. Narušení Sla2 - Rpg1 interakce totiž nemá podstatný vliv na vegetativní růst či endocytózu a polarizaci aktinu (Holtzman et al., 1993).

HIP1 je lidský ortholog proteinu Sla2, který také s ním kolokalizuje a váže se na klatrin, F - aktin a adaptorový protein2 (AP2) (Engqvist - Goldstein et al., 2001). HIP1 byl identifikován přes jeho interakci s huntingtinem (Kalchman et al., 1997), proteinem obsahujícím polyglutaminové úseky. Mutace tohoto proteinu vede k Huntingtonovi nemoci (Kalchman et al., 1997). Rodina proteinů Sla2/Hip1 může mít konzervovanou roli v propojení aktinu s mikrotubuly (Castagnetti et al., 2005). Ukázalo se, že C - koncová doména Hip1R se váže k SH3 doméně kortaktinu. Kortaktin je savčí protein vazebný k dynaminu, aktinovým mikrofilamentům. Kortaktin je umístěn v klatrinem obalených jamkách (Cao et al., 2003). Hip1R tvořící komplex s koraktinem inhibuje tvorbu aktinu, a tím blokuje větvení a elongaci aktinových mikrofilament. Pokud dojde ke spotřebě Hip1R, tak nastane zvýšená tvorba aktinu v endocytických místech. Tudiž Hip1R negativně reguluje sestavování aktinového cytoskeletu během endocytózy (Le Clainche et al., 2007).

#### 4.2.2 Sla2 - interakční protein Sla1

Bylo prokázáno, že Sla1p se váže ke Sla2p v průběhu vytváření endocytického pláště. Tato interakce je zprostředkována aminokyselinami 118 - 361 v proteinu Sla1 a aminokyselinami 310 - 768 v coiled - coil oblasti proteinu Sla2 (Gourlay et al., 2003). Na obrázku č. 3 je uveden model znázorňující mechanismus vzniku interakce Sla1p se Sla2p v buněčném kortexu (Gourlay et al., 2003). V prvním kroku, dimér Sla2p asociuje s klatrinem v místech endocytózy. V dalším kroku, protein Sla2 interaguje s dalšími proteiny Sla1, End3 a Pan1. Na Sla1p se vážou proteiny Abp1 a Las17, aktin vázající proteiny, které aktivují Arp2/3 komplex (Duncan et al., 2001). Zmíněné interakce se podílí na reorganizaci aktinu a postupně pohánějí endocytózu (Warren et al., 2002). V buňkách postrádajících buď Sla1p či Sla2p není kortikální aktin schopen polarizace a většina aktinu je lokalizována do distálních míst buňky. Kromě toho, absence proteinů Sla1 a Sla2 proto způsobuje kompletní blokaci endocytózy (Gourlay et al., 2003).



Obr. 3: Model znázorňující interakci Sla2p se Sla1p v buněčném kortexu.

Převzato ze Gourlay (2003).

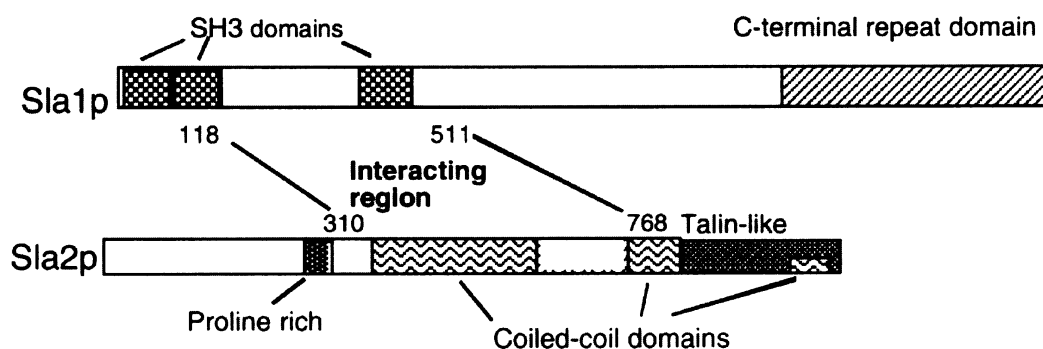
#### 4.2.3 Struktura proteinu Sla1 a Sla2

Sla1 je adaptorovým proteinem, který je důležitý pro tvorbu kortikálního aktinového cytoskeletu. Kortikální aktinový cytoskelet se nachází pod cytoplazmatickou membránou a je zodpovědný za pohyblivost a adhezivitu buňky a přenos extracelulárních signálů do cytoplazmy (Luna et al., 1992). Protein Sla1 můžeme nalézt nejen v buněčném kortexu, ale i v buněčném jádře (Gardiner et al., 2007). Lokalizace Sla1p v buněčném kortexu je závislá na EH - doméně proteinu End3 (Warren et al., 2002). Podobně jako Sla2p, Sla1p propojuje proteiny endocytického komplexu s aktinovým cytoskeletem (Gardiner et al., 2007). Sla1p destabilizuje a depolymerizuje F - aktin a v důsledku toho, Sla2p může vytvářet nové struktury F - aktinu. Sla1p má tři SH3 (Src homogy - 3) domény, které jsou bohaté na repetice aminokyselin prolinu, glutaminu, glycinu a threoninu (viz Obr. 4). Tyto repetice obsahují motivy pro fosforylaci aktin - regulační kinázy Prk1p (Zeng et al., 2001). SH3 domény jsou přímo zodpovědné za tvorbu aktinových patches (Warren et al., 2002; Gourlay et al., 2003).

Protein Sla2 dorazí do místa endocytózy (patches) o něco dříve než protein Sla1 (Newphen et al., 2006). Sla2p je protein asociovaný s cytoplazmatickou membránou.



Jeho C - i N- koncová doména obsahuje signál lokalizující Sla2p do buněčného kortexu, přičemž N - koncový úsek se do aktinových patches váže nezávisle na F - aktinu (Yang et al., 1999). Sla2p obsahuje domény bohaté na coiled - coil oblasti a prolin bohatou oblast (viz Obr. 4). Sla2p obsahuje ANTH (AP180 N - terminal homology) doménu na jeho N - konci, která protein lokalizuje do oblasti klatrinových jamek (Baggett et al., 2003). N - koncová doména Sla2p (aminokyseliny 114 – 284) je nezbytná k iniciaci endocytózy, organizaci cytoskeletu a k buněčnému růstu při vysokých teplotách (Wesp et al., 1997). C - koncová doména Sla2p (tvořená 768. – 968. aminokyselinou) je homologní s C - koncovou doménou talinu (Holtzman et al., 1993), proteinu regulujícího dynamiku aktinu a propojujícího aktinový cytoskelet s cytoplazmatickou membránou při fokální adhezi savčích buněk (Rees et al., 1990). Bylo prokázáno, že C - koncová, talinu - podobná doména Sla2p je schopná vázat aktin (Mc Cann a Craig, 1997). Oblast Sla2p, která se nachází vedle oblasti homologní s talinem, může vlastnost Sla2p vázat aktin maskovat. Proto se Sla2p váže k aktinu prostřednictvím jeho talinu - podobné domény, když je modifikován (např. fosforylací) nebo je - li asociován s jinými proteiny, které umožňují odhalení tohoto místa (Yang et al., 1999). Střední část proteinu je tvořena tzv. coiled – coil doménou (360. – 580. aminokyselina), která je schopná zprostředkovávat interakci mezi proteiny (Wesp et al., 1997).



Obr. 4: Struktura Sla1p a Sla2p.

Převzato ze Gourlay (2003).

## 5. Kontrola dynamiky endocytického pláště

Fosfatidylinositol (4,5) - bisfosfát [PI(4,5)P<sub>2</sub>] spolu s protein kinázami Ark1/Prk1 a proteinem Pan1 ovlivňují dynamiku endocytického komplexu (Sun et al., 2007). Ark1p, Prk1p a Sjl2p negativně regulují endocytózu a jejich umístění do aktinových patches je závislé na Abp1p/F - aktinu (Cope et al., 1999, Stefan et al., 2005).

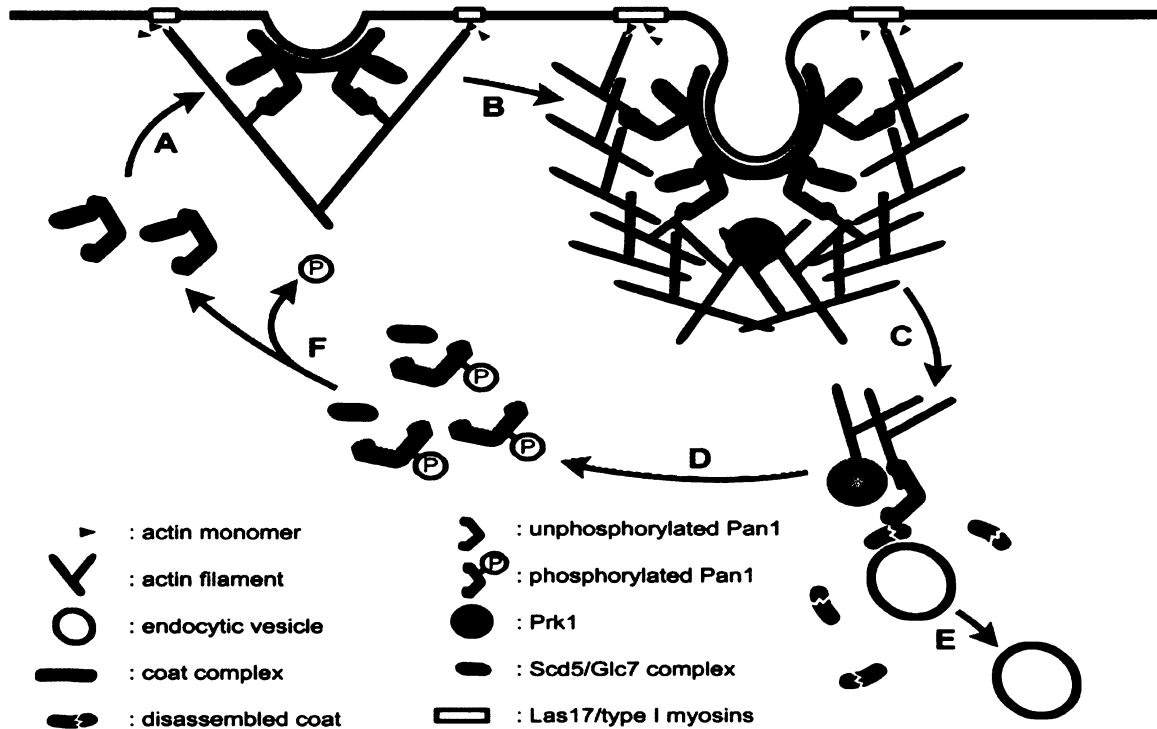
### 5.1 Protein Pan1

U kvasinky *S. cerevesiae* má významnou roli při endocytóze protein Pan1. Pan1p působí jako centrální lešení pro tvorbu plášťového komplexu v místech endocytózy (patches). Aktivuje Arp2/3 komplex přes jeho WH2 a kyselou doménu a tím zprostředkovává aktinovou nukleaci (Toshima et al., 2005). Podobně jako Sla2p, je schopen vázat F - aktin a tudíž je zodpovědný za připojení endocytického váčku k aktinové síti již v časných fázích endocytózy (Huang et al., 2007). Pan1p interaguje s mnoha proteiny díky svým různým doménám a motivům. Mezi jeho interagující proteiny patří Sla2, Ent1 a Ent2 (Kaminska et al. 2002). Adaptorové proteiny Ent1/2 pravděpodobně pomáhají navádět klatrin do endocytických míst (Owen et al., 2004). Není však známo, že by se Pan1p vázal na klatrin. Za to je zodpovědný protein Sla2. Dále bylo zjištěno, že Pan1p také interaguje s proteiny End3 a Sla1, jenž společně vytvářejí funkční trimer (Tang et al., 2000). Bylo prokázáno, že Sla2p inhibuje vlastnost proteinu Pan1 aktivovat Arp2/3 komplex. Je to z důvodu toho, že coiled - coil oblast Sla2p vyvazuje F - aktin vazebnou oblast proteinu Pan1 (Toshima et al., 2007).

Fosforylace proteinů je jedním z důležitých regulačních mechanismů podílejících se na dynamice endocytického pláště a distribuci proteinů do míst endocytózy. Proteiny endocytického pláště Sla1, Sla2 a Ent1/2 jsou fosforylovány serin/threoninovou kinázou Prk1p, když tvorba endocytického váčku je ukončena (Zeng et al., 2001). Tato kináza také fosforyluje protein Pan1, který poté není schopen aktivovat Arp2/3 komplex (Toshima et al., 2007), což má za následek rozpad pláště v cytoplazmě a oddělení neopláštěného váčku od aktinové sítě (viz obr. 5). Umístění protein kinázy Prk1 do aktinových patches zprostředkovává protein Abp1 (Cope et al., 1999).

Dále dochází k disociaci Pan1p - End3p - Sla1p trimerního komplexu (Zeng et al., 2001). Následně se Scd5p/Glc7p fosfatázový komplex váže na fosforylovaný Pan1p a

reaktivuje/defosforyluje ho (Zeng et al., 2007). Pokud by nenastala defosforylace, tak fosforylovaný/ inaktivní Pan1p by se hromadil v cytoplasmě a nemohl by se znovu zapojit do procesu endocytózy (Huang et al., 2007).



Obr. 5: Fosforylace proteinu Pan1 pomocí Prk1p kinázy.

A) Cytosolický protein Pan1 je dopraven na cytoplazmatickou membránu, kde sestavuje plášťový komplex; B) rostoucí aktinová síť je připojena k pučícímu endocytickému váčku přes Pan1p; C) Prk1p kináza se nachází v aktinové síti a fosforyluje Pan1p a další komponenty endocytického pláště; D) po fosforylaci se Pan1p oddělí od endocytického váčku a endocytický plášť se rozpadá; E) neopláštěný endocytický váček; F) Scd5p/Glc7p fosfatáza defosforyluje/reaktivuje Pan1p.

Převzato ze Huang (2007).

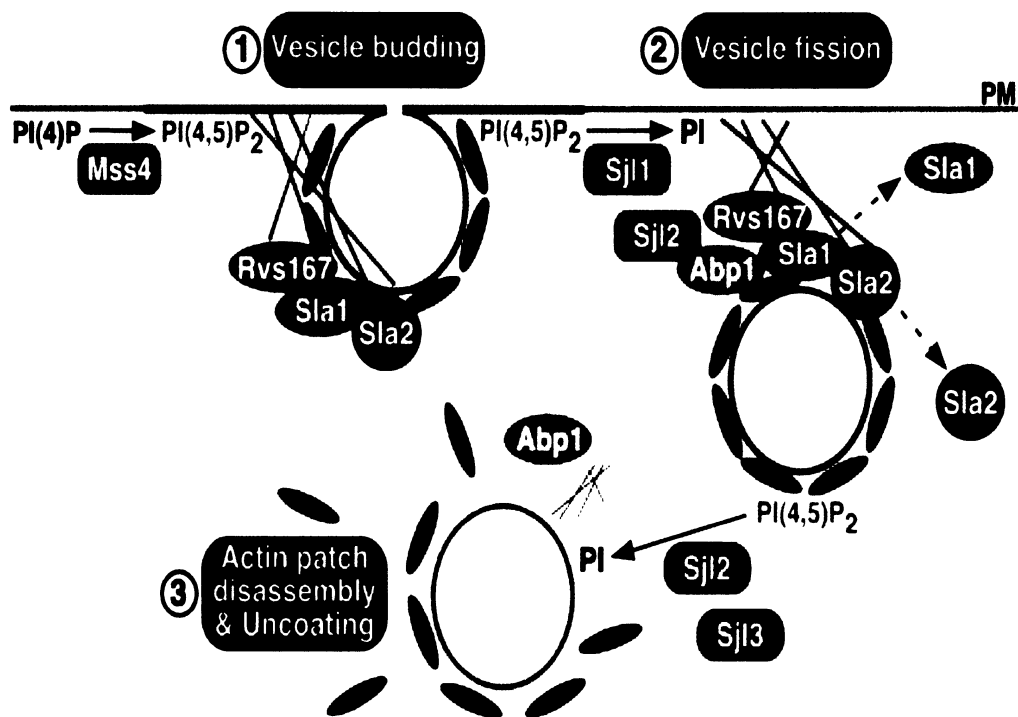
## 5.2 Synaptojaniny

Dynamiku endocytického pláště kvasinek také ovlivňují synaptojaniny - podobné proteiny Sjl1, Sjl2 a Sjl3. Jsou to fosfoinositidy 5' - fosfatázy, které mají za úkol regulovat metabolismus fosfoinositidů při aktinové organizaci a transportu endocytického váčku (viz Obr. 6). Fosfoinositidy (PI) jsou fosforylované deriváty fosfatidylinositolu, které řídí buněčné procesy zahrnující signalizaci, růst, transport proteinů a uspořádání aktinového cytoskeletu (Czech et al., 2003). Mezi fosfoinositidy patří fosfatidylinositol (4,5) - bisfosfát [PI(4,5)P<sub>2</sub>], který se nachází na buněčném povrchu a hraje důležitou roli při tvorbě a štěpení klatrinem obalených váčků. Zjistilo se, že [PI(4,5)P<sub>2</sub>] stimuluje aktinovou polymerizaci tím, že váže WASP/Las17p, Sla2p a Ent1p (Yin et al., 2003).

Sjl2p je lokalizován do kortikálních aktinových patches nebo do endozómů. Sjl2p je zapojen v časných fázích endocytózy, při štěpení váčku od cytoplazmatické membrány a při depolymerizaci pláště. Sjl2p a Sjl3p se vážou na klatrin (Ha et al., 2003). Sjl2p je odváděn do aktinových patches pomocí aktinových vláken a proteinu Abp1. Abp1p obsahuje SH3 doménu a ta fyzicky interaguje s doménou Sjl2, která je bohatá na aminokyselinu prolin.

Předpokládá se, že PI metabolismus kontrolovaný synaptojaniny - podobnými proteiny také řídí dynamiku aktinu a membránovou invaginaci. Ta je částečně regulována též proteinem Sla2. Ukázalo se, že ANTH doména proteinu Sla2 váže [PI(4,5)P<sub>2</sub>] *in vitro* (Sun et al., 2005). Lokalizace Sla2p do míst endocytózy závisí na jeho interakci s [PI(4,5)P<sub>2</sub>] (Sun et al., 2005). Kromě toho umístění proteinu Sla2 do aktinových patches je závislá na synaptojaninu Sjl1 a Sjl2 (Stefan et al., 2005). Předpokládá se, že Sla2p se stává limitujícím faktorem během endocytické internalizace v buňkách, které mají sníženou aktivitu PI fosfatázy.

Porucha metabolismu [PI(4,5)P<sub>2</sub>] v *sjl1Δ sjl2Δ* mutantech má za následek defekty v dynamice plášťových proteinů Sla1 a Sla2, a proto nemůže dojít k rozpadu endocytického pláště (Stefan et al., 2005). Důsledkem mislokalizace Sla2p v buňkách, jimž chybí Sjl proteiny, je zvýšená polymerizace aktinu a defekt v tvorbě klatrinového pláště (Stefan et al., 2005). Podobně buňkám, kterým chybí Sjl1p a Sjl2p, vykazují defekty v organizaci aktinového cytoskeletu a endocytické internalizaci (Singer - Kruger et al., 1998). Současné studie ukazují, že ANTH doména proteinu Sla2 může částečně potlačovat poruchy endocytózy v *sjl1Δ sjl2Δ sjl3Δ* mutantech (Stefan et al., 2005). Ale detaily zatím nejsou známy.



Obr. 6: Sjl2p během endocytické internalizace.

[PI(4,5)P<sub>2</sub>] je syntetizována PI(4)P 5 - kinázou a Mss4 je efektorový protein indukující polymerizaci aktinu. Poté se přidají proteiny Rvs167, Sla1 a Sla2, které interagují se Sjl2p. Sjl1p reguluje dynamiku [PI(4,5)P<sub>2</sub>] v cytoplazmatické membráně. Abp1p dorazí na endocytická místa a následně také Sjl2p, jakmile je aktin sestaven (Kaksonen et al., 2003) a internalizace plášťových proteinů je zahájena. Protein Sjl2 je zapojen v koordinaci aktinové polymerizace a štěpení váčku. Po určité době dochází k disociaci Abp1p, Sla1p a Sla2p od aktinových patches, Sjl2p a Sjl3p defosforylují [PI(4,5)P<sub>2</sub>] na nově vznikajícím váčku, a to má za následek rozpad pláště. Synaptojaniny také recyklují [PI(4,5)P<sub>2</sub>] vazebné faktory (komponenty aktinových patches) od endozómu.

Převzato ze Stefan (2005).

## 6. Proteinové agregáty

Pokud jsou polypeptidy přerušeny či chybně sbaleny jsou následně degradovány pomocí proteazomu, jenž se nachází v cytoplazmě a v jádře. Mechanizmy znovu sbalení a degradace chrání buňky před hromaděním mutantních a poškozených polypeptidů v buňce. Proces agregace nastane, v tom okamžiku, kdy kapacita proteazomální degradační dráhy (rozkládat špatně sbalené/misfoldované proteiny) je překročena, a to buď nadprodukcí daného proteinu či snížením účinnosti proteazomu (Johnston et al., 1998). Proteinová agregace je regulovaný proces, který je závislý na buněčných komponentách a ovlivňuje funkci a stabilitu mnoha poškozených proteinů v buňce.

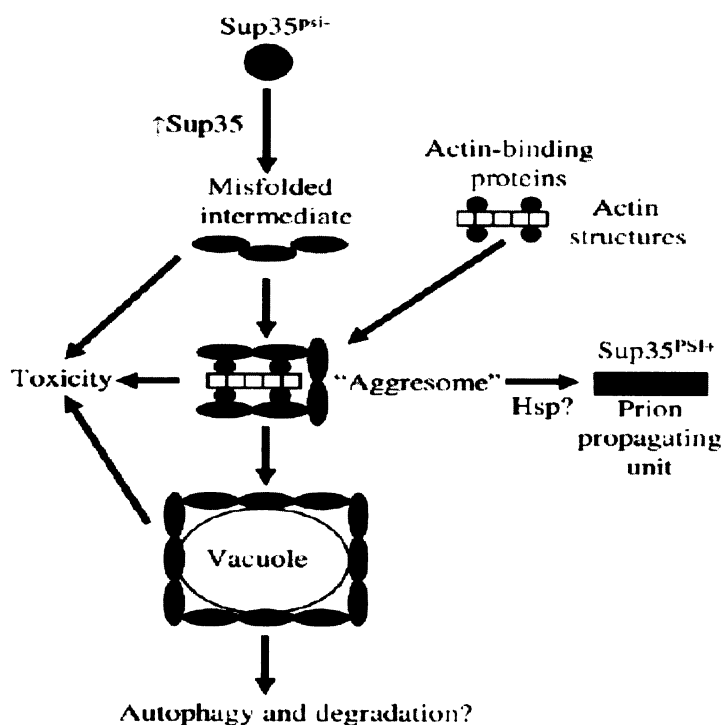
Proteinové agregáty jsou tvořeny špatně prostorově uspořádanými proteiny, které mohou způsobit v důsledku řady vážných onemocnění lidského těla. Například se jedná o Alzheimerovu, Parkinsonovu nebo Huntingtonovu chorobu. Znakem těchto nemocí je tvorba nerozpustných buněčných inkluzí, které vznikají z abnormálních polypeptidů (proteinových agregátů) (Gokhale et al., 2005). Špatné prostorové uspořádání (konformace) proteinů může být důsledkem stresem indukované denaturace, destabilizujících mutací nebo absencí partnerů pro sestavení komplexů. Proteinové agregáty nemají membránu a vyskytují se v cytoplazmě a v buněčném jádře. V kvasinkách *S. cerevisiae* se agregáty cytosolických proteinů začínají tvořit na aktinových patches a dále putují spolu s dalšími komponenty endocytózy do nitra buňky. Jakmile jsou v cytosolu, proteinové agregáty se shlukují v okolí vakuoly (viz Obr. 7) (Ganusova et al., 2006). Malé proteinové agregáty jsou toxické, zatímco velké inkluze jsou cytoprotektivní (ochraňující buňku) (Arrasate et al., 2004).

Proteinové agregáty obsahují domény bohaté na aminokyseliny glutamin (Q) a asparagin (N). Jejich příkladem jsou agregované polyglutaminové (polyQ) proteiny a priony. Q/N bohaté domény proteinových agregátů zprostředkovávají proteinovou agregaci. Polyglutaminové domény způsobují, že proteiny jsou hůře rozpustné a vznikající proteinové agregáty jsou pak příčinou např. Huntingtonovy nemoci (Meriin et al., 2003).

### 6.1 Agrezóm a priony

Agrezóm u kvasinek je tvořen prionovými proteiny a velkým počtem agregátů asociovaných s cytoskeletem (viz Obr. 7). Agrezómy se nacházejí kolem vakuoly nebo volně

v cytosolu (Johnston et al., 1998). Bylo také zjištěno, že agrezomy mají cytoprotektivní funkci, jenž slouží jako cytoplazmatický prostředek pro usnadnění odbourávání toxických proteinů (Taylor et al., 2003), tzn. že agrezomy chrání buňky před škodlivými účinky misfoldovaných proteinů.



Obr. 7: Role aktinového cytoskeletu v tvorbě prionu.

Převzato ze Ganusova (2006).

Mezi proteinovými agregáty jsou nejznámější priony, které představují infekční proteinové částice způsobující různá neurodegenerativní onemocnění, které vznikají nevhodným prostorovým uspořádáním proteinu. V molekule, kde původně dominovala struktura tzv. alfa šroubovice se najednou objeví v převaze struktura tzv. beta skládaného listu (Osherovich et al., 2004).

U kvasinky *S. cerevisiae* priony vznikají agregací domén, které jsou bohaté na QN aminokyseliny (Osherovich et al., 2004). Priony kvasinek jsou tvořeny řadou proteinů, jako např. Rnq1, Sup35, Ure2 a New1. Protein Sup35 je translační terminační faktor eRF3, který pomáhá při translaci RNA do proteinů. N-koncové domény Sup35p jsou bohaté na

glutaminové (Q) a asparaginové (N) zbytky. Sup35p pozměňuje proteinovou konformaci a vytváří [PSI<sup>+</sup>] prionové formy. Bylo také zjištěno, že Sup35p je v normálních buňkách rozpustný, zatímco v [PSI<sup>+</sup>] buňkách rozpustný není. V normálních buňkách je rovnoměrně rozptýlený, zatímco v [PSI<sup>+</sup>] tvoří shluky. Předpokládá se, že shluky proteinů se cytoplazmou přenesou do dceřinné buňky, a tam působí jako zárodek pro další shlukování proteinů (Ganusova et al., 2006).

Bylo prokázáno, že agregáty proteinů poškozených teplem jsou rozpouštěny a proteiny jsou sbaleny komplexem chaperonů: Hsp104, Hsp70 a Hsp40 (Glover et al., 1998). Je-li inhibována produkce chaperonového komplexu Hsp104/Hsp70/Hsp40, nastane tak rychlé zmnožení prionů v buňce. Chaperony jsou tedy nezbytnými komponenty proteinových agregátů a redukuje jejich počet (Bagriantsev et al., 2008).

## 6.2 Endocytický komplex a dynamika proteinových agregátů

Bylo zjištěno, že proteinová agregace je závislá na endocytóze. Endocytické komponenty v pozdní fázi endocytózy jsou zapojeny v agregaci cytosolických proteinů. Poslední analýzy ukázaly, že proteiny Pan1, Sla1 a Sla2 se po rozpadu endocytického pláště objevují v asociaci s proteinovými agregáty v cytosolu. Vyčerpání nebo mutace těchto komponent endocytického pláště má u kvasinky *S. cerevisiae* vliv například na agregaci a prionizaci proteinu Sup35. V polyglutaminových proteinových agregátech se komponenty endocytického komplexu Sla1p, Sla2p a Pan1p jeví jako shluky. Oproti tomu, proteiny Ede1 a Ent1, které se účastní začátku endocytózy, nebyly v agregátech nalezeny. Destabilizace endocytického komplexu má za následek potlačení proteinové agregace, zatímco stabilizace endocytického komplexu v pozdní fázi endocytózy zesílí proces agregace (Meriin et al., 2007).

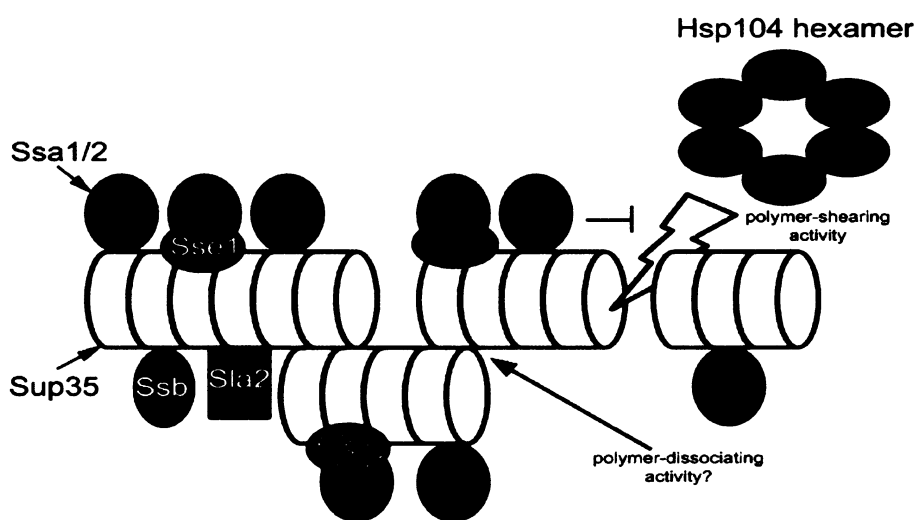
PolyQ agregáty mohou tvořit malé agregáty na endocytických místech, a tím fyzicky rušit proces endocytózy. PolyQ agregace vede k zastavení a postupnému rozpadu procesu endocytózy (Meriin et al., 2003).

[PSI<sup>+</sup>] proteinové agregáty, které jsou složené z infekčních Sup35 polymerů o různé velikosti, úzce asociují se sebou samými a i s jinými proteiny (viz Obr. 8). Na Sup35 polymery se vážou proteiny Ssa1/2, Ssb1/2, Sla1 a Sla2. Protein Sla1 zprostředkuje interakci endocytického pláště s proteinem Sup35 přes svou C - koncovou oblast repetice oligopeptidu



(Bailleul et al., 1999). Protein Sla2 obsahuje malou QN bohatou oblast, která interaguje s QN doménami prionu (Michelitsch et al., 2000). Vazba proteinu Ssa1/2 na Sup35 polymer může být regulována chaperony Sis1, Sse1 a Ydj1. Tyto chaperony se vážou na Sup35 polymer zcela nezávisle nebo prostřednictvím Ssa1/2. Chaperon Hsp104 také interaguje se Sup35 polymerem a vykazuje polymer - štěpící funkci (Bagriantsev et al., 2008).

Jeho polymer - disociační aktivita odděluje jednotlivé oligomery od sebe do menších infekčních jednotek (viz Obr. 8)



Obr. 8: Polymer Sup35 a jeho interakční proteiny.

Převzato ze Bagriantsev (2008).

## 7. Závěr

Bylo ukázáno, že protein endocytického pláště Sla2 umožňuje endocytózu přes interakce s jinými aktin - asociovanými proteiny. Sla2p se váže přímo na aktin přes svoji talin - podobnou doménu, která se nachází na jeho C - konci a obsahuje centrální ANTH doménu na jeho N - konci. ANTH doména lokalizuje protein do oblastí akumulovaného klatrinu (klatrinových jamek) na cytoplazmatické membráně. N - koncová doména Sla2p je proto důležitá k iniciaci endocytózy a organizaci aktinu. Sla2p je adaptorovým proteinem, který propojuje klatrinové váčky s aktinovým cytoskeletem. Absence proteinu Sla2 způsobuje za teploty 37°C inhibici endocytózy a ztrátu polaritu kvasinkové buňky. V buňkách, které obsahují kvasinkové priony je delece genu *SLA2* letální.

Agregace špatně sbalených cytosolických proteinů je závislá na komponentách endocytického komplexu. Toto se zvláště týká proteinu endocytického pláště Sla2, jehož přítomnost zřejmě ovlivňuje dynamiku cytosolických proteinových agregátů a kvasinkových prionů.

## 8. Seznam použité literatury

- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**, 805-10.
- Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. and Drubin, D. G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**, 399-416.
- Baggett, J. J., D'Aquino, K. E. and Wendland, B. (2003). The Sla2p talin domain plays a role in endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**, 1661-74.
- Bagriantsev, S. N., Gracheva, E. O., Richmond, J. E. and Liebman, S. W. (2008). Variant-specific [PSI<sup>+</sup>] infection is transmitted by Sup35 polymers within [PSI<sup>+</sup>] aggregates with heterogeneous protein composition. *Mol Biol Cell* **19**, 2433-43.
- Bailleul, P. A., Newnam, G. P., Steenbergen, J. N. and Chernoff, Y. O. (1999). Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein sla1 and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**, 81-94.
- Cao, H., Orth, J. D., Chen, J., Weller, S. G., Heuser, J. E. and McNiven, M. A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* **23**, 2162-70.
- Castagnetti, S., Behrens, R. and Nurse, P. (2005). End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **118**, 1843-50.
- Cope, M. J., Yang, S., Shang, C. and Drubin, D. G. (1999). Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast. *J Cell Biol* **144**, 1203-18.
- Czech, M. P. (2003). Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* **65**, 791-815.
- Duncan, M. C., Cope, M. J., Goode, B. L., Wendland, B. and Drubin, D. G. (2001). Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**, 687-90.
- Engqvist-Goldstein, A. E. and Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Engqvist-Goldstein, A. E., Warren, R. A., Kessels, M. M., Keen, J. H., Heuser, J. and Drubin, D. G. (2001). The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly *in vitro*. *J Cell Biol* **154**, 1209-23.
- Galletta, B. J. and Cooper, J. A. (2009). Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 20-7.

- Galletta, B. J., Chuang, D. Y. and Cooper, J. A. (2008). Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS Biol* **6**, e1.
- Ganusova, E. E., Ozolins, L. N., Bhagat, S., Newnam, G. P., Wegrzyn, R. D., Sherman, M. Y. and Chernoff, Y. O. (2006). Modulation of prion formation, aggregation, and toxicity by the actin cytoskeleton in yeast. *Mol Cell Biol* **26**, 617-29.
- Gardiner, F. C., Costa, R. and Ayscough, K. R. (2007). Nucleocytoplasmic trafficking is required for functioning of the adaptor protein Sla1p in endocytosis. *Traffic* **8**, 347-58.
- Gheorghe, D. M., Aghamohammadzadeh, S., Smaczynska-de, R., II, Allwood, E. G., Winder, S. J. and Ayscough, K. R. (2008). Interactions between the yeast SM22 homologue Scp1 and actin demonstrate the importance of actin bundling in endocytosis. *J Biol Chem* **283**, 15037-46.
- Girao, H., Geli, M. I. and Idrissi, F. Z. (2008). Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett* **582**, 2112-9.
- Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73-82.
- Gokhale, K. C., Newnam, G. P., Sherman, M. Y. and Chernoff, Y. O. (2005). Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. *J Biol Chem* **280**, 22809-18.
- Gourlay, C. W., Dewar, H., Warren, D. T., Costa, R., Satish, N. and Ayscough, K. R. (2003). An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast. *J Cell Sci* **116**, 2551-64.
- Ha, S. A., Torabinejad, J., DeWald, D. B., Wenk, M. R., Lucast, L., De Camilli, P., Newitt, R. A., Aebersold, R. and Nothwehr, S. F. (2003). The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **14**, 1319-33.
- Holtzman, D. A., Yang, S. and Drubin, D. G. (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**, 635-44.
- Huang, B. and Cai, M. (2007). Pan1p: an actin director of endocytosis in yeast. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1760-4.
- Chang, F. S., Stefan, C. J. and Blumer, K. J. (2003). A WASp homolog powers actin polymerization-dependent motility of endosomes in vivo. *Curr Biol* **13**, 455-63.
- Idrissi, F. Z., Grotsch, H., Fernandez-Golbano, I. M., Presciatto-Baschong, C., Riezman, H. and Geli, M. I. (2008). Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J Cell Biol* **180**, 1219-32.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.
- Kaksonen, M., Sun, Y. and Drubin, D. G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-87.

- Kaksonen, M., Toret, C. P. and Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-20.
- Kalchman, M. A., Koide, H. B., McCutcheon, K., Graham, R. K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F. C., Wellington, C., Metzler, M., Goldberg, Y. P., Kanazawa, I., Gietz, R. D. and Hayden, M. R. (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* **16**, 44-53.
- Kaminska, J., Gajewska, B., Hopper, A. K. and Zoladek, T. (2002). Rsp5p, a new link between the actin cytoskeleton and endocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**, 6946-8.
- Kim, K., Galletta, B. J., Schmidt, K. O., Chang, F. S., Blumer, K. J. and Cooper, J. A. (2006). Actin-based motility during endocytosis in budding yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 1354-63.
- Le Clainche, C., Pauly, B. S., Zhang, C. X., Engqvist-Goldstein, A. E., Cunningham, K. and Drubin, D. G. (2007). A Hip1R-cortactin complex negatively regulates actin assembly associated with endocytosis. *Embo J* **26**, 1199-210.
- Li, R., Zheng, Y. and Drubin, D. G. (1995). Regulation of cortical actin cytoskeleton assembly during polarized cell growth in budding yeast. *J Cell Biol* **128**, 599-615.
- Lombardi, R. and Riezman, H. (2001). Rvs161p and Rvs167p, the two yeast amphiphysin homologs, function together in vivo. *J Biol Chem* **276**, 6016-22.
- Luna, E. J. and Hitt, A. L. (1992). Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* **258**, 955-64.
- McCann, R. O. and Craig, S. W. (1997). The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5679-84.
- Meriin, A. B., Zhang, X., Alexandrov, I. M., Salnikova, A. B., Ter-Avanessian, M. D., Chernoff, Y. O. and Sherman, M. Y. (2007). Endocytosis machinery is involved in aggregation of proteins with expanded polyglutamine domains. *Faseb J* **21**, 1915-25.
- Meriin, A. B., Zhang, X., Miliaras, N. B., Kazantsev, A., Chernoff, Y. O., McCaffery, J. M., Wendland, B. and Sherman, M. Y. (2003). Aggregation of expanded polyglutamine domain in yeast leads to defects in endocytosis. *Mol Cell Biol* **23**, 7554-65.
- Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L. and Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* **4**, 691-8.
- Michelitsch, M. D. and Weissman, J. S. (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11910-5.
- Morton, W. M., Ayscough, K. R. and McLaughlin, P. J. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* **2**, 376-8.
- Moseley, J. B. and Goode, B. L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 605-45.

- Nefsky, B. and Bretscher, A. (1992). Yeast actin is relatively well behaved. *Eur J Biochem* **206**, 949-55.
- Newpher, T. M. and Lemmon, S. K. (2006). Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* **7**, 574-88.
- Newpher, T. M., Smith, R. P., Lemmon, V. and Lemmon, S. K. (2005). In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell* **9**, 87-98.
- Okreglak, V. and Drubin, D. G. (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol* **178**, 1251-64.
- Osherovich, L. Z., Cox, B. S., Tuite, M. F. and Weissman, J. S. (2004). Dissection and design of yeast prions. *PLoS Biol* **2**, E86.
- Owen, D. J., Collins, B. M. and Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-91.
- Palecek, J., Hasek, J. and Ruis, H. (2001). Rpg1p/Tif32p, a subunit of translation initiation factor 3, interacts with actin-associated protein Sla2p. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 1244-50.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-9.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113** ( Pt 4), 571-85.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. and Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 559-91.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. and Riezman, H. (1993). end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 55-65.
- Rees, D. J., Ades, S. E., Singer, S. J. and Hynes, R. O. (1990). Sequence and domain structure of talin. *Nature* **347**, 685-9.
- Singer-Kruger, B., Nemoto, Y., Daniell, L., Ferro-Novick, S. and De Camilli, P. (1998). Synaptojanin family members are implicated in endocytic membrane traffic in yeast. *J Cell Sci* **111** ( Pt 22), 3347-56.
- Stefan, C. J., Padilla, S. M., Audhya, A. and Emr, S. D. (2005). The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* **25**, 2910-23.
- Sun, Y., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J. Y. and Drubin, D. G. (2007). PtdIns(4,5)P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J Cell Biol* **177**, 355-67.

- Sun, Y., Kaksonen, M., Madden, D. T., Schekman, R. and Drubin, D. G. (2005). Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol Biol Cell* **16**, 717-30.
- Sun, Y., Martin, A. C. and Drubin, D. G. (2006). Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev Cell* **11**, 33-46.
- Tang, H. Y., Xu, J. and Cai, M. (2000). Pan1p, End3p, and S1a1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol Cell Biol* **20**, 12-25.
- Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S. and Fischbeck, K. H. (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* **12**, 749-57.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Duncan, M. C., Cope, M. J., Sun, Y., Martin, A. C., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, Mizuno, K. and Drubin, D. G. (2007). Negative regulation of yeast Eps15-like Arp2/3 complex activator, Pan1p, by the Hip1R-related protein, Sla2p, during endocytosis. *Mol Biol Cell* **18**, 658-68.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Martin, A. C. and Drubin, D. G. (2005). Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **7**, 246-54.
- Toshima, J. Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A. C., King, D. S. and Drubin, D. G. (2006). Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5793-8.
- Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W. and Ayscough, K. R. (2002). Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J Cell Sci* **115**, 1703-15.
- Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L. and Cooper, J. A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 23-30.
- Wesp, A., Hicke, L., Palecek, J., Lombardi, R., Aust, T., Munn, A. L. and Riezman, H. (1997). End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**, 2291-306.
- Yang, S., Cope, M. J. and Drubin, D. G. (1999). Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell* **10**, 2265-83.
- Yin, H. L. and Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.
- Young, M. E., Cooper, J. A. and Bridgman, P. C. (2004). Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J Cell Biol* **166**, 629-35.
- Zeng, G., Huang, B., Neo, S. P., Wang, J. and Cai, M. (2007). Scd5p mediates phosphoregulation of actin and endocytosis by the type 1 phosphatase Glc7p in yeast. *Mol Biol Cell* **18**, 4885-98.

Zeng, G., Yu, X. and Cai, M. (2001). Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol Biol Cell* **12**, 3759-72.