

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Získalová

Role cytoskeletu ve splývání a odštěpování endozomálních váček

The role of cytoskeleton in endosomal fusion and fission

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lenka Libusová, PhD.

Praha, 2015

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, 10. 7. 2015

Tereza Získalová

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lence Libusové, PhD., za ochotu a trpělivost projevovanou při odborném vedení mé práce.

Obsah:

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 6 |
| Abstract | 7 |
| Seznam zkratk..... | 8 |
| 1 Úvod | 12 |
| 2 Endozomální kompartmenty | 12 |
| 2.1 Endocytóza - představení | 13 |
| 2.2 Typy endozómů | 14 |
| 3 Cytoskelet..... | 17 |
| 3.1 Mikrotubuly | 18 |
| 3.1.1 Molekulární motory pohybující se po mikrotubulech | 18 |
| 3.2 Aktinová síť | 19 |
| 3.2.1 Molekulární motory pohybující se po aktinových vláknech | 20 |
| 3.2.2 Proteiny ovlivňující dynamiku aktinové sítě..... | 20 |
| 3.2.2.1 Regulátory proteinů ovlivňujících dynamiku aktinové sítě | 20 |
| 4 Splývání membrán | 21 |
| 4.1 Obecné mechanismy | 21 |
| 4.1.1 Rab proteiny, „tethers“ a SNARE proteiny | 22 |
| 4.1.2 Role aktinu ve splývání membrán | 22 |
| 4.1.2.1 Remodelace kortikální aktinové sítě pomocí Rho GTPáz | 23 |
| 4.1.2.2 Mechanismus působení aktinových vláken na fúzi váčků s plazmatickou membránou..... | 24 |
| 4.2 Fúze endozomálních membrán | 26 |
| 4.2.1 Molekuly účastnící se fúze endozomálních membrán | 26 |
| 4.2.2 Role cytoskeletu v endozomální fúzi..... | 27 |
| 5 Odštěpování membrán | 28 |
| 5.1 Obecné mechanismy odštěpování váčků | 28 |
| 5.1.1 Proteiny účastnící se endocytózy | 28 |
| 5.1.2 Role cytoskeletu při odštěpování váčků..... | 31 |
| 5.2 Odštěpování endozomálních váčků..... | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2.1 | Vznik distinktních domén určených k odštěpení | 34 |
| 5.2.2 | Tvorba membránových tubulů..... | 36 |
| 6 | Závěr..... | 37 |
| | Použitá literatura..... | 38 |

Abstrakt

Cytoskelet hraje klíčovou roli v procesu endocytózy. Po mikrotubulech se váčky pohybují k cílovým membránám. Mikrotubuly se také účastní tvorby membránových tubulů na endozómech, ze kterých jsou odštěpovány recyklované váčky. Aktinová síť má v rámci endocytózy taktéž několikerý účinek. V případě splývání membrán je její funkce jak pozitivní, tak i negativní, neboť v poslední fázi vytváří mechanickou sílu usnadňující splynutí, zatímco ve fázi první se chová jako fyzická bariéra, kterou je pro úspěšnou fúzi nutno rozrušit. Aktin se taktéž aktivně podílí na odštěpování váček. Aktinová síť i mikrotubuly jsou tedy s endocytickou dráhou propojeny v čase a prostoru. Správné funkční propojení cytoskeletu s dynamikou endocytických váček je řízeno řadou regulačních proteinů. Mezi významné regulátory aktinové sítě patří například proteiny Arp2/3, WASH komplexu, WASP či Rab a Rho proteiny.

Klíčová slova: endozóm, endocytóza, aktin, Arp2/3, WASH komplex, Rab, Rho proteiny

Abstract

Cytoskeleton plays a key role in endocytic process. Vesicles move along microtubules to target membranes. Microtubules also partake in the formation of endosomal tubules, from which recycled vesicles are splitted off. Actin network has in endocytosis multiple effect as well. In the case of membrane fusion is its role both, positive and negative, for it creates mechanical force which facilitates the fusion in last stage. By contrast, in the first stage, it acts as a physical barrier, which needs to be removed. Actin also actively participates in fission of vesicles. Actin network and microtubules are thus interconnected with endocytic pathway in time and space. Right functional connection of the cytoskeleton with dynamics of endocytic vesicles is driven by many regulatory proteins. Among important regulators of actin network belong for example proteins of Arp2/3, WASH complex, WASP or Rab and Rho proteins.

Key words: endosome, endocytosis, actin, Arp2/3, WASH complex, Rab, Rho proteins

Seznam zkratek

| | |
|-------------------|--|
| AAA doména | ATPases associated with cell activities ATPázy asociované s buněčnými aktivitami |
| Arf | ADP ribosylation factor ADP ribozylační faktor |
| Arp2/3 | actin related protein 2/3 s aktinem spojený protein 2/3 |
| ATP | adenosintriphosphate adenosintrisfosfát |
| BAR | Bin-Amphiphysin-Rvs |
| CART | cytoskeleton-associated recycling or transport s cytoskeletem asociovaná recyklace nebo transport |
| CLIC/GEEC | clathrin independent carrier/GPI-AP-enriched endosomal compartment klatrin independentní nosič/GPI-AP-obohacený endozomální kompartment |
| CME | clathrin mediated endocytosis klatrinem zprostředkovaná endocytóza |
| CORVET | class C core endosome vacuole tethering endozomální vakuolární vázání třídy C |
| CP | capping protein čepičkující protein |
| DHC | dynein heavy chain těžký řetězec dyneinu |
| EEA1 | early endosome antigen 1 antigen časných endozómů 1 |
| ERC | endosomal recycling compartment endozomální recyklační kompartment |
| ERM | ezrin/radixin/moesin |

| | |
|----------------|---|
| ESCRT | endosomal sorting complexes required for transport endozomální třídící komplexy vyžadované pro transport |
| GAP | GTPase activating protein GTPázu aktivující protein |
| GDI | GDP dissociation inhibitor GDP disociační inhibitor |
| GEF | guanine nucleotide exchange factor faktor vyměňující guaninový nukleotid |
| GPI | glycophosphatidylinositol glykofosfatidylinositol |
| GTP | guanosin triphosphate guanosintrifosfát |
| HOPS | homotypic vacuole fusion and protein sorting homotypická fúze vakuol a třídění proteinů |
| IC | intermediate chain střední řetězec |
| ILVs | intraluminal bodies intraluminální tělíska |
| JMY | junction mediating and regulatory protein spoje zprostředkující a regulující protein |
| LC | light chain lehký řetězec |
| LIC | light-intermediate chain lehký-střední řetězec |
| MAGE-L2 | melanoma antigen family L2 melanomový antigen rodiny L2 |
| MHC | major histocompatibility complex hlavní histokompatibilní komplex |

| | |
|-------------------------------|--|
| MTOC | microtubule organizing centre organizační centrum mikrotubulů |
| NPF | nucleation promoting factor faktor spouštějící nukleaci |
| PAK1 | p21-activated kinase 1 p21-aktivovaná kináza 1 |
| PI | phosphatidylinositol fosfatidylinositol |
| PI3K | phosphatidylinositol-3-kinase fosfatidylinositol-3-kináza |
| PI(3)P | phosphatidylinositol-3-phosphate fosfatidylinositol-3-fosfát |
| PI(3,5)P2 | phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát |
| PI(3,4,5)P3 | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát |
| PI(4)P | phosphatidylinositol-4-phosphate fosfatidylinositol-4-fosfát |
| PI(4,5)P2 | phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát |
| PLCγ | phospholipase C γ fosfolipáza C γ |
| PX domain | phox domain phox doména |
| Rab | Ras like in rat brain Ras podobný v krysím mozku |
| ROCK | Rho associated coiled-coil forming kinase s Rho asociovaná coiled-coil formující kináza |
| SNX | sorting nexin |

| | |
|------------------|---|
| TRIM27 | tripartite motif-containing 27 tripartitní motiv obsahující 27 |
| v/t-SNARE | vesicular/target SNAP (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein) receptor receptor vezikulárního/cílového SNAP (rozpustný NSF (N-ethylmelimid-senzitivní faktor připevňující protein) |
| VCA | verprolin, cofilin, acidic |
| Vps | vacuolar protein sorting vakuolární třídění proteinů |
| Vrp | verprolin |
| WASP | Wiskott-Aldrich syndrome protein protein Wiskott-Aldrich syndromu |
| WAVE | WASP and verprolin homology WASP a verprolin homologický |
| WHAMM | WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules homolog WAS proteinu asociovaný s aktinem, membránami Golgiho aparátu a mikrotubuly |
| WIP | WASP interacting protein s WASP interagující protein |

1 Úvod

Cytoskeletem rozumíme síť proteinových vláken. V případě mikrotubulů a aktinových vláken se jedná o síť dynamickou, zatímco intermediární filamenta jsou stabilní, mechanicky odolné struktury. Tyto vlastnosti odráží i jednotlivé funkce, jaké tyto typy cytoskeletárních struktur mají. Intermediární filamenta jsou molekuly dodávající buňkám pevnost, jako například keratiny v epitelálních a desminy ve svalových buňkách. Mikrotubuly a aktinová filamenta se naproti tomu účastní dynamických procesů, jako je dělení a pohyb buňky a intracelulární pohyb organel. Svou roli hrají i ve splývání a odštěpování membrán. Splývání a odštěpování membránových útvarů – váčků – je zcela zásadní v endocytické dráze. Tato dráha je mechanismem, kterým buňka pohlcuje molekuly ze svého okolí, či recykluje transmembránové proteiny vystavené na plazmatické membráně. Ústředními organelami této dráhy jsou endozómy. Právě splýváním a odštěpováním endozomálních váčků dochází k maturaci jednotlivých endozomálních kompartmentů a třídění pohlcených molekul.

Cílem této práce je popsat a vysvětlit možné mechanismy, kterými aktinová vlákna a mikrotubuly ovlivňují splývání a odštěpování membrán v endocytické dráze.

2 Endozomální kompartmenty

Hlavní úlohou endozómů je roztřídit endocytované proteiny a proteiny přijaté z Golgiho aparátu tak, aby se každá molekula dostala na místo svého určení. Kam molekula zamíří, závisí na jejím konkrétním typu a funkci. Některé molekuly budou po splnění své role uvnitř buňky recyklovány zpět na plazmatickou membránu (Hsu and Prekeris 2010), jiné budou směřovány k degradaci do lysozómu (Piper and Katzmann 2007). Třetí možnou cestou molekul z endozómu je návrat do Golgiho aparátu (Johannes and Popoff 2008).

2.1 Endocytóza - představení

Endocytóza, což je proces pohlcování molekul buňkou z jejího okolí, se dá rozdělit do více typů na základě několika kritérií. Těmi jsou například typ pohlcované látky, mechanismus samotného pohlcení, či proteiny účastnící se daného typu endocytózy. Endocytózu můžeme rozdělit například následujícím způsobem:

Typy endocytózy závislé na aktinu:

- klatrin-dependentní endocytóza (CME) – Na plazmatické membráně tvoří jamky kryté klatrinem, do nichž jsou soustředěny pohlcované molekuly. Po navázání molekul na příslušné transmembránové receptory dochází ke změně konformace těchto receptorů, čímž je umožněna jejich interakce s adaptorovými proteiny. S adaptorovými proteiny posléze asociují molekuly klatrinu. Takto vytvořené klatrinem kryté jamky jsou odštěpeny od membrány, čímž vznikají endocytické váčky. Tomuto kroku se také říká internalizace. Endocytický váček poté putuje dále do buňky, kde záhy splývá s dalšími endocytickými váčkami a vytváří takzvaný časný/třídící endozóm (Kornilova 2014; M. N. J. Seaman 2008; Huotari and Helenius 2011). Příkladem takto internalizovaného nákladu je transferin vázaný na transferinový receptor.
- kaveolin-dependentní endocytóza – Membrány obohacené proteiny kaviny a kaveoliny vytvářejí vchlípeniny s nákladem zvané kaveoly.
- CLIC/GEEC dráha – Při pohlcování nákladu, kterým jsou proteiny vázající glykofosfatidylinositol (GPI), se vytváří tubulární, či prstencové membránové útvary.
- makropinocytóza – Je děj, při kterém vznikají větvené membránové vchlípeniny, které následně splývají mezi sebou, či znovu s plazmatickou membránou, díky čemuž buňka absorbuje molekuly, které byly ve vnitřních prostorách těchto vchlípenin.
- fagocytóza – Buňky mechanismem fagocytózy pohlcují větší objemy, jako například různé patogeny, či apoptotické zbytky jiných buněk. Z membrány jsou aktivně remodelací aktinu vytvářeny výběžky směrem do okolí buňky, které uchvacují patogen a obrůstají ho, dokud není buňkou zcela pohlcen.

- entóza – Touto endocytickou dráhou je celá buňka pohlcená buňkou jinou. K tomuto dochází v případě, že buňka, jež bude následně pohlcena, ztratila kontakt s extracelulární matrix.

Typy endocytózy nezávislé na aktinu:

- flotilin-dependentní endocytóza – Endocytovaným nákladem jsou proteoglykany a CD59 – molekula podílející se na ochraně vlastních buněk organismu před komplementem. Tento typ endocytózy je, jak název napovídá, závislý na flotilinu, typu proteinu, který je podobný kaveolinu.

Typy endocytózy, u nichž zatím není jasné, zda je aktin vyžadován:

- arf6 dependentní endocytóza – Tímto způsobem jsou endocytovány například MHC glykoproteiny I. třídy. Vznikají opět tubulární, či vezikulární membránové útvary.

Výše uvedené rozdělení typů endocytózy a k nim vztahované informace byly převzaty z přehledového článku (Doherty and McMahon 2009).

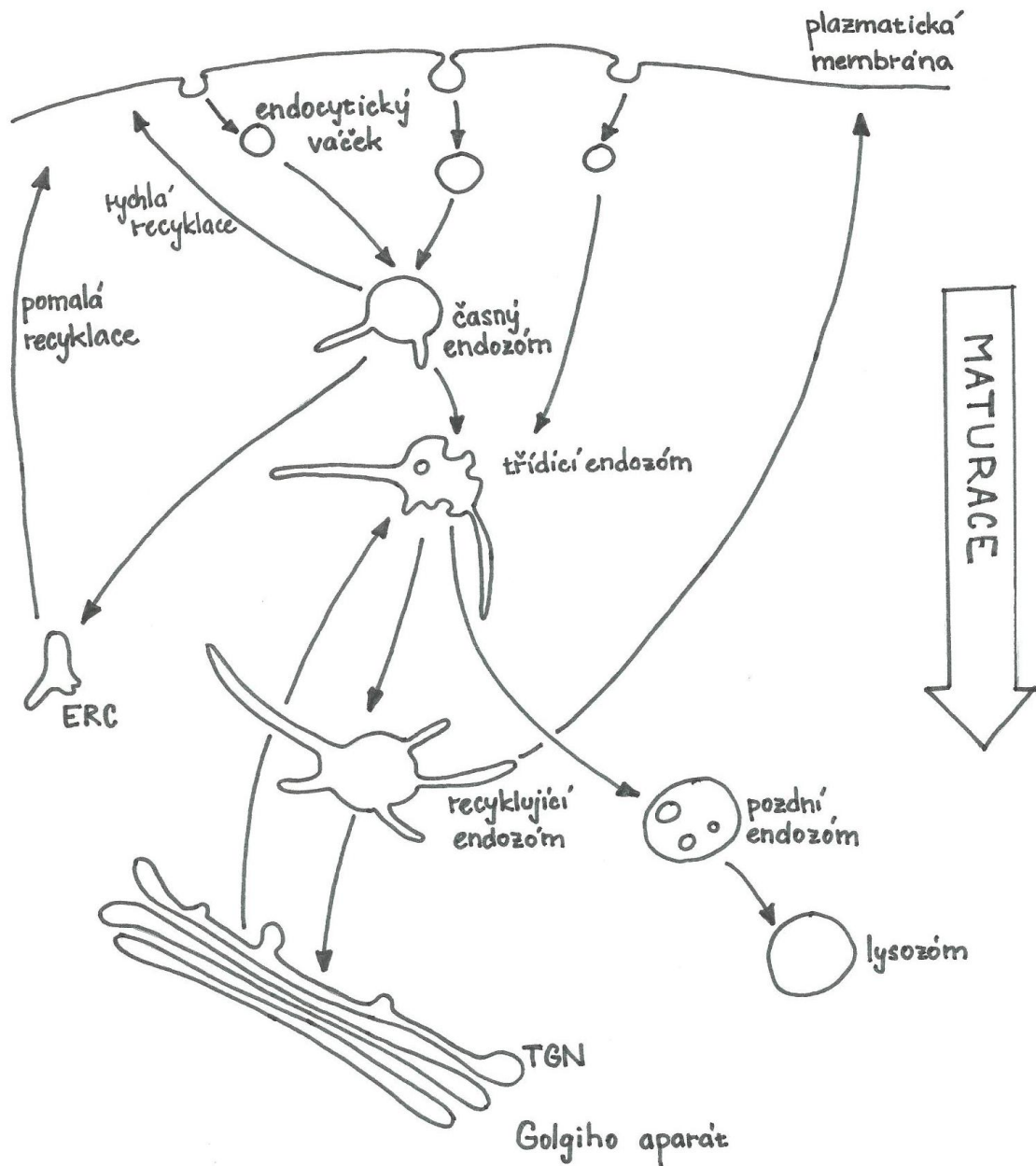
Z uvedených typů endocytózy je nejlépe prozkoumaná CME. Z tohoto důvodu se budou údaje ve zbytku mé práce, pokud nebude uvedeno jinak, právě klatrin-dependentní endocytózy. Stejně tak, pokud nebude řečeno jinak, se budou uvedené informace týkat savčích buněk.

2.2 Typy endozómů

Časný/třídící endozóm se procesem maturace mění na recyklující endozóm, ten posléze na pozdní endozóm, a ten splývá s lysozómem (Obr 1.) (Huotari and Helenius 2011), (Gruenberg, Griffiths, and Howell 1989). Je nutné podotknout, že vzhledem k proměnlivosti a dynamice těchto struktur je používaná terminologie poněkud nekonzistentní. Například se můžeme dočíst o třídícím endozómu, na němž se vyskytují recyklující membránové tubuly, o samostatném recyklujícím endozómu, nebo o endocytických recyklačních kompartmentech (ERC). Pro přehlednost uvádím terminologii, kdy

se daný název endozómu vztahuje k jeho funkci a umístění v endocytické dráze z hlediska času a prostoru. Toto rozdělení bylo zpracováno na základě (M. N. J. Seaman 2008) a (Kornilova 2014).

- časný endozóm – Vzniká fúzí endocytických váčků odštěpených z plazmatické membrány. Má tubulovezikulární charakter.
- třídící endozóm – Jeho funkce i umístění v endocytické dráze se může překrývat s endozómem časným. Specifickými mechanismy dochází k třídění, takzvanému „sortingu“, přijatého nákladu.
- recyklující endozóm – Má tubulovezikulární morfolonii a nachází se blíže k jádru buňky, než časný/třídící endozóm. Jeho funkcí je recyklace některých molekul zpět na plazmatickou membránu.
- pozdní endozóm – Nazývá se také multivezikulární tělísko. Jeho morfologie je spíše vezikulární, s mnoha vnitřními váčky, v nichž je uchován náklad směřující do lysozómu.
- lysozóm – Organela sloužící k degradaci molekul, pohlcených patogenů atd. Pozdní endozómy s ním splývají, čímž jsou uvolněny vnitřní váčky s nákladem (proteiny integrované do jejich membrány) do lumen lysozómu.
- ERC – Těmito kompartmenty procházejí molekuly, které jsou recyklovány na plazmatickou membránu tzv. pomalou recyklací. Tedy nevrací se přímo z časného/třídícího endozómu (rychlá recyklace). Morfologie těchto organel je tubulární, pravděpodobně vznikají z časného endozómu odštěpením membránových tubulů z něj pučících, zatímco vezikulární část časného endozómu maturuje v pozdní endozóm.



Obr. 1

Endocytická dráha. Šipky znázorňují tok endozomálních váčků. Zpracováno dle (Kornilova 2014; M. N. J. Seaman 2008)

Maturace endozómů je uskutečněna splýváním nových váčků s endozómem, a odštěpováním váčků s již „odtříděným“ nákladem. Mění se jak morfologie endozómu, tak složení jeho membrány – to se týče nejen membránových proteinů, (Gautreau, Oguievetskaia, and Ungermann 2014), ale i fosfatidylinositidů – na časných endozómech se nachází fosfatidylinositol-3-fosfát (PI(3)P) (Gillooly et al. 2000), na pozdních fosfatidylinositol-3,5-

bisfosfát (PI(3,5)P₂) (Li et al. 2013) a na ERC fosfatidylinositol-4-fosfát (PI(4)P) (Jović et al. 2009). V průběhu maturace se endozóm v rámci buňky fyzicky posunuje více do centra, po mikrotubulech pomocí molekulárních motorů (M. N. J. Seaman 2008). Pozdní endozómy se tedy nacházejí v juxt nukleární oblasti, zatímco časně endozómy blíže u plazmatické membrány – což je dáno i mechanismem jejich vzniku.

Třídění proteinů začíná už v samotném časném endozómu (Sheff et al. 2002). Proteiny se z něj buď navracejí zpět na membránu pomocí odštěpených váčků – čemuž se říká „rychlá recyklace“ (M. N. J. Seaman 2008), nebo zůstávají v endozómu, ze kterého se postupně stává recyklující endozóm. Z recyklujícího endozómu se proteiny mohou váčky opět vracet na plazmatickou membránu – takzvaná pomalá recyklace (Hsu and Prekeris 2010), putovat do Golgiho aparátu, nebo stále zůstat v endozomální membráně. V průběhu maturace endozómu se také vytvářejí takzvané intraluminální váčky (ILVs) (Piper and Katzmann 2007), což jsou váčky vytvořené vchlípením endozomální membrány do lumen. Membránové proteiny, umístěny v membráně vnitřního váčku, jsou proteiny určené k degradaci. Uvnitř endozómu zůstávají až do chvíle, kdy pozdní endozóm splývá s lysozómem, kde jsou pak degradovány (M. N. J. Seaman 2008).

Celá endocytická dráha je esenciální pro signalizaci, regulaci a růst buňky. Jak je zřejmé, důležitou, takřka hlavní roli, v ní hraje membránová fúze a odštěpování membránových váčků – ať už pro maturaci endozómu, samotné třídění proteinů, či přijímání proteinů z Golgiho aparátu a plazmatické membrány. Odštěpení a splnutí membrány je prvním a posledním krokem ve váčkovém transportu, který je základním principem komunikace jednotlivých endocytických kompartmentů s Golgiho aparátem, plazmatickou membránou a lysozómem.

3 Cytoskelet

Cytoskelet, tedy doslova „kostra buňky“, je síť proteinových vláken, která slouží nejen k opoře buňky. Kromě toho, že cytoskelet udržuje tvar živočišných buněk, podílí se také na fagocytóze, pohybu organel a váčků v buňkách, pohybu samotných buněk a na buněčném dělení.

Rozlišují se tři typy cytoskeletárních struktur – mikrotubuly, aktinová vlákna a intermediární filamenta. Intermediární filamenta jsou vlákna tvořená homodimery různých proteinů. Protože dosavadní úroveň poznání ukazuje, že intermediární filamenta nehrají v endocytóze žádnou významnou roli, zabývá se tato práce dále pouze mikrotubuly a mikrofilamenty.

3.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly se skládají z tubulinových dimerů, jež jsou tvořeny dvěma podjednotkami – α -tubulinem a β -tubulinem. Tyto tubulinové heterodimery se skládají do protofilament, jež díky laterálním vzájemným interakcím tvoří výsledný tubul. Mikrotubuly jsou polarizovanou strukturou, na které rozlišujeme (+) konec a (-) konec. V buňkách mikrotubuly rostou z nukleačního centra (MTOC) tvořeného dalším typem tubulinu – tubulinem γ . V těchto nukleačních centrech je mikrotubul kotven za svůj (-) konec. Stabilita mikrotubulů závisí na tom, zda je na jednotlivých heterodimerech navázaná molekula GTP či GDP, přičemž GDP vláknu uděluje nestabilitu. V důsledku toho dochází k depolymeraci vlákna. Stabilitu může také ovlivňovat řada proteinů svou přímou vazbou na jednotky tubulinu. (Brinkley 1997; Wade and Hyman 1997)

3.1.1 Molekulární motory pohybující se po mikrotubulech

S mikrotubuly je spjatý pohyb organel a váčků. Ten je umožněn interakcí molekulárních motorů s membránou a zároveň mikrotubulem. Molekulární motory pohybující se po mikrotubulech spadají do dvou skupin – kineziny a dyneiny (Murray and Wolkoff 2003).

- kineziny - Téměř všechny typy kinezinů se pohybují k (+) konci mikrotubulů. Jsou to dimerické proteiny s ATP hydrolyzující doménou na N-konci. Na C-konci se nachází vazebná doména. Kineziny pohybující se k (-) konci mikrotubulů mají vazebnou doménu na N-konci a motorovou doménu na C-konci. Nazývají se C-terminální kineziny. V souvislosti s váčkovým transportem byly popsány napří-

klad kineziny-1 na časných endozómech a kineziny-2 na pozdních endozómech. (Loubéry et al. 2008).

- dyneiny – Tyto molekulární motory pohybující se k (-) konci mikrotubulů jsou oproti kinezinům mnohem větší. Skládají se ze dvou těžkých (DHC), středních (IC) a lehkých-středních řetězců (LIC) a z šesti lehkých řetězců (LC), přičemž různorodost dyneinů je způsobena produkcí izoforem IC a LIC. S endozomálními kompartmenty asociují například dyneiny obsahující LIC1 a LIC2 (Tan, Scherer, and Vallee 2011).

Endozómy a z nich odštěpené váčky se po mikrotubulech pohybují v rámci buňky oběma směry. Při anterográdním transportu jsou využívány kineziny, protože MTOC a tedy (-) konec mikrotubulu se nachází blíže k jádru buňky, zatímco (+) konec mikrotubulů se nachází blíže k periférii buňky. Při retrográdním transportu jsou pak ze zjevného důvodu využívány dyneiny. Mikrotubulární molekulární motory také způsobují mechanické vytahování endozomálních membrán, díky čemuž vznikají endozomální membránové tubuly (Soppina et al. 2009).

3.2 Aktinová síť

Aktinová vlákna jsou nejtenčí z uvedených struktur cytoskeletu. Skládají se z monomerů aktinu. Toto vlákno má dva odlišené konce, a sice (+) konec (barbed end) a (-) konec (pointed end). Na (+) konci probíhá polymerace vlákna snadněji, než na (-) konci. Pro rozlišení se pro aktinové monomery ve formě tubulu používá označení F-aktin (fibrilární), a pro monomery disociované v cytoplazmě G-aktin (globulární). (Beltzner and Pollard 2008) Aktinová vlákna mohou rychlou polymerací vytvářet mechanickou sílu tlačící na membránu. To má za následek deformaci membrány, což může být využito při vzniku membránových váčků. Rychlá polymerace aktinu je také mechanismem měňavkovitého pohybu améb, a pohybu váčků v nitru buněk na krátké vzdálenosti. Aktinová filamenta se nachází, kromě jiného, v podobě kortikálního aktinu pod plazmatickou membránou a na endozómech, na jejichž membránách tvoří plošky sestávající se z vysoce větvených aktinových vláken (Beltzner and Pollard 2008).

3.2.1 Molekulární motory pohybující se po aktinových vláknech

Podobně jako u mikrotubulů, i s aktinovou sítí interagují molekulární motory. Jedná se o myoziny, proteiny strukturně podobné kinezinům. Myoziny se rozdělují do několika podtříd v závislosti na tom, jakou konkrétní úlohu vykonávají. Účastní se například svalové kontrakce, transportu váčků, stahování kontraktálního prstence při cytokinezi a vzniku mechanického pnutí membrány (Murray and Wolkoff 2003). Konkrétními typy myozinů účastnících se váčkového transportu jsou myozin I (Raposo et al. 1999), myozin V (Yan et al. 2005) a myozin VI (Chibalina et al. 2007).

3.2.2 Proteiny ovlivňující dynamiku aktinové sítě

Polymerace aktinu do lineárních vláken je v buňce v důsledku určité koncentrace aktinových monomerů samovolný proces. Tento proces je však nutné regulovat. Mezi proteiny, které posunují rovnováhu reakce ve směru aktinových monomerů, patří například čepičkující (*capping*) protein (CP), který zabraňuje polymeraci vazbou na rostoucí konec vlákna (Wear et al. 2003), či cofilin a coronin, způsobující rozpad filament (Carlier et al. 1997). Profilin naopak napomáhá polymeraci aktinových vláken úpravou aktinových monomerů (Kovar et al. 2006). Důležitou molekulou ovlivňující dynamiku aktinové sítě je *actin related protein 2/3* (Arp2/3). Tento komplex skládající se ze sedmi podjednotek umožňuje vznik větvených aktinových filament. Arp2/3 interaguje s mateřským vláknem, a slouží jako nukleační místo, ze kterého vyrůstá nové, dceřinné vlákno. Forminy jsou proteiny, které způsobují vznik dlouhých nevětvených filament tím, že se váží na polymerující konec vlákna a brání tak vazbě CP. (Beltzner and Pollard 2008)

3.2.2.1 Regulátory proteinů ovlivňujících dynamiku aktinové sítě

Regulační kaskády ovlivňující dynamiku aktinu se nesestávají pouze z jediného, na aktin přímo působícího, proteinu. Regulátory aktinu mají své vlastní regulační proteiny, které jsou taktéž regulovány, atd. Tím je umožněna jemnější modulace celé kaskády.

Například Arp2/3 komplex je sám o sobě velmi málo účinným nukleátorem polymerace aktinu. Jeho aktivita je však dále umocněna proteiny, které se souhrnně nazývají nukleaci spouštějící faktory (NPF) (Derivery et al. 2009). Těmito faktory jsou proteinové komplexy rozdělené do čtyř následujících rodin:

- WASP – Regulují polymeraci aktinu při fagocytóze, při internalizaci a při tvorbě panožek. Také bylo zjištěno, že za určitých podmínek se podílejí na tlačení endozómů cytoplazmou rychlou polymerací aktinu. (Benesch et al. 2002)
- WAVE – Účastní se taktéž fagocytózy a tvorby panožek. (Derivery et al. 2009)
- WASH – Tento komplex skládající se z pěti podjednotek aktivuje Arp2/3 na povrchu endozómů. Konkrétně na endozómech třídících a recyklačních, kde tímto vytváří aktinové domény. (Derivery et al. 2009).
- WHAMM/JMY – WHAMM proteiny se podílejí na udržení morfologie Golgiho aparátu (Campellone et al. 2008), zatímco JMY proteiny, přes podobnost s WHAMM, regulují transkripci a buněčnou migraci (Zuchero et al. 2009).

Všechny proteiny z výše zmíněných rodin obsahují C-koncovou Verprolin homologickou (VCA) doménu. Touto doménou jsou schopny vázat zároveň aktin a Arp2/3, čímž usnadňují počátek polymerace nového vlákna. (Hüfner et al. 2001).

NPF jsou regulovány dalšími proteiny. Mezi ty patří Rho GTPázy, které ovlivňují dynamiku aktinové sítě nejen skrze NPF (Eitzen 2003). Rho GTPázy patří do Ras superrodiny, stejně jako Rab GTPázy (Croisé et al. 2014). Obě tyto skupiny malých monomerních GTPáz se podílejí na regulaci buněčného vezikulárního transportu.

4 Splývání membrán

4.1 Obecné mechanismy

V buňkách existuje specifický mechanismus, jehož úkolem je zajistit úspěšné splynutí dvou membrán. Hlavními účastníky tohoto procesu jsou proteiny zvané Rab, vázající komplexy (*tethers*), a v neposlední řadě SNARE proteiny (Bonifacino and Glick 2004).

4.1.1 Rab proteiny, „*tethers*“ a SNARE proteiny

Rab proteiny jsou malé, monomerní GTPázy z Ras superrodiny, fungující jako regulátory intracelulárního vezikulárního transportu. Pod kontrolou Rab probíhají všechny čtyři fáze – pučení váčku, transport váčku, ukotvení váčku na cílové membráně, a konečně splynutí obou membrán. Aktivita Rab je regulována vazbou GTP, potažmo GDP. Rab s navázaným GTP je aktivní, membránově vázaný protein. Aktivace a deaktivace Rab skrze vazbu nukleotidu je řízena specifickými proteiny – faktorem vyměňujícím guanin (GEF), GTPázu aktivujícím proteinem (GAP), a inhibitorem disociace GTP (GDI). (Bhuin and Roy 2014)

Aktivní Rab proteiny mají řadu efektorů. Jsou to například molekuly zvané v anglickém jazyce *tethers* (Bröcker, Engelbrecht-Vandré, and Ungermann 2010). Protože jsem nenašla žádný používaný český ekvivalent, budu je dále nazývat „vázající komplexy“. Tyto vázající komplexy jsou membránově vázané proteiny nezbytné k ukotvení váčku na cílovou membránu a k dostání obou membrán do bližšího kontaktu. Po přiblížení membrán dochází k reakci SNARE proteinů. To jsou molekuly umístěné na vezikulární membráně (v-SNARE) a na cílové membráně (t-SNARE). Pokud váček dorazil ke správnému cíli, v-SNARE a t-SNARE proteiny jsou navzájem „komplementární“. Díky tomu pak vytvoří coiled-coil strukturu, zapletou se do sebe, a tím fyzicky přiblíží obě membrány natolik, že dojde k vytlačení molekul vody a obě membrány splynou. (Cai, Reinisch, and Ferro-Novick 2007)

4.1.2 Role aktinu ve splývání membrán

Ve splývání membrán hraje aktin jak pozitivní, tak negativní roli. Spontánnímu splývání membrány váčku s povrchem buňky brání větvená vlákna kortikálního aktinu, která se nachází z vnitřní strany plazmatické membrány. Tato aktinová síť fyzicky znemožňuje dostatečné přiblížení membrán. Je tedy třeba tuto síť rozvolnit, aby se váček dostal do těsné blízkosti plazmatické membrány. (Eitzen 2003)

4.1.2.1 Remodelace kortikální aktinové sítě pomocí Rho GTPáz

Za remodelaci kortikální aktinové sítě jsou zodpovědné Rho GTPázy (Croisé et al. 2014). Rho proteiny vytváří membránové domény, ve kterých asociují jejich efekторы - aktin vázající proteiny, proteiny způsobující zakřivení membrán a pro Rho potřebné GEF proteiny. S těmito doménami je spjata také fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K) (de Curtis and Meldolesi 2012), díky čemuž jsou Rho domény obohaceny o fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PI(3,4,5)P3). Tím vzniká specifická platforma pro konkrétní děje na plazmatické membráně (Heo et al. 2006). Dalším efektořem Rho je fosfatidylinositol 5-kináza (PI5K), díky které vzniká fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PI(4,5)P2) (Eitzen 2003). Ten je zřejmě důležitý pro uskupení vázajících komplexů na membráně, a slouží tak jako značka pro cílení váčků, které mají splynout s plazmatickou membránou. Navíc reguluje aktivitu WASP, potažmo tedy Arp2/3 (Rozelle et al. 2000). PI(4,5)P2 také stimuluje ezrin/radixin/moesin (ERM) proteiny, které mají nukleační aktivitu (Defacque et al. 2000).

Efektořem RhoA jsou forminy a WASP, overexprese RhoA v neuroendokrinních buňkách indukuje polymeraci kortikálního aktinu. Následkem toho je inhibována exocytóza (S. Gasman et al. 1999). Stejný vliv má vysoká hladina RhoA na sekreci v neutrofilech. Tato skutečnost napovídá, že RhoA musí být v neaktivním stavu, aby úspěšně došlo ke splnutí váčku s plazmatickou membránou. RhoA také aktivuje PI-4 kinázu, potažmo tedy indukuje produkci PI(4)P. Tyto fosfatidylinositidy jsou v kvasinkách nutné pro transport sekrečních granulí na periferii buňky pomocí myozinu. (S. Gasman et al. 1998). Je tedy možné, že inaktivace RhoA, která by vedla ke snížení hladiny PI(4)P, má za následek uvolnění sekrečních váčků z preexistujícího aktinového filameta, a tedy umožnění ukotvení váčku na plazmatické membráně (Croisé et al. 2014).

Pro úspěšné splnutí membrán je však nutné, aby rozvolnění kortikální aktinové sítě bylo pouze dočasné. Bylo prokázáno, že použití látek rozrušujících aktinovou síť v nižších koncentracích splývání váčků s plazmatickou membránou usnadňuje, zatímco použití vyšších koncentrací téže látky způsobí zastavení exocytózy - váčky s plazmatickou membránou nesplynou (Muallem et al. 1995). Aktinová síť je tedy pravděpodobně potřeba v pozdějších fázích splývání membrán, ve chvíli, kdy se váček úspěšně dostal do těsné blízkosti plazmatické membrány a je kotven vázajícími faktory.

Opětovnou polymeraci aktinové sítě způsobují Rho GTPázy Cdc42 a Rac1. Obě tyto GTPázy stimulují polymeraci kortikálního aktinu aktivací fosfolipázy C γ (PLC γ). Díky tomu je produkován inositoltrisfosfát, který vyvolá vzrůst koncentrace vápníku uvnitř buňky. (Hong-Geller and Cerione 2000). To je signál pro p21 protein (Cdc/Rac)-aktivovanou kinázu 1 (PAK1), která způsobí remodelaci aktinu na plazmatické membráně (Allen et al. 2009). Cdc42 také stimuluje opětovné vytvoření aktinové sítě aktivací NPF pro Arp2/3 - WASP a forminů (Stéphane Gasman et al. 2004). Cdc42 může navíc podporovat membránovou fúzi interakcí s proteiny SNARE komplexu (Nevins and Thurmond 2005).

Jednotlivé Rho proteiny se navíc vzájemně negativně ovlivňují. RhoA aktivuje s Rho-asociovanou coiled-coil formující kinázu (ROCK). Tato kináza inhibuje funkci Rac1. (Jeon et al. 2012). To by mohlo být výhodné, vzhledem k tomu, že tyto Rho GTPázy zřejmě hrají roli v jiných časových fázích splývání membrán.

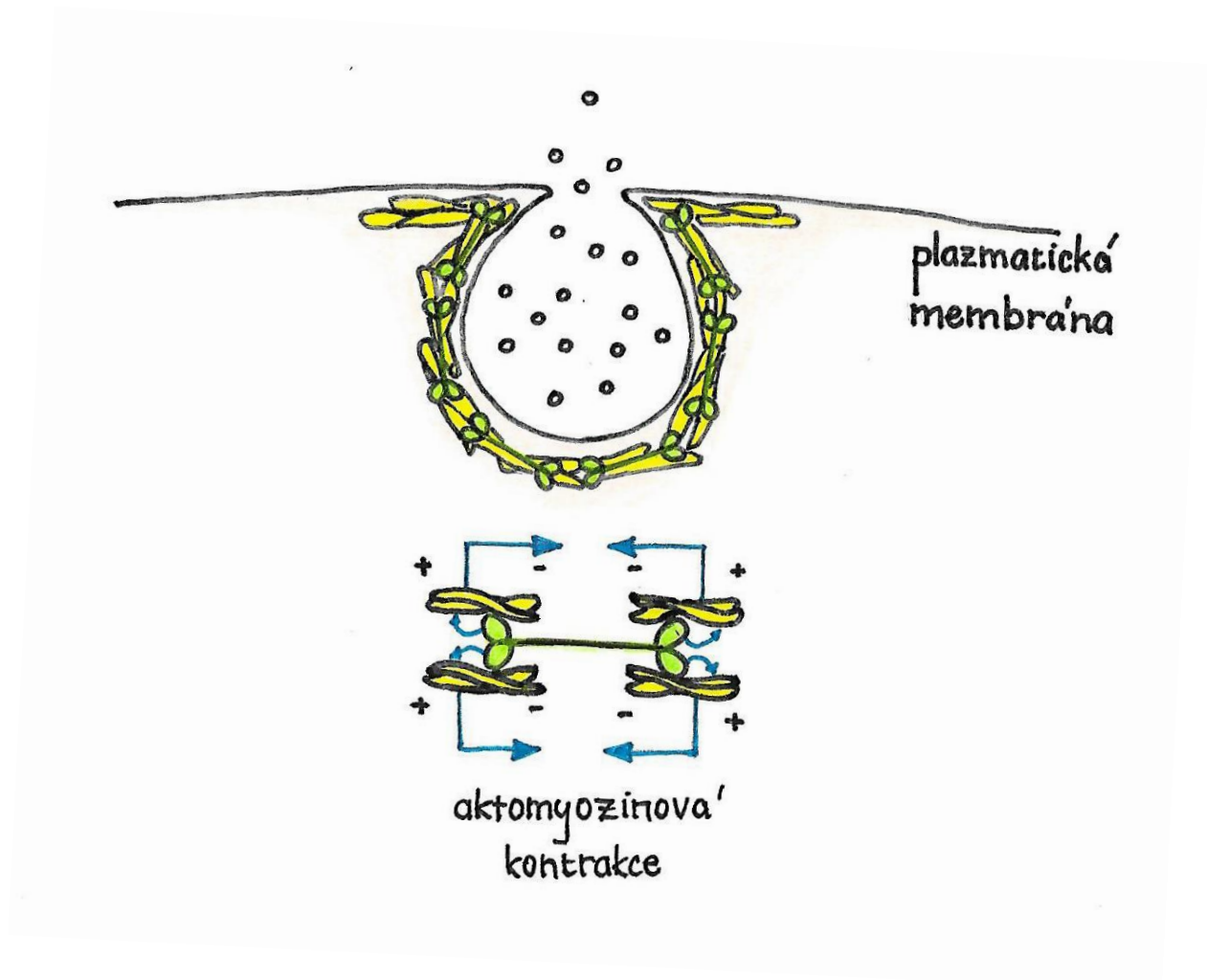
Všechny Rho proteiny jsou na membráně vázány skrze isoprenylovou kotvu. Nenacházejí se pouze na plazmatické membráně, v menším množství jsou i na Golgiho aparátu, sekrečních váčcích, vakuolách a lysozómech. Na všech těchto místech se mohou podílet na remodelaci aktinové sítě spjaté s membránou dané organely. (Eitzen 2003).

4.1.2.2 Mechanismus působení aktinových vláken na fúzi váčků s plazmatickou membránou

Negativní role aktinové sítě při splývání váčků je zřejmá. Jakým mechanismem by však mohla aktinová vlákna splývání naopak usnadňovat? Možnou odpovědí na tuto otázku je model představený v práci (Nightingale, Cutler, and Cramer 2012) (Obr. 2).

Po splynutí membrán, které je zprostředkováno interakcí příslušných SNARE proteinů, se na plazmatické membráně vytváří pór. Ten se buď dále rozšiřuje, čímž nakonec dojde k začlenění membrány celého váčku do povrchu buňky, nebo k jeho zavření, aniž by došlo ke splynutí váčku s plazmatickou membránou, pak se jedná o takzvaný *kiss and run* proces. Chvilí po splynutí lipidických dvojvrstev dochází k rychlé tvorbě aktinového pláště/prstence okolo splývající organely. Součástí tohoto aktinového útvaru je také myozin II. (Jerdeva et al. 2005). Možné mechanismy toho, jak aktinový plášť/prsteneček v asociaci s myozinem II podporuje fúzi váčku s plazmatickou membránou, jsou dva.

Prvním je produkce mechanické síly pomocí stahování se aktomyozinové struktury, tedy přímé tlačení na splývající váček (Obr. 2).



Obr. 2

Model aktomyozinového prstence okolo vylévajícího se váčku na plazmatické membráně. Pohyb myozinu II (zelená) po aktinových vláčkách (žlutá) v naznačeném směru způsobuje kontrakci prstence, čímž usnadňuje úplnou fúzi váčku s membránou a vylití nákladu. Zpracováno dle (Nightingale, Cutler, and Cramer 2012).

Další možností je to, že stahy aktomyozinové struktury mají za následek stabilizaci splývajících organel, čímž brání energeticky výhodnějšímu procesu uzavírání membránového póru. Tvorba výše zmíněného aktinového prstence je umožněna díky Arp2/3 komplexu, který je zde aktivován WASP, a ten je zase pod kontrolou Cdc42 – tedy Rho GTPázy účastníci se přestavby kortikálního aktinu v prvním kroku splývání membrán.

Aktinová vlákna by mohla usnadňovat i samotné splývání lipidických dvojvrstev. Mezi membránami, které mají splynout, je velká odpuzující elektrostatická síla. Polymerace aktinových vláken ve chvíli, kdy jsou membrány již natolik blízko, že se odpuzují, by mohla vytvořit mechanickou sílu působící v opačném směru, a membránu váčku k plazmatické membráně „dotlačit“.

4.2 Fúze endozomálních membrán

4.2.1 Molekuly účastnící se fúze endozomálních membrán

Fúze endozómů je řízena typově stejnými molekulami, jako fúze váčků s plazmatickou membránou. Konkrétní proteiny jsou však jiné než na plazmatické membráně, a liší se i v průběhu endolysozomální dráhy.

Jak již bylo řečeno, regulátory membránové fúze jsou proteiny z rodiny Rab GTPáz. Na časných endozómech je touto GTPázou Rab5. Rab5 se v průběhu přeměny časných endozómů na pozdní mění na Rab7. (Rink et al. 2005). Vezikulární jádro recyklujících endozómů je obohaceno o Rab11, zatímco na tubulech tohoto typu endozómů se vyskytuje Rab4 (Sönnichsen et al. 2000). Tyto GTPázy tak zároveň slouží jako jakési „značky“ pro jednotlivé typy endozómů, či pro odlišné endozomální membránové domény.

Tyto GTPázy na endozómech aktivují své cílové molekuly – vázající komplexy a SNARE proteiny. Z endozomálních vázajících komplexů jsou nejznámější zřejmě komplexy CORVET a HOPS – heterohexamery nacházející se na časných a pozdních endozómech (Balderhaar and Ungermann 2013) a EEA1 - coiled-coil vázající komplex, používaný často jako marker časných endozómů.

Na endozomálních membránách nachází domény tvořené větveným aktinem. Ty vznikají díky interakci Arp2/3 komplexu s jeho endozomálním NPF – a sice WASH komplexem (Derivery et al. 2009).

4.2.2 Role cytoskeletu v endozomální fúzi

Do dnešních dnů není jasné, zdali se můžou aktinové domény na endozomálních membránách chovat podobným způsobem jako kortikální aktin pod plazmatickou membránou. Za předpokladu, že tomu tak je, musí pro úspěšnou endozomální fúzi dojít k rozvolnění aktinových domén. Vzhledem k tomu, že jediným známým regulátorem dynamiky aktinu na endozómech je WASH komplex, bylo by toto rozvolnění zřejmě zcela pod kontrolou tohoto komplexu. WASH komplex sám je pak regulován mechanismem odlišným od regulace NPF na plazmatické membráně, kde je funkce WASP pod kontrolou Rho GTPáz. Aktivita WASH komplexu je regulována E3 ubiquitin ligázou TRIM27, jejíž funkce je dále zesílena vazbou proteinu MAGE-L2. Ubiquitylace WASH komplexu má za následek jeho aktivaci. Pokud je zabráněno tomu, aby WASH komplex mohl být ubiquitylován, je jeho schopnost tvorby aktinových domén narušena. (Hao et al. 2013). To by mohlo být mechanismem rozvolnění těchto domén, a tedy i mechanismem, který by usnadňoval endozomální fúzi.

Faktory způsobující membránovou fúzi – vázací komplexy a SNARE proteiny asociují do membránových domén s Rab GTPázami. Ke splývání tedy dochází v místech těchto Rab domén. Vzhledem k malé velikosti endozomálních kompartmentů, a tudíž jejich ztíženému pozorování ovšem není snadné určit, jestli tyto Rab domény přesně kolokalizují s doménami větveného aktinu. Je tedy možné, že k fúzi endozómů dochází v místech, ve kterých se aktinové domény nenacházejí, a poté by rozvolnění aktinu pro splynutí endozomálních váček nutné nebylo.

Vzhledem k tomu, že s endozómy asociuje myozin I (Raposo et al. 1999), je možné že by spolupráce tohoto motorového proteinu s aktinem mohla vytvářet mechanickou sílu, která by, stejně jako v případě aktinového prstence na váčcích splývajících s plazmatickou membránou, mohla stlačit splývající organely, a tím dokončit proces jejich fúze.

5 Odštěpování membrán

5.1 Obecné mechanismy odštěpování váčků

Odštěpování váčků z plazmatické membrány je prvním krokem endocytické dráhy. Váček vypučí z membrány díky specializovaným molekulárním mechanismům, načež je pomocí malé GTPázy – dynaminu odštěpen (Sweitzer and Hinshaw 1998).

5.1.1 Proteiny účastnící se endocytózy

Následuje rozdělení proteinů účastnících se endocytózy, které je rozčleněno na základě časové pozice v průběhu endocytózy. Tyto moduly, a informace k nim, pokud není uvedeno jinak, byly převzaty z (Mooren, Galletta, and Cooper 2012). U kvasinek jsou definovány čtyři moduly, a sice:

- modul plášťových proteinů – Plášťové proteiny pokrývají membránu pučícího váčku a napomáhají jeho formování.
- aktinový modul – V kvasinkách je polymerace aktinu při CME spouštěna Arp2/3, ten je ovšem, na rozdíl od savčího Arp2/3, schopen spouštět polymeraci aktinových vláken i bez NPFs (Wen and Rubenstein 2005). Ty tedy slouží zřejmě jen jako regulátory vyladující aktivitu Arp2/3. Kvasinkovými NPFs pro Arp2/3 jsou Las17 (homolog savčího WASP), dva myoziny typu I – Myo3 a Myo5, Pan1 a Abp1. Negativním regulátorem Arp2/3 v kvasinkách je coronin. Pro správný průběh endocytózy je nutný turn-over aktinu, tedy rozpad starých vláken na monomery, které jsou využity pro stavbu vláken nových. Rozpad vláken probíhá díky cofilinu, coroninu a Aip1, přičemž největší vliv má první z nich.
- WASp/Myo modul – Modul regulátorů dynamiky aktinové sítě. Z těchto regulátorů je v kvasinkách nejlépe prozkoumaný WASp/Las17. K místu endocytózy lokalizuje před Arp2/3 a aktinem. Jeho schopnost regulovat polymeraci aktinu není omezena zřejmě jen na aktivaci Arp2/3, vzhledem k rozdílným fenotypům mutantů, kterým Las17 úplně chybí a mutantů, kde je narušena vazba mezi Las17 a

Arp2/3. Pokud je Las17 z buňky deletován, z prostoru pod plazmatickou membránou úplně mizí kortikální aktinové oblasti. V případě, kdy je znemožněna vazba Las17 a Arp2/3, je narušeno načasování a pohyb endocytických struktur, avšak polymerace aktinu eliminována není. Kromě Arp2/3 interaguje Las17 s dalšími proteiny, z nichž některé inhibují jeho aktivitu. Tato regulace je nutná, protože Las17 není autoinhibován, a v časných fázích endocytózy není vhodné, aby proteiny způsobující polymeraci aktinu byly aktivní.

Proteiny negativně regulující aktivitu Las17 jsou Syp1, Sla1 a Bbc1, přičemž druhé dva zmíněné kooperují, aby k inhibici Las17 došlo. Jakmile Syp1 z místa endocytózy mizí, inhibice Las17 je zrušena. Negativní regulace Las17 pomocí Sla1/Bbc1 je zrušena pomocí pozitivního regulátoru Las17 – Bzz1. Ten k místu endocytózy přichází těsně před začátkem polymerace aktinu. Obsahuje F-BAR doménu, která rozpoznává zakřivené membrány, díky čemuž zprostředkovává správné načasování polymerace aktinu. Další aktivátory Arp2/3 – Myo3 a Myo5 obsahují kyselou/DDW Arp2/3 vázající doménu. Myo5 je autoinhibován pomocí své TH1 domény, která se váže na svůj C-konec, kde se nachází zmíněná kyselá/DDW doména, což brání Myo5 interagovat s Vrp1(verprolin). A právě interakce Myo5 s Vrp 1 je kritická pro schopnost Myo5 aktivovat Arp2/3. Inhibovat aktivaci Arp2/3 přes Myo5 může, alespoň částečně Cmd1 (calmodulin). Jeho interakce s Myo5 může bránit vazbě Vrp1 na Myo5. Tato negativní regulace zprostředkovaná Cmd1 je redukována vápenatými ionty. Dalším aktivátorem Arp2/3 je v kvasinkách Pan1, který, stejně jako Myo5 obsahuje kyselou/DDW doménu. Pan1 je negativně regulován Sla2. Výše zmiňovaný Vrp1 interaguje kromě Las17 ještě s myoziny typu I a aktinovými monomery. Pokud Vrp1 v buňce chybí, dochází sice ke vzniku endocytických oblastí, ty jsou ale nepohyblivé.

- amphiphysinový modul – Amphiphysin je protein obsahující Bin-amphiphysin-Rvs (BAR) doménu, díky které je schopný rozpoznat a indukovat zakřivení membrány.

U savců jsou identifikovány moduly podobné, proběhlo ale rozdělení některých kvasinkových modulů, a přidání modulů dalších. To je důsledkem vyšší propracovanosti a složitosti savčí endocytózy. Savčí buňky endocytují v mnohem vyšším měřítku, nežli buňky kvasinkové – to je dáno i tím, že jsou to mnohobuněčné organizmy, a buňky signalizují

v zájmu udržení integrity organismu. Je nutné tedy udržovat určitou hladinu membránových receptorů, což je zajišťováno právě endocytickou dráhou.

- adaptor/F-BAR submodul – Adaptorové proteiny jsou proteiny, které asociují s klatrinovými molekulami a zároveň se membránou vznikajícího váčku, a také s nákladem. Tím spojují nabrání konkrétního nákladu s vytvořením váčku prostřednictvím kterého je pak náklad pohlcen.

F-BAR proteiny jsou proteiny s BAR doménou. Těch existuje několik typů (BAR/N-BAR proteiny, F-BAR proteiny a I-BAR proteiny). Tyto proteiny rozeznávají a indukují zakřivení membrány pomocí své BAR domény, což je dimerizující motiv skládající se ze tří α helixů, které formují rigidní strukturu, jež svým tvarem připomíná banán (Peter et al. 2004). Konkávní strana BAR domény obsahuje mnoho zásaditých aminokyselinových zbytků, díky čemuž může asociovat s fosfolipidickou dvojvrstvou prostřednictvím elektrostatických interakcí (van Weering, Verkade, and Cullen 2010). BAR domény rozeznávají zakřivené membrány právě proto, že samy jsou stabilně zakřivené, a vazba na membránu může proběhnout lépe v místech membrány, která pasují do tohoto zakřivení. Proteiny s BAR doménou nejenže rozeznávají zakřivené membrány, ale také samy jejich zakřivení indukují. Toho je dosaženo formováním BAR domén do organizovaných helikálních řad. Tímto způsobem mohou BAR domény stabilizovat i tak vysoce zakřivené útvary, jako jsou membránové tubuly. (Frost et al. 2008).

BAR proteiny jsou také koordinovány s aktinem – mezi takové patří například FBP17, Toca1/CIP4, Syndapin (Bzz1), FCho1 (Syp1). V závorkách jsou uvedeny kvasinkové homology. Je také možné, že BAR proteiny hrají roli i ve skládání klatrinu. F-BAR proteiny interagují s N-WASP/WASp nebo N-WASP/WIP. (Mooren, Galletta, and Cooper 2012).

- klatrinový submodul – klatrin vytváří struktury zvané triskeliony. Triskeliony se pod membránou skládají v košovitě útvary, a protože jsou přes adaptorové proteiny spojeny s membránou, dochází spolu se složením klatrinového koše k jejímu zakřivení.
- submodul aktinového složení – aktinová vlákna se začínají skládat ve chvíli, kdy jsou endocytické a aktin regulující proteiny již asociovány s membránou. Aktin

v průběhu CME asociuje s BAR proteiny. Složení aktinu při CME je regulováno Arp2/3, jehož aktivita je závislá na NPF – tím je na plazmatické membráně WASP. (Mooren, Galletta, and Cooper 2012).

- submodul rozpadu aktinu – K rozpadu aktinu dochází po odštěpení váčku z plazmatické membrány a poté, co je váček díky polymeraci aktinu dotlačen dále do cytoplazmy. Rozpad aktinové sítě je regulován proteiny cofilinem a coroninem, které jsou k místu endocytózy přivedeny po složení aktinových vláken.
- dynaminový modul - Na dynaminu je rozlišováno pět domén. PH doména vázající PIP2, N-koncová GTPázová doména, doména zodpovědná za oligomerizaci, GED doména stimulující GTPázovou doménu a PRD doména, díky které je dynamin schopná interagovat s jinými proteiny. (Taylor, Perrais, and Merrifield 2011). Dynamin je asociován s aktinem přes cortactin, syndapin, mAbp1 a myozin 1E (Mooren, Galletta, and Cooper 2012), nebo přímo bez adaptorového proteinu (Gu et al. 2010). Bez aktinu není dynamin k místu endocytózy přiveden, a nedochází k odštěpení.

Svou roli v odštěpování hraje také vznik odlišných fosfatidylinositidů (PI) – vytváření membránových domén, mezi kterými vzniká kvůli rozdílnému složení napětí. Nové PI vznikají pomocí fosfatáz a kináz. (Cullen and Carlton 2012). PI jsou spjaty i s BAR proteiny, které v místě své vazby na membránu chrání stávající PI před fosfatázami a kinázami. Ke změně PI tedy dochází jen na „vršku“ membránového tubulu, což zvyšuje pnutí mezi membránovými doménami (Liu et al. 2006). V průběhu tohoto procesu vznikají pozitivní zpětnovazebné smyčky, jak v asociaci BAR proteinů s membránou, tak s proměnou PI.

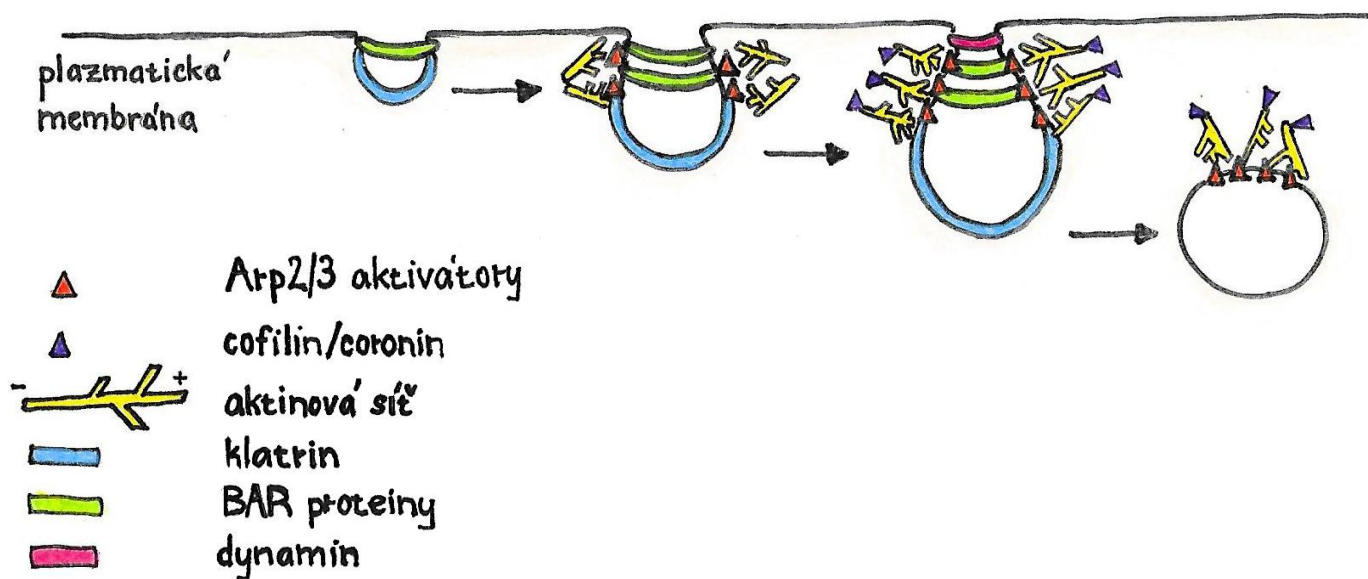
5.1.2 Role cytoskeletu při odštěpování váčků

Jak je již z předchozí kapitoly zřejmé, aktin se na CME aktivně podílí. Esenciální je pro kvasinkovou CME. U savčí CME je potřeba také, ale nikoliv ve všech případech. Vyžadován je tehdy, pokud je mechanismem klatrinové endocytózy pojmán velký náklad, či při endocytóze probíhající v oblastech plazmatické membrány, se kterou je asociovaná hustá aktinová síť. Potřeba aktinu při endocytóze se projevuje i u jiných typů buněk, než

savcích, a kvasinek – např. u hlenky je nutný pro fagocytózu a makropinocytózu a pro CME je pravděpodobně vyžadován také. V případě octomilky je aktin také vyžadován při CME, neboť při ošetření buněk Latrunculinem A, což je toxin inhibující polymeraci aktinu, je proces CME narušen. (Mooren, Galletta, and Cooper 2012).

Mechanismem, kterým by aktin mohl napomáhat odštěpování membrány je, stejně jako v případě pozitivní regulace splývání membrán, vyvíjení fyzické síly, která tlačí na membránu. V tomto případě by takováto síla působila pozitivně ve smyslu zvyšování tenze membrány, přičemž takto namáhaná membrána by pak byla ideálním substrátem pro dynamin. Mechanická síla by mohla být vytvořena myoziny – k místům CME lokalizuje myozin I, myozin 1E a myozin VI (jsou součástí dynaminového modulu). Myozin I je nutný pro pohyb vychlipující se membrány směrem do cytosolu. Myozin VI je nezbytný pro CME na apikální straně endoteliálních buněk, která je velmi bohatá na aktinová vlákna. Většina těchto vláken je orientována svým (-) koncem směrem od plazmatické membrány. Myozin VI se pohybuje po aktinových filamentech právě k (-) konci, a tedy může vytahovat plazmatickou membránu směrem do centra buňky. (Mooren, Galletta, and Cooper 2012).

Další možným modelem je ten, ve kterém je síla produkována pomocí polymerace aktinových vláken skrze Arp2/3 komplex. Jeho NPFs se nacházejí na bázi vznikajících klatrinových váčků, kde díky nim vznikají aktinová filamenta, rostoucí na svém (+) konci, který směřuje k membráně. Růst těchto vláken, která se na krku vznikajícího váčku vyskytují v podobě „límečku“ tedy způsobuje tlak na membránu, díky čemuž se krk váčku stahuje (Collins et al. 2011) (Obr. 3).



Obr. 3

Pučení a odštěpování váčku z plazmatické membrány při CME. Znázorněn je „límeček“ z aktinových vláken, jejichž polymerace by mohla způsobovat zužování krku váčku a tím napomáhat jeho odštěpení pomocí dynaminu. Zpracováno dle (Mooren, Galletta, and Cooper 2012).

Existuje ale studie (Yao et al. 2013), která s uvedenými modely nesouhlasí. Autoři této práce potvrzují, že aktin odštěpení váčků z membrány usnadňuje, avšak zamítají možnost, že by se tak dělo vytvářením mechanické síly. Navrhují mechanismus, ve kterém by aktinová vlákna indukovala na cholesterolu závislou reorganizaci membrány, která by následně podporovala samotné odštěpení váčku. Cholesterol se podílí na tvorbě membránových domén, na jejichž rozhraní vzniká tenze. Ta by mohla vyvolat odtržení membránového tubulu (Liu et al. 2006). Tento model je podporován výsledky, ve kterých rozrušení aktinové sítě Latrunculinem B nemělo žádný podstatný vliv na průměr krku váčku. Ovlivněno bylo ale trvání membránového póru, tedy došlo ke zpomalení odštěpování váčku. Stejný fenotyp prokázaly buňky, z jejichž membrány byl extrahován cholesterol. Navíc účinky rozrušení aktinové sítě a extrakce cholesterolu z membrány buňky nejsou aditivní, což by mohlo poukazovat na závislost cholesterolu na aktinové síti.

Vliv na odštěpování váčků z membrány mohou mít i mikrotubuly. Na plazmatickou membránu vázané dyneiny pohybující se k (-) konci mikrotubulů (tedy směrem do cent-

ra buňky) by mohly vytvořit dostatečnou sílu k zakřivení a vytažení membrány směrem do cytosolu.

5.2 Odštěpování endozomálních váček

Endozomální váčky vytváří komunikační tok mezi jednotlivými kompartmenty endocytické/endozomální dráhy, plazmatickou membránou a Golgiho aparátem.

5.2.1 Vznik distinktních domén určených k odštěpení

Na membráně endozómu vznikají jasně odlišené - distinktní - membránové domény, ve kterých je soustředěn náklad určený k transportu do jedné ze tří již zmíněných cílových oblastí. Vytváření takovýchto oblastí je principem třídění endozomálního nákladu, a je zprostředkováno specializovanými proteinovými komplexy. Komplex ESCRT je zodpovědný za třídění nákladu do intraluminálních váček (Babst 2005). Další z komplexů, retromer, vytváří membránové domény obsahující proteiny směřující do TGN (M. N. J. Seaman 2008; M. N. Seaman, McCaffery, and Emr 1998). Rychlá recyklace na plazmatickou membránu z časných endozómů probíhá díky CART komplexu (Yan et al. 2005).

Vytváření takovýchto domén je předpokladem vzniku váčky, který bude následně odštěpen a poté putovat ke správné cílové destinaci.

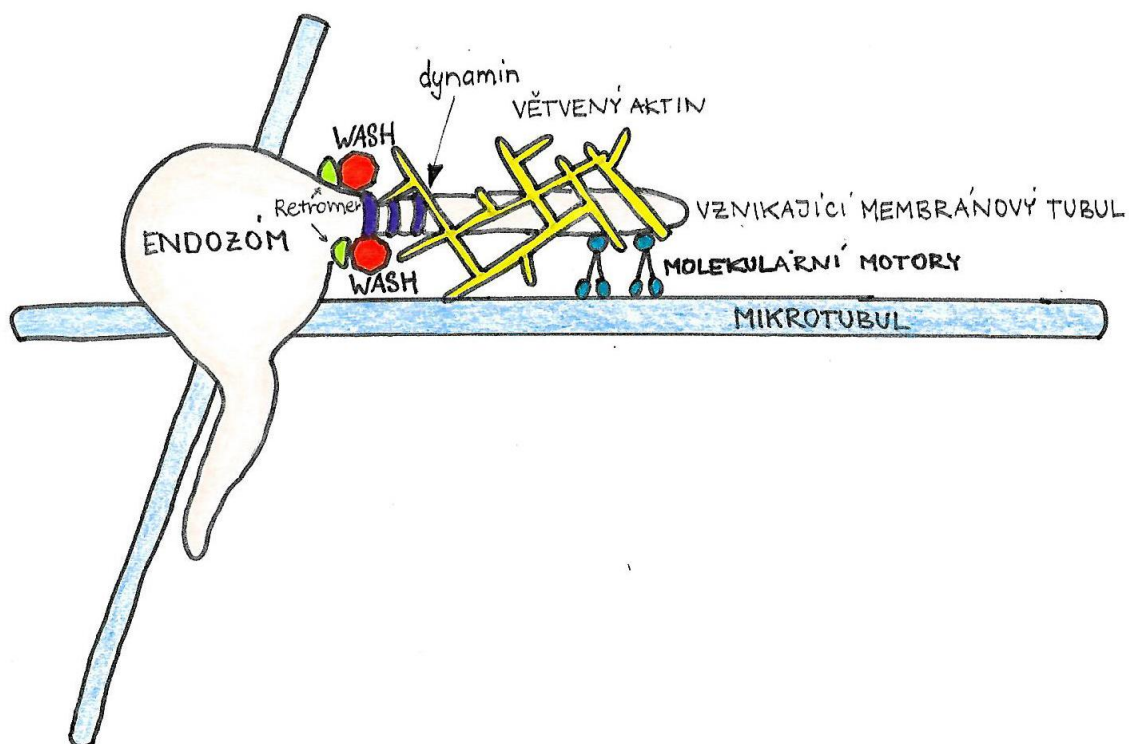
Retromer zřejmě úzce spolupracuje s WASH komplexem (Gomez and Billadeau 2009). Ten aktivací Arp2/3 způsobuje vznik domén větveného aktinu. Tato aktinová síť se podílí na vzniku membránových mikrodomén určených k odštěpení a může vytvářet mechanickou sílu působící na endozomální membránu.

Komplex retromer, který je zodpovědný za přivádění WASH komplexu na endozomální membrány je navíc komplexem obsahujícím SNX-BAR. Tyto proteiny, vyskytující se ve většině eukaryot (Casal et al. 2006), koordinují deformaci membrán se sortingem, čili propojují tyto dva mechanismy v čase. Jsou podrodinou sorting nexinů (SNX), což jsou proteiny asociující s membránou přes PX doménu. Ta specificky rozpoznává různé PI,

kteřé slouží jako identifikařory jednotlivých endocytických kompartmentů. (Cullen and Carlton 2012). Napřříklad SNX9 asociuje s PI(4,5)P2 – tedy na plazmatické membráně v místech endocytózy (Yarar, Waterman-Storer, and Schmid 2007). SNX1 asociuje s řasným endozómem (PI(3)P), a pozdním endozómem (PI(3,5)P2) (Cozier et al. 2002). Jak je z názvu zřejmé, obsahují SNX-BAR proteiny BAR domény. Aby byla interakce SNX-BAR s membránou úspěšná, musí dojít k vazbě jak pomocí PX domény SNX, tak pomocí elektrostatických interakcí mezi BAR doménou a membránou (Pylypenko et al. 2007).

SNX-BAR proteiny způsobují zakřivení membrán vložením amfipatického α helixu do membrány. Tento amfipatický helix funguje jako klín, odtlačuje od sebe lipidy v jednom listu membrány. Tím vznikají rozdíly v napětí mezi oběma listy membrány, což se projeví jejím zakřivením, které stabilizováno BAR doménou. (van Weering, Verkade, and Cullen 2010). Tento amfipatický helix obsahují pravděpodobně SNX1, SNX2, SNX4 a SNX9 (Pylypenko et al. 2007). Retromer obsahuje SNX1, SNX2, SNX5 a SNX6. Některé SNX (SNX5 a SNX6) navíc interagují s dyneinem přes jeho aktivátor dynactin (Wassmer et al. 2009) a spojují tak tvorbu endozomálních váčků s jejich transportem po mikrotubulech.

Je tedy zřejmé, že interakce WASH komplexu s retromerem slouží ke koordinaci několika dějů. Těmi jsou třídění molekul v nitru endozómů, tvorba zakřivených membrán pomocí SNX-BAR proteinů a vznik aktinových domén vyvíjejících tlak na membránu v místech báze vznikajících váčků. Ve výsledku je tedy třídění proteinů koordinováno s konečným odstěpením endozomálního váčku (Obr. 4).



Obr. 4

Model mašinerie koordinující třídění proteinů s odštěpováním váčku z endozomálního tubulu za pomoci mechanické síly generované polymerací aktinu. Zpracováno dle (Gautreau, Oguietvetskaia, and Ungermann 2014).

5.2.2 Tvorba membránových tubulů

Některé váčky nepučí přímo z vezikulární části endozómů, ale jsou odštěpovány z tubulárních útvarů. Tyto membránové tubuly vznikají činností mikrotubulárních molekulárních motorů, které mechanickou silou vytahují membránu směrem ven (Soppina et al. 2009). Jejich vznik je zároveň spojen v čase s endozomální fúzí – ta má totiž za důsledek přebytek endozomální membrány, ze které se následně vytváří tubul (Skjeldal et al. 2012). Tvorba těchto tubulů je také koordinována s tříděním proteinů – molekulární motor dynein, jak bylo uvedeno výše, asociuje s SNX-BAR proteiny (Wassmer et al. 2009).

6 Závěr

Endocytóza je vysoce dynamický proces, který je uskutečňován díky rychlému splývání a odštěpování membránových váčků. Pro buňku jsou tyto děje zcela zásadní, neboť tímto způsobem může regulovat signalizační události na plazmatické membráně, obnovovat použité receptory a udržovat požadované hodnoty vnitřního prostředí. Endocytóza je také možným způsobem buněčné ochrany, neboť nebezpečný patogen může být pohlcen a stráven, a v ideálním případě tak již nemůže škodit. Endocytická dráha je úzce spjata s cytoskeletárními strukturami – ať už mikrotubuly, či aktinovou sítí. V této práci jsou shrnuty současné poznatky o vzájemné interakci cytoskeletárních struktur a endocytických váčků. Protože metody studia endocytické dráhy jsou ve většině případů založeny na vizualizaci těchto struktur, události odehrávající se přímo na plazmatické membráně jsou hojně diskutovány ve velkém množství prací z důvodu její dobré pozorovatelnosti. Naopak spojení cytoskeletu a dějů na endozomálních membránách tolik zmiňováno není. Je tomu tak pravděpodobně proto, že endozomální kompartmenty jsou nesmírně dynamické a malé organely, a jejich pozorování je tímto nesnadné. Proto jsou i v této práci hojně využity příklady dějů na plazmatické membráně, na kterých se pokouším osvětlit obecné mechanismy splývání a odštěpování membrán. Tyto získané poznatky jsem se pak snažila uplatnit při popisování dějů přímo na membránách endozomálních.

Použitá literatura

- Allen, J.D., Jaffer, Z.M., Park, S.-J., Burgin, S., Hofmann, C., Sells, M.A., Chen, S., Derr-Yellin, E., Michels, E.G., McDaniel, A., et al. (2009). p21-activated kinase regulates mast cell degranulation via effects on calcium mobilization and cytoskeletal dynamics. *Blood* *113*, 2695–2705.
- Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* *6*, 2–9.
- Balderhaar, H.J. kleine, and Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell. Sci.* *126*, 1307–1316.
- Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2008). Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex. *J. Biol. Chem.* *283*, 7135–7144.
- Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E.B., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J., and Rottner, K. (2002). Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J. Biol. Chem.* *277*, 37771–37776.
- Bhuin, T., and Roy, J.K. (2014). Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* *328*, 1–19.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Brinkley, W. (1997). Microtubules: a brief historical perspective. *J. Struct. Biol.* *118*, 84–86.
- Bröcker, C., Engelbrecht-Vandré, S., and Ungermann, C. (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr. Biol.* *20*, R943–R952.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell* *12*, 671–682.
- Campellone, K.G., Webb, N.J., Znameroski, E.A., and Welch, M.D. (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* *134*, 148–161.
- Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* *136*, 1307–1322.
- Casal, E., Federici, L., Zhang, W., Fernandez-Recio, J., Priego, E.-M., Miguel, R.N., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Luisi, B.F., and Laue, E.D. (2006). The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry* *45*, 12917–12928.
- Chibalina, M.V., Seaman, M.N.J., Miller, C.C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* *120*, 4278–4288.

- Collins, A., Warrington, A., Taylor, K.A., and Svitkina, T. (2011). Structural Organization of the Actin Cytoskeleton at Sites of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Curr Biol* 21, 1167–1175.
- Cozier, G.E., Carlton, J., McGregor, A.H., Gleeson, P.A., Teasdale, R.D., Mellor, H., and Cullen, P.J. (2002). The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 48730–48736.
- Croisé, P., Estay-Ahumada, C., Gasman, S., and Ory, S. (2014). Rho GTPases, phosphoinositides, and actin. *Small GTPases* 5.
- Cullen, P.J., and Carlton, J.G. (2012). Phosphoinositides in the mammalian endo-lysosomal network. *Subcell Biochem* 59, 65–110.
- De Curtis, I., and Meldolesi, J. (2012). Cell surface dynamics - how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 125, 4435–4444.
- Defacque, H., Egeberg, M., Habermann, A., Diakonova, M., Roy, C., Mangeat, P., Voelter, W., Marriott, G., Pfannstiel, J., Faulstich, H., et al. (2000). Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *EMBO J.* 19, 199–212.
- 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, 712–723.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Eitzen, G. (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 175–181.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E.H., De Camilli, P., and Unger, V.M. (2008). Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell* 132, 807–817.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Aunis, D., and Bader, M.F. (1998). Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16913–16920.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M.R., Aunis, D., and Bader, M.F. (1999). Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 24), 4763–4771.
- Gautreau, A., Oguievetskaia, K., and Ungermann, C. (2014). Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.-M., Parton, R.G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* 19, 4577–4588.

- Gomez, T.S., and Billadeau, D.D. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* *17*, 699–711.
- Gruenberg, J., Griffiths, G., and Howell, K.E. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* *108*, 1301–1316.
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., and Sever, S. (2010). Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* *29*, 3593–3606.
- Hao, Y.-H., Doyle, J.M., Ramanathan, S., Gomez, T.S., Jia, D., Xu, M., Chen, Z.J., Billadeau, D.D., Rosen, M.K., and Potts, P.R. (2013). Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell* *152*, 1051–1064.
- Heo, W.D., Inoue, T., Park, W.S., Kim, M.L., Park, B.O., Wandless, T.J., and Meyer, T. (2006). PI(3,4,5)P₃ and PI(4,5)P₂ lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* *314*, 1458–1461.
- Hong-Geller, E., and Cerione, R.A. (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J. Cell Biol.* *148*, 481–494.
- Hsu, V.W., and Prekeris, R. (2010). Transport at the recycling endosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 528–534.
- Hüfner, K., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Jacobi, C., Aepfelbacher, M., and Linder, S. (2001). The Verprolin-like Central (VC) Region of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Induces Arp2/3 Complex-dependent Actin Nucleation. *J. Biol. Chem.* *276*, 35761–35767.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J.* *30*, 3481–3500.
- Jeon, C.-Y., Moon, M.-Y., Kim, J.-H., Kim, H.-J., Kim, J.-G., Li, Y., Jin, J.-K., Kim, P.-H., Kim, H.-C., Meier, K.E., et al. (2012). Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation. *Journal of Neurochemistry* *120*, 684–698.
- Jerdeva, G.V., Wu, K., Yarber, F.A., Rhodes, C.J., Kalman, D., Schechter, J.E., and Hamm-Alvarez, S.F. (2005). Actin and non-muscle myosin II facilitate apical exocytosis of tear proteins in rabbit lacrimal acinar epithelial cells. *J Cell Sci* *118*, 4797–4812.
- Johannes, L., and Popoff, V. (2008). Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking. *Cell* *135*, 1175–1187.
- Jović, M., Kieken, F., Naslavsky, N., Sorgen, P.L., and Caplan, S. (2009). Eps15 Homology Domain 1-associated Tubules Contain Phosphatidylinositol-4-Phosphate and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate and Are Required for Efficient Recycling. *Mol Biol Cell* *20*, 2731–2743.
- Kornilova, E.S. (2014). Receptor-mediated endocytosis and cytoskeleton. *Biochemistry Mosc.* *79*, 865–878.
- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the Assembly of ATP- and ADP-Actin by Formins and Profilin. *Cell* *124*, 423–435.

- Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W.L., Zhang, Y., Yau, R.G.W., Weisman, L.S., and Xu, H. (2013). Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 21165–21170.
- Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D.G., and Oster, G. (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *PNAS* *103*, 10277–10282.
- Loubéry, S., Wilhelm, C., Hurbain, I., Neveu, S., Louvard, D., and Coudrier, E. (2008). Different Microtubule Motors Move Early and Late Endocytic Compartments. *Traffic* *9*, 492–509.
- Mooren, O.L., Galletta, B.J., and Cooper, J.A. (2012). Roles for actin assembly in endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 661–686.
- Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X., and Yin, H.L. (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* *128*, 589–598.
- Murray, J.W., and Wolkoff, A.W. (2003). Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 1385–1403.
- Nevins, A.K., and Thurmond, D.C. (2005). A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 1944–1952.
- Nightingale, T.D., Cutler, D.F., and Cramer, L.P. (2012). Actin coats and rings promote regulated exocytosis. *Trends in Cell Biology* *22*, 329–337.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* *303*, 495–499.
- Piper, R.C., and Katzmann, D.J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 519–547.
- Pylypenko, O., Lundmark, R., Rasmuson, E., Carlsson, S.R., and Rak, A. (2007). The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *EMBO J* *26*, 4788–4800.
- Raposo, G., Cordonnier, M.N., Tenza, D., Menichi, B., Dürrbach, A., Louvard, D., and Coudrier, E. (1999). Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1477–1494.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* *122*, 735–749.
- Seaman, M.N.J. (2008). Endosome protein sorting: motifs and machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2842–2858.
- 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*, 665–681.
- Sheff, D., Pelletier, L., O’Connell, C.B., Warren, G., and Mellman, I. (2002). Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J. Cell Biol.* *156*, 797–804.

- Skjeldal, F.M., Strunze, S., Bergeland, T., Walseng, E., Gregers, T.F., and Bakke, O. (2012). The fusion of early endosomes induces molecular-motor-driven tubule formation and fission. *J. Cell. Sci.* *125*, 1910–1919.
- 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*, 901–914.
- Soppina, V., Rai, A.K., Ramaiya, A.J., Barak, P., and Mallik, R. (2009). Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 19381–19386.
- Sweitzer, S.M., and Hinshaw, J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* *93*, 1021–1029.
- Tan, S.C., Scherer, J., and Vallee, R.B. (2011). Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Mol Biol Cell* *22*, 467–477.
- Taylor, M.J., Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2011). A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biol* *9*, e1000604.
- Wade, R.H., and Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 12–17.
- 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*, 110–122.
- Wear, M.A., Yamashita, A., Kim, K., Maéda, Y., and Cooper, J.A. (2003). How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr. Biol.* *13*, 1531–1537.
- Van Weering, J.R.T., Verkade, P., and Cullen, P.J. (2010). SNX–BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* *21*, 371–380.
- Yan, Q., Sun, W., Kujala, P., Lotfi, Y., Vida, T.A., and Bean, A.J. (2005). CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2470–2482.
- Yao, L.-H., Rao, Y., Bang, C., Kurilova, S., Varga, K., Wang, C.-Y., Weller, B.D., Cho, W., Cheng, J., and Gong, L.-W. (2013). Actin polymerization does not provide direct mechanical forces for vesicle fission during clathrin-mediated endocytosis. *J. Neurosci.* *33*, 15793–15798.
- Zuchero, J.B., Coutts, A.S., Quinlan, M.E., Thangue, N.B.L., and Mullins, R.D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat. Cell Biol.* *11*, 451–459.