

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program:  
Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor:  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Markéta Polidarová**

Vezikulární transport z kyselých endozomálních kompartmentů do  
endoplazmatického retikula

Vesicular trafficking from acidic compartments to the endoplasmic reticulum

Bakalářská práce  
Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2014



**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, 14. 5. 2014

Podpis

Velmi děkuji své školitelce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za rady a připomínky při vypracování této bakalářské práce. Také děkuji svým rodičům za jejich podporu při studiu.

## Abstrakt

Retrográdní transport z endozomů do Golgiho aparátu a dál do endoplasmatického retikula slouží buňkám pro opětovné využití receptorů a dalších proteinů. Existuje řada drah začínající na různých typech endozomů cílená do *trans*-Golgi sítě a z ní dál do endoplasmatického retikula. Z časných a maturujících endozomů jsou proteiny transportovány pomocí retromeru, pro pohyb z pozdních endozomů je zásadní GTPáza Rab9 a v transportu z recyklujících endozomů se uplatňují Rab6 a Rab11. V rámci Golgiho aparátu jsou známy dvě dráhy. Jedna pomocí COPI váček regulovaná GTPázou Arf1, která je citlivá k brefeldinu A. Druhá dráha je regulována GTPázou Rab6.

Retrográdní transport využívají kromě endogenních proteinů také proteinové toxiny a malé neobalené DNA viry. Pro Shiga toxin je charakteristické využívání Rab6 dráhy z recyklujících endozomů i přes Golgiho aparát. Retrográdní transport ricinu začíná na časných endozomech a je méně jasný. Transport malých neobalených DNA virů začínají vědci teprve podkrývat.

**Klíčová slova:** retrográdní transport, endozom, GTPáza, COPI, Shiga toxin, ricin, papillomavirus, polyomavirus

## **Abstract**

The cell uses retrograde transport from endosomes to Golgi apparatus and further to the endoplasmic reticulum to recycle its receptors and other proteins. There are several pathways starting on different types of endosomes aimed to the *trans*-Golgi network and from it further to the endoplasmic reticulum. From the early and maturing endosomes the proteins are transported using the retromer complex. Rab9 GTPase is essential for transport from the late endosomes. Rab6 and Rab11 play major role in the transport from the recycling endosomes. There are two pathways going through the Golgi apparatus. The first one is mediated by COPI vesicles which are regulated by Arf1 GTPase and the pathway is sensitive to brefeldin A. The second pathway is regulated by Rab6 GTPase.

Except for endogenous proteins the retrograde transport is used by protein toxins and small unenveloped DNA viruses as well. Rab6 pathway from the recycling endosomes and through the Golgi apparatus is characteristic for Shiga toxin. The retrograde transport of ricin starts on the early endosomes and is less clear. Scientists only started uncovering the transport of small unenveloped DNA viruses.

**Key words:** retrograde transport, endosome, GTPase, COPI, Shiga toxin, ricin, papillomavirus, polyomavirus

## Seznam použitých zkratk

<b>AGAP2</b>	Arf GTPase activating protein 2	protein 2 aktivující Arf GTPázu
<b>Arf1</b>	ADP-ribosylation factor 1	ADP-ribosylační faktor 1
<b>Arl</b>	Arf-like	GTPáza podobná Arf
<b>BAR</b>	Bin/amphiphysin/Rvs domain	doména Bin/amphiphysin/Rvs
<b>BARS</b>	brefeldin A ADP-ribosylated substrate	BFA ADP-ribosylovaný substrát
<b>BFA</b>	brefeldin A	brefeldin A
<b>BICD1, BICD2</b>	bicaudal 1, bicaudal 2	bicaudal 1, bicaudal 2
<b>BiP</b>	binding immunoglobulin protein	imunoglobulinový vazebný protein
<b>BKV</b>	BK virus	lidský BK virus
<b>CD-MPR, CI-MPR</b>	cation dependent-, cation independent-mannose-6-phosphate receptor	na kationtech závislý-, na kationtech nezávislý-manózo-6-fosfátový receptor
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	cytoplasmic phospholipase A2	cytoplasmatická fosfolipáza A2
<b>Crb</b>	crumbs	crumbs
<b>CTx, CTxB</b>	Cholera toxin, Cholera toxin B-subunit	Cholera toxin, podjednotka B Cholera toxinu
<b>COG</b>	conserved oligomeric Golgi complex	konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný na Golgiho aparátu
<b>DAG</b>	diacylglycerol	diacylglycerol
<b>DMT1-II</b>	divalent metal transporter 1-II	přenašeč dvojmocných kationtů 1-II
<b>dsDNA</b>	double strand DNA	dvouvláknová DNA
<b>DYNLRB1, DYNLT1, DYNLT3</b>	dynein light chains	lehké řetězce dyneinu
<b>EEA1</b>	early endosomal antigen 1	časně endozomální antigen 1
<b>EHD1</b>	Eps15 (epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15) homology domain containing protein 1	protein 1 obsahující homologickou doménu s Eps15 (klon 15 substrátu dráhy epidermálního růstového faktoru)
<b>ER</b>	endoplasmic reticulum	endoplasmatické retikulum
<b>ERAD</b>	ER-associated degradation,	degradace spojená s endoplasmatickým retikulem
<b>ERGIC</b>	ER-GA intermediate compartment	intermediální kompartment ER-GA
<b>Evt-2</b>	evectin-2	evectin-2
<b>FIP1/RCP</b>	Rab11-family interacting protein 1/Rab-coupling protein	protein 1 interagující s rodinou Rab11/protein párující s Rab
<b>GA</b>	Golgi apparatus	Golgiho aparát

<b>GAP</b>	GTPase activating protein	protein aktivující GTPázu
<b>GARP</b>	Golgi associated retrograde protein complex	retrográdní proteinový komplex asociovaný s GA
<b>GBF1</b>	Golgi brefeldin A-resistance faktor	faktor resistance k brefeldinu A lokalizovaný na GA
<b>GDP</b>	guanosine diphosphate	guanosin difosfát
<b>GEF</b>	guanosin nucleotide exchange factor,	faktor vyměňující guanosinový nukleotid
<b>GM130</b>	Golgi matrix protein of 130 kDa	130 kDa protein přítomný v matrix GA
<b>GPP130</b>	Golgi phosphoprotein of 130 kDa	fosfoprotein o velikosti 130 kDa lokalizovaný v GA
<b>GS</b>	Golgi SNARE	Golgi SNARE
<b>GTP</b>	guanosine triphosphate	guanosin trifosfát
<b>GTPáza</b>	GTPase, GTP hydrolase	GTP hydroláza
<b>HPV16</b>	human papillomavirus 16	lidský papillomavirus 16
<b>JCV</b>	JC virus	lidský JC virus
<b>kDa</b>	kilodalton	kilodalton
<b>LAMP</b>	lysosome associated membrane protein	membránový protein asociovaný s lysozomy
<b>LPAAT<math>\gamma</math></b>	lysophosphatidic acid acyltransferase $\gamma$	acyltransferáza $\gamma$ lysofosfatidové kyseliny
<b>MPyV</b>	mouse polyomavirus	myší polyomavirus
<b>PDI</b>	protein disulfide isomerase	protein disulfid izomeráza
<b>PI3K</b>	phosphatidylinositol 3-kinase	fosfatidylinositol 3-kináza
<b>PI3P</b>	phosphatidylinositol 3-phosphate	fosfatidylinositol 3-fosfát
<b>PITP<math>\beta</math></b>	phosphatidylinositol transfer protein $\beta$	protein $\beta$ přesouvající fosfatidylinositol
<b>PKC<math>\delta</math></b>	protein kinase C $\delta$	protein kináza C $\delta$
<b>PS</b>	phosphatidylserin	fosfatidylserin
<b>PX</b>	phox domain	doména phox
<b>R6IP1</b>	Rab6 interacting protein 1	protein 1 interagující s Rab6
<b>Rank5</b>	rankyrin 5	rankyrin 5
<b>Rgp1</b>	retrograde Golgi transport protein 1	protein 1 retrográdního transportu přes Golgiho aparát
<b>Ric1</b>	ribosome control 1	protein 1 kontrolující ribozom
<b>RILP</b>	Rab7 interacting lysosomal protein	lysozomální protein interagující s Rab7



<b>RME-8</b>	receptor-mediated endocytosis-8 protein	protein receptorem zprostředkované endocytózy 8
<b>SMAP2</b>	small Arf-GAP 2	malý protein 2 aktivující GTPázu Arf
<b>SNARE, tSNARE, vSNARE</b>	soluble N-ethyl maleimide sensitive factor adaptor protein receptor	receptor pro adaptorový protein rozpustného faktoru citlivého k N-ethylmaleimidu
<b>SNX, SNX-BAR</b>	sorting nexin, sorting nexin containing a BAR domain	třídící nexin, třídící nexin obsahující doménu BAR
<b>STARD3</b>	StAR (steroidogenic acute regulatory protein) related lipid transfer domain 3	doména přenášející lipidy příbuzná StAR (steroidogenní akutní regulační protein)
<b>STARD3NL</b>	STARD3 N-terminal like	protein N-terminálně podobný STARD3
<b>STX</b>	syntaxin	syntaxin
<b>STx, STxB</b>	Shiga toxin, Shiga toxin B-subunit	Shiga toxin, podjednotka B Shiga toxinu
<b>SV40</b>	simian virus 40	opičí polyomavirus 40
<b>TBC1D5</b>	TBC1 (Tre-2, BUB2p and Cdc16p) domain family member 5	člen 5 TBC1(Tre-2, BUB2p a Cdc16p) doménové rodiny
<b>TGN</b>	<i>trans</i> -Golgi network	<i>trans</i> -Golgi síťovina
<b>TIP47</b>	MPR tail interacting protein of 47 kDa	47 kDa protein interagující s „ocáskem“ MPR
<b>TMF/ARA160</b>	TATA element modulatory factor/androgen receptor activator of 160kDa	modulační faktor TATA elementu/aktivátor androgenního 160kDa receptoru
<b>VAMP</b>	vesicle-associated membrane protein	membránový protein asociovaný s vezikuly
<b>VAP</b>	VAMP-associated proteins	proteiny asociované s VAMP
<b>Vps</b>	vacuolar protein sorting	protein účastníci se třídění proteinů do vakuol
<b>Wls</b>	Wntless	Wntless
<b>WASH</b>	Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR (supressor of cyclic AMP receptor) homolog	homolog proteinu Wiskott-Aldrich syndromu a SCAR (supresor receptoru cyklického AMP)
<b>ZW10/RINT1</b>	Zeste White 10/RAD50-interacting protein 1	Zeste White 10/protein 1 interagující s RAD50

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Endozomální systém .....	2
3. Retrográdní transport z kyselých endozomálních kompartmentů do <i>trans</i> -Golgi síťoviny .....	4
3.1 Retrográdní transport z časných a maturujících endozomů .....	4
3.1.1 Retromer .....	4
3.1.2 Proteiny retrográdně transportované pomocí retromeru v savčích buňkách .....	5
3.1.3 Regulace transportu pomocí retromeru .....	6
3.1.4 Další faktory v transportu z časných a maturujících endozomů .....	7
3.2 Retrográdní transport z recyklujících endozomů .....	9
3.2.1 Transport pomocí malé GTPázy Rab6 .....	9
3.2.2 Další faktory důležité pro transport z recyklujících endozomů .....	10
3.3 Společné rysy transportu z časných, maturujících a recyklujících endozomů .....	10
3.4 Retrográdní transport z pozdních endozomů .....	12
3.4.1 Transport pomocí malé GTPázy Rab9 .....	12
3.4.2 Transport pomocí malé GTPázy Rab7b .....	14
4. Retrográdní transport z Golgiho aparátu do endoplasmatického retikula .....	14
4.1 Transport zprostředkovaný COPI váčky .....	14
4.1.1 Regulace transportu pomocí COPI váček .....	14
4.2 Transport pomocí malé GTPázy Rab6 .....	16
5. Přímá cesta z endozomů do ER? .....	17
6. Retrográdní transport toxinů .....	18
6.1 Retrográdní transport Shiga toxinu .....	18
6.2 Retrográdní transport ricinu .....	20
7. Transport malých neobalených dsDNA virů do ER .....	21
7.1 Transport papillomavirů z endozomů do ER .....	21
7.2 Transport polyomavirů z endozomů do ER .....	22
8. Závěr .....	26
Seznam použité literatury .....	27

# 1. Úvod

Buňky potřebují komunikovat se svým okolím, z vnějšku přijímají signály a živiny, naopak samy vylučují řadu látek a dopravují na membránu různé proteiny. K dopravě látek ven a dovnitř buňky slouží systém membránou ohraničených organel, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a složitého endozomálního systému.

Buňka využívá několika typů endozomů. Po endocytóze vzniká váček a stává se z něj časný endozom. Živiny, které buňka přijala, jsou většinou v zatím nevyužitelné formě makromolekul nebo vázané na svém receptoru a je potřeba je z něj uvolnit. Časný endozom tedy zraje, při tom se okyseluje a přes stádia maturujících endozomů (nazývaných také „multivesicular bodies“) vzniká pozdní endozom. Po dalším okyselení z pozdního endozomu vznikne konečná degradační organela, lysozom. V průběhu okyselování a zrání endozomu dochází k uvolňování živin z receptorů a štěpení makromolekul na stavební komponenty až do úplného rozložení v lysozomu. Do endozomů však přichází řada proteinů, které buňka chce znovu využít a ne degradovat v lysozomu. Jsou to jednak receptory z cytoplasmatické membrány, které slouží k transportu živin z vnějšího prostředí do buňky, a jednak proteiny pocházející z Golgiho aparátu, které slouží např. k transportu enzymů do lysozomu. Proto dochází v endozomech k třídění jejich obsahu a selektivnímu vezikulárnímu a tubulárnímu transportu zpět na původní membrány. Pro recyklaci na cytoplasmatickou membránu, ale i do jiných kompartmentů, slouží převážně zvláštní typ časných endozomů, tzv. recyklující endozomy.

K přepravě nákladu (v angličtině označovaného pojmem „cargo“) z endozomů do Golgiho aparátu a případně do endoplasmatického retikula slouží tzv. retrográdní transport. Ten probíhá jak z časných, pozdních i recyklujících endozomů. Kromě endogenních proteinů využívají retrográdní transport také některé bakteriální a rostlinné toxiny a možná i některé viry, které vstupují do buňky endocytickou cestou a putují ve váčcích cytoplasmou, aby dosáhly jádra. Např. u polyomavirů zůstává jejich způsob transportu z endozomů do endoplasmatického retikula nejasný. Ve své práci popisují různé mechanismy retrográdního transportu, transport vybraných bakteriálních a rostlinných toxinů a shrnují nejnovější poznatky o využití retrográdního malými neobalenými viry s dvouvláknovou DNA.

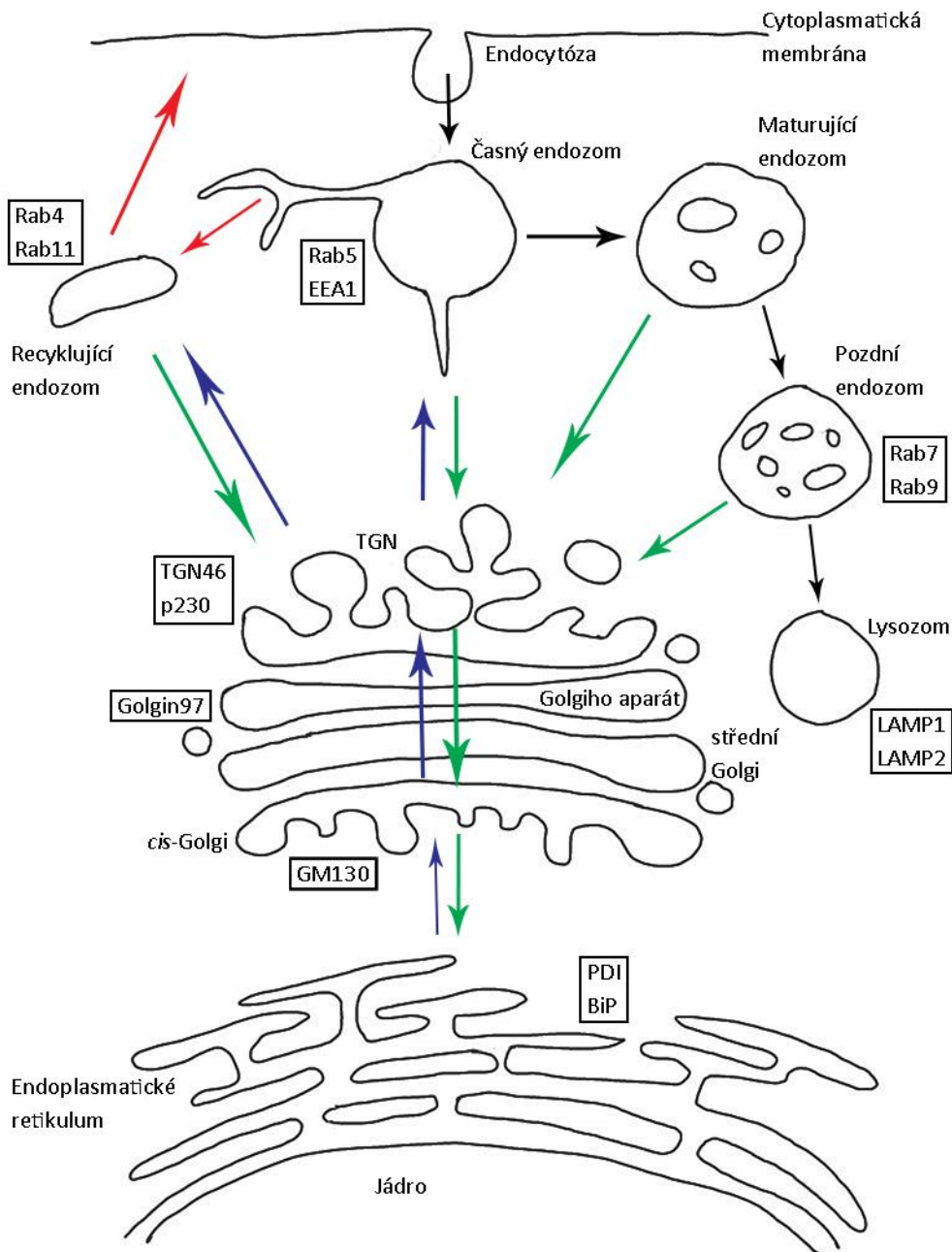
## 2. Endozomální systém

Jak již bylo řečeno v úvodu, endozomální systém je tvořen různými endozomy. Jednotlivé typy jsou charakterizované specifickými proteiny, které se na jiných kompartmentech nevyskytují. Obr. 1 ukazuje endozomální systém, Golgiho aparát a endoplasmatické retikulum, různé cesty transportu mezi jednotlivými kompartmenty a specifické proteiny, tzv. markery, jednotlivých organel.

Časně endozomy jsou typické přítomností GTPázy Rab5 a jejího efektorového proteinu EEA1 (early endosomal antigen 1, časně endozomální antigen 1) (Bucci *et al.*, 1992; Mu *et al.*, 1995; Simonsen *et al.*, 1998). Pozdní endozomy se vyznačují proteiny Rab7 a Rab9 (Lombardi *et al.*, 1993; Méresse *et al.*, 1995). Na lysozomech (ale i pozdních endozomech) potom nalezneme glykoproteiny LAMP1 a LAMP2 (lysosome associated membrane protein, membránový protein asociovaný s endozomy) (Chen *et al.*, 1985). Recyklující endozomy obsahují GTPázy Rab4 a Rab11 (Ullrich *et al.*, 1996; van der Sluijs *et al.*, 1991), subpopulaci časných a recyklujících endozomů lze také zviditelnit označením transferinového receptoru nebo transferinu (Yamashiro *et al.*, 1984).

Golgiho aparát (GA) lze rozdělit na několik částí. Nejbližší jádru se nachází *cis*-Golgi, dále střední Golgi. Nejbližší k cytoplasmatické membráně najdeme *trans*-Golgi a tzv. *trans*-Golgi síťovinu (*trans*-Golgi network, TGN), ze které se odštěpují váčky cílené do endozomů a na cytoplasmatickou membránu. TGN charakterizuje u primátů protein TGN46 (TGN38 u hlodavců), který se ale pohybuje mezi TGN a cytoplasmatickou membránou (Luzio *et al.*, 1990; Ponnambalam *et al.*, 1996). Jiným typickým proteinem TGN je protein p230 (Gleeson *et al.*, 1996). Golgiho aparát charakterizuje řada proteinů, např. golgin-97 (Griffith *et al.*, 1997), pro *cis*-Golgi je charakteristický protein GM130 (Golgi matrix protein of 130 kDa, 130 kDa protein přítomný v matrix GA) (Nakamura *et al.*, 1995). Za marker endoplasmatického retikula (ER) můžeme označit např. protein disulfid isomerázu (PDI) (Ohba *et al.*, 1977) nebo BiP (binding immunoglobulin protein, imunoglobulinový vazebný protein) (Bole *et al.*, 1989).

Struktura endozomální sítě však není tak jednoduchá. Nejedná se o soubor přesně definovaných váček, ale spíše o síť různých tubulů a váček. Mezi jednotlivými typy endozomů jsou různá mezistádia obsahující oba markery. Např. v dráze recyklace transferinu můžeme na jednom endozomu nalézt membránové domény, kde jedna obsahuje pouze GTPázu Rab5, jiná Rab5 a Rab4 a ještě další Rab4 a Rab11 (Sönnichsen *et al.*, 2000). Při maturaci časných endozomů v pozdní endozomy dochází k výměně časně endozomální GTPázy Rab5 za pozdně endozomální GTPázu Rab7 (Rink *et al.*, 2005). Tato výměna je zřejmě důležitá pro retrogradní transport pomocí retromeru (viz dále) (Rojas *et al.*, 2008; van Weering *et al.*, 2012).



**Obr. 1: Schéma transportu v rámci endozomální sítě, Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula**

Po endocytóze vzniká z váčku časný endozom. Obsah časného endozomu se pak třídí. Část z něj prochází degradační cestou (černé šipky) přes maturující endozomy, ze kterých vznikají pozdní endozomy. Pozdní endozomy dozrávají v lysozom, kde dojde k rozložení endocytovaného materiálu. Část obsahu časného endozomu prochází do recyklujících endozomů, odkud se dostává zpět na cytoplasmatickou membránu (červeně). Modré šipky znázorňují anterográdní transport proteinů syntetizovaných v endoplasmatickém retikulu cílených do endozomálních kompartmentů a lysozomů (z časných endozomů se dostávají dále degradační cestou). Nezbytnou roli hraje také retrográdní transport (zelené šipky), pomocí něhož se dostávají proteiny z časných, pozdních a recyklujících endozomů do Golgiho aparátu a skrz něj dále do endoplasmatického retikula.

V rámečcích jsou uvedeny některé charakteristické proteiny, tzv. markery, jednotlivých kompartmentů. (EEA1 – early endosomal antigen 1, časně endozomální antigen 1; GM130 - Golgi matrix protein of 130 kDa, 130 kDa protein přítomný v matrix GA; LAMP – lysosom associated membrane protein, membránový protein asociovaný s lysozomy; PDI – protein disulfid izomeráza; BiP - binding immunoglobulin protein, imunoglobulinový vazebný protein; TGN – *trans*-Golgi network, *trans*-Golgi síťovina)

Endozomální síť je tedy vhodné vnímat spíše jako mozaiku různých membránových domén, kde dochází k plynulé přeměně jednoho typu endozomu v druhý.

### **3. Retrográdní transport z kyselých endozomálních kompartmentů do *trans*-Golgi síťoviny**

#### **3.1 Retrográdní transport z časných a maturujících endozomů**

##### **3.1.1 Retromer**

Retromer je komplex proteinů zodpovědných za vznik tubulárních útvarů na endozomech sloužících k třídění endozomálního obsahu do dalších kompartmentů. Poprvé byl popsán u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Seaman *et al.*, 1998). U kvasinek ho tvoří dva subkomplexy, trimer proteinů Vps35p, Vps29p a Vps26p a dimer Vps5p a Vps17p (vacuolar protein sorting, protein účastnící se třídění proteinů do vakuol). Trimer tvoří jádro retromeru a je zodpovědný za vazbu nákladu a zároveň interakci s dimerem schopným vázat se na membrány (Seaman *et al.*, 1998). Na základě homologie pak byl objeven retromer i u savčích buněk (Haft *et al.*, 2000) a rostlin (Oliviusson *et al.*, 2006).

Dále se budu zabývat jen savčím retromerem. Ten sestává také s trimerním proteinů Vps35, Vps29 a Vps26 a dimerem třídících nexinů (sorting nexins, SNX), který odpovídá kvasinkovému dimeru Vps5p a Vps17p (Haft *et al.*, 2000). V savčích buňkách byl nejprve objeven pouze jeden Vps26, bioinformatickými metodami byl později nalezen homologní Vps26B (Kerr *et al.*, 2005). První pokusy ukazovaly, že retromer obsahující Vps26B neasociuje s endozomální membránou, ale pouze s cytoplazmatickou membránou lamelipodií (Kerr *et al.*, 2005). Ukázalo se ale, že pro studium byla použita nevhodná metodika a že i protein Vps26B kolokalizuje s endozomy. Navíc bylo zjištěno, že existují dvě formy retromeru, jedna obsahující pouze Vps26A a druhá Vps26B, protože spolu oba homology kompetují o vazebné místo na proteinu Vps35 (Collins *et al.*, 2008). Vps26A-retromer a Vps26B-retromer hrají v buňce odlišnou roli (Bugarcic *et al.*, 2011)

Druhým subkomplekem je dimer třídících nexinů tvořených homodimerem SNX1 nebo heterodimerem SNX1 a SNX2 (Haft *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2007). Později byly objeveny další SNX, které hrají roli v retrográdním transportu využívajícím retromer. Jedná se o proteiny SNX5 a SNX6 (Wassmer *et al.*, 2007). Proteiny SNX1, SNX2, SNX5 a SNX6 spolu mohou tvořit všechny možné kombinace heterodimerů (Wassmer *et al.*, 2009). Dimer třídících nexinů interaguje s trimerním jádrem a je zodpovědný za vazbu na membrány, a to přes doménu PX (phox homology, homologie Phox) rozeznávající fosfatidylinositidy. Protein SNX1 je schopný rozeznávat zakřivení membrány a indukovat vznik tubulárních membránových útvarů na časných endozomech, a to díky doméně BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) (Carlton *et al.*, 2004). Doménu BAR

obsahují i ostatní SNX2, SNX5 a SNX6 (Carlton *et al.*, 2005; Wassmer *et al.*, 2007), proto jsou označovány jako SNX-BAR (Harterink *et al.*, 2011).

Nejnovější studie ukazují, že s trimerem Vps35-Vps29-Vps26 může interagovat SNX3. Vzniká tak SNX3-retromer a jím zprostředkovaný transport je nezávislý na dimeru SNX-BAR (Harrison *et al.*, 2014; Harterink *et al.*, 2011).

### **3.1.2 Proteiny retrográdně transportované pomocí retromeru v savčích buňkách**

Poprvé byla role savčího retromeru v retrográdním transportu popsána při studiu transportu na kationtech nezávislého manózo-6-fosfátového receptoru (cation independent – mannose-6-phosphate receptor, CI-MPR). Tento receptor slouží k transportu lysozomálních hydroláz značených manózo-6-fosfátem z TGN do endozomů. Retromer je zodpovědný za recyklaci volného receptoru z časných a maturujících endozomů zpět na TGN. V buňkách s poškozenými retromerními složkami byl CI-MPR transportován do lysozomů a tam degradován (Arighi *et al.*, 2004; Seaman, 2004).

Dalším proteinem, v jehož retrográdním transportu byla potvrzena role retromeru, je sortilin, který také, jako CI-MPR, zprostředkovává transport lysozomálních proteinů z TGN do endozomů. Je transportován stejným způsobem jako CI-MPR (Canuel *et al.*, 2008; Seaman, 2004). Ukázalo se, že retromer je důležitý také pro transport proteinu SorLA, což je receptor transportující protein amyloidního prekursoru a defekt v tomto transportu je spojován s Alzheimerovou chorobou (Fjorback *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2007). V neposlední řadě hraje retromer také důležitou roli v udržování apikobazální polaridy epiteliálních buněk, protože slouží k recyklaci apikální determinanty, proteinu crumbs (Crb), přes TGN zpět na cytoplazmatickou membránu (Pocha *et al.*, 2011).

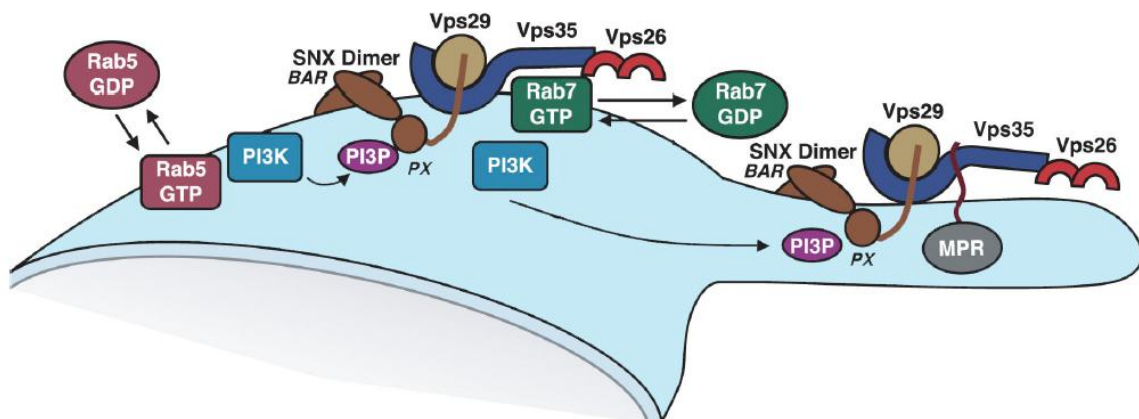
Retromerní komplex se také účastní procesů metabolismu železa. Transportér pro dvojmocné kovy DMT1-II (divalent metal transporter 1-II) je transportován pomocí retromeru z maturujících endozomů přes TGN do recyklujících endozomů (Tabuchi *et al.*, 2010). K transportu DMT1-II slouží retromer obsahující SNX3 místo SNX-BAR (Harrison *et al.*, 2014). SNX3-retromer recykluje také protein Wls (Wntless) z časných endozomů na TGN a hraje tak roli ve vývoji organismu a udržování homeostázy, protože protein Wls transportuje důležité signální glykoproteiny Wnt (Belenkaya *et al.*, 2008; Harterink *et al.*, 2011).

Retromer slouží také k recyklaci integrálního membránového proteinu TGN38 (lidského TGN 46) a Shiga toxinu. Oba tyto proteiny jsou transportovány do TGN z recyklujících endozomů (viz kapitola 3.2), i když pravděpodobně jinými cestami (Bujny *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 1998; Lieu a Gleeson, 2010).

### 3.1.3 Regulace transportu pomocí retromerů

Retromer je regulován pomocí malých GTPáz. Klíčovou roli hraje GTPáza Rab7, která se ve formě s vázaným GTP (GTP-forma) může vázat na membrány. Dvě nezávislé studie ukázaly, že je Rab7 nezbytná pro vazbu trimerního retromerů na membránu endozomů (viz obr. 2) (Rojas *et al.*, 2008; Seaman *et al.*, 2009), a to přes dimer SNX-BAR, který se na endozomální membránu může vázat nezávisle na Rab7 (Rojas *et al.*, 2008). Rab7 je potřeba také v transportu zprostředkovaném SNX3-retromerem (Harrison *et al.*, 2014). Protein TBC1D5 (TBC1 domain family member 5, člen 5 TBC1 doménové rodiny), což je protein aktivující GTPázu (GAP), vyvazuje retromer z membrán, nejspíše mechanismem indukce hydrolyzy GTP vázaného na Rab7 za vzniku GDP-Rab7, který se do membrán již neváže (Seaman *et al.*, 2009).

Roli v retrográdním transportu za účasti retromerů hraje i GTPáza Rab5. Nadprodukce dominantně negativní mutanty Rab5 způsobila odpojení trimerního jádra retromerů, ale i SNX1 z membrán. Rab5 neinteraguje s retromerem přímo, ale aktivuje endozomální fosfatidylinositol 3-kinázu (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), která vytváří PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate, fosfatidylinositol 3-fosfát), tedy vazebné místo pro třídící nexiny (viz obr. 2) (Rojas *et al.*, 2008). Rabankyrin 5 (Rank5), což je efektor Rab5, a EHD1 (Eps15 homology domain containing protein 1, protein 1 obsahující homologickou doménu s Eps15), který slouží jako regulátor recyklace proteinů, kolokalizují, interagují s trimerním jádrem retromerů a jsou také důležité pro jeho správnou funkci v retrográdním transportu (Zhang *et al.*, 2012).



**Obr. 2: Regulace transportu zprostředkovaného retromerem malými GTPázami Rab5 a Rab7**

GTPáza Rab5 se v GTP-formě váže na membránu časného endozomu. Aktivuje fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3K), která vytváří fosfatidylinositol 3-fosfát (PI3P). PI3P je vazebné místo pro dimer třídících nexinů (SNX), které jej váží pomocí domény PX. Při maturaci časných endozomů dochází k výměně GTPázy Rab5 za Rab7. Rab7 se v GTP-formě váže na membránu maturujícího endozomu a umožňuje vazbu trimerního subkomplexu retromerů Vps35-Vps29-Vps26 k membránově vázanému dimeru SNX. Kompletní retromer umožňuje tvorbu tubulárních transportních útvarů na časných a maturujících endozomech. Za zakřivení membrány je zodpovědná doména BAR třídících nexinů, trimerní jádro retromerů váže náklad (zde na kationtech nezávislý manózo-6-fosfátový receptor (MPR)). Převzato a upraveno dle Rojas *et al.* (2008)



Pro funkční retrográdní transport pomocí retromeru je podle nejnovější práce důležitá právě výměna Rab5 za Rab7 na maturujících endozomech. Pokud se tato výměna zablokuje, i nadále se tvoří transportní tubuly na časných endozomech pomocí SNX-BAR, neváže se však na ně trimerní jádro retromeru (van Weering *et al.*, 2012).

Kromě malých GTPáz z rodiny Rab se retrográdního transportu pomocí retromeru účastní i další proteiny. Třídící nexin 8 (SNX8) kolokalizuje s retromerem na časných endozomech a může fungovat jako negativní regulátor retromerem zprostředkovaného retrográdního transportu (Dyve *et al.*, 2009). Proteinový komplex WASH (Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog, homolog proteinu Wiskott-Aldrich syndromu a SCAR) slouží jako aktivátor Arp2/3, který iniciuje nukleaci a následnou polymerizaci aktinu (Derivery *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že WASH interaguje s retromerem a reguluje retrográdní transport CI-MPR (Gomez a Billadeau, 2009).

### **3.1.4 Další faktory v transportu z časných a maturujících endozomů**

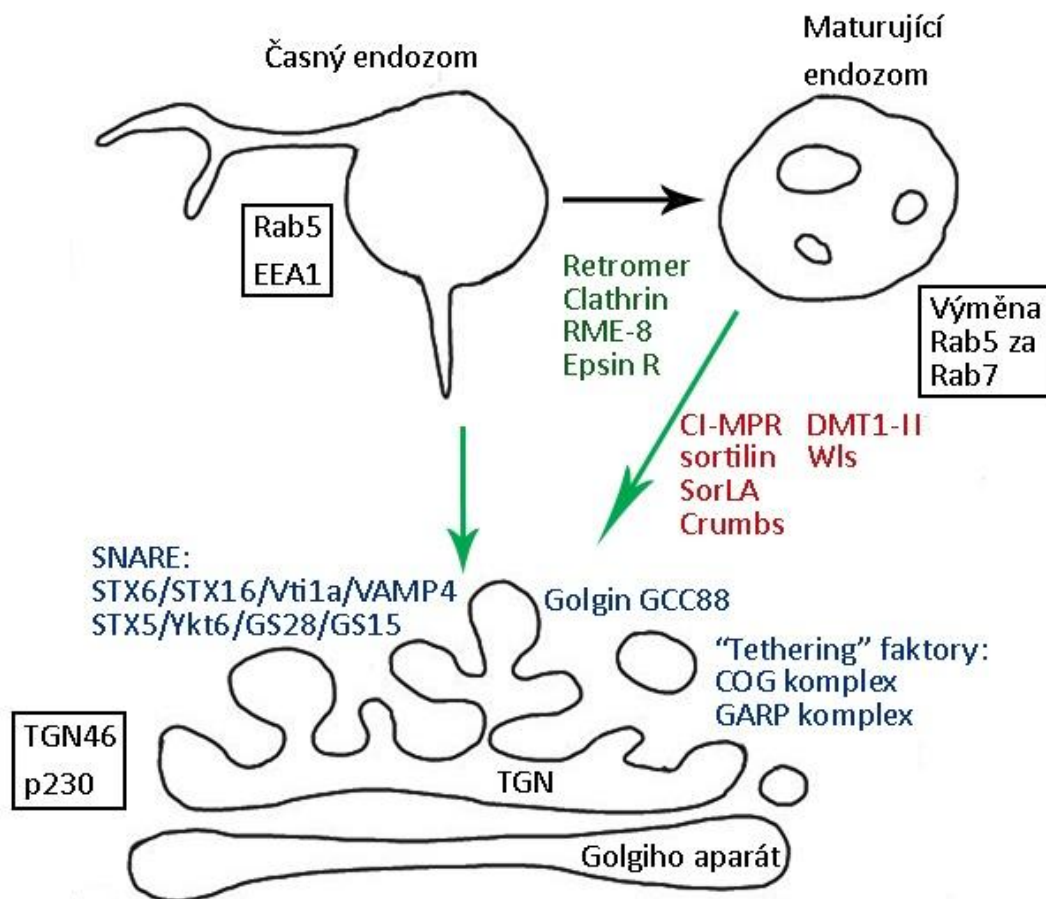
Dalšími nezbytnými proteiny pro transport z časných a maturujících endozomů do TGN jsou tzv. golginy, tedy proteiny lokalizované na Golgiho aparátu. Golgin GCC88 lokalizovaný na TGN se ukázal být jedním z faktorů potřebných pro retrográdní transport z časných endozomů (Lieu *et al.*, 2007).

Řada prací ukázala na důležitost clathrinu a jeho interakčních partnerů epsinuR a RME-8 (receptor-mediated endocytosis-8 protein, protein receptorem zprostředkované endocytózy 8) v retrográdním transportu z časných endozomů (Popoff *et al.*, 2007; Popoff *et al.*, 2009; Saint-Pol *et al.*, 2004). Protože se clathrin i retromer nacházejí na časných endozomech, uvažovalo se o modelu, kde je clathrin nezbytný pro tvorbu tubulů a váček pomocí retromeru. Novější publikace však ukázala, že SNX-BAR-retromer je schopný vytvářet transportní membránové útvary nezávisle na clathrinu. Protože je však clathrin nezbytný pro retrográdní transport endogenního i exogenního nákladu, byl postulován model, kde clathrin nejprve nabohatí transportovaný protein na membráně časných endozomů a poté je nahrazen SNX-BAR-retromerem možná pomocí proteinu RME-8. Teprve pak dojde k tvorbě transportních tubulů, kterou indukuje samotný SNX-BAR-retromer (McGough a Cullen, 2013).

Zajímavý byl objev retrográdního transportu závislého na derlinech. Derliny jsou proteiny kontrolující kvalitu membránových proteinů. Špatně sbalené proteiny jsou po rozeznání cíleny k degradaci pomocí ERAD dráhy (ER-associated degradation, degradace spojená s endoplasmatickým retikulem). Ukázalo se, že některé špatně sbalené proteiny na cytoplasmatické membráně jsou retrográdně transportovány z endozomů do Golgiho aparátu

pomocí derlinů interagujících s třídícími nexiny (SNX1, SNX2). Interakce s trimerním jádrem retromeru však nebyla nalezena (Dang *et al.*, 2011).

Další faktory důležité pro transport z časných endozomů jsou společné i pro transport z recyklujících endozomů (viz kap. 3.3). Nejdůležitější aspekty transportu z časných a maturujících endozomů shrnuje obrázek 3.



**Obr. 3: Transport z časných a maturujících endozomů do TGN**

Časný endozom během zrání v pozdní endozom prochází stádiem maturujícího endozomu. Na něm dochází k výměně časně endozomální GTPázy Rab5 za pozdně endozomální Rab7. Tato výměna je nezbytná pro správnou funkci retromeru v transportu nákladu do TGN. Při tvorbě transportního membránového útvaru pomáhá clathrin (a jeho interakční partneři RME-8 a epsinR; zeleně) nabohatit náklad (červeně) do oblasti, ze které následně pomocí retromeru vypučí transportní tubuly. V retrográdním transportu z časných a maturujících endozomů fungují také proteiny a jejich komplexy lokalizované TGN (modře). Zajišťují zejména přichycení a fúzi vakuoly nebo tubulu s cílovou membránou.

(EEA1 – early Endosomal antigen 1, časně endozomální antigen 1; RME-8 - receptor-mediated endocytosis-8 protein, protein receptorem zprostředkované endocytózy 8; CI-MPR – cation independent mannose-6-phosphate receptor, na kationtech nezávislý manózo-6-fosfátový receptor; DMT1-II – divalent metal transporter 1-II; přenašeč dvojmocných kationtů 1-II; Wls – Wntless; STX – syntaxin; VAMP4 - vesicle-associated membrane protein 4, membránový protein 4 asociovaný s vezikuly; GS – Golgi SNARE; COG – conserved oligomeric Golgi complex, konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný na Golgiho aparát; GARP - Golgi associated retrograde protein complex, retrográdní proteinový komplex asociovaný s Golgiho aparátem)

## 3.2 Retrográdní transport z recyklujících endozomů

Recyklující endozomy vznikají z časných endozomů a lze je vnímat jako zvláštní subpopulaci časných endozomů. V některých pracích jsou značeny pomocí transferinu nebo transferinového receptoru, jindy pomocí GTPázy Rab11 (Ullrich *et al.*, 1996; Yamashiro *et al.*, 1984). Problém je, že transferin a transferinový receptor definují část časných a recyklujících endozomů zatímco Rab11 definuje pouze endozomy recyklující, a tak je možné, že nejasnosti vyplývající z prací využívajících různou metodiku jsou způsobeny tímto rozparem.

Dalším problémem studia transportu z recyklujících endozomů je výběr sledované molekuly. Přes recyklující endozomy je transportován Shiga toxin (STx) nebo pouze jeho podjednotka B (STxB) (Mallard *et al.*, 1998) a také Cholera toxin (CTx) a jeho podjednotka B (CTxB) (Pang *et al.*, 2004). Kromě toho přes recyklující endozomy pravděpodobně prochází TGN38 (Ghosh *et al.*, 1998). Nová studie však ukazuje, že STxB a TGN38 pro svůj transport využívají jiné komponenty. STxB vyžaduje protein SNX1 a golgin GCC185. Pokud se retrográdní transport zablokuje, zůstává toxinová podjednotka uvězněna v recyklujících endozomech pozitivních na Rab11. TGN38 naopak potřebuje SNX2 a golgin GCC88 využívaný časně endozomální dráhou. Při zablokování retrográdního transportu zůstává TGN38 v časných endozomech. Tento výsledek tedy ukazuje že TGN38 je do TGN transportován odlišnou cestou než STxB, což opět přináší komplikace v interpretaci výsledků různých prací (Lieu a Gleeson, 2010).

Kromě již zmíněných proteinů prochází přes recyklující endozomy do TGN protein VAMP4 (vesicle-associated membrane protein 4, membránový protein 4 asociovaný s vezikuly). Není však známý přesný mechanismus tohoto transportu (Tran *et al.*, 2007).

### 3.2.1 Transport pomocí malé GTPázy Rab6

Poprvé byl transport z recyklujících endozomů do TGN popsán na transportu Shiga toxinu a jeho podjednotky B (Mallard *et al.*, 1998). Ukázalo se, že klíčovou roli v tomto retrográdním transportu hraje GTPáza Rab6A' (Mallard *et al.*, 2002) i její izoforma Rab6A (Utskarpen *et al.*, 2006). Důležitá je ale i GTPáza Rab11, která pravděpodobně zajišťuje třídění v rámci recyklujících endozomů (Wilcke *et al.*, 2000). S Rab6A' interaguje protein TMF/ARA160 (TATA element modulatory factor/androgen receptor activator of 160kDa, modulační faktor TATA elementu/aktivátor androgenního 160kDa receptoru), který je také nezbytný pro retrográdní transport STxB (Yamane *et al.*, 2007).

GTPázy Rab6 jsou ale lokalizované na Golgiho aparátu (Antony *et al.*, 1992) a tak mechanismus transportu závislého na Rab6 z recyklujících endozomů do TGN není zcela jasný. S Rab6 interaguje protein R6IP1 (Rab6 interacting protein 1, protein 1 interagující s Rab6), který zároveň

interaguje i s nadprodukovanou GTPázou Rab11. Tak by mohl protein R6IP1 představovat spojkou mezi recyklujícími endozomy a Golgiho aparátem (Miserey-Lenkei *et al.*, 2007).

### **3.2.2 Další faktory důležité pro transport z recyklujících endozomů**

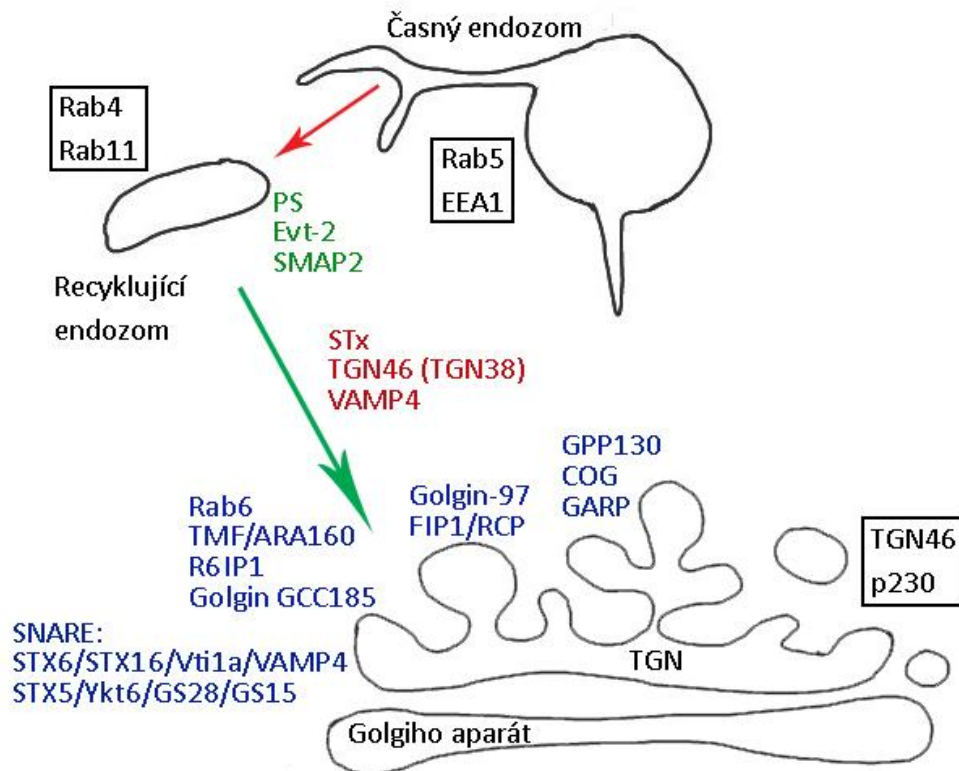
Podle nejnovějších prací je zásadní v retrográdním transportu z recyklujících endozomů fosfolipid fosfatidylserin (phosphatidylserin, PS). Ten je rozeznáván proteinem eectin-2 (Evt-2). Nedostatek Evt-2 nebo maskování PS způsobilo blokování retrográdního transportu Cholera toxinu a špatnou lokalizaci TGN46 (Lee *et al.*, 2012; Uchida *et al.*, 2011). Eectin-2 váže také SMAP2 (small Arf-GTPase activating protein 2, malý protein 2 aktivující GTPázu Arf), který indukuje hydrolýzu GTP vázaného GTPázou Arf. Nedostatek SMAP2 má stejný efekt na transport CTxB jako nedostatek Evt-2 (Matsudaira *et al.*, 2013). Z těchto výsledků tedy plyne, že pro retrográdní transport z recyklujících endozomů má zásadní význam lipid fosfatidylserin a proteiny eectin-2 a SMAP2.

V retrográdním transportu z recyklujících endozomů hrají také roli golginy. Golgin-97 je důležitý pro transport STxB i CTxB z endozomů do TGN (Lu *et al.*, 2004). S golginem-97 interaguje FIP1/RCP (Rab11-family interacting protein 1/Rab-coupling protein, protein 1 interagující s rodinou Rab11/protein párující s Rab), což je vazebný partner Rab11. GTPáza Rab11 i FIP1/RCP jsou potřeba pro retrográdní transport proteinů STxB, VAMP4 a TGN38 z endozomů do TGN (Jing *et al.*, 2010). Kromě golginu-97 je důležitý v retrográdním transportu z recyklujících, ale i z pozdních endozomů golgin GCC185 (Derby *et al.*, 2007). S GCC185 totiž interaguje jak malá GTPáza Rab6, tak Rab9 spojovaná s transportem z pozdních endozomů (Burguete *et al.*, 2008).

Retrográdní transport TGN46 a podjednotky B Shiga toxinu reguluje také protein GPP130 (Golgi phosphoprotein of 130 kDa, fosfoprotein o hmotnosti 130 kDa přítomný v GA). Je také nezbytný pro transport z recyklujících endozomů do TGN (Natarajan a Linstedt, 2004). Další faktory důležité pro transport z recyklujících endozomů jsou společné i pro transport z časných a maturujících endozomů (viz kap. 3.3). Nejdůležitější aspekty transportu z recyklujících endozomů ukazuje obr. 4.

### **3.3 Společné rysy transportu z časných, maturujících a recyklujících endozomů**

Protože recyklující endozomy jsou zvláštní populací časných endozomů, sdílejí dráhy retrográdního transportu z obou těchto kompartmentů řadu společných znaků.



**Obr. 4: Transport z recyklujících endozomů do TGN**

V retrográdním transportu je klíčová GTPáza Rab6 lokalizovaná na GA, a to její isoforma Rab6A' a v menší míře Rab6A. Protein R6IP1 (Rab6 interacting protein 1, protein 1 interagující s Rab6) může sloužit jako spojovací článek mezi recyklujícími endozomy a TGN protože váže jak Rab6 tak Rab11 (marker recyklujících endozomů). Dalším takovým spojovacím prvkem by mohl být FIP1/RCP (FIP1/RCP - Rab11-family interacting protein 1/Rab-coupling protein, protein 1 interagující s rodinou Rab11/protein párující s Rab), vazebný partner Rab11, který interaguje s TGN golginem-97. Další faktory retrográdního transportu z RE působící na TGN jsou označeny modře. Lipid fosfatidylserin (PS), vyskytující se na recyklujících endozomech, se ukázal být také zásadní. Váže protein evertin-2 (Evt-2), který dále interaguje s malým proteinem 2 aktivujícím Arf-GTPázu (SMAP2). Proteiny transportovány touto dráhou jsou vyznačeny červeně.

(EEA1 – early endosomal antigen 1, časně endozomální antigen 1; STX – Shiga toxin; VAMP4 - vesicle-associated membrane protein 4, membránový protein 4 asociovaný s vezikuly; GS – Golgi SNARE; TMF/ARA160 - TATA element modulatory factor/androgen receptor activator of 160kDa, modulační faktor TATA elementu/aktivátor androgenního 160kDa receptoru; GPP130 - Golgi phosphoprotein of 130 kDa, fosfoprotein o hmotnosti 130 kDa přítomný v GA; COG – conserved oligomeric Golgi complex, konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný na Golgiho aparátu; GARP - Golgi associated retrograde protein complex, retrográdní proteinový komplex asociovaný s Golgiho aparátem)

Ve vezikulárním transportu jsou nepostradatelné proteiny SNARE (soluble N-ethyl maleimide sensitive factor adaptor protein receptor, receptor pro adaptorový protein rozpustného faktoru citlivého k N-ethylmaleimidu), pomocí kterých dojde k zachycení váčku a jeho fúzi s cílovou membránou. Vždy se jedná o SNARE proteiny na cílové membráně, tzv. tSNARE (target, cílové SNARE), a SNARE na váčku, tzv. vSNARE (vesicle, vezikulární SNARE). V transportu z časných i recyklujících endozomů na TGN fungují dva SNARE komplexy. Jedním je komplex TGN tSNARE, tvořený proteiny STX6/STX16/Vti1a (STX, syntaxin), který váže vSNARE VAMP4. Druhým SNARE komplexem je STX5/Ykt6/GS28/GS15 (GS, Golgi SNARE), kde

proteiny STX5 a GS28 jsou TGN tSNARE a proteiny GS15 a Ykt6 potenciální vSNARE (Amessou *et al.*, 2007; Ganley *et al.*, 2008; Mallard *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2004). Se SNARE proteiny interagují ještě tzv. „tethering“ faktory, které usnadňují zachycení vakuoly na cílovou membránu před tím, než začnou fungovat SNARE proteiny. Se SNARE komplexem STX6/STX16/Vti1a/VAMP4 kooperuje komplex GARP (Golgi associated retrograde protein complex, retrográdní proteinový komplex asociovaný s Golgiho aparátem) tvořený proteiny Vps52-Vps53-Vps54 (Liewen *et al.*, 2005; Pérez-Victoria a Bonifacino, 2009). Druhým takovým komplexem, který interaguje se SNARE nacházejícími se na TGN je komplex COG (conserved oligomeric Golgi complex, konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný na Golgiho aparátu). COG interaguje s STX6, STX5 a STX16. Klíčovou podjednotkou COG komplexu pro tuto interakci je Cog6 (Kudlyk *et al.*, 2013; Laufman *et al.*, 2011).

Kromě GTPázy Rab se regulace vezikulárního transportu v buňce účastní ještě GTPázy Arf a GTPázy Arl. V retrográdním transportu z časných endozomů a recyklujících endozomů hraje roli Arf1 a její regulátor AGAP2 (Arf GTPase activating protein 2, protein 2 aktivující GTPázu Arf) (Shiba *et al.*, 2010). Jak ukazuje Nakai *et al.* (2013), pro retrográdní transport je potřeba Arf1 v kombinaci s GTPázou Arf4. GTPáza Arf1 také hlavní regulátor transportu pomocí COPI vakuol přes GA (viz kapitola 4.1). Její funkce v transportu z endozomů do TGN může vnášet nejasnosti do výzkumu transportu z GA do ER. Kromě již zmíněných je důležitý také protein Arl5b přítomný na TGN (Houghton *et al.*, 2012).

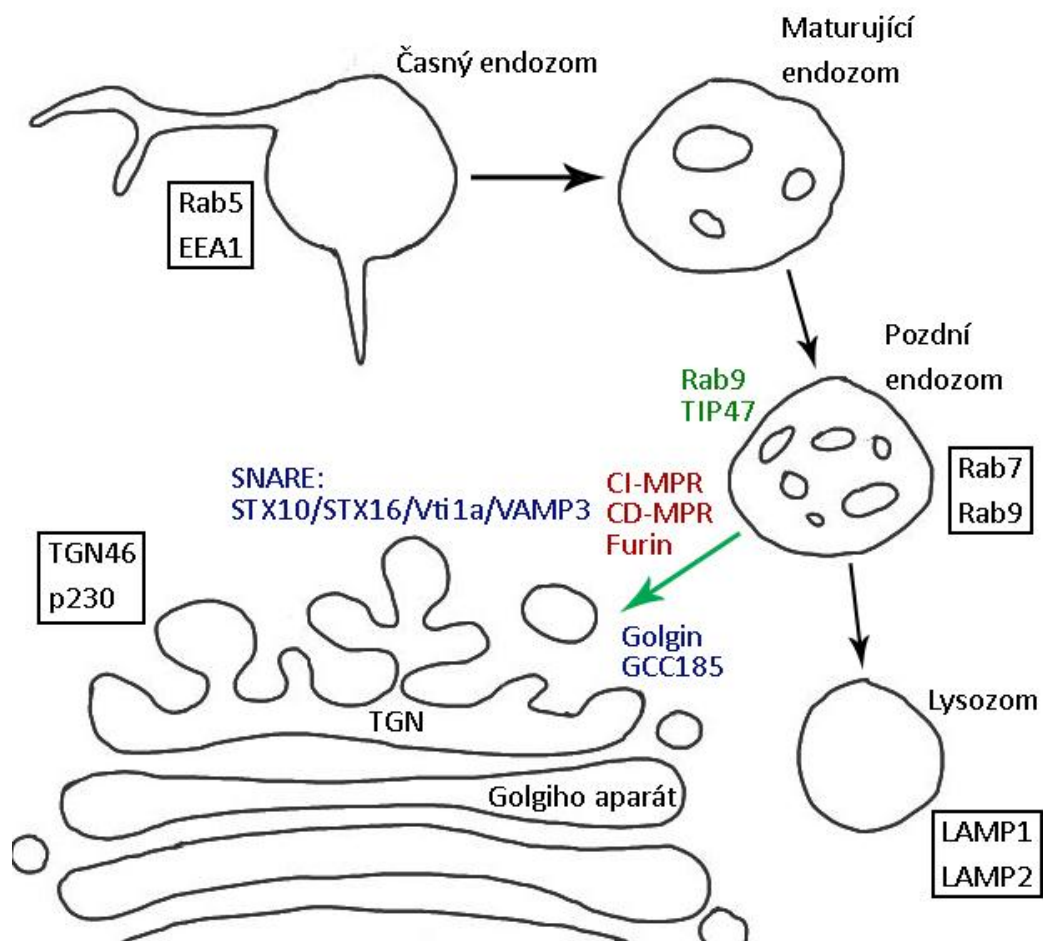
## **3.4 Retrográdní transport z pozdních endozomů**

### **3.4.1 Transport pomocí malé GTPázy Rab9**

V transportu z pozdních endozomů do ER se ukázala být klíčovou GTPáza Rab9 (Lombardi *et al.*, 1993). Touto cestou jsou transportovány oba typy manózo-6-fosfátových receptorů, jak na kationtech závislý (CD-MPR, cation dependent MPR), tak na kationtech nezávislý (CI-MPR). Dále byly objeveny dva proteiny interagující s GTPázou Rab9 a hrající roli v retrográdním transportu MPR. Jedná se o protein p40 a protein TIP47 (MPR tail interacting protein of 47 kDa, 47 kDa protein interagující s „ocáskem“ MPR) (Díaz *et al.*, 1997; Díaz a Pfeffer, 1998). Důležitější je protein TIP47, který zprostředkovává vazbu Rab9 s vázaným GTP k MPR (Carroll *et al.*, 2001). Vizualizace transportních kompartmentů mezi pozdními endozomy a TGN ukázala, že se jedná spíše o vakuoly než tubulární útvary a že obsahují Rab9. Na pozdních endozomech bylo navíc možné odlišit membránové domény obsahující buď Rab9 nebo Rab7 (Barbero *et al.*, 2002). Protože se jedná o vezikulární transport, hrají i zde roli SNARE proteiny a „tethering“ faktory. SNARE komplex potřebný pro transport z pozdních endozomů je odlišný od komplexů

účastnících se transportu z časných a recyklujících endozomů. Jedná se o komplex TGN tSNARE skládající se z proteinů STX10/STX16/Vti1a a vSNARE VAMP3 (Ganley *et al.*, 2008). „Tethering“ faktor GCC185 je však tentýž jako v dráze z recyklujících endozomů a přímo interaguje s Rab9 (Reddy *et al.*, 2006). Burguete a kolektiv (2008) navrhli model, kde je nejprve cytosolický GCC185 vázán k Rab9, odtud je předán na GTPázu Rab6 vázanou na TGN. Během tohoto přiblížení váčku a membrány TGN by mohlo dojít k interakci SNARE proteinů a fúzi váčku s TGN.

Nová studie ukazuje, že kromě MPR je touto dráhou z pozdních endozomů retrográdně transportována endopeptidáza furin (Chia *et al.*, 2011). Dráhu z pozdních endozomů do TGN zobrazuje obr. 5.



**Obr. 5: Transport z pozdních endozomů do TGN**

Transport z pozdních endozomů do TGN zprostředkovává malá GTPáza Rab9, která v GTP-formě váže náklad (červeně), a to pomocí proteinu TIP47 (MPR tail interacting protein of 47 kDa, 47 kDa protein interagující s „ocáskem“ MPR). Modře jsou označeny faktory transportu z pozdních endozomů působících na TGN.

(EEA1 – early endosomal antigen 1, časně endozomální antigen 1; LAMP – lysosom associated membrane protein, membránový protein asociovaný s lysozomy; STX – syntaxin; VAMP3 – vesicle associated membrane protein 3, membránový protein 3 asociovaný s vezikuly; CI-MPR, CD-MPR – cationt independent-, cationt dependent-mannose-6-phosphate receptor, na kationtech nezávislý, na kationtech závislý manózo-6-fosfátový receptor)

### 3.4.2 Transport pomocí malé GTPázy Rab7b

Nejnovější studie ukazují existenci další retrográdní dráhy z pozdních endozomů regulované GTPázou Rab7b. Rab7b je homologem Rab7, nachází se na pozdních endozomech a lysozomech a byla poprvé popsána na buňkách imunitního systému (Yang *et al.*, 2004). Ukázalo se však, že je přítomná i v jiných buněčných liniích a kromě pozdních endozomů a lysozomů se nachází ještě na TGN. Navíc je nezbytným faktorem retrográdního transportu z endozomů do TGN, což bylo ukázáno na transportu proteinu CI-MPR, podjednotky B Cholera toxinu (CTxB) a později i sortilinu (Progida *et al.*, 2010; Progida *et al.*, 2012). Protože se jedná o recentní studie, není zatím známo, zda se skutečně jedná o novou nezávislou dráhu, nebo zda Rab7b kooperuje v transportu s Rab9 případně s retromerem.

## 4. Retrográdní transport z Golgiho aparátu do endoplasmatického retikula

### 4.1 Transport zprostředkovaný COPI váčky

První objevenou a známější retrográdní cestou přes Golgiho aparát do endoplasmatického retikula je transport pomocí COPI váček. Ten ale zároveň funguje i v anterográdním transportu skrz GA. Za vazbu nákladu a zakřivení membrány vznikajících váček je zodpovědný tzv. coatomer. To je komplex 7 proteinů skládající se ze dvou subkomplexů. Prvním je trimer podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta'$  a  $\epsilon$ , který formuje vnější obal váčku a zakřivení membrány, druhým subkomplexem je tetramer podjednotek  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\zeta$  tvořící vnitřní vrstvu coatomeru, ke které je vázán náklad. Coatomer na membráně Golgiho aparátu váže náklad, což je typicky KDEL receptor. Sekvenci aminokyselin KDEL obsahují proteiny cílené do endoplasmatického retikula. Kromě nákladu váže coatomer ještě membránové proteiny z rodiny p24, které jsou také důležitými faktory pro vznik COPI váčku (přehledně zpracováno v Popoff *et al.*, (2011)). Mezi proteiny využívající cestu pomocí COPI patří kromě proteinů endoplasmatického retikula protein ERGIC-53, který se nachází na intermediálním kompartmentu ER-GA (ERGIC) (Schindler *et al.*, 1993).

#### 4.1.1. Regulace transportu pomocí COPI váček

Celý proces transportu z GA do ER pomocí COPI reguluje GTPáza Arf1 (ADP-ribosylation factor 1, ADP-ribosylační faktor 1). Arf1 se váže v GTP-formě do membrán, dimerizuje a umožňuje sestavení coatomerní sítě (Beck *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 1993). Hydrolyza GTP na GDP zajišťuje zahrnutí nákladu do váčku (Lanoix *et al.*, 1999; Malsam *et al.*, 1999; Pepperkok *et al.*, 2000) a také rozbalení váčku, tedy uvolnění coatomeru z membrán (Goldberg, 1999). Nová studie je částečně v rozporu s těmito poznatky. Tvrdí, že GTPáza Arf1 v GTP-formě je potřeba pro vznik



i odstřížení váčku, ale že není nutná hydrolyza GTP na GDP. Váček pak ale zůstane obalený coatomerem (Adolf *et al.*, 2013). Za prvotní zakřivení váčku je zřejmě zodpovědný coatomer, k odstřížení váčku z Golgiho aparátu pak slouží dimer GTP-Arf1 (viz obr. 6) (Beck *et al.*, 2011).

Procesy spojené s GTP-Arf1 nebo GDP-Arf1 regulují proteiny GAP (GTPase activating protein, protein aktivující GTPázu) a GEF (guanosin nucleotide exchange factor, faktor vyměňující guanosinový nukleotid). Proteiny GAP aktivují hydrolytickou aktivitu GTPázy, dojde k rozštěpení GTP na GDP a fosfát, což obvykle GTPázu inaktivuje. Proteiny GEF katalyzují výměnu GDP za GTP a tím obvykle GTPázu aktivují.

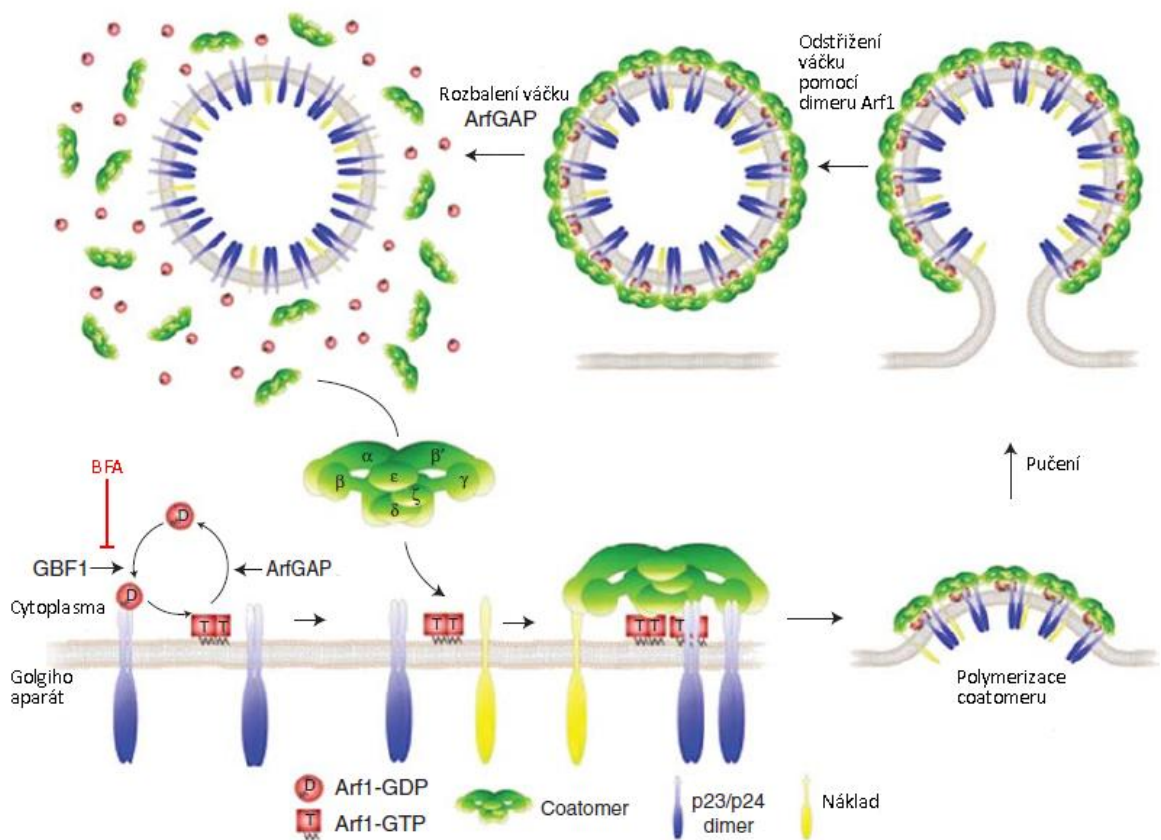
Jako GEF slouží na úrovni Golgiho aparátu protein GBF1 (Golgi brefeldin A-resistance factor, faktor resistance k brefeldinu A lokalizovaný na GA) (Kawamoto *et al.*, 2002). Funkce GBF1 je inhibována brefeldinem A (BFA) a tak je celý transport pomocí COPI citlivý k BFA (García-Mata *et al.*, 2003). Protein GBF1 tak hraje roli v indukci tvorby COPI váčku, protože je zodpovědný za vznik GTP-Arf1 (viz obr. 6).

Jako GAP slouží pro Arf1 tři proteiny, ArfGAP1, ArfGAP2 a ArfGAP3. Ty tedy aktivují GTPázu Arf1 aby štěpila vázané GTP na GDP. Mohou tedy hrát funkci ve výběru nákladu do COPI váčku a v dalších fázích při odpadnutí coatomeru z vytvořeného váčku (viz obr. 6). První objevený byl ArfGAP1 (Lanoix *et al.*, 2001), později byly nalezeny ještě zbylé dva (Frigerio *et al.*, 2007). Všechny tři proteiny se ve svých funkcích překrývají, pouze absence všech vede k narušení retrográdního transportu pomocí COPI váčků (Saitoh *et al.*, 2009). ArfGAP1 má ale i funkce nezávislé na COPI a je schopný se vázat sám do zakřivených membrán, zatímco ArfGAP2 a ArfGAP3 se na membrány vážou pouze v přítomnosti coatomeru (Bigay *et al.*, 2003; Weimer *et al.*, 2008). Nejnovější práce naznačují, že ArfGAP1 možná není vůbec potřeba pro tvorbu COPI váčku, mohl by tedy hrát roli pouze v jeho rozbalení (Asp *et al.*, 2009; Kartberg *et al.*, 2010).

Kromě těchto základních regulací ovlivňují vznik COPI váčku na Golgiho aparátu další faktory. K nim patří proteiny BARS (brefeldin A ADP-ribosylated substrate, BFA ADP-ribosylovaný substrát) a endophilin B. Oba interagují s ArfGAP1 a zřejmě pozitivně ovlivňují pučení COPI váčku (Yang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). Dále je pro vznik COPI váčku potřeba diacylglycerol (DAG) vznikající z kyseliny fosfatidové působením enzymu fosfatidát fosfohydrolázy (Asp *et al.*, 2009; Fernández-Ulibarri *et al.*, 2007). Carvou a kolektiv (2010) také ukázali, že pro retrográdní transport z GA do ER je nezbytná výměna fosfatidylinositolu za fosfatidylcholin pomocí PITP $\beta$  (phosphatidylinositol transfer protein  $\beta$ , protein  $\beta$  přesouvající fosfatidylinozitol).

O tom zda vznikne COPI transportní membránový útvar účastníci se retrográdního nebo anterográdního transportu se rozhoduje až poté, co začne coatomer deformovat membránu. LPAAT $\gamma$  (lysophosphatidic acid acyltransferase  $\gamma$ , acyltransferáza  $\gamma$  lysofosfatidové kyseliny)

reguluje vznik COPI váčků pro retrográdní transport. Působením jiného enzymu vznikají COPI tubulární útvary účastníci se transportu anterográdního (Yang *et al.*, 2011).



**Obr. 6: Mechanismus vzniku a rozbalení COPI váčku**

GTPáza Arf1 se v GTP-formě váže do membrány Golgiho aparátu a vytváří dimer. Výměna GDP za GTP je umožněna pomocí proteinu GBF1 (Golgi brefeldin A-resistance faktor, faktor resistance k brefeldinu A lokalizovaný na GA). Funkci GBF1 inhibuje brefeldin A (BFA) a blokuje tak transport pomocí COPI váčků. GTP-Arf1 umožňuje vazbu coatomeru na membránu GA. Coatomer váže proteiny z rodiny p24 a náklad (např. KDEL receptor). Pro výběr nákladu do COPI váčku je nezbytná GTPáza Arf1. Na membránu GA se váže mnoho coatomerních jednotek, které nakonec vytváří síť (polymerizují) a při tom dochází k zakřivení membrány a pučení váčku. Dimerní GTPáza Arf1 je pak nezbytná pro odstřížení váčku. Když dojde k hydrolyze GTP vázaného na Arf1, dojde k rozpadu coatomerní sítě, uvolnění coatomeru z membrány a tedy rozbalení váčku. Hydrolyzu GTP reguluje ArfGAP (protein aktivující GTPázu Arf), konkrétně ArfGAP2, ArfGAP3 a také ArfGAP1, jehož funkce je méně jasná (viz text). (Převzato a upraveno dle přehledného článku Popoff *et al.* (2011))

## 4.2 Transport pomocí malé GTPázy Rab6

Druhá retrográdní cesta přes Golgiho aparát do endoplasmatického retikula je zprostředkováná GTPázou Rab6 (Girod *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1997; White *et al.*, 1999), která hraje roli také v transportu z recyklujících endozomů do Golgiho aparátu (viz kapitola 3.2). Existují dvě izoformy Rab6, a to Rab6A a Rab6A' (Echard *et al.*, 2000). Obě tyto formy se účastní retrográdního transportu z Golgiho aparátu do ER, přestože izoforma Rab6A' se ukázala být účinnější než Rab6A (Del Nery *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2005).

GTPáza Rab6 je aktivní v GTP-formě. Transport, který zprostředkovává je závislý na mikrotubulech (Martinez *et al.*, 1997). Rab6 interaguje s molekulárním motorem dyneinem, který slouží k transportu po mikrotubulech. Tato interakce se odehrává pomocí proteinů bicaudal-D1 nebo bicaudal-D2 (BICD1 a BICD2), který váže komplex dynactinu a dyneinu (Matanis *et al.*, 2002; Short *et al.*, 2002). Novější studie ukázala, že Rab6 je schopná vázat lehký řetězec dyneinu, DYNLRB1, přímo (Wanschers *et al.*, 2008). Kromě mikrotubulů hraje v tvorbě transportních váčků spojených s GTPázou Rab6 roli také aktin-myosinový komplex (Miserey-Lenkei *et al.*, 2010). Retrogradní transport závislý na Rab6 je regulován proteinem Yip1A nacházejícím se na intermediálním kompartmentu ER-GA (ERGIC). Yip1A pozitivně ovlivňuje vazbu Rab6 do membrán (Kano *et al.*, 2009).

Retrogradní transport pomocí GTPázy Rab6 na úrovni Golgiho aparátu reguluje dráhy definované ZW10/RINT1 (Zeste White 10/RAD50-interacting protein 1, Zeste White 10/protein 1 interagující s RAD50) a COG komplexem. Oba slouží nejspíš jako „tethering“ faktory (Sun *et al.*, 2007).

Kromě Rab6 se na Golgiho aparátu nachází ještě malá GTPáza Rab33b. Ukázalo se, že na rozdíl od Rab6, která je zastoupena spíše na *trans*-straně GA, se Rab33b nalézá na středním GA. Zdá se, že Rab33b má podobné vlastnosti v retrogradním transportu jako Rab6, ale její funkce následuje až po Rab6. To naznačuje, že by v rámci retrogradního transportu na Golgiho aparátu mohlo docházet k podobné výměně Rab GTPáz jako při maturaci časných endozomů v pozdní (Starr *et al.*, 2010). Tuto teorii podporuje i další práce, ve které byl popsán komplex proteinů Ric1 a Rgp1 (ribosome control 1 a retrograde Golgi transport protein 1, protein kontrolující ribozom 1 a protein retrogradního transportu přes Golgiho aparát 1) jako efektor GTPázy Rab33b. Heterokomplex Ric1-Rgp1 váže Rab33b v GTP-formě a následně katalyzuje výměnu GDP za GTP na GTPáze Rab6 (Pusapati *et al.*, 2012).

Pomocí Rab6 jsou přes Golgiho aparát retrogradně transportovány glykosylační enzymy (glykosyltransferázy) lokalizované v GA a B-podjednotka Shiga toxinu (Girod *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999). Nová studie ukázala, že tento transport využívá také caveolin-2 na své cestě přes GA a ER do jádra (Jeong *et al.*, 2012).

## 5. Přímá cesta z endozomů do ER?

Existuje přímý transport nákladu z endozomů do endoplasmatického retikula, který se vyhýbá Golgiho aparátu? Polyomaviry, které nikdy nebyly v Golgiho aparátu pozorovány, prochází endozomy a endoplasmatickým retikulem na své cestě do jádra (viz kap. 7.2). Transport cholesterolu do ER z pozdních endozomů a lysozomů je také nejasný. Existují zřejmě dvě dráhy transportu cholesterolu do ER, jedna přes cytoplasmatickou membránu a druhá přímá z pozdních

endozomů a lysozomů do ER (Neufeld *et al.*, 1996; Underwood *et al.*, 1998). Nejnovější studie ukazují, že mezi pozdními endozomy a endoplasmatickým retikulem vznikají kontaktní místa, tzv. meziorganelární membránová kontaktní místa (inter-organelle membrane contact sites) (Eden *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2009). Pro jejich vznik jsou zřejmě zásadní proteiny STARD3 (StAR related lipid transfer domain 3, doména 3 přenášející lipidy příbuzná StAR) a STARD3NL (STARD3 N-terminal like, protein N-terminálně podobný STARD3) nacházející se na pozdních endozomech, které mohou na ER vázat proteiny VAP (VAMP-associated proteins, proteiny asociované s VAMP) (Alpy *et al.*, 2013). S proteiny VAP interaguje také komplex složený z GTPázy Rab7 a proteinu RILP (Rab7 interacting lysosomal protein, lysozomální protein interagující s Rab7) s vázaným molekulárním motorem dyneinem (Rocha *et al.*, 2009). Komplex Rab7 a RILP slouží k transportu pozdních endozomů a lysozomů z periferie buňky směrem k jádru (Johansson *et al.*, 2007).

Elektronová mikroskopie ukazuje, že v meziorganelárních membránových kontaktních místech vznikají drobná membránová spojení mezi pozdními endozomy (popř. lysozomy) a ER. Navíc ER těsně obaluje pozdní endozom, se kterým je v kontaktu. Uvažuje se, že by kontaktními místy mohl být transportován receptor pro epidermální růstový faktor procházející přes ER do jádra (Alpy *et al.*, 2013; Eden *et al.*, 2010). Hladina cholesterolu v pozdních endozomech ovlivňuje vznik meziorganelárních membránových kontaktních míst, proto existuje možnost, že i cholesterol je transportován do ER přes tato místa (Rocha *et al.*, 2009).

## 6. Retrogradní transport toxinů

Některé rostlinné a bakteriální toxiny vstupují do buněk endocytózou a putují retrogradně do endoplasmatického retikula. Z ER unikají do cytoplasmy, kde různě interferují s přirozenými buněčnými mechanismy. Pro tuto práci jsem vybrala popis retrogradního transportu bakteriálního Shiga toxinu a rostlinného toxinu ricinu, protože se vzájemně odlišují jak svou cestou do endoplasmatického retikula, tak mírou prozkoumanosti jejich transportu.

### 6.1 Retrogradní transport Shiga toxinu

Shiga toxin (STx) je proteinový toxin produkováný bakterií *Shigella dysenteriae*. Patří do skupiny tzv. AB<sub>5</sub> toxinů. Skládá se z katalytické podjednotky A a pěti podjednotek B. Podjednotka B (STxB) je zodpovědná za retrogradní transport celého toxinu, protože je i sama schopná být retrogradně transportována stejným způsobem jako celý Shiga toxin (Sandvig *et al.*, 1994). Původní práce ukázaly, že STx je transportován z plasmatické membrány přes endozomy do Golgiho aparátu a z něj dál až do endoplasmatického retikula (Sandvig *et al.*, 1991; Sandvig *et al.*,

1992). Poté, co se ukázalo, že STxB je transportována z recyklujících endozomů přímo do GA a vyhýbá se tedy pozdním endozomům (Mallard *et al.*, 1998), se stal Shiga toxin účinným nástrojem studia tohoto retrográdního transportu. Díky němu byla odhalena dráha z recyklujících endozomů závislá na Rab6 (Mallard *et al.*, 2002) popsaná v kapitole 3.2. Také cesta přes Golgiho aparát pomocí Rab6 byla odhalena při studiu transportu STx do ER (Girod *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999), viz kapitola 4.2.

Pro transport STx z endozomů do Golgiho aparátu tedy platí poznatky popsané v kapitole 3.2 a také 3.3. Transport STx z Golgiho aparátu do ER popisuje kapitola 4.2. Kromě těchto mechanismů společných pro STx i pro buněčné proteiny však transport STx má i svá specifika. Aby se Shiga toxin dostal z endozomů do TGN, potřebuje membrány rezistentní k detergentům bohaté na cholesterol (Falguières *et al.*, 2001) a také glykosfingolipidy (Raa *et al.*, 2009). S lipidickým složením membrány souvisí negativní regulace retrográdního transportu STx pomocí annexinu A1. Annexin A1 tvoří pravděpodobně komplex s cytoplasmatickou fosfolipázou A2 (cPLA<sub>2</sub>) a tím inhibuje její funkci v indukci zakřivení membrán (Tcatchoff *et al.*, 2012).

Ukázalo se, že v transportu STx z endozomů do TGN hrají také roli komponenty retromeru, třídící nexiny, zejména SNX1 (Bujny *et al.*, 2007; Utskarpen *et al.*, 2007; Lieu a Gleeson, 2010). Retromer ale funguje na časných a maturujících endozomech. Jak tedy může ovlivňovat transport STx z recyklujících endozomů? McKenzie a kolektiv (2012) přišli s vysvětlením, že SNX1, resp. retromer umožňuje přesun STx z časných endozomů do recyklujících. Odtud je STx transportován do TGN prostřednictvím EHD1 (EPS15 homology domain containing protein 1, protein 1 obsahující homologickou doménu s Eps15).

Kromě golginu GCC185 a golginu-97 (viz kap. 3.2) se ukázal být pro STx důležitý golgin p230 (Yoshino *et al.*, 2005). Také GTPáza Arl1 reguluje transport STx z endozomů do TGN (Nishimoto-Morita *et al.*, 2009). Dalšími proteiny, které hrají roli v transportu STx z endozomů do TGN, jsou „molekulární nůžky“ dynamin (Lauvrak *et al.*, 2004), proteiny ezrin a moesin, které váží aktin, (Kvalvaag *et al.*, 2013) a protonové pumpy, jejichž funkce pro pohyb STx není jasná (Lingelem *et al.*, 2012).

Shiga toxin je navíc schopný regulovat svůj vlastní transport. STx např. aktivuje protein kinázu Cδ (PKCδ), která pak dále stimuluje retrográdní transport STx do TGN (Torgersen *et al.*, 2007). STx také aktivuje protein kinázu p38α, která podporuje přesun STx do TGN (Wälchli *et al.*, 2008). Proti kináze p38α působí β-arrestiny, které transport STx ovlivňují negativně (Skånland *et al.*, 2009). Protein kináza p38α pravděpodobně reguluje také flotillin-1 a flotillin-2, které jsou důležité pro cestu STx z endozomů do TGN (Pust *et al.*, 2010). Navíc se ukázalo, že transport STx záleží na cytoplasmatické koncentraci vápenatých kationů (Wälchli *et al.*, 2008). K transportu Shiga toxinu jsou také nezbytné mikrotubuly a molekulární motor dynein. STx

podporuje vznik mikrotubulů z monomerního tubulinu (Hehnlly *et al.*, 2006). Tento proces je regulován GTPázou Cdc42 z rodiny Rho a její GAP ARHGAP21. Retrográdní transport STx je inhibován neustále aktivní formou Cdc42 (tedy v GTP-formě) nebo nedostatkem ARHGAP21. Shiga toxin tedy využívá GDP-Cdc42 (Hehnlly *et al.*, 2009).

## 6.2 Retrográdní transport ricinu

Ricin je proteinový toxin ze semen rostliny skočce obecného (*Ricinus communis*). Skládá se z katalytické podjednotky A a podjednotky B, která má vlastnosti lektinu (proteinu vážící cukerné oligomery).

Ricin je také jako Shiga toxin endocytován a transportován přes endozomy a Golgiho aparát až do endoplasmatického retikula, odkud uniká katalytická podjednotka A do cytoplasmy (Rapak *et al.*, 1997; van Deurs *et al.*, 1985; van Deurs *et al.*, 1986). Po endocytóze se ricin dostává do časných endozomů charakterizovaných GTPázami Rab5 a Rab4 (Moisenovich *et al.*, 2004). Odtud je transportován do TGN. Tento proces je nezávislý na GTPáze Rab9, řídící retrográdní transport z pozdních endozomů, na GTPáze Rab11 důležité pro transport z recyklujících endozomů a na clathrinu (Iversen *et al.*, 2001). Naopak se ukazuje, že pro přesun ricinu z časných endozomů do TGN jsou potřeba malé GTPázy Rab6A a Rab6A', které se ve své funkci překrývají (Utskarpen *et al.*, 2006). Ricin tedy využívá podobný mechanismus jako Shiga toxin v transportu z recyklujících endozomů.

Podobně jako retrográdní transport Shiga toxinu z endozomů do TGN je i transport ricinu závislý na cholesterolu. Nízká i vysoká hladina cholesterolu v buněčných membránách blokuje přesun ricinu do TGN (Grimmer *et al.*, 2000). Cytoplasmatická koncentrace vápenatých kationtů a dynamin také regulují transport ricinu podobně jako STx (Lauvrak *et al.*, 2002; Llorente *et al.*, 1998). Na rozdíl od STx, glykosfingolipidy nejsou pro tuto cestu potřeba a dokonce jejich nedostatek zvyšuje účinnost transportu ricinu z endozomů do TGN (Grimmer *et al.*, 2006; Spilsberg *et al.*, 2003). Dalším důležitým faktorem je fosfatidylinositol 3-fosfát (PI3P), který vytváří fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K), konkrétně hVps34. Na PI3P se vážou třídící nexiny (SNX), z nichž v retrográdním transportu ricinu hrají roli SNX2 a SNX4 (Skånland *et al.*, 2007). Třídící nexin SNX2 se účastní retrográdního transportu závislého na derlinech (viz kapitola 3.1.4). Bylo zjištěno, že zvýšení výskytu špatně složených proteinů na cytoplasmatické membráně zvýšilo retrográdní transport ricinu z endozomů do GA. Ukázalo se, že transport ricinu je závislý na derlinu-1 (Dang *et al.*, 2011).

Z obecných faktorů se transportu ricinu z endozomů do TGN účastní SNARE proteiny, a to konkrétně STX5, GS15 a STX16, což naznačuje využití dvou různých SNARE komplexů STX5/Ykt6/GS28/GS15 a STX6/STX16/Vti1a/VAMP4 (viz kap. 3.3) (Amessou *et al.*, 2007).

Cesta ricinu z TGN do endoplasmatického retikula je méně známá. Transport ricinu je blokován brefeldinem A (BFA) a nefunkčními mutanty GTPázy Arf1, což by naznačovalo využití COPI váčků v retrográdním transportu ricinu přes Golgiho aparát (Simpson *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1991). BFA má ale širší pole působnosti než jen blokování retrográdního transportu pomocí COPI, způsobuje také tubulaci endozomálních kompartmentů a TGN (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Tooze and Hollinshead, 1992). GTPáza Arf1 navíc funguje i v transportu z endozomů do TGN (Shiba *et al.*, 2010). Ricin pro svůj transport z GA do ER nevyžaduje COPI a dokonce ani GTPázu Rab6A (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003), což by mohlo naznačovat novou retrográdní cestu. Je ale nutno podotknout, že tyto práce nezahrnuly do výzkumu isoformu Rab6A', která byla jinde popsána jako účinnější a důležitější pro retrográdní transport z GA do ER (Del Nery *et al.*, 2006). Cestu ricinu přes GA do ER reguluje cytoplasmatická fosfolipáza A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), která indukuje vznik váčků a tubulů na Golgiho aparátu (Grimmer *et al.*, 2005; Klok et al., 2011).

V buňkách, kde byla narušena struktura a funkce Golgiho aparátu, byl ricin stále schopný transportu z TGN přímo do ER. Tato dráha je rezistentní k brefeldinu A a stále závislá na cholesterolu (Llorente *et al.*, 2003). Zda se však jedná o dráhu existující i v buňkách s funkčním GA není známo.

## **7. Transport malých neobalených dsDNA virů do ER**

### **7.1 Transport papillomavirů z endozomů do ER**

Papillomaviry jsou malé neobalené viry s dvouvláknovou DNA (dsDNA). Mají kruhovou DNA uzavřenou do ikosahedrální kapsidy tvořené hlavním proteinem L1 a minoritním L2. Papillomaviry mají složitý replikační cyklus. Infikují bazální keratinocyty, ale produkce nových virionů probíhá až v diferencovaných keratinocytech. Jsou zodpovědné za vznik benigních i maligních nádorů u lidí a zvířat.

Mechanismus transportu papillomavirů cytoplasmou až do jádra je stále nejasný. Papillomaviry vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. Poté putují do časných endozomů a následně do kyselých pozdních endozomů popř. lyzozomálních kompartmentů (značených proteiny LAMP1 nebo LAMP2) (Day *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2002; Schelhaas *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 1995). V endozomech dochází alespoň k částečnému rozložení virových částic, protein L1 se uvolní z komplexu proteinu L2 a genomu (Day *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2008). Z endozomů je transportován minoritní protein L2 spolu s genomem, prochází přes *trans*-Golgi síťovinu a endoplasmatické retikulum a nakonec se dostává do jádra (viz obr. 7) (Day *et al.*, 2013; Kämper *et al.*, 2006; Laniosz *et al.*, 2009). Únik z pozdních endozomů umožňuje minoritní

protein L2 prostřednictvím interakce s třídícím nexinem 17 (SNX17) (Bergant Marušič *et al.*, 2012; Bergant a Banks, 2013). SNX17 je zodpovědný za recyklaci a třídění různých endogenních proteinů a brání jejich degradaci v lysozomech (Böttcher *et al.*, 2012; Farfán *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2008). Také  $\gamma$ -sekreáza a protein S100A10 (podjednotka heterotetramerního annexinu A2) hrají roli v transportu papillomavirového genomu z pozdních endozomů do jádra (Karanam *et al.*, 2010; Dziduszko a Ozbun, 2013). Únik papillomavirového genomu z pozdních endozomů regulují GTPázy Rab9a a Rab7b (Day *et al.*, 2013), obě zprostředkovávají retrográdní dráhy z pozdních endozomů (viz kapitola 3.4).

Překvapivé zjištění přinesl Lipovsky a kolektiv (2013), který ve své genomické studii odhalil důležitost retromeru pro cestu lidského papillomaviru 16 (HPV16) do TGN. Podle této studie je do TGN transportován i majoritní protein L1, který podle jiných prací zůstává v pozdních endozomech (Day *et al.*, 2013). Retromer navíc funguje na časných a maturujících endozomech charakterizovaných GTPázou Rab5 a Rab7 nikoli na pozdních endozomech obsahujících Rab9 a lysozomální proteiny LAMP1 a LAMP2 (viz kap. 3.1). Otázkou tedy je, zda se jedná o dvě různé cesty papillomavirů do TGN nebo zda může být role retromeru nějak spojená s následným transportem papillomavirů z pozdních endozomů.

Transport papillomavirů se ukázal být závislý na mikrotubulech (Liu *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1995). Tento fakt podpořily další studie, které odhalily, že molekulární motor dynein asociovaný s mikrotubuly je také potřeba pro cestu papillomavirů do jádra. S dyneinem interaguje minoritní protein L2, konkrétně s lehkými řetězci DYNLT1 a DYNLT3 (Florin *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2011). Samotná cesta papillomavirů z TGN do ER je nejasná. Hraje v ní pravděpodobně roli na ER lokalizovaný syntaxin 18 (STX18), což je tSNARE protein, se kterým interaguje protein L2 (Bossis *et al.*, 2005; Hatsuzawa *et al.*, 2000; Laniosz *et al.*, 2007).

## 7.2 Transport polyomavirů z endozomů do ER

Polyomaviry jsou malé neobalené viry s kruhovou dsDNA. Jejich kapsida je ikosahedrální, tvořená majoritním proteinem VP1 a dvěma minoritními VP2 a VP3. Polyomaviry infikují živočichy včetně člověka. Zde se zaměřím na opičí polyomavirus 40 (Simian Virus 40, SV40), myší polyomavirus (MPyV), lidský virus JC (JCV) a lidský virus BK (BKV). JCV a BKV obvykle u člověka nezpůsobují žádná onemocnění, rizikové jsou pouze pro imunosuprimované osoby. Polyomaviry vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou, a poté putují patrně přes endoplasmatické retikulum do jádra. Transport polyomavirů z cytoplasmatické membrány do jádra není stále plně objasněn.

Již první práce ukázaly a novější studie potvrdily, že SV40 je transportován z endozomů do ER a při této cestě neprochází Golgiho aparátem (Engel *et al.*, 2011; Kartenbeck *et al.*, 1989; Pelkmans

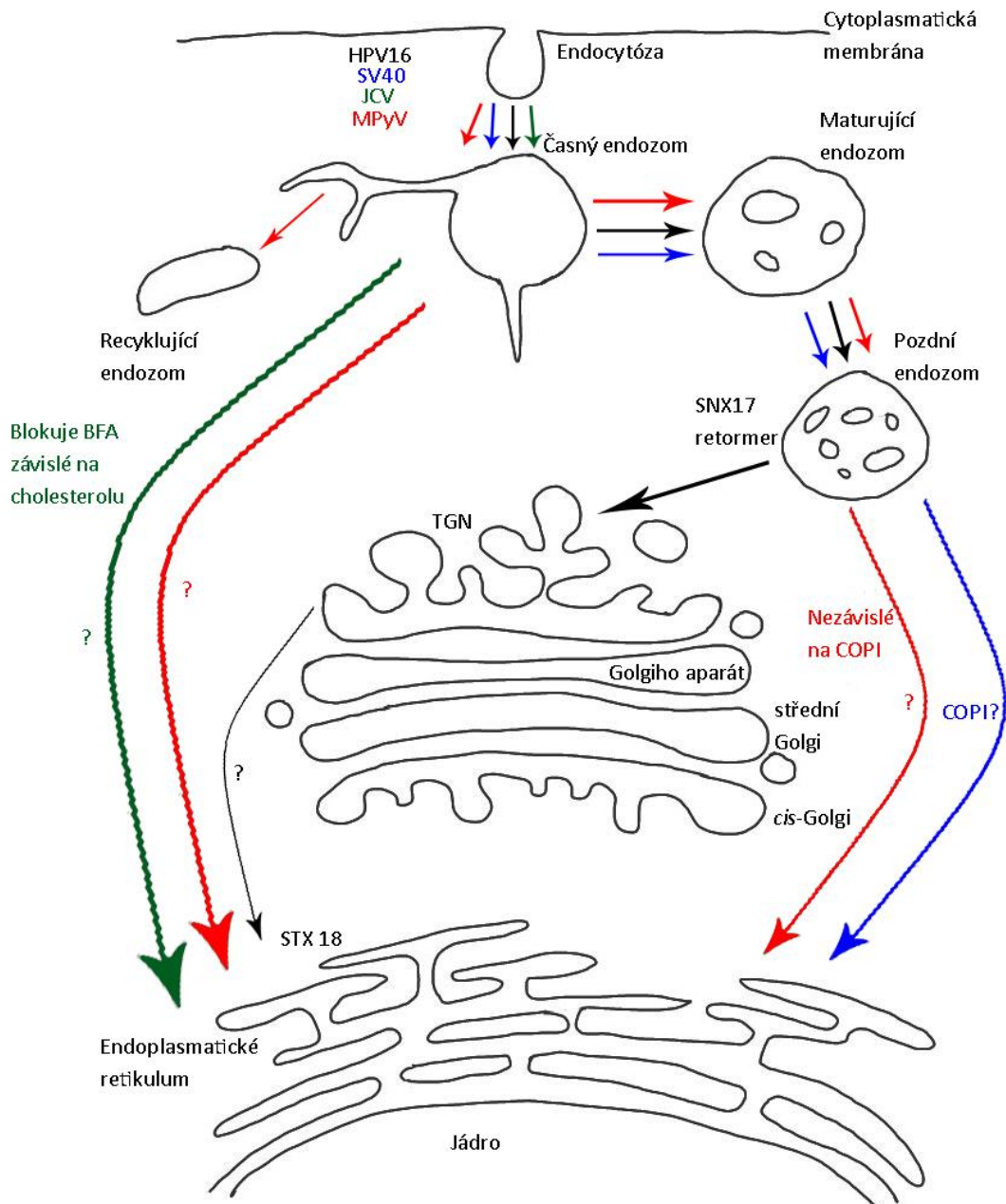


*et al.*, 2001). Transport SV40 je citlivý k brefeldinu A, je blokován nefunkční GTPázou Arf1 i protilátkami proti podjednotce coatomeru  $\beta$ -COP, se kterou i kolokalizuje. Tyto poznatky ukazují, že SV40 využívá COPI váčky (Norkin *et al.*, 2002; Richards, 2002; Norkin a Kuksin, 2005). Spory se vedly o tom, jakými endozomálními kompartmenty SV40 při svém transportu prochází. Dlouho se uvažovalo o kompartmentu obohaceném o caveolin-1, který měl mít spíše neutrální pH (Pelkmans *et al.*, 2001). Nová práce však ukazuje, že SV40 prochází kyselými časnými a pozdními endozomy, odkud je dosud neznámým mechanismem transportován do ER (viz obr. 7). V této cestě je zásadní maturace endozomů, protože neustále aktivní forma GTPázy Rab5 (která brání maturaci časných endozomů v pozdní), inhibovala infekci buněk virem SV40 (Engel *et al.*, 2011).

Lidský virus JC je transportován také přes časně endozomy, potřebuje funkční Rab5 a nízké pH. Neprochází ale přes pozdní endozomy, lysozomy ani GA, je přímo z časných endozomů transportován do ER (viz obr. 7). Tento transport je závislý na cholesterolu a je blokován brefeldinem A, tedy podobně jako transport ricinu z časných endozomů do ER (viz kap. 6.2) (Ashok a Atwood, 2003; Querbes *et al.*, 2006).

Transport viru BK je téměř neznámý, nebyl pozorován v Golgiho aparátu při své cestě do ER a jeho transport je citlivý k brefeldinu A (Low *et al.*, 2006; Moriyama a Sorokin, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Jiang a kolektiv (2009) ukázal také důležitost derlinu-1 pro infekci BKV. Funkci derlinu-1 zde spojují s únikem BKV z ER pomocí ERAD dráhy. Derliny ale také podle nových poznatků hrají roli v retrográdním transportu a účastní se i transportu ricinu z endozomů do GA (Dang *et al.*, 2011). Proto zůstává otázkou, v které fázi transportu BKV z cytoplasmatické membrány do jádra se derlin-1 uplatňuje.

Myší polyomavirus stejně jako SV40 prochází přes časně endozomy a pozdní endozomy, odkud uniká do ER. Při tom nebyl nikdy pozorován v GA (Mannová a Forstová, 2003; Gilbert a Benjamin, 2004; Liebl *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009). Pro tuto cestu jsou důležité funkční GTPázy Rab5 a Rab7 (Qian *et al.*, 2009). Na rozdíl od SV40 však MPyV nevyužívá transport zprostředkovaný COPI (Mannová a Forstová, 2003). Další možností je i přímá cesta z časných endozomů obsahujících membránové oblasti bohaté na cholesterol, protože práce Richterové a kolektivu (2001) ukázala, že někdy dochází k fúzi mezi časnými endozomálními kompartmenty obsahujícími polyomavirové viriony a endoplasmatickým retikulem. Dvě práce ukázaly přítomnost MPyV v recyklujících endozomech (Mannová a Forstová, 2003; Liebl *et al.*, 2006). Mannová a Forstová (2003) ale také ukázaly, že MPyV nekolokalizuje s Rab6 spojenou s transportem z recyklujících endozomů (viz. kap. 3.2). Nová studie ukazuje, že MPyV skutečně do recyklujících endozomů vstupuje, ale tato dráha není důležitá pro produktivní infekci viru (viz obr. 7) (Žíla *et al.*, 2014).



**Obr. 7: Cesty zástupců papillomavirů a polyomavirů z endozomálních kompartmentů do endoplasmatického retikula**

Dráhy transportu malých neobalených virů zůstávají málo poznané, obecně se všechny vyhýbají Golgiho aparátu. Lidský papillomavirus 16 (HPV16, černě) prochází přes časné a maturující endozomy až do pozdních endozomů odkud je jeho genom s minoritním proteinem L2 transportován za pomoci třídícího nexinu SNX17 do TGN. Podle nové studie se v transportu HPV16 z endozomů do TGN uplatňuje také retromer, není však jasné, zda se jedná o novou dráhu nebo účinkuje spolu se SNX17. Transport HPV16 z TGN do ER je nejasný, účastní se jej protein SNARE STX18 nacházející se na ER. Opičí polyomavirus SV40 (modře) prochází také přes časné a pozdní endozomy odkud je transportován do ER neznámým mechanismem. Transportu SV40 se účastní COPI váčky. O transportu lidského viru JC (JCV, zeleně) není mnoho známo, prochází přes časné endozomy, vyhýbá se pozdním endozomům i GA. Dráha JCV je citlivá k brefeldinu A (BFA). Myší polyomavirus (MPyV, červeně) prochází jako SV40 přes časné a pozdní endozomy, jeho další nejasný transport do ER je však nezávislý na COPI váčcích. MPyV možná prochází do ER i přímo z časných endozomů. V průběhu infekce jej můžeme nalézt i v recyklujících endozomech, tato dráha však není důležitá pro produktivní infekci viru.

Společnými rysy transportu všech uvedených zástupců polyomavirů je využití mikrotubulů (Pelkmans *et al.*, 2001; Richterová *et al.*, 2001; Ashok a Atwood, 2003; Gilbert *et al.*, 2003; Damm *et al.*, 2005; Moriyama a Sorokin, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2011) a potřeba nízkého pH v endozomech (Ashok a Atwood, 2003; Liebl *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2011).

Kromě toho jsou pro polyomaviry klíčové jejich receptory, které umožňují jak vstup, tak jejich další cestu cytoplasmou až do ER (Tsai *et al.*, 2003; Gilbert a Benjamin, 2004; Low *et al.*, 2006). Transport polyomavirů JCV, BKV a SV40 je také blokován inhibitorem transportu Shiga toxinu, Cholera toxinu a ricinu. To naznačuje, že transport jak těchto toxinů tak polyomavirů do ER sdílí některé společné rysy (Nelson *et al.*, 2013). Objev, že retromer je využíván lidským papillomavirem 16 přinesl myšlenku, zda není retromer potřeba také pro transport polyomavirů (Bradbury, 2013; Lipovsky *et al.*, 2013). Lipovsky a kolektiv (2013) sice ukázal, že retromer s majoritním proteinem VP1 viru SV40 přímo neinteraguje, neznamená to ale, že tato případná interakce nemůže být nepřímá, nebo využívaná jinými polyomaviry. Také není známo, zda polyomaviry neprocházejí při svém transportu *trans*-Golgi síťovinou (TGN). Všechny práce sice ukazují, že polyomaviry se nevyskytují v Golgiho aparátu, ale pouze jedna na základě elektronové mikroskopie tvrdí, že SV40 neprochází TGN (Engel *et al.*, 2011).

Kromě toho nedávno objevené membránové kontakty mezi pozdními endozomy a endoplasmatickým retikulem mohou představovat novou přímou cestu z endozomů do ER (viz kap. 5). Pokud by se v budoucnu ukázalo, že těmito útvary skutečně dochází ke vstupu endozomálního obsahu do ER, bylo by zajímavé zjistit, zda tuto cestu mohou využívat i polyomaviry.

## 8. Závěr

Retrográdní transport je pro buňku nezbytný proces, kterým se vrací receptory a další proteiny z endozomů zpět na původní membránu Golgiho aparátu nebo endoplasmatického retikula poté co vykonají svou funkci. Bez funkčního retrográdního transportu by buňka vydávala obrovské množství energie na neustálou syntézu nových receptorů, protože by docházelo k jejich degradaci v lysozomech.

Jak popisuje tato práce, drah pro retrográdní transport mezi endozomy, Golgiho aparátem a endoplasmatickým retikulem je velké množství a velmi pravděpodobně ještě další čekají na objevení. Ač se mohou zdát jednotlivé dráhy velmi odlišné, přesto mají několik společných rysů. Všechny uvedené retrográdní cesty jsou charakterizovány různými GTPázami, které mají zásadní regulační funkci. Obvykle je potřeba jejich aktivní forma s vázaným GTP, která je schopná vázat se do membrán. Další podobností je využití proteinů SNARE pro fúzi transportního útvaru, ať již vakuoly či tubuly, s cílovou membránou. Konečně transportní membránové útvary obvykle vznikají v závislosti na rozeznání specifického nákladu receptorem.

Retrográdní transport zneužívají také některé toxiny a malé neobalené DNA viry. Do buněk vstupují receptorem zprostředkovanou endocytózou, dostanou se do endozomální sítě a odtud se přesouvají do endoplasmatického retikula a v případě virů dále do jádra. Znalost retrográdních drah využívaných těmito cizorodými proteinovými útvary je ale značně rozdílná. Transport Shiga toxinu je například velmi dobře znám, byla díky němu popsána retrográdní dráha pomocí Rab6. Je proto využíván jako modelová molekula pro studium tohoto transportu. Naopak retrográdní transport ricinu a transport malých neobalených dsDNA virů do endoplasmatického retikula je spíše nejasný. Poměrně výrazná je role cholesterolu a mikrotubulárního cytoskeletu v transportu virů i toxinů. Přesto pro papillomaviry a polyomaviry platí, že jejich cesta z endozomů do ER není zřejmá.

Tato práce podává ucelený přehled o drahách retrográdního transportu. Popisuje jejich nejdůležitější faktory a regulace. Nové metody a nové objevy přispívají k dalšímu studiu vezikulárního transportu. Tyto poznatky lze pak dále využít pro studium transportu bakteriálních i rostlinných toxinů, které může sloužit k vývoji účinných léčiv. Také lze nové znalosti použít pro studium transportu malých neobalených DNA virů, který zůstává i nadále záhadou. To může být užitečné i pro aplikovaný výzkum, protože virům podobné částice odvozené od kapsidových proteinů malých neobalených virů lze využít pro doručování léčiv či genů do buněk. Konečně řada chorob je spojená s poškozeným nebo nefunkčním retrográdním transportem. Jeho studium může vést k odhalení možnosti léčby takových onemocnění.

## Seznam použité literatury

- Adolf, F., Herrmann, A., Hellwig, A., Beck, R., Brügger, B. and Wieland, F. T. (2013). Scission of COPI and COPII vesicles is independent of GTP hydrolysis. *Traffic* **14**, 922–32.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J. Cell Sci.* **126**, 5500–12.
- Amessou, M., Fradagrada, A., Falguières, T., Lord, J. M., Smith, D. C., Roberts, L. M., Lamaze, C. and Johannes, L. (2007). Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell Sci.* **120**, 1457–68.
- Antony, C., Cibert, C., Géraud, G., Santa Maria, A., Maro, B., Mayau, V. and Goud, B. (1992). The small GTP-binding protein Rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* **103**, 785–96.
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S. (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* **165**, 123–33.
- Ashok, A. and Atwood, W. J. (2003). Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and Simian Virus 40. *J. Virol.* **77**, 1347–1356.
- Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsner, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K. A., Valentijn, J. A., Koster, A. J., et al. (2009). Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* **20**, 780–90.
- Barbero, P., Bittova, L. and Pfeffer, S. R. (2002). Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* **156**, 511–8.
- Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brügger, B., Béthune, J., et al. (2008). Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11731–6.
- Beck, R., Prinz, S., Diestelkötter-Bachert, P., Röhling, S., Adolf, F., Hoehner, K., Welsch, S., Ronchi, P., Brügger, B., Briggs, J. a G., et al. (2011). Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J. Cell Biol.* **194**, 765–77.
- Belenkaya, T. Y., Wu, Y., Tang, X., Zhou, B., Cheng, L., Sharma, Y. V., Yan, D., Selva, E. M. and Lin, X. (2008). The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **14**, 120–31.
- Bergant, M. and Banks, L. (2013). SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *J. Virol.* **87**, 1270–3.
- Bergant Marušič, M., Ozbun, M. a, Campos, S. K., Myers, M. P. and Banks, L. (2012). Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* **13**, 455–67.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. and Antonny, B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563–6.
- Bole, D. G., Dowin, R., Doriaux, M. and Jamieson, J. D. (1989). Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 1817–1823.
- Bossis, I., Roden, R. B. S., Gambhira, R., Yang, R., Tagaya, M., Howley, P. M. and Meneses, P. I. (2005). Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J. Virol.* **79**, 6723–31.
- Böttcher, R. T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H.-Y. and Fässler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of  $\beta$ 1 integrins by binding to the  $\beta$ 1-integrin tail. *Nat. Cell Biol.* **14**, 584–92.
- Bradbury, F. A. (2013). Potential role for the retromer complex in polyomavirus infection. *Future Virol.* **8**, 215–217.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M. (1992). The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715–28.

- Bugarcic, A., Zhe, Y., Kerr, M. C., Griffin, J., Collins, B. M. and Teasdale, R. D.** (2011). Vps26A and Vps26B subunits define distinct retromer complexes. *Traffic* **12**, 1759–73.
- Bujny, M. V., Popoff, V., Johannes, L. and Cullen, P. J.** (2007). The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *J. Cell Sci.* **120**, 2010–21.
- Burguete, A. S., Fenn, T. D., Brunger, A. T. and Pfeffer, S. R.** (2008). Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* **132**, 286–98.
- Canuel, M., Lefrançois, S., Zeng, J. and Morales, C. R.** (2008). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 724–30.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M. J., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T. and Cullen, P. J.** (2004). Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr. Biol.* **14**, 1791–800.
- Carlton, J. G., Bujny, M. V., Peter, B. J., Oorschot, V. M. J., Rutherford, A., Arkell, R. S., Klumperman, J., McMahon, H. T. and Cullen, P. J.** (2005). Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *J. Cell Sci.* **118**, 4527–39.
- Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. and Pfeffer, S. R.** (2001). Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* **292**, 1373–6.
- Carvou, N., Holic, R., Li, M., Futter, C., Skippen, A. and Cockcroft, S.** (2010). Phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-transfer activity of PITPbeta is essential for COPI-mediated retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **123**, 1262–73.
- Collins, B. M., Norwood, S. J., Kerr, M. C., Mahony, D., Seaman, M. N. J., Teasdale, R. D. and Owen, D. J.** (2008). Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* **9**, 366–79.
- Damm, E.-M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T. and Helenius, A.** (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**, 477–88.
- Dang, H., Klok, T. I., Schaheen, B., McLaughlin, B. M., Thomas, A. J., Durns, T. a, Bitler, B. G., Sandvig, K. and Fares, H.** (2011). Derlin-dependent retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Traffic* **12**, 1417–31.
- Day, P. M., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.** (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1–11.
- Day, P. M., Thompson, C. D., Schowalter, R. M., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.** (2013). Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *J. Virol.* **87**, 3862–70.
- Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguières, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F. and Goud, B.** (2006). Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* **7**, 394–407.
- Derby, M. C., Lieu, Z. Z., Brown, D., Stow, J. L., Goud, B. and Gleeson, P. a** (2007). The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic* **8**, 758–73.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J. J., Lombard, B., Loew, D. and Gautreau, A.** (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* **17**, 712–23.
- Díaz, E. and Pfeffer, S. R.** (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**, 433–43.
- Díaz, E., Schimmöller, F. and Pfeffer, S. R.** (1997). A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J. Cell Biol.* **138**, 283–90.
- Dyve, A. B., Bergan, J., Utskarpen, A. and Sandvig, K.** (2009). Sorting nexin 8 regulates endosome-to-Golgi transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 109–14.
- Dziduszko, A. and Ozbun, M. a** (2013). Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. *J. Virol.* **87**, 7502–15.

- Eden, E. R., White, I. J., Tsapara, A. and Futter, C. E.** (2010). Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B-epidermal growth factor receptor interaction. *Nat. Cell Biol.* **12**, 267–72.
- Echard, A., Opdam, F. J., de Leeuw, H. J., Jollivet, F., Savelkoul, P., Hendriks, W., Voorberg, J., Goud, B. and Fransen, J. a** (2000). Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3819–33.
- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A. and Helenius, A.** (2011). Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J. Virol.* **85**, 4198–211.
- Falguières, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J. and Johannes, L.** (2001). Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2453–68.
- Farfán, P., Lee, J., Larios, J., Sotelo, P., Bu, G. and Marzolo, M.-P.** (2013). A sorting nexin 17-binding domain within the LRP1 cytoplasmic tail mediates receptor recycling through the basolateral sorting endosome. *Traffic* **14**, 823–38.
- Fernández-Ulibarri, I., Vilella, M., Lázaro-Diéguez, F., Sarri, E., Martínez, S. E., Jiménez, N., Claro, E., Mérida, I., Burger, K. N. J. and Egea, G.** (2007). Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3250–63.
- Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., Militz, D., Schmidt, V., Madsen, P., Nyengaard, J. R., et al.** (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J. Neurosci.* **32**, 1467–80.
- Florin, L., Becker, K. a, Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R. E. and Sapp, M.** (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J. Virol.* **80**, 6691–6.
- Frigerio, G., Grimsey, N., Dale, M., Majoul, I. and Duden, R.** (2007). Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic* **8**, 1644–55.
- Ganley, I. G., Espinosa, E. and Pfeffer, S. R.** (2008). A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J. Cell Biol.* **180**, 159–72.
- García-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C. and Sztul, E.** (2003). ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2250–61.
- Ghosh, R. N., Mallet, W. G., Soe, T. T., McGraw, T. E. and Maxfield, F. R.** (1998). An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J. Cell Biol.* **142**, 923–36.
- Gilbert, J. and Benjamin, T.** (2004). Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol.* **78**, 12259 – 12267.
- Gilbert, J. M., Goldberg, I. G. and Benjamin, T. L.** (2003). Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J. Virol.* **77**, 2615–2622.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. and Pepperkok, R.** (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **1**, 423–30.
- Gleeson, P. a, Anderson, T. J., Stow, J. L., Griffiths, G., Toh, B. H. and Matheson, F.** (1996). p230 is associated with vesicles budding from the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* **109**, 2811–21.
- Goldberg, J.** (1999). Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893–902.
- Gomez, T. S. and Billadeau, D. D.** (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* **17**, 699–711.
- Griffith, K., Chan, E., Lung, C., Hamel, J., Guo, X., Miyachi, K. and Fritzler, M.** (1997). Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **40**, 1693–1702.
- Grimmer, S., Iversen, T. G., van Deurs, B. and Sandvig, K.** (2000). Endosome to Golgi transport of ricin is regulated by cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4205–16.

- Grimmer, S., Ying, M., Wälchli, S., Deurs, B. Van and Sandvig, K. (2005). Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism. *Traffic* **1**, 144–156.
- Grimmer, S., Spilsberg, B., Hanada, K. and Sandvig, K. (2006). Depletion of sphingolipids facilitates endosome to Golgi transport of ricin. *Traffic* **7**, 1243–53.
- Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M. a, Barr, V. a and Taylor, S. I. (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4105–16.
- Harrison, M. S., Hung, C.-S., Liu, T.-T., Christiano, R., Walther, T. C. and Burd, C. G. (2014). A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 267–72.
- Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M. J., McGough, I. J., Silhankova, M., Betist, M. C., van Weering, J. R. T., van Heesbeen, R. G. H. P., Middelkoop, T. C., Basler, K., et al. (2011). A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nat. Cell Biol.* **13**, 914–23.
- Hatsuzawa, K., Hirose, H., Tani, K., Yamamoto, A., Scheller, R. H. and Tagaya, M. (2000). Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* **275**, 13713–13720.
- Hehny, H., Sheff, D. and Stamnes, M. (2006). Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4379–89.
- Hehny, H., Longhini, K. M., Chen, J. and Stamnes, M. (2009). Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4303–12.
- Houghton, F. J., Bellingham, S. a, Hill, A. F., Bourges, D., Ang, D. K. Y., Gemetzi, T., Gasnereau, I. and Gleeson, P. a (2012). Arl5b is a Golgi-localised small G protein involved in the regulation of retrograde transport. *Exp. Cell Res.* **318**, 464–77.
- Chen, J. W., Murphy, T. L., Willingham, M. C., Pastan, I. and August, J. T. (1985). Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J. Cell Biol.* **101**, 85–95.
- Chen, A., Hu, T., Mikoryak, C. and Draper, R. K. (2002). Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* **1589**, 124–39.
- Chen, A., AbuJarour, R. J. and Draper, R. K. (2003). Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. *J. Cell Sci.* **116**, 3503–10.
- Chia, P. Z. C., Gasnereau, I., Lieu, Z. Z. and Gleeson, P. a (2011). Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *J. Cell Sci.* **124**, 2401–13.
- Iversen, T. G., Skretting, G., Llorente, A., Nicoziani, P., van Deurs, B. and Sandvig, K. (2001). Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2099–107.
- Jeong, K., Kwon, H., Lee, J., Jang, D., Hwang, E. M., Park, J.-Y. and Pak, Y. (2012). Rab6-mediated retrograde transport regulates inner nuclear membrane targeting of caveolin-2 in response to insulin. *Traffic* **13**, 1218–33.
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B. and Imperiale, M. J. (2009). Early events during BK virus entry and disassembly. *J. Virol.* **83**, 1350–8.
- Jing, J., Junutula, J. R., Wu, C., Burden, J., Matern, H., Peden, A. A. and Prekeris, R. (2010). FIP1/RCP binding to Golgin-97 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3041–53.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M. and Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J. Cell Biol.* **176**, 459–71.
- Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T. and Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J. Virol.* **80**, 759–68.
- Kano, F., Yamauchi, S., Yoshida, Y., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Nakamura, N. and Murata, M. (2009). Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER. *J. Cell Sci.* **122**, 2218–27.
- Karanam, B., Peng, S., Li, T., Buck, C., Day, P. M. and Roden, R. B. S. (2010). Papillomavirus infection requires gamma secretase. *J. Virol.* **84**, 10661–70.



- Kartberg, F., Asp, L., Dejgaard, S. Y., Smedh, M., Fernandez-Rodriguez, J., Nilsson, T. and Presley, J. F.** (2010). ARFGAP2 and ARFGAP3 are essential for COPI coat assembly on the Golgi membrane of living cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 36709–20.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. and Helenius, a** (1989). Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 2721–9.
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S. and Nakayama, K.** (2002). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic* **3**, 483–95.
- Kerr, M. C., Bennetts, J. S., Simpson, F., Thomas, E. C., Flegg, C., Gleeson, P. a, Wicking, C. and Teasdale, R. D.** (2005). A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic* **6**, 991–1001.
- Klokk, T. I., Lingelem, A. B. D., Myrann, A.-G. and Sandvig, K.** (2011). Role of phospholipase A(2) in retrograde transport of ricin. *Toxins (Basel)*. **3**, 1203–19.
- Kudlyk, T., Willett, R., Pokrovskaya, I. D. and Lupashin, V.** (2013). COG6 interacts with a subset of the Golgi SNAREs and is important for the Golgi complex integrity. *Traffic* **14**, 194–204.
- Kvalvaag, A. S., Pust, S., Sundet, K. I., Engedal, N., Simm, R. and Sandvig, K.** (2013). The ERM proteins ezrin and moesin regulate retrograde Shiga toxin transport. *Traffic* **14**, 839–52.
- Laniosz, V., Nguyen, K. C. and Meneses, P. I.** (2007). Bovine papillomavirus type 1 infection is mediated by SNARE syntaxin 18. *J. Virol.* **81**, 7435–48.
- Laniosz, V., Dabydeen, S. a, Havens, M. a and Meneses, P. I.** (2009). Human papillomavirus type 16 infection of human keratinocytes requires clathrin and caveolin-1 and is brefeldin a sensitive. *J. Virol.* **83**, 8221–32.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Lin, C. C., Stark, A., Love, H. D., Ostermann, J. and Nilsson, T.** (1999). GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *EMBO J.* **18**, 4935–48.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Stark, a, Szafer, E., Cassel, D., Dejgaard, K., Weiss, M. and Nilsson, T.** (2001). Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J. Cell Biol.* **155**, 1199–212.
- Laufman, O., Hong, W. and Lev, S.** (2011). The COG complex interacts directly with Syntaxin 6 and positively regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J. Cell Biol.* **194**, 459–72.
- Lauvrak, S. U., Llorente, A., Iversen, T.-G. and Sandvig, K.** (2002). Selective regulation of the Rab9-independent transport of ricin to the Golgi apparatus by calcium. *J. Cell Sci.* **115**, 3449–56.
- Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L. and Sandvig, K.** (2004). Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J. Cell Sci.* **117**, 2321–31.
- Lee, J., Retamal, C., Cuitiño, L., Caruano-Yzermans, A., Shin, J.-E., van Kerkhof, P., Marzolo, M.-P. and Bu, G.** (2008). Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J. Biol. Chem.* **283**, 11501–8.
- Lee, S., Uchida, Y., Emoto, K., Umeda, M., Kuge, O., Taguchi, T. and Arai, H.** (2012). Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. *Genes Cells* **17**, 728–36.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Stokrová, J. and Forstová, J.** (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J. Virol.* **80**, 4610–22.
- Lieu, Z. Z. and Gleeson, P. a** (2010). Identification of different itineraries and retromer components for endosome-to-Golgi transport of TGN38 and Shiga toxin. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 379–93.
- Lieu, Z. Z., Derby, M. C., Teasdale, R. D., Hart, C., Gunn, P. and Gleeson, P. A.** (2007). The golgin GCC88 is required for efficient retrograde transport of cargo from the early endosomes to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4979–91.
- Liewen, H., Meinhold-Heerlein, I., Oliveira, V., Schwarzenbacher, R., Luo, G., Wadle, A., Jung, M., Pfreundschuh, M. and Stenner-Liewen, F.** (2005). Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex. *Exp. Cell Res.* **306**, 24–34.
- Lingelem, A. B. D., Bergan, J. and Sandvig, K.** (2012). Inhibitors of intravesicular acidification protect against Shiga toxin in a pH-independent manner. *Traffic* **13**, 443–54.

- Lipovsky, A., Popa, A., Pimienta, G., Wyler, M., Bhan, A., Kuruvilla, L., Guie, M., Poffenberger, A. C., Nelson, C. D. S., Atwood, W. J., et al.** (2013). Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7452–7.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L. and Klausner, R. D.** (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**, 601–616.
- Liu, W. J., Qi, Y. M., Zhao, K. N., Liu, Y. H., Liu, X. S. and Frazer, I. H.** (2001). Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules. *Virology* **282**, 237–44.
- Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S. L., van Deurs, B. and Sandvig, K.** (1998). Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **140**, 553–63.
- Llorente, A., Lauvrak, S. U., van Deurs, B. and Sandvig, K.** (2003). Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatome protein (epsilon-COP). *J. Biol. Chem.* **278**, 35850–5.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. a, Goda, Y., Zerial, M. and Pfeffer, S. R.** (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* **12**, 677–82.
- Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B. and Imperiale, M. J.** (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J. Virol.* **80**, 1361–6.
- Lu, L., Tai, G. and Hong, W.** (2004). Autoantigen Golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-golgi network. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4426–43.
- Luzio, J. P., Brake, B., Banting, G., Howell, K. E., Braghetta, P. and Stanley, K. K.** (1990). Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem. J.* **270**, 97–102.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. and Johannes, L.** (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* **143**, 973–990.
- Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L.** (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* **156**, 653–64.
- Malsam, J., Gommel, D., Wieland, F. T. and Nickel, W.** (1999). A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. *FEBS Lett.* **462**, 267–72.
- Mannová, P. and Forstová, J.** (2003). Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol.* **77**, 1672–1681.
- Martinez, O., Schmidt, a, Salaméro, J., Hoflack, B., Roa, M. and Goud, B.** (1994). The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* **127**, 1575–88.
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J. and Goud, B.** (1997). GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1828–33.
- Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C. I., et al.** (2002). Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat. Cell Biol.* **4**, 986–92.
- Matsudaira, T., Uchida, Y., Tanabe, K., Kon, S., Watanabe, T., Taguchi, T. and Arai, H.** (2013). SMAP2 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the Golgi. *PLoS One* **8**, e69145.
- McGough, I. J. and Cullen, P. J.** (2013). Clathrin is not required for SNX-BAR-retromer-mediated carrier formation. *J. Cell Sci.* **126**, 45–52.
- McKenzie, J. E., Raisley, B., Zhou, X., Naslavsky, N., Taguchi, T., Caplan, S. and Sheff, D.** (2012). Retromer guides STxB and CD8-M6PR from early to recycling endosomes, EHD1 guides STxB from recycling endosome to Golgi. *Traffic* **13**, 1140–59.
- Méresse, S., Gorvel, J. P. and Chavrier, P.** (1995). The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J. Cell Sci.* **108**, 3349–58.

- Miserey-Lenkei, S., Waharte, F., Boulet, A., Cuif, M.-H., Tenza, D., El Marjou, A., Raposo, G., Salamero, J., Héliot, L., Goud, B., et al. (2007). Rab6-interacting protein 1 links Rab6 and Rab11 function. *Traffic* **8**, 1385–403.
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. and Echard, a (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 645–54.
- Moisenovich, M., Tonevitsky, A., Maljuchenko, N., Kozlovskaya, N., Agapov, I., Volkmandt, W. and Bereiter-Hahn, J. (2004). Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem. Cell Biol.* **121**, 429–39.
- Moriyama, T. and Sorokin, A. (2008). Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* **371**, 336–49.
- Mu, F., Callaghan, J., Steelemortimer, O., Stenmark, H., Parton, R., Campbell, P., McCluskey, J., Yeo, J., Tock, E. and Toh, B. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein - EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane-protein flanked by cysteine fingers and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* **270**, 13503–13511.
- Nakai, W., Kondo, Y., Saitoh, A., Naito, T., Nakayama, K. and Shin, H.-W. (2013). ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2570–81.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E. and Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **131**, 1715–1726.
- Natarajan, R. and Linstedt, A. D. (2004). A cycling cis-Golgi protein mediates endosome-to-Golgi traffic. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4798–806.
- Nelson, C. D. S., Carney, D. W., Derdowski, A., Lipovsky, A., Gee, G. V, O’Hara, B., Williard, P., DiMaio, D., Sello, J. K. and Atwood, W. J. (2013). A retrograde trafficking inhibitor of ricin and Shiga-like toxins inhibits infection of cells by human and monkey polyomaviruses. *MBio* **4**, e00729–13.
- Neufeld, E. B., Cooney, A. M., Pitha, J., Dawidowicz, E. A., Dwyer, N. K., Pentchev, P. G. and Blanchette-Mackie, E. J. (1996). Intracellular Trafficking of Cholesterol Monitored with a Cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* **271**, 21604–21613.
- Nielsen, M. S., Gustafsen, C., Madsen, P., Nyengaard, J. R., Hermey, G., Bakke, O., Mari, M., Schu, P., Pohlmann, R., Dennes, A., et al. (2007). Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6842–51.
- Nishimoto-Morita, K., Shin, H.-W., Mitsushashi, H., Kitamura, M., Zhang, Q., Johannes, L. and Nakayama, K. (2009). Differential effects of depletion of ARL1 and ARFRP1 on membrane trafficking between the trans-Golgi network and endosomes. *J. Biol. Chem.* **284**, 10583–92.
- Norkin, L. C. and Kuksin, D. (2005). The caveolae-mediated sv40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Viol. J.* **2**, 61–67.
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A. and Oppenheim, A. (2002). Caveolar endocytosis of Simian Virus 40 is followed by Brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol.* **76**, 5156–5166.
- Ohba, H., Harano, T. and Omura, T. (1977). Presence of two different types of protein-disulfide isomerase on cytoplasmic and luminal surfaces of endoplasmic reticulum of rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 830–836.
- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y. C., Jiang, L. and Robinson, D. G. (2006). Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* **18**, 1239–52.
- Palmer, D. J., Helms, J. B., Beckers, C. J., Orci, L. and Rothman, J. E. (1993). Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 12083–9.
- Pang, H., Le, P. U. and Nabi, I. R. (2004). Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **117**, 1421–30.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, a (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473–83.

- Pepperkok, R., Whitney, J. a, Gomez, M. and Kreis, T. E.** (2000). COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J. Cell Sci.* **113**, 135–44.
- Pérez-Victoria, F. J. and Bonifacino, J. S.** (2009). Dual roles of the mammalian GARP complex in tethering and SNARE complex assembly at the trans-golgi network. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5251–63.
- Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. and Knust, E.** (2011). Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr. Biol.* **21**, 1111–7.
- Ponnambalam, S., Girotti, M., Yaspo, M. L., Owen, C. E., Perry, a C., Suganuma, T., Nilsson, T., Fried, M., Banting, G. and Warren, G.** (1996). Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *J. Cell Sci.* **109**, 675–85.
- Popoff, V., Mardones, G. a, Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J. S., Raposo, G. and Johannes, L.** (2007). The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J. Cell Sci.* **120**, 2022–31.
- Popoff, V., Mardones, G. a, Bai, S.-K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P. V, Shi, A., Benaroch, P., Urbé, S., Lamaze, C., et al.** (2009). Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic* **10**, 1868–80.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. and Wieland, F.** (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005231.
- Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O. and Bucci, C.** (2010). Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *J. Cell Sci.* **123**, 1480–91.
- Progida, C., Nielsen, M. S., Koster, G., Bucci, C. and Bakke, O.** (2012). Dynamics of Rab7b-dependent transport of sorting receptors. *Traffic* **13**, 1273–85.
- Pusapati, G. V, Luchetti, G. and Pfeffer, S. R.** (2012). Ric1-Rgp1 complex is a guanine nucleotide exchange factor for the late Golgi Rab6A GTPase and an effector of the medial Golgi Rab33B GTPase. *J. Biol. Chem.* **287**, 42129–37.
- Pust, S., Dyve, A. B., Torgersen, M. L., van Deurs, B. and Sandvig, K.** (2010). Interplay between toxin transport and flotillin localization. *PLoS One* **5**, e8844.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J. and Tsai, B.** (2009). A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000465.
- Querbes, W., O’Hara, B. a, Williams, G. and Atwood, W. J.** (2006). Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* **80**, 9402–13.
- Raa, H., Grimmer, S., Schwudke, D., Bergan, J., Wälchli, S., Skotland, T., Shevchenko, A. and Sandvig, K.** (2009). Glycosphingolipid requirements for endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin. *Traffic* **10**, 868–82.
- Rapak, A., Falnes, P. O. and Olsnes, S.** (1997). Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3783–8.
- Reddy, J. V, Burguete, A. S., Sridevi, K., Ganley, I. G., Nottingham, R. M. and Pfeffer, S. R.** (2006). A functional role for the GCC185 golgin in mannose 6-phosphate receptor recycling. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4353–63.
- Richards, A. A., Stang, E., Pepperkok, R. and Parton, R. G.** (2002). Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1750–64.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J. and Forstová, J.** (2001). Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* **75**, 10880–91.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735–49.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W. and Neefjes, J.** (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* **185**, 1209–25.
- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S.** (2007). Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1112–24.

- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. a, Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Raposo, G., van der Sluijs, P. and Bonifacino, J. S.** (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* **183**, 513–26.
- Saint-Pol, A., Yélamos, B., Amessou, M., Mills, I. G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H. T., Lamaze, C., et al.** (2004). Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev. Cell* **6**, 525–38.
- Saitoh, A., Shin, H.-W., Yamada, A., Waguri, S. and Nakayama, K.** (2009). Three homologous ArfGAPs participate in coat protein I-mediated transport. *J. Biol. Chem.* **284**, 13948–57.
- Sandvig, K., Prydz, K., Ryd, M. and van Deurs, B.** (1991). Endocytosis and intracellular transport of the glycolipid-binding ligand Shiga toxin in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **113**, 553–62.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V, Hansen, S. H. and van Deurs, B.** (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**, 510–2.
- Sandvig, K., Ryd, M., Garred, O., Schweda, E., Holm, P. K. and van Deurs, B.** (1994). Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell Biol.* **126**, 53–64.
- Seaman, M. N. J.** (2004). Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell Biol.* **165**, 111–22.
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M. and Emr, S. D.** (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell Biol.* **142**, 665–81.
- Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E. and Bright, N.** (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J. Cell Sci.* **122**, 2371–82.
- Selinka, H.-C., Giroglou, T. and Sapp, M.** (2002). Analysis of the Infectious Entry Pathway of Human Papillomavirus Type 33 Pseudovirions. *Virology* **299**, 279–287.
- Shiba, Y., Römer, W., Mardones, G. a, Burgos, P. V, Lamaze, C. and Johannes, L.** (2010). AGAP2 regulates retrograde transport between early endosomes and the TGN. *J. Cell Sci.* **123**, 2381–90.
- Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R. and Barr, F. a** (2002). The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr. Biol.* **12**, 1792–5.
- Schelhaas, M., Shah, B., Holzer, M., Blattmann, P., Kühling, L., Day, P. M., Schiller, J. T. and Helenius, A.** (2012). Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.* **8**, e1002657.
- Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F. and Hauri, H.** (1993). ERGIC-53, a Membrane-Protein of the ER-Golgi Intermediate Compartment, Carries an ER Retention Motif. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 1–9.
- Schneider, M. a, Spoden, G. a, Florin, L. and Lambert, C.** (2011). Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell. Microbiol.* **13**, 32–46.
- Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.-M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.-H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H.** (1998). EEA1 links PI (3) K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 1–6.
- Simpson, J., Dascher, C., Roberts, L., Lord, J. and Balch, W.** (1995). Ricin cytotoxicity is sensitive to recycling between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 20078–20083.
- Skånland, S. S., Wälchli, S., Utskarpen, A., Wandinger-Ness, A. and Sandvig, K.** (2007). Phosphoinositide-regulated retrograde transport of ricin: crosstalk between hVps34 and sorting nexins. *Traffic* **8**, 297–309.
- Skånland, S. S., Wälchli, S. and Sandvig, K.** (2009).  $\beta$ -arrestins attenuate p38-mediated endosome to Golgi transport. *Cell. Microbiol.* **11**, 796–807.
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A. and Ozbun, M. a** (2008). Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J. Virol.* **82**, 9505–12.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M.** (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901–14.

- Spilberg, B., Van Meer, G. and Sandvig, K.** (2003). Role of lipids in the retrograde pathway of ricin intoxication. *Traffic* **4**, 544–52.
- Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N. and Storrie, B.** (2010). Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking. *Traffic* **11**, 626–36.
- Sun, Y., Shestakova, A., Hunt, L., Sehgal, S., Lupashin, V. and Storrie, B.** (2007). Rab6 regulates both ZW10/RINT-1 and conserved oligomeric Golgi complex-dependent Golgi trafficking and homeostasis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4129–42.
- Tabuchi, M., Yanatori, I., Kawai, Y. and Kishi, F.** (2010). Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *J. Cell Sci.* **123**, 756–66.
- Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L. and Hong, W.** (2004). Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4011–22.
- Tcatchoff, L., Andersson, S., Utskarpen, A., Klok, T. I., Skånland, S. S., Pust, S., Gerke, V. and Sandvig, K.** (2012). Annexin A1 and A2: roles in retrograde trafficking of Shiga toxin. *PLoS One* **7**, e40429.
- Tooze, J. and Hollinshead, M.** (1992). In AtT20 and HeLa cells brefeldin A induces the fusion of tubular endosomes and changes their distribution and some of their endocytic properties. *J. Cell Biol.* **118**, 813–30.
- Torgersen, M. L., Wälchli, S., Grimmer, S., Skånland, S. S. and Sandvig, K.** (2007). Protein kinase Cdelta is activated by Shiga toxin and regulates its transport. *J. Biol. Chem.* **282**, 16317–28.
- Tran, T. H. T., Zeng, Q. and Hong, W.** (2007). VAMP4 cycles from the cell surface to the trans-Golgi network via sorting and recycling endosomes. *J. Cell Sci.* **120**, 1028–41.
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L. and Rapoport, T. a** (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* **22**, 4346–55.
- Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., et al.** (2011). Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15846–51.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. and Parton, R.** (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913–924.
- Underwood, K. W., Jacobs, N. L., Howley, A. and Liscum, L.** (1998). Evidence for a cholesterol transport pathway from lysosomes to endoplasmic reticulum that is independent of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 4266–4274.
- Utskarpen, A., Slagsvold, H. H., Iversen, T.-G., Wälchli, S. and Sandvig, K.** (2006). Transport of ricin from endosomes to the Golgi apparatus is regulated by Rab6A and Rab6A'. *Traffic* **7**, 663–72.
- Utskarpen, A., Slagsvold, H. H., Dyve, A. B., Skånland, S. S. and Sandvig, K.** (2007). SNX1 and SNX2 mediate retrograde transport of Shiga toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 566–70.
- Van der Sluijs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Goud, B. and Mellman, I.** (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6313–7.
- Van Deurs, B., Pedersen, L. R., Sundan, A., Olsnes, S. and Sandvig, K.** (1985). Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in vero cells. *Exp. Cell Res.* **159**, 287–304.
- Van Deurs, B., Tønnessen, T. I., Petersen, O. W., Sandvig, K. and Olsnes, S.** (1986). Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **102**, 37–47.
- Van Weering, J. R. T., Verkade, P. and Cullen, P. J.** (2012). SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic* **13**, 94–107.
- Wälchli, S., Skånland, S. S., Gregers, T. F., Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., Ying, M., Kuroda, S., Maturana, A. and Sandvig, K.** (2008). The Mitogen-activated protein kinase p38 links Shiga Toxin-dependent signaling and trafficking. *Mol. Biol. Cell* **19**, 95–104.

- Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wieringa, B., King, S. M. and Fransen, J. (2008). Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 183–96.
- Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M. V., Oakley, J., Traer, C. J. and Cullen, P. J. (2007). A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J. Cell Sci.* **120**, 45–54.
- Wassmer, T., Attar, N., Harterink, M., van Weering, J. R. T., Traer, C. J., Oakley, J., Goud, B., Stephens, D. J., Verkade, P., Korswagen, H. C., et al. (2009). The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **17**, 110–22.
- Weimer, C., Beck, R., Eckert, P., Reckmann, I., Moelleken, J., Brügger, B. and Wieland, F. (2008). Differential roles of ArfGAP1, ArfGAP2, and ArfGAP3 in COPI trafficking. *J. Cell Biol.* **183**, 725–35.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., et al. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* **147**, 1505–1521.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* **151**, 1207–20.
- Yamane, J., Kubo, A., Nakayama, K., Yuba-Kubo, A., Katsuno, T., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2007). Functional involvement of TMF/ARA160 in Rab6-dependent retrograde membrane traffic. *Exp. Cell Res.* **313**, 3472–85.
- Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R. and Maxfield, F. R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789–800.
- Yang, M., Chen, T., Han, C., Li, N., Wan, T. and Cao, X. (2004). Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 792–9.
- Yang, J.-S., Lee, S. Y., Spanò, S., Gad, H., Zhang, L., Nie, Z., Bonazzi, M., Corda, D., Luini, A. and Hsu, V. W. (2005). A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *EMBO J.* **24**, 4133–43.
- Yang, J.-S., Zhang, L., Lee, S. Y., Gad, H., Luini, A. and Hsu, V. W. (2006). Key components of the fission machinery are interchangeable. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1376–82.
- Yang, J.-S., Valente, C., Polishchuk, R. S., Turacchio, G., Layre, E., Moody, D. B., Leslie, C. C., Gelb, M. H., Brown, W. J., Corda, D., et al. (2011). COPI acts in both vesicular and tubular transport. *Nat. Cell Biol.* **13**, 996–1003.
- Yoshida, T., Chen, C., Zhang, M. and Wu, H. C. (1991). Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and Pseudomonas toxin. *Exp. Cell Res.* **192**, 389–395.
- Yoshino, A., Setty, S. R. G., Poynton, C., Whiteman, E. L., Saint-Pol, A., Burd, C. G., Johannes, L., Holzbaur, E. L., Koval, M., McCaffery, J. M., et al. (2005). tGolgin-1 (p230, golgin-245) modulates Shiga-toxin transport to the Golgi and Golgi motility towards the microtubule-organizing centre. *J. Cell Sci.* **118**, 2279–93.
- Young, J., Stauber, T., del Nery, E., Vernos, I., Pepperkok, R. and Nilsson, T. (2005). Regulation of microtubule-dependent recycling at the trans-Golgi network by Rab6A and Rab6A'. *Mol. Biol. Cell* **16**, 162–77.
- Zhang, J., Reiling, C., Reinecke, J. B., Prislán, I., Marky, L. a, Sorgen, P. L., Naslavsky, N. and Caplan, S. (2012). Rabankyrin-5 interacts with EHD1 and Vps26 to regulate endocytic trafficking and retromer function. *Traffic* **13**, 745–57.
- Zhou, J., Gissmann, L., Zentgraf, H., Müller, H., Picken, M. and Müller, M. (1995). Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* **214**, 167–76.
- Žíla, V., Difato, F., Klimová, L., Huerfano, S. and Forstová, J. (2014). Involvement of microtubular network and its motors in productive endocytic trafficking of mouse polyomavirus. *PLoS One* **9**, e96922.