

p. 939

31.02.09

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2009
TOM 55
NUMER 2

Mechanizmy migracji komórek
Transport wewnątrzkomórkowy
Przekazywanie sygnałów
a migracja komórek
Aktyna i miozyny
w jądrze

Numer specjalny sieci Mobilitas.pl
pod redakcją Marii Jolanty Rędownicz



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

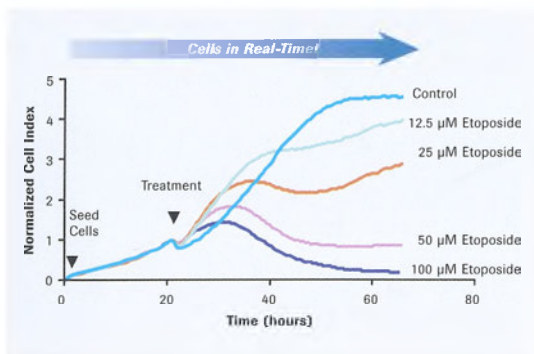


www.roche-applied-science.com

xCELLigence
Aparat RTCA SP

xCELLigence system analizy komórek w czasie rzeczywistym

Głębsze spojrzenie, prawdziwe zrozumienie



Ryc. 1: monitorowanie w czasie rzeczywistym cytotoksyczności poprzez degradację DNA.
Etoposyd to czynnik niszczący DNA, który w wysokim stężeniu indukuje apoptozę, a w niższych stężeniach prowadzi do przejścia w fazę S lub G2.

Doświadcz potęgę dynamiki analizy komórkowej w czasie rzeczywistym, bez użycia barwników przy użyciu nowego systemu xCELLigence. Uzyskuj dane z całych eksperymentów, które przy użyciu dotychczasowych metod nie były osiągalne. Pracuj bez użycia barwników by zapewnić pełną fizjologiczną wiarygodność danych. Wybierz z elastycznych opcji formatów by dostosować system do swoich potrzeb: 48, 96 lub 576 (6 x 96) dołków.

- **Zbieraj dane z całego przebiegu eksperymentu**
- **Otrzymuj fizjologiczną wiarygodność danych i eliminuj konieczność stosowania obcych barwników i reporterów**
- **Maksymalizuj wszechstronność: analizuj komórki w szerokim zakresie dynamicznym oraz wykonuj różne rodzaje analiz (np. proliferację i cytotoksyczność, ryc. 1)**

System xCELLigence to głębsze spojrzenie dla prawdziwego zrozumienia

Odwiedź naszą stronę internetową www.xcelligence.roche.com w celu uzyskania dodatkowych informacji lub skontaktuj się z naszym lokalnym przedstawicielem.



xCELLIGENCE jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.
© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

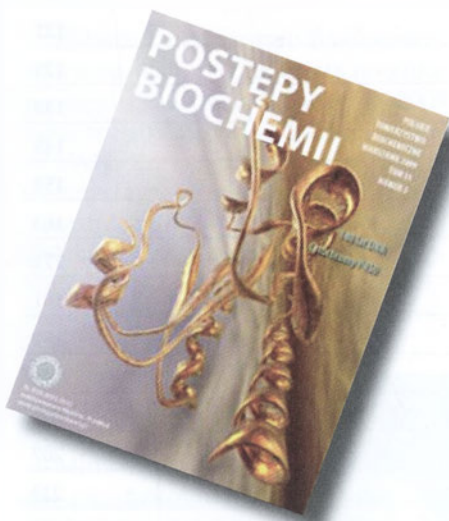
<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.
Ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
01-531 Warszawa
www.roche-applied-science.com
biologia.molekularna@roche.com
tel. 022 481-55-55
fax. 022 481-55-92



Postępy Biochemii – vol. 55, nr 2, 2009

Numer specjalny pod redakcją Marii Jolanty Rędownicz



W NASTĘPNYM NUMERZE:

140-te urodziny DNA

Cytochromy P-450

Kwas jasmonowy w przekazywaniu sygnałów

Redakcja przeprasza za błąd powstały w vol. 55 nr 1, 2009, s. 4: Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego PTBioch XVIII kadencji (2005–2008)

jest: Pozostali członkowie Z.G.: Marek Gniazdowski (Łódź, zmarł 18. 7. 2006 r.), Teresa Jakubowicz (Lublin), Wiesława Jarmuszkiewicz (Poznań), Michał Komoszyński (Toruń), Piotr Laidler (Kraków), Adam Szewczyk (Warszawa), Michał Woźniak (Gdańsk), Ludmiła Żylirska (Łódź)

powinno być: Pozostali członkowie Z.G.: Dariusz Chłubek (Szczecin), Marek Gniazdowski (Łódź, zmarł 18. 7. 2006 r.), Teresa Jakubowicz (Lublin), Wiesława Jarmuszkiewicz (Poznań), Piotr Laidler (Kraków), Adam Szewczyk (Warszawa), Teresa Wesołowska (Szczecin), Michał Woźniak (Gdańsk)

Rysunek na okładce:

Zdjęcie na okładce, przedstawiające geparda (*Acinonyx jubatus*) polującego na ofiarę, nawiązuje do treści obecnego numeru specjalnego „Postępów Biochemii” poświęconego w całości mechanizmom ruchów komórkowych.

Jubileusz 50-lecia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XLII Maria Jolanta Rędownicz	105
Wspomnienie o profesor Renacie Dąbrowskiej Maria Jolanta Rędownicz, Barbara Pliszka	106
Wspomnienie o profesorze Przemysławie Janiku Pracownicy i doktoranci Zakładu Biologii Komórki Centrum Onkologii – Instytutu w Warszawie	107
WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE	
Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	108
ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE	
Sposoby migracji komórek nowotworowych Agnieszka Popow-Woźniak, Dorota Nowak, Maria Malicka-Błaszkiwicz	113
Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu Monika Gos, Joanna Miłoszewska, Małgorzata Przybyszewska	121
Regulacja dynamiki cytoszkieletu korykalnego podczas migracji swobodnie żyjących ameb Wanda Kłopotcka, Maria Jolanta Rędownicz, Anna Wasik	129
Aktyna w procesie gojenia ran Dorota Nowak, Agnieszka Popow-Woźniak, Linda Raźnikiewicz, Maria Malicka-Błaszkiwicz	138
Udział reaktywnych form tlenu i reduktazy tioredoksyny w regulacji migracji komórek Jolanta Sroka, Zbigniew Madeja	145
Rola efryn w regulacji migracji komórek nowotworowych Ewa Wybieralska, Eliza Łączna, Zbigniew Madeja	153
Regulacja migracji komórek przez jony wapnia Paweł Pomorski	163
Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych Marta Olchowik, Marta Miączyńska	171
Endocytoza i zależny od cytoszkieletu transport składników ścian komórkowych roślin Anna Kasproicz, Michał Michalak, Magdalena Wierzchowicka, Michałina Maruniewicz, Przemysław Wojtaszek	181
Rola układu aktomiozynowego w ruchach chloroplastów indukowanych światłem niebieskim Weronika Krzeszowiec, Halina Gabrys	187
Roślinna twarz formin – organizatorów cytoszkieletu aktynowego Michalina Maruniewicz, Anna Kasproicz, Przemysław Wojtaszek	196
Rola izoform tropomiozyny w różnicowaniu funkcji filamentów aktynowych Joanna Moraczewska	201
Białka aktynowego szkieletu komórki i błony partnerami lipidów Ewa Bok, Anita Hryniewicz-Jankowska, Aleksander F. Sikorski	207
Białka śledzące koniec plus mikrotubul oraz ich udział w organizacji wrzeciona mitotycznego Seweryn Bajer, Andrzej A. Kasprzak	223
Aktyna w jądrze komórkowym Marta Migocka-Patrzałek, Maria Malicka-Błaszkiwicz	232
Miozyny w jądrze komórkowym Magdalena Sobczak, Łukasz Majewski, Maria Jolanta Rędownicz	239

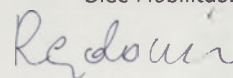
Events/Opinions/Comments	105
REVIEWS	
Types of tumor cell movement	113
Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression	121
Regulation of cortical cytoskeleton dynamics during migration of free-living amoebae	129
Actin in the wound healing process	138
Reactive oxygen species in regulation of cell migration. The role of thioredoxin reductase	145
Role of ephrins in regulation of tumor cell migration	153
Calcium regulation of cell migration	163
Effectors of GTPase Rab5 in endocytosis and signal transduction	171
Endocytosis and actin-dependent transport of plant cell wall components	181
The role of actomyosin in blue light-induced chloroplast movements	187
At the plant side of formins – organizers of the actin cytoskeleton	196
Role of tropomyosin isoforms in diversification of actin filaments functions	201
The interactions of actin cell and membrane skeleton proteins with lipids	207
Plus end tracking proteins and their role in mitotic spindle organization	223
Nuclear actin	232
Myosins in nucleus	239

Mechanizmy Ruchów Komórkowych

Ruch jest nierozzerwalnie związany z każdą żywą komórką, z każdym żywym organizmem – od bakterii po ssaki i rośliny. Problematyką ruchów komórkowych, rozumianych jako migracja i ruch wewnątrzkomórkowy, zajmuje się w Polsce szereg grup badawczych, które w 2006 r. podjęły inicjatywę utworzenia Sieci Mechanizmów Ruchów Komórkowych – Mobilitas.pl. Członkami Sieci zostały zespoły z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Curie-Skłodowskiej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN i Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. Z Siecią stowarzyszyły się grupy z Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu Wrocławskiego, Uniwersytetu Łódzkiego i Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Informacje o Sieci znajdują się na stronie internetowej www.mobilitas.pl. Z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego uzyskaliśmy fundusze na rozpoczęcie wspólnych badań, lecz w kolejnych konkursach nie przyznano już środków. Pomimo to kontynuujemy rozpoczętą współpracę, wyrazem czego jest m.in. przygotowanie numeru specjalnego „Postępów Biochemii”.

Autorami artykułów zamieszczonych w niniejszym numerze „Postępów Biochemii” są badacze związani z Siecią. Poza opisem mechanizmów migracji komórek od ameb po komórki nowotworowe (Kłopocka i współaut., Popow-Woźniak i współaut., Gos i współaut.), Czytelnik znajdzie w tym numerze prace dotyczące endocytozy w komórkach zwierzęcych (Olchowik i Miączyńska) i roślinnych (Kasprowicz i współaut.), przekazywania sygnałów (Olchowik i Miączyńska, Wybierańska i współaut., Sroka i Madeja, Pomorski), ruchu organelli w roślinach (Krzyszowicz i Gabryś), regulacji organizacji aktyny (Maruniewicz i współaut., Moraczewska, Kłopocka i współaut., Nowak i współaut.) i mikrotubul (Bajer i Kasprzak), białek szkieletu komórki oddziałujących z błoną komórkową (Bok i współaut.), a także aktyny i miozyny w jądrze komórkowym (Migocka-Patrzalek i Malicka Błaszczewicz, Sobczak i współaut.). Zamieszczamy także wspomnienia o prof. Renacie Dąbrowskiej, światowej sławy biochemiku mięśni i prof. Przemysławie Janiku, światowej sławy biologu komórek nowotworowych.

Zapraszam do lektury, Maria Jolanta Rędownicz
Sieć Mobilitas.pl



PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

Redaktor naczelny: Sławomir Pikula; e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl, Redaktor senior: Zofia Zielińska

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesołowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartos@biol.uni.lodz.pl

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zablocki, Alicja Żylicz

Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska-Książek; e-mail: marta.izdebska@gmail.com

Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: postepy@nencki.gov.pl; <http://www.postepybiochemii.pl>

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (022) 6582099, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl; <http://www.ptbioch.edu.pl>

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego,

„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

JUBILEUSZ 50-LECIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Polskie Towarzystwo Biochemiczne świętowało pięćdziesiątą rocznicę swojego powstania 3 kwietnia 2009 roku w Sali Lustrzanej Pałacu Staszica PAN. Zorganizowano z tej okazji uroczystą sesję naukową, w której uczestniczyło wielu zaproszonych gości, sympatyków i członków Towarzystwa z całego kraju i zagranicy. Na uroczystość przybyli m.in.: prof.

Israel Pecht (sekretarz generalny FEBS), prof. Jerzy Duszyński (podsekretarz stanu w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego), minister Julia Pitera wraz z siostrą Krystyną i synem Jakubem (rodzina prof. Kazimierza Zakrzewskiego, wieloletniego prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego), prof. Serhij Komisarenko (prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego), prof. Andriej Mojsiejonok (Białoruskie Towarzystwo Biochemiczne), prof. Andriy Sybirny (prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biologii Komórki), prof. Wojciech Stec (wiceprezes PAN), profesorowie: Adam Szewczyk (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN i Piotr Zielenkiewicz (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN) – dyrektorzy placówek naukowych od lat wspierających Polskie Towarzystwo Biochemiczne, a także prorektorzy i dziekani z uczelni biologicznych z całego kraju, m.in.: Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Akademii Wychowania Fizycznego w Warszawie; Wydziałów: Biologii i Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydziałów: Biotechnologii, Nauk Biologicznych i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, a także



Fotografia 1. Od prawej: w pierwszym rzędzie – prof. Piotr Zielenkiewicz, prof. Bogusław Buszewski, prof. Andriy Sybirny, prof. Israel Pecht, prof. Adam Szewczyk, prof. Jerzy Duszyński, sekretarz stanu Julia Pitera z synem Jakubem; w drugim rzędzie: prof. Michał Woźniak, prof. Małgorzata Skup, prof. Sławomir Majewski, mgr Łukasz Majewski; w głębi – prof. Janina Kwiatkowska-Korczak i prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert

przedstawiciele polskich towarzystw naukowych: prof. Jerzy Kawiak (Polskie Towarzystwo Histochemiczne i Cytochemiczne), prof. Bogusław Buszewski (Polskie Towarzystwo Chemiczne), prof. Alicja Józkiewicz (Polskie Towarzystwo Biologii Komórki); prof. Małgorzata Skup (Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego), prof. Jan Pachecka (Polskie To-

warzystwo Farmaceutyczne), przedstawiciele warszawskich placówek naukowych, m.in. Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej oraz Centrum Onkologii, redaktor Krzysztof Michalski z I Programu Polskiego Radia (laureat Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. B.

Filipowicza) oraz członkowie honorowi Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: prof. Mieczysław Chorąży, prof. Janina Kwiatkowska-Korczak, prof. Aleksander Koj i prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska.

Po krótkich wystąpieniach gości i odczytaniu listów gratulacyjnych m.in. od prof. Andrzeja Legockiego (przewodniczący Wydziału Nauk Biologicznych PAN), prof.

Macieja J. Nałęcza (dyrektor Departamentu Nauk Podstawowych i Inżynieryjnych, UNESCO) i prof. Karola Musioła (rektor Uniwersy-

tetu Jagiellońskiego), prof. Lech Wojtczak (trzykrotny prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) przedstawił wykład o historii Towarzystwa. Wręczył on również dyplomy nowym członkom honorowym Towarzystwa: prof. Jolancie Barańskiej (Instytut Nenckiego), prof. Edwardowi Bańkowskiemu (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku), prof. Andrzejowi Dzugajowi (Uniwersytet Wrocławski) i prof. Aleksandrowi Kojowi (Uniwersytet Jagielloński).

Następnie wspaniałe wykłady wygłosili laureaci nagród im. J. K. Parnasa: prof. Maciej Żylicz z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej, prezes Fundacji na rzecz Nauki Polskiej („Kameleony białkowe”) oraz prof. Grzegorz Węgrzyn z Uniwersytetu Gdańskiego, redaktor naczelny *Acta Biochimica Polonica* („50 lat Polskiego Towarzystwa Biochemicznego – 150 lat DNA”).

Po części oficjalnej nastąpiły pełne wzruszeń chwile wspomnień przy lampce wina i nie tylko. Podczas za-

jadania smakołyków można było wspominać oglądając pokaz zdjęć z zasobów archiwalnych Zarządu i członków Towarzystwa. Szczegółowy opis uroczystości wraz z galerią zdjęć znajduje się na stronie internetowej Towarzystwa – www.ptbioch.edu.pl; zamierzamy tam również umieścić prezentację z wykładem prof. Wojtczaka oraz pokazywane podczas części wspomnieniowej zdjęcia archiwalne.

Zorganizowanie uroczystości było możliwe dzięki hojności sponsorów: Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Instytutu Bioche-



Fotografia 2. Prof. Andrzej Dzugaj, prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego otwiera Sesję Jubileuszową.

mii i Biofizyki PAN oraz firm: Come-sa Polska, Sigma-Aldrich, Kendrolab, Carl Zeiss, Kawa.ska, Abo Grażyna Boreysza, A.G.A. Analytical, Millipore, Olympus Polska, Sarstedt i Becton Dickinson Polska.

Wszystkim darczyńcom bardzo serdecznie dziękujemy.

Ponadto, I Program Polskiego Radia wyemitował w dniu 4 kwietnia 2009 r. audycję radiową poświęconą historii polskiej biochemii. Była to dyskusja w ramach cyklu Wieczór Odkrywców; gospodarzem był redaktor Krzysztof Michalski, a gościem – prof. Andrzej Dżugaj (prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego), prof. Jolanta Barańska (wice-

prezes) i prof. Edward Bańkowski (członek Prezydium Zarządu Głównego). Ze strony internetowej Towarzystwa można odsłuchać tę ciekawą audycję.

Maria Jolanta Rędownicz
Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

WSPOMNIENIE O PROFESOR RENACIE DĄBROWSKIEJ



Profesor dr hab. Renata Dąbrowska (zdjęcie ze zbiorów Jana Dąbrowskiego).

Prof. dr hab. Renata Dąbrowska zmarła 4 października 2008 r. po długiej i wyniszczającej chorobie. Należała ona do tych uczonych, których określa się mianem pasjonatów. Niezwykle oddana badaniom w dziedzinie wiedzy, którą sobie obrała za przedmiot wieloletnich dociekań, była niekwestionowanym liderem w zakresie biochemii mięśni, a w szczególności struktury i funkcji białek aparatu skurczu i cytoskieletu różnych typów mięśni oraz regulacji aktywności motorycznej mięśni gładkich. Była autorką ponad 100 publikacji doświadczalnych i przeglądowych oraz niezliczonej liczby doniesień i komunikatów zjazdowych poświęconych procesom regulacji skurczu mięśni. O wadze Jej osiągnięć świadczy obecność Jej nazwiska na liście polskich uczonych najczęściej cytowanych w literaturze światowej. Jej publikacje były wielokrotnie nagradzane, otrzymała m.in. nagrody zespołowe Sekretarza PAN, Przewodniczącego Wydziału Nauk Biologicznych PAN, a ostatnio nagrodę za współpracę pomiędzy Polską i Rosyjską Akademią Nauk; nie doczekała jednak momentu

jej odbioru. Powierzano Jej prestiżowe funkcje w krajowych i międzynarodowych organizacjach naukowych. Była m.in. członkiem Komitetu Cytobiologii PAN, Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN, Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN i Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w którym w latach siedemdziesiątych pełniła funkcję sekretarza Zarządu Głównego. Należała również do European Cytoskeleton Forum oraz European Muscle Society, w którego pracach uczestniczyła jako członek Zarządu ds. Europy Środkowo-Wschodniej. Wielokrotnie zapraszano ją do prezentowania swoich osiągnięć naukowych; wygłaszała wykłady w tak prestiżowych placówkach naukowych jak m.in. College de France w Paryżu, Uniwersytet w Heidelbergu, Uniwersytety w Tokio i Nagoi, Boston University oraz instytucjach Szwedzkiej Akademii Nauk w Sztokholmie i Lund.

Prof. Dąbrowska urodziła się w 1936 r. w podwarszawskim Konstancinie. Po ukończeniu w 1958 r. Wydziału Chemii na Politechnice Warszawskiej rozpoczęła pracę jako asystent w Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Warszawie, a od 1966 r. aż do odejścia na emeryturę w 2006 r. związała się z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, gdzie została wprowadzona w tematykę biochemii mięśni przez prof. Witolda Drabikowskiego. W Instytucie Nenckiego osiągnęła wszystkie etapy kariery naukowej, tu w 1969 r. obroniła pracę doktorską, w 1974 r. uzyskała stopień doktora habilitowanego, w 1982 r. została profesorem nadzwyczajnym, a w 1990 r. – profesorem

zwyczajnym. Staże podoktorskie odbywała w Zakładzie Zoologii, University of Oxford, Wielka Brytania (1970-1971) oraz w Zakładzie Biochemii, Pittsburgh University, USA (1977/78), gdzie pracowała w laboratorium kierowanym przez prof. Davida J. Harshorne'a; owocną współpracę z nim i jego wychowankami kontynuowała do końca aktywnej pracy zawodowej. W 1981 r. zorganizowała Pracownię Regulacji Procesów Skurczu, którą kierowała przez ćwierć wieku, zaś w latach 1991-1999 była kierownikiem Zakładu Biochemii Mięśni, a w latach 1982-1990 pełniła funkcję zastępcy Dyrektora Instytutu ds. Spraw Naukowych. Przez wiele kadencji aktywnie uczestniczyła również w pracach Rady Naukowej Instytutu.

Była w ścisłej czołówce badaczy, którym Instytut Nenckiego zawdzięcza wysoką pozycję w Polsce i na świecie. Praca pod Jej kierunkiem zapewniała młodym ludziom solidne przygotowanie do prowadzenia samodzielnych badań i gwarantowała udział w rozwiązywaniu ważnych i jednocześnie ciekawych problemów. Współpracując owocnie z zagranicznymi ośrodkami naukowymi na wschód (m.in. z Prof. Jurijem Borowikowem z Instytutu Cytologii Rosyjskiej Akademii Nauk) i zachód od Polski (przede wszystkim z D. Harshornem), starała się kierować swoich wychowanków na staże do najlepszych laboratoriów; większość z jej podopiecznych pozostała jednak za granicą.

Ostatnie dziesięć lat Jej życia było heroiczną walką z chorobą, której

starala się nie poddawać, pracowała niezwykle intensywnie pomiędzy jej nawrotami, chociaż sił miała coraz mniej. W tym ostatnim okresie była w stanie doprowadzić do opublikowania kilkunastu publikacji, a mimo to odczuwała wielki dyskomfort, że tyle

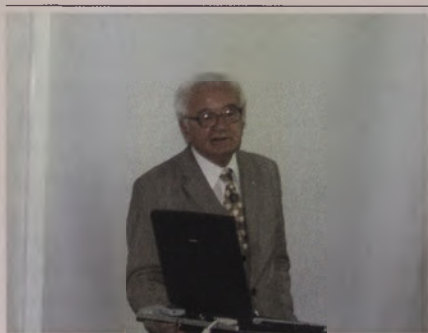
rzeczy pozostało jeszcze do zrobienia, a ona już nie jest w stanie pracować.

Jej odejście jest niepowetowaną stratą dla osób prowadzących badania nad strukturą i funkcją białek, zwłaszcza dla tych zajmujących się molekularnymi mechanizmami ruchu. Mimo,

iż prof. Dąbrowska nie zdążyła zostać członkiem Sieci *Mobilitas.pl* jej spuścizna naukowa i niepokorny duch odkrywcy tajemnic natury zawsze nam towarzyszył...

**Barbara Pliszka,
Maria Jolanta Rędownicz**

WSPOMNIENIE O PROFESORZE PRZEMYSŁAWIE JANIKU



Profesor dr hab. Przemysław Janik (zdjęcie wykonała Anna Mirgos, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie).

Minął już rok odkąd pożegnaliśmy **prof. dr hab. med. Przemysława Janika**, wybitnego naukowca, lekarza, twórcę i wieloletniego Kierownika Zakładu Biologii Komórki w Centrum Onkologii - Instytucie w Warszawie. Odszedł od nas nagle, będąc w pełni sił twórczych, energii i zapału do pracy. W codziennej pracy Profesor zachęcał nas do podejmowania nowych wyzwań, wspierał nas swoją wiedzą naukową i medyczną.

Profesor Przemysław Janik, urodzony 12 grudnia 1937 roku we Lwowie, od czasów powojennych mieszkał w Warszawie. Tu ukończył prestiżowe Liceum im. T. Rejtana, a następnie – Wydział Lekarski Akademii Medycznej. Już w czasie studiów, które ukończył w 1963 roku, aktywnie działał w Kole Naukowym przy Klinice Chorób Wewnętrznych AM pracując jednocześnie w Pogotowiu Warszawskim.

Pracę naukową, która okazała się Jego wielkim powołaniem, rozpoczął w Zakładzie Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie przy ul. Wawelskiej

w Warszawie, pod kierunkiem Profesora Kazimierza Duxa. Tam też uzyskał kolejne stopnie naukowe: doktora medycyny w 1969 r., a doktora habilitowanego medycyny w roku 1979. Doświadczenie naukowo-badawcze z zakresu biologii komórki, biologii medycznej i onkologii doświadczalnej zdobywał nie tylko w kraju, ale również poprzez kontakt z zagranicznymi ośrodkami, w których na przestrzeni lat 1969–1980 odbył kilka znaczących staży naukowych: w Cancer Research Institute w Londynie, Fibiger Institute w Danii oraz w Roswell Park Memorial Cancer Institute w Buffalo (USA).

W roku 1989 uzyskał tytuł Profesora, nadany przez Przewodniczącego Rady Państwa na wniosek Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie. Od czasu ukończenia studiów cała aktywność zawodowa i kariera naukowa Profesora Przemysława Janika związana była ściśle z Instytutem Onkologii, gdzie przez wiele lat kierował stworzonymi przez siebie zespołami: najpierw Pracownią Proliferacji Komórkowej w Zakładzie Biologii Nowotworów, a następnie, już po przeprowadzce do nowej siedziby Instytutu na Ursynowie w roku 1995, Zakładem Biologii Komórki. Zainteresowania naukowe Profesora związane były początkowo z wpływem stresu i czynników immunologicznych na proliferację komórek nowotworowych. Następnie, wraz z niewielkim jeszcze wówczas zespołem, rozpoczął badania nad antypromocyjną rolą retinoidów w procesie karcynogenezy. Za cykl prac związanych z tą tematyką, w tym również za badania nad zastosowaniem klinicznym retinoidów, otrzymał w 1990 roku wraz z Zespołem Nagrodę I st. Ministra Zdrowia i Opieki Spo-

łecznej, a w roku 1992 Nagrodę I st. Wydziału Nauk Medycznych PAN.

Od roku 1995, już w Zakładzie Biologii Komórki, Profesor Janik kierował pracami, które koncentrowały się na badaniach procesu inhibicji kontaktowej, mechanizmów powstawania przerzutów oraz procesów: angiogenezy i antyangiogenezy. Prawdziwym sukcesem okazały się zainspirowane przez Profesora badania w tej ostatniej dziedzinie, które doprowadziły do stworzenia podstaw terapii genowej przy użyciu skonstruowanych w naszym Zakładzie i opatentowanych plazmidów zawierających geny kodujące czynniki proangiogenne i antyangiogenne i w roku 2003 nagrodzone zostały przez Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny. Dalsze działania Profesora spowodowały, że wyniki tych ostatnich prac nie pozostały tylko na papierze – udało się im przejść trudną drogę, jaką mają do pokonania nowe technologie – od badań laboratoryjnych do zastosowań terapeutycznych. W latach 2003–2007 Profesor Janik był współautorem projektu trzech badań klinicznych z zastosowaniem skonstruowanych przez Jego zespół plazmidowych preparatów leczniczych.

Profesor Przemysław Janik był w latach 2007–2008 jednym z inicjatorów i wykonawców prac prowadzonych w ramach projektu badawczego finansowanego przez Polską Sieć Ruchów Komórkowych *Mobilitas.pl*. W tym ogólnopolskim, wieloosrodkowym programie, w którym uczestniczył wraz ze swoim zespołem, koncentrował się na mechanizmach tworzenia przerzutów nowotworowych. Równoległe pod jego kierunkiem prowa-

dzone były w Zakładzie Biologii Komórki prace związane z diagnostyką molekularną nowotworów oraz tzw. komórkami macierzystymi nowotworów. W ramach tego ostatniego zagadnienia dążył do stworzenia nowego paradygmatu leczenia chorób nowotworowych, opartego na celowanym uderzeniu w komórki, które przetrwały konwencjonalne leczenie cytostatykami. Badania te prowadził we współpracy z Instytutem Farmaceutycznym w Warszawie. Do wyników uzyskanych z całego spektrum tematów Profesor odnosił się nie tylko z naukowego ale i z medycznego punktu widzenia. Ważne było, aby z podjętych działań badawczych wynikały wymierne efekty terapeutyczne, co w sposób oczywisty stanowiło dla Niego sedno etosu pracy lekarza.

Przez te wszystkie lata Profesor był ponadto promotorem i wnikliwym recenzentem prac habilitacyjnych, doktorskich i magisterskich. Dla tych, którzy tego potrzebowali, Profesor był bardzo pomocny, zawsze służył radą i swoim czasem, inspirował odbiegającymi od schematu pomysłami. Dla przeprowadzenia zamierzeń, które uważał za wartościowe, potrafił łączyć badaczy z różnych dziedzin, ułatwiał realizację badań wspierając je swoim autorytetem. Ponieważ pochodził z pokolenia, którego młodość i początki kariery nie były łatwe, starał się stworzyć pracującym z Nim młodym ludziom jak lepsze wa-

runki do startu. Profesor lubił młodych ludzi, był im zawsze życzliwy i miał z nimi świetny, bezpośredni kontakt.

W ciągu swojej pracy w Centrum Onkologii – Instytucie Profesor był wielokrotnie wybierany do Rady Naukowej, a przez dwie kadencje pełnił w niej funkcję Przewodniczącego Komisji d/s Przewodów Doktorskich. W latach 1992–1998 był również członkiem Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.

Dorobek naukowy Profesora obejmuje ponad 100 opublikowanych prac naukowych, z których większość umieszczona została w wiodących międzynarodowych czasopismach. Współpracował także z czasopismami naukowymi; był członkiem Kolegium Redakcyjnego *Cell Proliferation*, brał również udział w pracach Rady Konsultantów i Komitecie Redakcyjnym dwumiesięcznika *Nowotwory – Journal of Oncology*.

Warto tu przypomnieć, że Profesor Janik był członkiem wielu towarzystw naukowych polskich i zagranicznych. Szczególnie cenił sobie to, że został założycielem i członkiem honorowym Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej. Działal ponadto w Polskiej Unii Onkologii (przewodniczący sądu koleżeńskiego), Polskim Towarzystwie Biologii Komórki (członek zarządu krajowego), Komisji Biologii Nowotworów (przewodniczący), Komitecie Patologii

Komórkowej i Molekularnej PAN, Komitecie Cytobiologii PAN oraz w Europejskiej Grupie do Badań Proliferacji Komórkowej (ESGCP) przekształconej w European Cell Proliferation Society (ECPS). W ostatnim roku Profesor z wielką energią i entuzjazmem zaangażował się w organizację międzynarodowego Zjazdu tego Towarzystwa, który odbył się na przełomie maja i czerwca 2007 roku na terenie naszego Instytutu. Z okazji obchodów jubileuszu 70. lecia Instytutu Onkologii w 2002 roku, niemal w czterdziestolecie pracy zawodowej, Profesor Przemysław Janik za swoje zasługi został odznaczony Krzyżem Kawalerskim – Orderu Polonia Restituta.

Kiedy siedem lat temu wygrał heroiczną walkę z poważną chorobą serca i po operacji wrócił do pracy pełen optymizmu i planów, myśleliśmy, że będzie z nami jeszcze przez wiele lat. Odejście Profesora zamknęło ważny etap w działalności naszego Zakładu, Centrum Onkologii Instytutu, niezapomniany okres w życiu każdego z Jego współpracowników i przyjaciół. Wiemy, że Profesor chciałby, aby jego idee i myśli były kontynuowane, rozwijane i udoskonalane.

Przedruk ze skrótami autorów z *Nowotwory, Journal of Oncology*, 2008, vol. 5: 275–277, za zgodą redakcji

Pracownicy i doktoranci Zakładu Biologii Komórki Centrum Onkologii – Instytutu w Warszawie

WIADOMOŚCI KRAJOWE

5 lutego 2009 roku Prezes Rady Ministrów Donald Tusk wręczył nagrody (Fot. 1) za **wyróżnione rozprawy doktorskie i habilitacyjne** oraz za działalność naukową, naukowo-techniczną lub artystyczną. Premier wręczył także dwie nagrody za wybitne krajowe osiągnięcia naukowo-techniczne: zespołowi naukowców i indywidualnemu uczonemu. Nagrody otrzymało pięćdziesiąt osób. Wśród laureatów znajdują się członkowie PAN i pracownicy placówek naukowych PAN, nagrodzeni w kategoriach: za wybitne osiągnięcia naukowe – cztery, za wybitny dorobek naukowy – cztery, za najlepsze prace habilitacyjne – dziesięć,

za najlepsze rozprawy doktorskie – trzydzieści dwie. Wśród wyróżnionych są członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski (Fot. 2) z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN oraz z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, nagrodzony za wybitne osiągnięcia naukowe; prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz (Fot. 3) – Akademia Medyczna w Gdańsku; Katedra Biochemii Klinicznej, nagrodzony za wybitny dorobek naukowy; dr Marcin Balcerzak, z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie oraz dr Jacek Król, z Instytutu Chemii Bioorga-

nicznej PAN w Poznaniu, nagrodzeni za rozprawy doktorskie.

Laureatom (Fot. 4) VII edycji konkursu Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny 2 kwietnia 2009 roku wręczono granty na badania oryginalne wnoszące istotne wartości do medycyny i farmacji. Do konkursu zgłoszono 20 wniosków projektów badawczych. Decyzją Rady Naukowej do kolejnego etapu (ocena recenzentów) skierowanych zostało 8 wniosków. Na podstawie oceny recenzentów i rekomendacji Rady Naukowej zarząd Fundacji zatwier-

dził przyznanie 5 grantów. Granty otrzymali:

Dr n. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego na badania w projekcie „Izolacja komórek macierzystych z mięśnia poprzecznie prążkowanego naramiennego z wykorzystaniem ich w leczeniu wysiłkowego nietrzymania moczu u kobiet”. Koszt projektu 253 200 zł brutto. Projekt zakłada sprawdzenie alternatywnej w stosunku do obecnie jedynej metody chirurgicznej, nowatorskiej terapii z wykorzystaniem własnych komórek macierzystych pochodzących z mięśni. Z powodu wysiłkowego nietrzymania moczu w Polsce cierpi około 3 miliony kobiet.

Dr hab. n. med. Agnieszka Słowik z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego na prowadzenie badań w projekcie „Czy polimorfizmy na chromosomie 4q25 związane z ryzykiem migotania przedsionków mają wpływ na ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu w populacji polskiej?”. Koszt projektu 273 600 zł brutto. Celem badań jest ustalenie



Fotografia 2. Prof. Andrzej Jerzmanowski odbiera nagrodę z rąk Premiera RP.

przyczyny występowania udarów o nieznanym podłożu. Stanowią one ponad 30% wszystkich podobnych zaburzeń pracy mózgu, a ujmując globalnie w Polsce ginie co roku z powodu udarów mózgu ok. 30 ty-



Fotografia 1. Laureaci nagrody Premiera za rok 2008.

się osób. Szacuje się, iż przynajmniej w części przypadków udary mogą być związane z napadowym migotaniem przedsionków, które jest trudne do wykrycia w jednorazowym badaniu EKG. Jeśli tak jest w rzeczywistości, osoby dotknięte tym problemem powinno się inaczej niż dotychczas diagnozować oraz leczyć.

Dr Barbara Dołęgowska z Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie na badanie w projekcie „Porównanie metod pomiaru aktywności dehydrogenazy dihydropirymidowej (DPD) w osoczu i limfocytach krwi obwodowej – wybór optymalnej metody dla testów przesiewowych poprzedzających leczenie pochodnymi 5-fluoropirymidynowymi”. Koszt projektu 174 960 zł brutto. Celem projektu jest poprawienie skuteczności i bezpieczeństwa chemioterapii u chorych na raka poprzez opracowanie szybkiego, taniego i łatwo dostępnego testu, z pomocą którego można będzie ocenić, czy popularny lek przeciwnowotworowy nie spowoduje u pacjentów poważnych powikłań. U ok. 3–6% osób leczonych 5-FU enzym DPD jest za mało aktywny, co

prowadzi do gromadzenia się leku i nasila jego działania toksyczne.

Dr hab. Rafał Pawliczak z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi będzie za uzyskane środki realizował projekt „Analiza ekspresji genów metodą *whole genome scan* w przebiegu astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę i niesteroidowe leki przeciwzapalne, astmy oskrzelowej bez nadwrażliwości, możli-



Fotografia 3. Prof. Andrzej Szutowicz odbiera nagrodę z rąk Premiera Donalda Tuska.

wości farmakologicznej interwencji i ewaluacji ryzyka”. Koszt projektu wnioskowany 446 000 zł brutto. Celem badań jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, co jest przyczyną astmy z nadwrażliwością na kwas ace-



Fotografia 4. Laureaci VII edycji konkursu Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny; od lewej: dr Barbara Dołęgowska, dr Edyta Brzóska-Wójtowicz, dr hab. Rafał Pawliczak, dr Klaudia Stangel-Wójcikiewicz, dr hab. Agnieszka Słowik.

tylosalicylowy (aspirynę). Drugim celem jest opracowanie prostego testu, z pomocą którego będzie można zdiagnozować tę chorobę, która dotyka od kilku do prawie 20% osób z astmą.

Dr Edyta Brzóska-Wójtowicz z Uniwersytetu Warszawskiego będzie prowadziła badania w projekcie „Stymulacja regeneracji mięśni szkieletowych – potencjalna rola cytokiny SDF-1”. Koszt projektu 450 000 zł brutto. Autorka oczekuje, że badania pomogą w lepszym zrozumieniu procesu regeneracji mięśni szkieletowych oraz doprowadzą do jego poprawy. Z ich wyników mogłyby skorzystać ofiary wypadków, których skutkiem jest mechaniczny uraz mięśni. Ale znalazłyby też zastosowanie w terapii dystrofii mięśniowej, choroby, której nie można dzisiaj wyleczyć. **Zaletą wszystkich nagrodzonych projektów jest fakt, iż ich wyniki mogą znaleźć zastosowanie praktyczne, choć każdy z nich wywodzi się z nauk podstawowych (wg PAP, Nauka w Polsce).**

Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej wyłoniła laureatów siedemnastej edycji programu stypendialnego START. Spośród 872 kandydatów wybrano 106 najzdolniejszych młodych naukowców, którzy otrzymają od FNP roczne stypendium w wysokości 24 000 zł. Wszyscy uczestnicy konkursu otrzymali pisemne zawiadomienia o jego wynikach. W tym roku stypendyści programu START

po raz pierwszy mogli ubiegać się o wyjazd studyjne do ośrodków zagranicznych w ramach stypendium. Fundacja sfinansuje takie wyjazdy 7 laureatom, którzy ubiegali się o tę formę wsparcia. Uroczystość wręczenia dyplomów tego rocznym laureatom programu START odbyła się 25 kwietnia na Zamku Królewskim w Warszawie. Wśród laureatów znaleźli się członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: dr Agnieszka Jaźwa (Fot. 5), Kraków, UJ; mgr Halina Waś (Fot. 6), Kraków UJ; dr Andrea Lipińska, Gdańsk, UG; dr Magda Łabieniec, Łódź, UŁ; mgr Seweryn Mroczek, Warszawa, UW; mgr Elżbieta Purta, Warszawa, UW.

Dr Agnieszka Jaźwa jest zatrudniona w Zakładzie Biotechnologii Medycznej przy Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego na stanowisku asystenta naukowego, gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Dulaka prowadzi badania nad wykorzystaniem terapii genowej i modeli myszy transgenicznnych dla opracowania nowych strategii leczenia chorób układu krążenia. Głównym tematem badań dr Agnieszki Jaźwy są zagadnienia stymulacji terapeutycznej angiogenezy w mo-

delach zwierzęcych. Równocześnie, prowadzi ona badania nad stworzeniem narzędzi do takiej terapii. Umiejętności te doskonaliła podczas odbywania staży naukowych – w dwóch ośrodkach badawczych – w Uniwersytecie w Kuopio w Finlandii w 2006 roku oraz w Bristol Heart Institute w Wielkiej Brytanii w 2007 roku. Zdobyte umiejętności dr Agnieszka Jaźwa wykorzystywała m. in. do realizacji promotorskiego projektu badawczego, mającego na celu stymulację procesu gojenia ran poprzez zastosowanie wektorów AAV (ang. *adeno-associated viral vectors*) umożliwiających ekspresję jednego lub dwóch czynników proangiogennych. Wynikiem realizacji tego projektu jest rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Dulaka. Na jej podstawie w listopadzie 2008 roku dr



Fotografia 5. Dr Agnieszka Jaźwa.

Agnieszka Jaźwa uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych z zakresu biochemii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Efektem dotychczasowej pracy dr Agnieszki Jaźwy jest, oprócz rozprawy doktorskiej, siedem prac oryginalnych i dwie prace przeglądowe, które ukazały się w renomowanych czasopismach specjalistycznych, o wysokim współczynniku oddziaływania. Ponadto, dr Agnieszka Jaźwa jest współautorem sześciu prac na temat konstrukcji i zastosowania wektorów plazmidowych, adenowirusowych i AAV, które ukazały się w 2007 roku w trzecim zeszycie kwartalnika *Biotechnologia*. Jest również współautorem kilkunastu doniesień konferencyjnych ustnych i plakatowych, prezentowanych w kraju i za granicą. W 2006 roku uzyskała stypendium Rektora



Fotografia 6. Mgr Halina Waś.

UJ dla wyróżniających się doktorantów, a rok później została wyróżniona stypendium doktoranckim programem L'Oreal Polska dla Kobiet i Nauki przy wsparciu Polskiego Komitetu do spraw UNESCO. (przygotowała dr Agnieszka Jazwa, Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, agnieszka.jazwa@uj.edu.pl).

Głównym tematem badań mgr Haliny Waś, która swoją pracę doktorską wykonuje w Zakładzie Biotechnologii Medycznej przy Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem dr hab. Alicji Józkowicz, jest udział oksygenazy hemowej-1 (HO-1) w indukcji i rozwoju nowotworów skóry, także w kontekście terapeutycznym. W pierwszym etapie badań, przeprowadzonych podczas przygotowania pracy magisterskiej, mgr Halina Waś wykazała rolę HO-1 w proliferacji, oporności na stres oksydacyjny i własnościach angiogennych komórek mysiego czerniaka *in vitro*. Natomiast cykl doświadczeń wykonanych w ramach pracy doktorskiej, której obrona nastąpi w najbliższych miesiącach, poświęcony był określeniu roli HO-1 w rozwoju czerniaka oraz raka płaskonabłonkowego u myszy. Wyprowadzenie modyfikowanych genetycznie linii komórkowych oraz możliwość wykorzystania unikatowego modelu, jakim są myszy pozbawione genu HO-1 pozwoliło na podjęcie próby poznania i rozróżnienia wpływu ekspresji HO-1 w komórkach nowotworowych i komórkach podścieliska. Efektem dotychczasowej pracy mgr Haliny Waś jest sześć prac oryginalnych, jedna praca przeglądowa i jeden komentarz, które ukazały się w renomowanych czasopiśmie specjalistycznych o wysokim współczynniku oddziaływania. Uzyskane wyniki były też prezentowane na kilkunastu konferencjach krajowych i międzynarodowych, gdzie zostały trzykrotnie nagrodzone (nagroda za najlepszy poster – Gliwice Scientific Meetings 2005; nagroda za prezentację ustną – IX Konferencja Biologii Komórki, Łódź 2005; nagroda za prezentację ustną – XLII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicz-

nego, Szczecin 2007). Ponadto mgr Halina Waś przygotowała i opublikowała pracę przeglądową (Postępy Biochemii, 2005) i popularno-naukową (uhonorowaną wyróżnieniem za najciekawszy artykuł wydrukowany w czasopiśmie Wszechświat w roku 2005). Została też uhonorowana wyróżnieniem za artykuł popularno-naukowy w konkursie organizowanym przez Forum Akademickie w roku 2007. Wykonywane przez nią doświadczenia stanowią część trzech projektów badawczych (w tym dwóch międzynarodowych). Badania były też finansowane z grantu promotorskiego uzyskanego przez mgr Halinę Waś w 2007 roku. Jej dorobek został już uhonorowany stypendium Rektora UJ dla wyróżniających się doktorantów (2007/2008), a także stypendium Prezydenta Miasta Krakowa (2008). W bieżącym roku, podobnie jak w poprzednim została laureatką programu stypendialnego START dla młodych naukowców Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. (przygotowała: mgr Halina Waś, Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków).

Prof. Hilary Koprowski, twórca pierwszej na świecie szczepionki przeciwko wirusowi polio, członek PAN i profesor Thomas Jefferson University, powiedział w Poznaniu, podczas III Kongresu Top Medical Trends, iż szczepionki podawane w zmutowanych genetycznie roślinach są przyszłością profilaktyki zdrowotnej. Wirusy chorobowe wszczepia się do roślin, które stają się biogeneratorami dla ich rozwoju. Tak zmodyfikowane rośliny trafiają do organizmu człowieka czy zwierzęcia w pokarmie. W innym przypadku, z zarażonych w ten sposób roślin wydobywa się zmodyfikowane wirusy, które są podawane w formie leków. Uczony uważa, że za 10-20 lat będziemy szczepionki zjadać, a nie wstrzykiwać. Szczepionki podawane w żywności, składającej się ze zmodyfikowanych roślin będą tańsze i dzięki temu powszechniejsze. W laboratorium prof. Koprowskiego w Filadelfii trwają też prace nad szczepionką przeciw brodawczakowi ludzkiemu HPV, wywołującego raka szyjki macicy; szczepionka ma

być podawana w formie czopków. W obradach III Kongresu Top Medical Trends wzięło udział ponad trzy tysiące lekarzy. Przez trzy dni, podczas wykładów tematycznych, zapoznawali się z najnowszymi osiągnięciami współczesnej medycyny. Tematem wiodącym III Kongresu były choroby cywilizacyjne – nadciśnienie, otyłość, choroba wieńcowa i wrzodowa, alergie, cukrzyca, zaburzenia psychiczne, alkoholizm.

W Waszyngtonie odbyło się pierwsze posiedzenie mieszanej **polsko-amerykańskiej komisji naukowo-technologicznej**, której celem jest ożywienie współpracy i wymiany w tej dziedzinie między obu krajami. Komisja powstała w wyniku umowy, podpisanej w 2006 roku. Obecnie stroną polską reprezentowała przebywająca w Waszyngtonie delegacja naukowców z czołowych uczelni i instytutów resortowych, której przewodniczył wiceminister nauki i szkolnictwa wyższego, profesor Jerzy Duszyński. Kwietniowe rozmowy w polsko-amerykańskiej komisji mieszanej koncentrowały się na trzech dziedzinach: pozyskiwania czystej energii, zdrowia i biotechnologii oraz nanotechnologii i technologii informatycznych. Równolegle z delegacją uczonych w Waszyngtonie przebywał wiceminister gospodarki Dariusz Bohdan, który razem z wiceministrem Duszyńskim spotkał się z kierownictwem amerykańskiego Ministerstwa Energetyki. Według wypowiedzi radcy naukowego ambasady RP w Waszyngtonie Marka Konarzewskiego, strona polska liczy na pogłębienie współpracy z USA w dziedzinie „zielnych” technologii, a zwłaszcza technologii „czystego węgla” (jego gazyfikacji, upłynniania itd.), w której Polska ma spory potencjał. Sprzyja temu znaczne zwiększenie funduszy na rozwijanie tej dziedziny w uchwalonej z inicjatywy prezydenta Baracka Obamy ustawie o pobudzeniu gospodarki USA do wzrostu. Rząd RP liczy, że część tych funduszy, wydzielona na wymianę z zagranicą, przypadnie m. in. na wymianę z Polską. Polska liczy na osobową wymianę naukową, gdyż w USA będą potrzebni naukowcy, w tym także z zagranicy, aby zrealizować cele postawione przez administrację Obamy. Marek Konarzewski

podkreślił jednak, że stronie polskiej zależy też, żeby wymiana pracowników naukowych nie była jednostronna; Polska liczy na możliwość atrakcyjnych przyjazdów Amerykanów do naszych placówek naukowych. Drugim nurtem współpracy byłby udział USA we wspólnych projektach realizowanych przez Polskę i Unię Europejską. Strona polska będzie się starała wraz z partnerami amerykańskimi wchodzić w unijne programy badawcze i technologiczne.

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski oraz dwie dolnośląskie uczelnie Uniwersytet Przyrodniczy i Uniwersytet Wrocławski zostały wyróżnione w konkursie „Liderzy wdrażania regionalnych strategii innowacyjnych w Polsce”. Konkurs przeprowadzono na zlecenie Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości, a patronowali mu minister rozwoju regionalnego Elżbieta Bieńkowska i przewodniczący konwentu marszałków ds. regionalnych strategii innowacyjnych Leszek Wojtasik, wicemarszałek wielkopolski. 107 zgłoszonych projektów konkurowało w siedmiu kategoriach. W każdej do tytułu lidera nominowano trzy projekty. Uniwersytet Wrocławski i Uniwersytet Przyrodniczy otrzymały nominacje w tej samej kategorii: Potencjał Badawczy. Ostatecznie zwyciężył jednak Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, który przedstawił projekt staży dla pracowników i absolwentów w firmach. Uniwersytet Przyrodniczy został wyróżniony za system stypendiów doktoranckich, a Uniwersytet Wrocławski – za system grantów naukowych dla doktorantów, którzy prowadzą badania w dziedzinach szczególnie ważnych dla potencjału innowacyjnego Dolnego Śląska. Najwięcej grantów przypadło doktoratom z geografii (11), chemii (9) i biologii molekularnej (8). Wśród beneficjentów byli także matematycy i geolodzy (po 4 granty) oraz fizycy (3).

W połowie przyszłego roku rozpocznie działalność laboratorium biotechnologiczne w **Gdańskim Parku Naukowo-Technologicznym (GPNT)**, na terenie Pomorskiej Specjalnej Strefy Ekonomicznej. Placówka, spełniająca międzynarodowe standardy, nastawia się na współpra-

cę z biznesem i przedsiębiorstwami. Laboratorium wejdzie w strukturę organizacyjną Bałtyckiego Centrum Biotechnologii i Diagnostyki Innowacyjnej, które znajdzie siedzibę na terenie GPNT. Według informacji prof. Krzysztofa Bielawskiego, naukowca UG oraz prezesa zarządu Bałtyckiego Centrum Biotechnologii i Diagnostyki Innowacyjnej w obiektach parku funkcjonować będzie ponad 20 laboratoriów wyposażonych w najnowocześniejszy sprzęt. Zakres badań obejmie tematykę od ochrony środowiska po nowe leki. Laboratorium będzie ściśle współpracować z przemysłem. Diagnostyka obejmie choroby człowieka, głównie nowotworowe, wirusy chorób zakaźnych ludzi i zwierząt, a także związane z przemysłem spożywczym. Po ocenie projektów badawczych przez radę naukową zacznie się ich wdrażanie za pieniądze z naukowych grantów, a także pozyskane z innych źródeł, na przykład z Unii Europejskiej. Gdański Park Naukowo-Technologiczny, nosi imię prof. Hilarego Koprowskiego, światowej sławy naukowca, i znajduje się w Gdańsku, przy ul. Trzy Lipy 3. Bałtyckie Centrum Biotechnologii i Diagnostyki Innowacyjnej, które będzie się rozwijać w tym parku, zostało powołane przez trzy uczelnie – Politechnikę Gdańską, Akademię Medyczną, Uniwersytet Gdański – oraz samorządy Gdańsk i województwa pomorskiego (wg Polska Dziennik Bałtycki).

Cieszy także, że **Uniwersytet Jagielloński, Politechnika Łódzka oraz Instytut Fizyki Jądrowej PAN** utworzą wspólny ośrodek badawczy, nowoczesne centrum wyposażone w najnowocześniejszą aparaturę do specjalistycznych i interdyscyplinarnych badań farmakologicznych i przedklinicznych leków. Przedsięwzięcie powstanie w ramach nowego projektu Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków (Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics – JCET), które otrzyma na ten cel ponad 45 milionów dotacji ze środków europejskich. Pierwsze laboratoria powstaną już jesienią 2009 roku.

Biblioteka Uniwersytecka w Warszawie (BUW) zakupiła książki z kolekcji ibuk.pl. Dzięki tej inwe-

stycji czytelnicy BUW mogą skorzystać z wersji on-line wybranych podręczników i publikacji naukowych polskich wydawnictw. [Ibuk.pl](http://ibuk.pl), to czytelnia podręczników akademickich i książek naukowych w języku polskim, dostarczanych on-line. Udostępnia elektroniczne wersje kilkuset książek z różnych dziedzin nauki. Każdy z internautów po dokonaniu opłaty może wykupić dostęp do wybranej publikacji na dobę, tydzień, miesiąc lub semestr. W Bibliotece Uniwersyteckiej, w wersji on-line, obecnie jest dostępnych ok. 600 podręczników i publikacji naukowych polskich wydawnictw. Czytelnicy mogą korzystać z książek z dziedziny nauk ekonomicznych, humanistycznych, społecznych, matematyczno-przyrodniczych i informatyki. Zbiór zorganizowany jest w ten sposób, by z jednej pozycji mogło korzystać jednocześnie pięć osób. BUW już zapowiada, że katalog tytułów będzie systematycznie rozszerzany. Instytucja podejmie decyzję o wyborze książek z dziedziny: medycyny, techniki i pedagogiki. Z tych dyscyplin naukowych udostępniane będą tylko wskazane tytuły (wg PAP).

XI Międzynarodowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Magnezologicznego „Pierwiastki w środowisku i życiu człowieka” odbywać się będzie w dniach 3-5 września b.r. w Nałęczowie, Termy Pałacowe, ul. Paderewskiego 1A. Kontakt: Sekretarz Zjazdu Dr Małgorzata Sztanke, Katedra i Zakład Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Staszica 4, 20-081 Lublin, tel.: 081 535 73 62, e-mail: malgorzata.sztanke@am.lublin.pl.

II Ogólnopolskie Sympozjum „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych” przygotowują w Lublinie Komitet Terapii i Nauk o Leku PAN, Komisja Analizy Leku Komitetu Terapii i Nauk o Leku PAN oraz Katedra i Zakład Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Termin obrad 24-25 września 2009 r. Informacje na stronie: <http://implant.am.lublin.pl/sympozjum>

Pod redakcją Teresy Wesołowskiej

Sposoby migracji komórek nowotworowych

STRESZCZENIE

Trudności w leczeniu chorób nowotworowych wynikają z adaptacyjnych zdolności komórek i ich przystosowania do dynamicznie zmieniającego się środowiska, co poprzedza zmianą w profilu ekspresji genów określonych białek. Scharakteryzowano dotychczas trzy sposoby poruszania się komórek nowotworowych: ruch ameboidalny, mezenchymalny i kolektywny. W ruchu mezenchymalnym i ameboidalnym komórki poruszają się pojedynczo. Natomiast ruch kolektywny to migracja grup komórek, która w dużej mierze zachowuje charakter mezenchymalny. Poszczególne typy ruchu różnią się rodzajem wypustek migracyjnych prezentowanych przez komórki oraz szlakami przekazywania sygnałów kontrolujących zjawisko ruchu. Ruch mezenchymalny, regulowany przez kinazę Cdc42, cechuje wydłużony kształt komórek z wyraźnie wyeksponowanym lamellipodium i tworzenie miejsc adhezji do białek ECM. Ruch ameboidalny odznacza się występowaniem pęcherzykowatych wypustek o charakterze pseudopodiów, a kontrolowany jest przez kaskady przekazywania sygnałów Rho/ROCK. W niniejszej pracy przeglądowej podjęto próbę scharakteryzowania różnych typów ruchu i mechanizmów ten ruch regulujących.

WPROWADZENIE

Zdolność do ruchu to ważny aspekt prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów. Jest to podstawowa funkcja wpływająca na wszystkie procesy życiowe zarówno u organizmów jednokomórkowych, jak i wielokomórkowych. Miliony komórek naszego ciała znajdują się w nieustającym ruchu uczestnicząc zarówno w procesach fizjologicznych, takich jak morfogeneza, różnicowanie, gojenie ran, angiogeneza, infekcja, odporność i regeneracja tkanek, jak i patologicznych, takich jak tworzenie przerzutów nowotworu [1]. Szczegółowe poznanie molekularnych podstaw procesu migracji komórkowej jest ważną częścią badań nad zrozumieniem biologii nowotworów i sposobami ich rozprzestrzeniania się w organizmie [2-4]. Jedną z najtrudniejszych barier w skuteczności leczenia nowotworów jest tworzenie przerzutów nowotworowych. Jest to złożony, wieloetapowy proces, na który składa się szereg połączonych i następujących po sobie zjawisk [5]. Uważa się, że pierwszy etap powstawania inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego wiąże się ze zmianą ich charakteru i wykształceniem fenotypu mezenchymalnego. Proces ten określa się obecnie jako przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT). Charakterystyczną cechą tak migrujących komórek jest utrata połączeń międzykomórkowych, spowodowana zmianami w ekspresji genów białek adhezyjnych i enzymów proteolitycznych, mutacjami w genach kodujących białka regulujące cykl komórkowy oraz proces ich migracji. Zmiany te pozwalają na reorganizację cytoszkieletu aktynowego, determinującą powstanie protruzji i przenikanie otaczającej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) [6].

Kolejnym etapem poprzedzającym utworzenie odległego przerzutu jest odejście komórki lub grupy komórek od guza pierwotnego, „inwazja” do sąsiadujących tkanek, intrawazacja naczyń układu krążenia, ekstrawazacja, „zagnieźdzenie” i proliferacja w nowym miejscu, co prowadzi do powstania guza wtórnego [8]. Zdolności inwazyjne nowotworów wiążą się nierozdzielnie ze zwiększonymi zdolnościami migracyjnymi komórek. Cechą, która pozwala komórkom nowotworowym bezbłędnie docierać do miejsca przeznaczenia jest ich plastyczność. Wynika ona z możliwości dostosowywania komórek nowotworowych do zmieniających się warunków otaczającego środowiska oraz współpracy z przylegającymi komórkami prawidłowymi [8].

Wyniki badań ostatnich lat, z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroskopowych, pozwalających na obserwację zjawisk w przestrzeni dwu- i trójwymiarowej, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, dostarczyły cennych informacji dotyczących mechanizmu poruszania się komórek nowotworowych [3,9-11]. Analiza tych wyników pokazała, że komórki mają zdolność poruszania się zarówno indywidualnie, jak i kolektywnie, czyli w połączeniu ze współpo-

Agnieszka Popow-Woźniak[✉]

Dorota Nowak

Maria Malicka-Błaszkiwicz

Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

[✉]Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77 51-148 Wrocław; e-mail: apopow@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 9 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 30 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: inwazyjność, ruch: ameboidalny, mezenchymalny, kolektywny

Wyjaśnienia skrótów: ADF – czynnik depolimeryzujący aktyne; CAT – przejście kolektywno-ameboidalne; DAG – diacylglicerol; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa; EGF – naskórkowy czynnik wzrostu; EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne; ERM – białka rodziny ezryna-radyksyna-moezyna; FAK – kinaza adhezji kontaktowej; GAP – czynnik aktywujący GTPazy; GEF – czynnik wymiany nukleotydów; IP3 – trifosforan 1,4,5-inozytolu; MAT – przejście mezenchymalno-ameboidalne; MLCK – kinaza lekkich łańcuchów miozyny; PIP2 – bifosforan 4,5-inozytolu; PLC – fosfolipaza C; Scar – białko supresorowe dla białka Car; WASP – białko syndromu Wiskotta-Aldricha; WAVE – białko homologiczne do werproliny

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektów „GRANT – wsparcie prac badawczych poprzez stypendia dla doktorantów” (finansowanego z Priorytetu VIII Działania 8.2.2. Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Urząd Marszałkowski Województwa Dolnośląskiego) oraz projektu własnego MNiSW nr N N303 337535

ruszającymi się komórkami [12,13]. W chwili obecnej wyróżniamy dwa główne typy ruchu pojedynczych komórek nowotworowych – ameboidalny [11,14] i mezenchymalny [15,16], pomiędzy którymi istnieją typy pośrednie [17].

Ruch mezenchymalny to najczęściej opisywany typ migracji obserwowany dla komórek hodowanych *in vitro* w przestrzeni dwuwymiarowej (Ryc. 1). Ten typ ruchu odznacza się wydłużonym, płaskim kształtem komórek, powstawaniem wypustek o charakterze lamellipodiów, tworzeniem miejsc adhezji w postaci płytki kontaktowej, retrakcją dystalnej części komórki oraz wydzieleniem proteaz, które trawią białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Mezenchymalny ruch komórki jest kontrolowany głównie przez kinazę Cdc42, która koordynuje polimeryzację aktyny w krawędzi wiodącej komórki, zapewniając regularne ułożenie mikrofilamentów i ich oddziaływanie z mikrotubulami [15,16]. Ruch ameboidalny natomiast, charakterystyczny dla niektórych komórek nowotworowych – migrujących przez trójwymiarową macierz białek zewnątrzkomórkowych, charakteryzuje się zaokrąglonym kształtem komórki, brakiem lamellipodiów i występowaniem raczej niewielkich pseudopodiów o charakterze pęcherzykowatym [9,15,18,19]. Kaskady przekazywania sygnałów z otoczenia w trakcie tego procesu uzależnione są od kinaz zależnych od Rho, ROCK, a sama migracja nie zależy od wydzielenia przez komórki enzymów proteolitycznych. Badania Sahai i Marshalla pokazały, że komórki nowotworowe migrujące w sposób ameboidalny przemieszczają się z reguły szybciej niż wędrujące w sposób mezenchymalny [9].

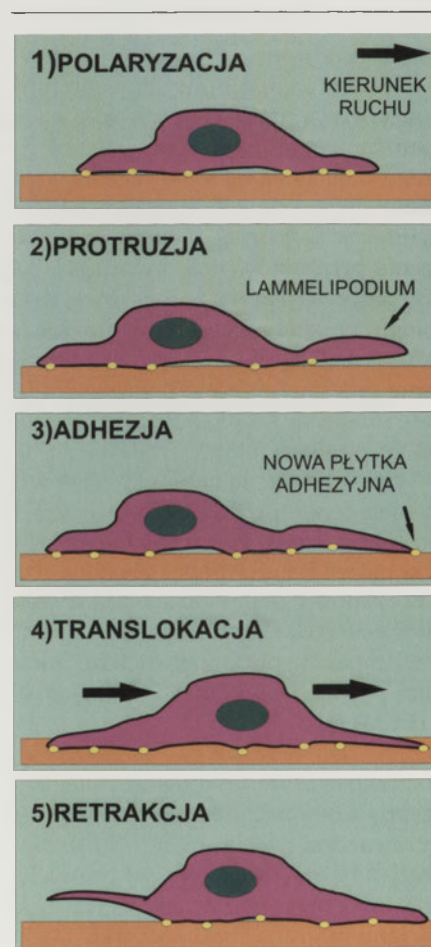
W niniejszym artykule podjęto próbę podsumowania wiedzy na temat mechanizmów rządzących procesem migracji komórek nowotworowych w relacji z prezentowanymi przez nie typami ruchu i siłami generującymi ruch. Praca ta uwzględnia równocześnie aspekt plastyczności komórek nowotworowych, czyli możliwości zmiany sposobu migracji komórek w zależności od zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego.

ROLA CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO W RUCHU KOMÓRKI

Bez względu na sposób migracji komórkowej, fundamentalną rolę w tym zjawisku odgrywa proces polimeryzacji aktyny prowadzący do powstania mikrofilamentów aktynowych. W komórkach niemięśniowych filamety aktynowe zbudowane są z dwóch cytoplazmatycznych izoform: β i γ . Zróznicowanie funkcji aktyn cytoplazmatycznych, podobnie jak ich subkomórkowe rozmieszczenie, pomimo wielu ciekawych obserwacji, w tym również naszych własnych, pozostają nadal w sferze badań [20-23]. Dynamiczna reorganizacja filamentów aktyny jest siłą napędową ruchu komórki, odpowiadającą za jej zdolność do zmiany kształtu. To właśnie dzięki procesowi polimeryzacji aktyny tworzą się wypustki migracyjne, takie jak lamellipodia i filopodia, chociaż nie do końca wiadomo w jaki dokładnie sposób następuje tak ważna w ich tworzeniu zmiana kształtu błony komórkowej. Przypuszcza się, że modelowanie błony jest następstwem podbłonowej polimeryzacji aktyny i powstającego lokalnie ciśnienia hydrostatycznego [23,24]. Aktyna to wszechobecne białko występujące w formie monomerycz-

nej (G) lub spolimeryzowanej (F). Tworzy filamety, które w komórkach mogą organizować się w struktury wyższego rzędu, np. równoległe wiązki czy krzyżujące się sieci. Filamety te wykazują polaryzację, zarówno strukturalną, jak i kinetyczną – posiadają szybko rosnący koniec (+), zwany kolczastym lub brodatym (ang. *barbed end*) o wysokim powinowactwie do monomerów oraz wolno rosnący koniec ostry (-) o niskim powinowactwie do monomerów aktywny. W stanie spoczynku komórki ilość monomerów przyłączających się do kolczastego końca filamentu równoważona jest przez monomery odłączane od końca ostrego. Monomer aktywny raz przyłączony do końca (+), w miarę postępowania polimeryzacji i depolimeryzacji, przesuwa się wzdłuż filamentu, aż do momentu gdy oddysocjowany zostanie na końcu ostrym filamentu [25].

U podstaw zmian architektury cytoszkieletu aktynowego oraz kontroli równowagi pomiędzy aktyną monomeryczną a filamentarną, leżą białka oddziałujące z aktyną. Decydują



Rycina 1. Etapy migracji komórkowej. W pierwszym stadium ruchu komórkowego następuje polaryzacja komórki, czyli utworzenie dynamicznego bieguna wiodącego i określenie kierunku ruchu. Następnie, wskutek polimeryzacji filamentów aktynowych i ich współpracy z białkami oddziałującymi z aktyną, tworzy się wypuklenie błony komórkowej, tzw. lamellipodium. Struktura ta tworzy miejsca adhezji do podłoża, umożliwiając dalszą translokację ciała komórki zgodnie z kierunkiem ruchu. Likwidacja istniejących miejsc adhezji na przeciwnym biegunie komórki pozwala na retrakcję dystalnej części komórki i jej przygotowanie do kolejnego cyklu migracyjnego.

one o dynamice polimeryzacji aktyny poprzez: udostępnianie jej monomerów z kompleksów (aktyna/profilina, aktyna/ β -tymozyna), nakrywanie ("czapeczkowanie") filamentów (żelsoлина), nukleację filamentów i tworzenie ich rozgałęzień (kompleks Apr2/3), tworzenie nowych miejsc polimeryzacji i regulację „obrotu” monomerami aktyny (rodzina białek ADF/kofilina), tworzenie wiązek filamentów (fascyna, fimbryna), stabilizację sieci aktynowych (filamina) oraz tworzenie kabli filamentów aktyny (forminy). Zainteresowanych odsyłamy do pracy przeglądowej [26].

Aktywność białek wiążących aktynę oraz

inicjacja ich wiązania do jej monomerycznej bądź filamentarnej postaci jest kontrolowana, bezpośrednio lub pośrednio, przez wyspecjalizowaną maszynę białkowych kaskad przekazywania sygnałów. W odpowiedzi na czynniki zarówno zewnętrzne (gradient czynników wzrostowych), jak i wewnętrzne (pH, ciśnienie osmotyczne, stężenie Ca^{2+}), uruchamiają one białkowe GTPazy z rodziny Rho – podstawowe białka regulujące dynamikę cytoszkieletu aktynowego [27-29]. Białka z rodziny Rho podlegają cyklowi stymulowanej przez białka GEF (ang. *Guanine Exchange Factors*) i GAP (ang. *GTPase Activating Proteins*) wymiany nukleotydów guanidynowych. Dzięki temu oscylują one pomiędzy nieaktywnym stanem wiązania GDP a aktywnym stanem wiązania GTP. W stanie zaktywowanym małe GTPazy z rodziny Rho oddziałują z białkami efektorowymi (takimi jak poniżej wymienione białka: Cdc42, Rac, WAVE, WASP, PAK, ROCK, Rho). Przykładowo, białka Rac i Cdc42 aktywnie uczestniczą w początkowych stadiach procesu migracji komórkowej: polaryzacji komórki, ekspansji lamellipodiów lub filopodiów (tylko Cdc42) oraz organizacji miejsc adhezji w strefie frontalnej. Natomiast białko Rho kontroluje proces translokacji ciała komórki, poprzez stymulację skurczów sieci włókien naprężeniowych [30,31]. Złożony proces ukierunkowanej lokomocji komórkowej zależy od ściśle zlokalizowanej aktywacji tych białek w określonych regionach cytoplazmy, gdzie działają one jako „molekularne przełączniki” aktywności białek cytoszkieletu, kluczowe przy tworzeniu wypustek komórkowych.

RUCH MEZENCHYMALNY

Mezenchymalny sposób migracji (nie tylko w odniesieniu do komórek nowotworowych) jest dość dobrze poznany i opisany. Jego cechy, przez wiele lat obserwowane w doświadczeniach prowadzonych na podłożach dwuwymiarowych (2D), przypisywano ogólnie uznanemu modelowi migracji komórkowej. Z tego powodu komórki migrujące opisywano jako płaskie, trójkątne, posiadające szeroką (przypominająca welon) determinującą kierunek migracji krawędź wiodącą – lamellipodium [16]. W związku z rozwojem technik trójwymiarowych hodowli komórkowych (3D), możliwa stała się bardziej wnikliwa obserwacja procesu migracji komórek, co pozwoliło nie tylko na wyodrębnienie innych niż mezenchymalny typów migracji, ale także na ich szczegółową klasyfikację.

Jednymi z najbardziej typowych przykładów komórek migrujących w sposób mezenchymalny są keratynocyty i fibroblasty. Komórki nowotworowe tak migrujące to w większości komórki wywodzące się z tkanki łącznej, np. mięsaka, czy z tkanek nabłonkowych, np. raka jelita grubego. W środowisku trójwymiarowym komórki mezenchymalne przyjmują wrzecionowatą morfologię, charakterystyczną dla fibroblastów, mioblastów, komórek mięsaka czy pojedynczych komórek nabłonkowych [12]. Mezenchymalny sposób poruszania się komórek cechuje pięcioetapowy cykl lokomocyjny przedstawiony na Ryc. 1. Pierwszy etap migracji komórki to jej polaryzacja, czyli określenie kierunku ruchu i podbłonowe gromadzenie białek regulujących ten proces. W drugim, zależnym od polimeryzacji aktyny, protruzyjnym etapie migracji, lamellipodium formuje miejsca adhezji do substratu za pośrednictwem heterodimerów

α , β -integryn. Płytko adhezyjna służy jako miejsce przyczepu komórki do podłoża, niezbędne dla wytworzenia się mechanicznego napięcia w podbłonowej części komórki i kluczowe dla dalszego jej poruszania się [32,33]. Kompleksy integrynowe za pośrednictwem białek adaptorowych (takich jak α -aktylina, paksylina, talina i winkulina) służą jako miejsce zakotwiczenia dla filamentów aktyny, a także pośredniczą w przekazywaniu sygnałów (z udziałem kinaz Src i FAK). Jednocześnie, wraz z utworzeniem miejsc adhezji, niezbędny jest udział lokalnie wydzielanych do środowiska lub związanych z zewnętrzną błoną komórkową proteaz (MMP, uPA/uPAR), służących enzymatycznej przebudowie włókien białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Komórka poruszająca się w sposób mezenchymalny powoduje degradację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, co może być wykorzystywane również przez inne metastatyczne komórki nowotworowe, sprzyjać tworzeniu tzw. komórkowych łańcuchów migracyjnych i zwiększać szansę wystąpienia przerzutów. Pomimo udziału enzymów proteolitycznych w mezenchymalnym typie ruchu komórek nowotworowych, samo utworzenie i likwidacja miejsc adhezji wymaga czasu (ok. 10-120 min.), co wydłuża czas migracji w przestrzeni trójwymiarowej do ok. 0,1- 2 μ m/min [14].

Jak wynika z wyżej przedstawionych informacji, proces mezenchymalnego ruchu komórkowego to cykl następujących po sobie zjawisk, których powtarzalność wymaga bardzo precyzyjnej kontroli, a samo jego zapoczątkowanie wiąże się z powstawaniem i zanikaniem ukierunkowanych wypustek komórkowych. Komórki pobudzone do migracji przez czynniki wzrostowe, np. naskórkowy czynnik wzrostu EGF, w ciągu kilku minut prezentują lamellipodium, które tworzy się w wyniku niezwykle dynamicznej polimeryzacji aktyny [34]. Stężenie aktyny w lamellipodium jest wysokie – ok. 450 μ M dla aktyny filamentarnej i ok. 95 μ M dla aktyny monomerycznej [11]. Stymulacja zewnątrzkomórkowego receptora EGF pobudza aktywność białkowej kinazy fosfatydylo-inozytolo-3-fosforanu (PI3K) i uwalnianie bifosforanu-4,5-fosfatydyloinozytolo (PIP_2), który aktywuje małe białka wiążące GTP: Rac, Cdc42 i Rho. Kinazy te, przy udziale białek z rodziny WASP i kompleksu Scar/WAVE 1/2/3, regulują aktywność białek wiążących aktynę, co umożliwia tworzenie lamellipodium i filopodiów [11,35]. Polimeryzacja aktyny uzależniona jest od szybkości powstawania wolnych końców brodatych filamentów oraz dostępności monomerów aktyny. Monomery aktyny występują w cytoplazmie w kompleksach z białkami wiążącymi G-aktynę – np. z profiliną i z β -tymozyną, które utrzymują, szczególnie tuż pod błoną, pulę aktyny, dostępną w odpowiedzi na sygnał z otoczenia o potrzebie wydłużenia rosnącego filamentu [36,37]. Wolne końce kolczaste, jako nowe miejsca polimeryzacji aktyny w rosnącym lamellipodium, mogą być wytwarzane na trzy sposoby: odłączenie białek nakrywających z końców filamentu, fragmentację lub syntezę nowych filamentów *de novo*. Polimeryzujące filamente organizowane są w podbłonową sieć przy udziale białka Arp2/3, którego głównymi aktywatorami są wyżej wspomniane białka kompleksu WAVE. Arp2/3 to złożony kompleks białkowy, który indukuje powstawanie rozgałęzień w kształcie litery Y w środku filamentów, a także pozwala na utworzenie rozgałęzień filamentów na rosnącym końcu kolczastym. Ponadto, Arp2/3 może uczestniczyć w procesie

nukleacji – syntezie trimeru aktyny, zarodzi dającej początek tworzeniu i wydłużaniu nowych filamentów. Kompleks Arp2/3 działa synergistycznie z białkami depolimeryzującymi i fragmentującymi filament aktynowy, które odsłaniają nowe miejsca nukleacji stabilizowane przez podobnowo zlokalizowaną kortaktynę [27,38]. Takim przykładem są białka z rodziny ADF/kofilina i wielofunkcyjna żelsolina, których aktywność i lokalizacja w rejonie lamellipodium została już niejednokrotnie potwierdzona [26]. W komórkach pozostających w spoczynku, związany z błoną bisforan-4,5-fosfatydyloinozytolu (PIP_2) uniemożliwia oddziaływanie pomiędzy aktyną a wieloma białkami wiążącymi aktynę, między innymi z ADF/kofiliną, która posiada miejsce wiązania PIP_2 . W komórkach migrujących aktywacja kofiliny objawia się spadkiem poziomu błonowego PIP_2 , dzięki aktywacji fosfolipazy C (PLC) hydrolizującej go do diacylglicerolu (DAG) i trifosforanu 1,4,5-inozytolu (IP_3). Ten ostatni aktywuje żelsolinę i pobudza jej aktywność depolimeryzującą filament aktynowy za pośrednictwem kalmoduliny. Związanie uwolnionego przez żelsolinę z kompleksów błonowych PIP_2 powoduje spadek jej nakrywającej filament aktywności, a w konsekwencji – ekspozycję szybko rosnących, gotowych do utworzenia rozgałęzień i wydłużenia końców brodatych filamentu aktyny. Dzięki tak złożonej współpracy sieci białek strukturalnych i enzymatycznych, tworzą się dendrytycznie wydłużające się, rozgałęzione filanty. Powstaje sieć aktynowa na tyle „sztywna”, aby powodować wytwarzanie ciąglego nacisku na błonę, a jednocześnie dynamiczna, zdolna do utworzenia krawędzi wiodącej, która determinuje powstanie ukierunkowanej protruzji i rozpoczęcie procesu poruszania się komórki [26,39,40].

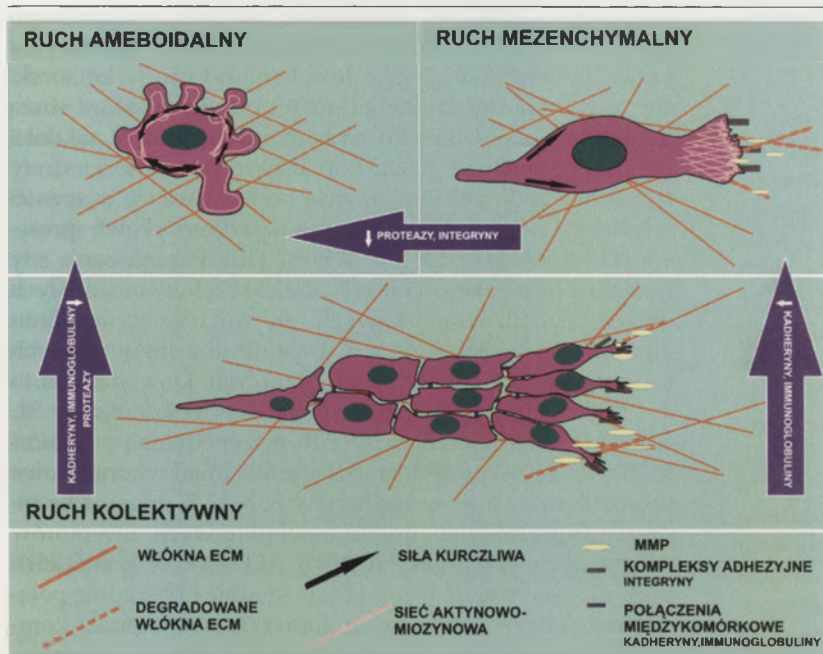
Kolejnym etapem procesu lokomocji mezenchymalnej jest przemieszczenie reszty ciała komórki razem z jądrem komórkowym. Proces ten następuje dzięki siłom molekularnych motorów, generowanym przez sieć aktomiozynową, tuż za dynamicznym obszarem wykraczającego poza ciało komórki lamellipodium, w tzw. lamellum. Jest to obszar, gdzie mikrofilamenty aktynowe tworzą szeroką i luźniej zorganizowaną sieć mikrofilamentów bogatych w miozynę II [11,16]. Dzięki oddziaływaniom domen głowowych miozyny II z wiązkami filamentów aktyny następuje zmniejszenie odległości pomiędzy końcami filamentów i w efekcie – powstanie siły umożliwiającej skrócenie długości ciała komórki i retrakcję jej części dystalnej [41]. Ten etap procesu migracji kontrolowany jest przez serynowo/treoninową kinazę zależną od Rho, zwaną także ROCK. Kinaza ta fosforyluje białka regulujące proces skurczu podobłonowej sieci mikrofilamentów aktyny - fosfatazę lekkich łańcuchów miozyny II (MLCP), lekkie łańcuchy miozyny oraz związane z wewnętrzną warstwą błony komórkowej białka ERM (ezryna, radyksyna, moezyna) [42,43]. Szlak sygnałowy Rho/ROCK kontroluje również proces powstawania, reorganizacji i kurczliwości włókien naprężeniowych [44]. Kiedy po raz pierwszy opisano naturę włókien naprężeniowych przypuszczano, iż ich funkcja może być związana z wytwarzaniem siły lokomocyjnej, chociaż *in vivo* oraz w warunkach hodowli trójwymiarowych włókna naprężeniowe w komórkach migrujących są obserwowane dość rzadko. Wkrótce zauważono również, iż struktury te są lepiej zorganizowane i bardziej widoczne w komórkach stacjonarnych, co wskazywałoby na ich negatywny wpływ

na proces migracji. W przypadku komórek takich jak fibroblasty, keratynocyty czy komórki nowotworu kości, w procesie migracji w przestrzeni dwuwymiarowej można wyróżnić trzy strukturalnie odmienne rodzaje włókien naprężeniowych. Widoczne są długie, układające się wzdłuż podłużnej osi komórki włókna naprężeniowe. Ze względu na ich równoległe do kierunku migracji ustawienie oraz zakotwiczenie obu końców w płytkach adhezyjnych zakłada się ich udział w tworzeniu siły kurczliwej i ruchu komórki. Ponadto, obserwuje się krótkie włókna grzbietowe, końcem ostrym zakotwiczone w płytce adhezyjnej, zawierające duże ilości α -aktyniny oraz włókna niezakotwiczone w płytkach adhezyjnych, zakrzywione i niejednokrotnie tworzące łuki poprzeczne [45,46]. Udział włókien naprężeniowych w procesie migracji komórkowej, a także wydarzenia zachodzące w sieci aktynowej poza lamellipodium są aktualnie intensywnie badane, a natura ich połączeń nie jest jeszcze do końca poznana.

RUCH AMEBOIDALNY

Komórki nowotworowe rosnące *in vivo* w środowisku guza pierwotnego charakteryzuje zwykle heterogenność, szczególnie w porównaniu z populacją komórek rosnących w hodowli *in vitro*. Większość tych komórek stanowi masę guza i tylko mała frakcja 1-5% komórek nabywa zdolności do poruszania się, zmiany kształtu, kierunku i szybkości ruchu (nawet do 15 $\mu\text{m}/\text{min}$) [14]. Okazało się, że te komórki migrują w sposób odmienny od mezenchymalnego, podobny do sposobu poruszania się przeciskających się przez ścianę naczyń krwionośnych leukocytów, a charakterystyczny dla niższych eukariontów (szczególnie ameb takich jak *Amoeba proteus* czy *Acanthamoeba castellanii*). Powszechnym modelem służącym do badań procesów chemotaksji oraz ruchu ameboidalnego jest amebowa postać śluzowca *Dictyostelium discoideum* [30, 47-49]. Ten typ ruchu komórkowego charakteryzuje się wysokim stopniem „deformacji” ciała komórki oraz występowaniem sferycznych, przypominających pęcherzyki apoptotyczne, wypustek błony komórkowej. Komórki nowotworowe poruszające się w ten sposób zawdzięczają zdolność do translokacji gwałtownie przyspieszającym cyklom ekspansji i retrakcji wypustek oraz skurczom ciała komórki (Ryc. 2). W ich przypadku wykazano również zdolność do szybkich zmian kierunku ruchu. Wynika to z możliwości dynamicznego, kilkunutowego tworzenia się i likwidacji pęcherzyków migracyjnych, czemu towarzyszy zmiana polaryzacji komórki. Zrozumienie zjawiska polaryzacji komórki pozostaje nadal sprawą otwartą [14,18]. Ostatnie badania pokazują, iż za polaryzację komórki odpowiada, wcześniej już wspomniana, regulująca dynamikę filamentów aktynowych kofilina. Jej uaktywnienie zachodzi poprzez defosforylację (reszty serynowej w pozycji 3) przy udziale fosfatazy Sling-shot, a dezaktywacja poprzez fosforylację przy udziale kinaz LIM i TES. Wysoki poziom kinazy LIM powiązано ze zredukowaną inwazyjnością komórek nowotworowych [35,50].

Ruch ameboidalny charakteryzuje wiele cech odmiennych w porównaniu z mezenchymalnym typem migracji komórkowej. Przede wszystkim w ameboidalnym typie ruchu komórkowego to nie polimeryzacja filamentów aktynowych jest główną siłą powodującą powstawanie protruzji.



Rycina 2. Sposoby migracji komórkowej. Komórki nowotworowe poruszające się w trójwymiarowym środowisku macierzy zewnątrzkomórkowej wykazują trzy typy ruchu komórkowego. Ameboidalny rodzaj lokomocji cechuje się występowaniem pęcherzykowatych protruzji. Ten typ ruchu uzależniony jest od siły kurczliwej (czarne strzałki) sieci aktynowo-miozynowej, powstałej wskutek lokalnie podwyższonego ciśnienia hydrostatycznego. Mezenchymalny sposób migracji komórkowej napędza dynamiczna polimeryzacja aktyny w lamellipodium. Komórki poruszające się w ten sposób wydzielają zewnątrzkomórkowe proteazy i oddziałują z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej za pomocą kompleksów białkowych płytki adhezyjnej. Skurcze sieci aktynowo-miozynowej umożliwiają tu retrakcję dystalnej części komórki (czarne strzałki). Kolektywny sposób poruszania się komórek nowotworowych wykazuje wiele podobieństw do mezenchymalnego. Dodatkowo charakteryzuje się zachowaniem międzykomórkowych połączeń i komunikacji międzykomórkowej. Ze względu na plastyczność komórek nowotworowych, możliwa jest zmiana sposobu poruszania (fioletowe strzałki) indukowana wzrostem lub spadkiem poziomu ekspresji genów niektórych białek (białe strzałki).

Ponadto, enzymatyczna proteoliza nie służy w tym przypadku do pokonania bariery migracyjnej jaką jest macierz zewnątrzkomórkowa. Stąd zastosowanie inhibitorów metaloproteinaz nie powoduje zmniejszenia zdolności inwazyjnych tych komórek nowotworowych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Komórki poruszające się w sposób ameboidalny generują tzw. siłę kurczliwą, w oparciu o współdziałanie aktyny i miozyny II. Dzięki temu następuje odkształcenie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, a komórki przeciskają się między jej elementami wg niżej opisanego mechanizmu [12,51].

Pierwszy etap inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej rozpoczyna się utworzeniem sferycznych wypustek migracyjnych. Ich powstawanie jest możliwe dzięki wzrostowi ciśnienia hydrostatycznego, które powoduje lokalne wypuklenie błony komórkowej [18]. W sytuacji spoczynku komórki ciągłość przylegania błony komórkowej do podbłonowej sieci białkowej (w skład której wchodzi aktyna, filamina, α -aktynina czy miozyna) stabilizowana jest przez poprzez liczne miejsca kontaktowe [52,53]. Utworzenie pęcherzyka migracyjnego skutkuje utratą tych stabilnych połączeń i w początkowym etapie pęcherzyki migracyjne pozbawione są F-aktyny. Ten niewielki wypuklony region wypełnia się następnie cytoplazmą i w ciągu kilku sekund formuje sferyczną strukturę, w której stopniowo rozpoczyna się odbudowa sieci cytoszkieletu aktynowego [51]. Niejasnym pozostaje mechanizm nukleacji aktyny w formujących

się pęcherzykach migracyjnych, jako że pozbawione są one białek Arp2/3 i mDia1, najlepiej do tej pory scharakteryzowanych czynników odpowiedzialnych za tworzenie jąder polimeryzacji aktyny. Od niedawna sugeruje się rolę białka mDia2 w procesie nukleacji filamentów sieci podbłonowej aktyny, choć nie jest to jeszcze jednoznacznie potwierdzone [19].

Jednym z pierwszych białek zaobserwowanych w początkowych etapach procesu tworzenia się pęcherzyków, które poprzedza napływ białek sieciujących i polimeryzację aktyny, jest wyżej wspomniane białko z rodziny ERM – ezryna [19]. Wiemy coraz więcej o udziale ezryny w procesie ruchu i adhezji komórkowej. Niektóre badania postulują jej kluczową rolę w procesie progresji nowotworów [54]. Fosforylacja ezryny indukuje jej aktywację i translokację z cytoplazmy w kierunku podbłonowym, gdzie prawdopodobnie łączy ona filamenty aktynowe z błoną komórkową [11]. Wykazano jednak, że ezryna nie jest bezwzględnie konieczna dla odtworzenia sieci aktynowej sferycznych wypustek migracyjnych, choć w przypadku jej nieobecności komórki tracą zdolność do ich pełnej retrakcji. Tuż po włączeniu ezryny w proces odtwarzania mikrofilamentów aktynowych w pęcherzykach migracyjnych, F-aktynowa sieć komórkowa zaczyna odbudowywać się tuż pod błoną samego pęcherzyka. Proces działania białek ERM pozostaje pod kontrolą kinazy ROCK, która nie tylko aktywuje ezrynę, ale także jest czynnikiem zapoczątkującym tworzenie się samych pęcherzyków migracyjnych. Enzym ten katalizuje fosforylację kinazy

łańcuchów lekkich miozyny (MLCK) [19,41], co skutkuje aktywacją cytoplazmatycznej miozyny II oraz dwojakim, najbardziej prawdopodobnym scenariuszem następujących po sobie zdarzeń: skurczami podbłonowej sieci aktynowo-miozynowej lub lokalnym jej rozerwaniem, a następnie wzrostem ciśnienia hydrostatycznego i wreszcie – utworzeniem wypukleń błony [51]. Wzrost tych struktur nie jest zjawiskiem do końca wyjaśnionym. Proces ten zachodzi w następstwie jednego z poniższych scenariuszy. Pierwszy to wspomniany już mechanizm odrywania błony komórkowej od sieci białek podbłonowych. Drugi polega na odkształcaniu się sfaldowań błony powstałych podczas skurczów i skracania sieci aktynowo-miozynowej. Trzeci zakłada napływ lipidów do podstawy pęcherzyka, zaś czwarty uwzględnia fuzję pęcherzyków aparatu Golgiego z błoną komórkową. Pomimo intensywnie prowadzonych w tym zakresie badań nadal poszukujemy odpowiedzi, który z wymienionych mechanizmów jest najbardziej prawdopodobny [19].

Charakterystyczne pęcherzykowate wypustki pojawiają się nie tylko w procesie ruchu komórek nowotworowych, ale również prawidłowych, np. leukocytów czy komórek zarodkowych i innych procesach biologicznych – np. cytokinezie i apoptozie. Pomimo skrajnie różnej roli tych wypustek w procesach życiowych komórki, mechanizmy od-

powiedzialne za ich wytworzenie kontrolowane są często przez te same szlaki przekazywania sygnałów, przynajmniej w początkowych etapach tego procesu [12,48].

Wiedza na temat mechanizmów aktywacji i hamowania powstawania i retrakcji pęcherzyków migracyjnych stale się poszerza. Zahamowanie tych procesów obserwujemy po zastosowaniu: czynników powodujących całkowitą depolimeryzację aktyny, hamujących aktywność miozyny II, chelatujących zewnątrzkomórkowe jony wapnia, wywołujących szok hiperosmotyczny czy osłabiających połączenia błony komórkowej z białkami cytoszkieletu. Jednym z najbardziej znanych czynników hamujących „pęcherzykowanie” jest blebbistatyna – inhibitor ATPazowej aktywności miozyny II [11,19]. Sytuację odwrotną, czyli pobudzenie powstawania sferycznych wypustek migracyjnych, wykazano dla komórek czerniaka M2, pozbawionych syntezy filaminy, która stabilizuje połączenia sieci aktynowej. Z uwagi na obniżoną siłę oddziaływań pomiędzy cytoszkieletem podbłonowym a błoną komórkową, komórki te tworzą pęcherzyki na całej powierzchni zewnętrznej. W komórkach tych proces powstawania pęcherzyków migracyjnych można zahamować poprzez rekonstrukcję połączeń błony komórkowej z siecią białek cytoszkieletu, np. poprzez przywrócenie syntezy filaminy, lub indukcję syntezy konstytutywnie aktywnej formy ezryny [19,55-57]. Dzięki tym właściwościom komórki czerniaka M2 pozbawione syntezy filaminy uczyniono jednym z najważniejszych modeli w badaniu podstaw mechanizmów ameboidalnego ruchu komórkowego.

RUCH KOLEKTYWNY

Przez wiele lat ruch komórek nowotworowych i proces inwazyjności nowotworów, a szczególnie ich zdolność do zasiedlania nowych tkanek wyobrażano sobie jako proces dotyczący pojedynczych komórek. Dlatego też większość testów inwazyjności przeznaczona jest dla komórek migrujących indywidualnie i jedynie ruch takich komórek można poddawać ocenie. Jest to zjawisko ważne nie tylko w odniesieniu do sposobu rozprzestrzeniania nowotworów, ale przede wszystkim istotne w kontekście zachowania homeostazy organizmów wyższych. Kolektywny sposób migracji zaobserwować można w następujących procesach fizjologicznych: migracja fragmentów nabłonków po płaskich substratach, takich jak błona śluzowa jelita podczas jego samoodnawiania, ruch warstw keratynocytów i fibroblastów w kierunku miejsca zranienia, czy warstw komórek przemieszczających się w procesie organogenezy. W warunkach *in vitro* najczęściej stosowanym modelem dla kolektywnego typu ruchu jest test gojenia ran, w którym fibroblasty zamykają przestrzeń powstałą po przerwaniu ciągłości monowarstwy komórek na płycie hodowlanej [58,59].

Kolektywny sposób migracji komórkowej polega na wspólnym przemieszczaniu się grup komórek przy funkcjonalnie zachowanych połączeniach międzykomórkowych. Komórki te zachowują pierwsze cztery z pięciu etapów ruchu wyżej opisanych dla komórek poruszających się w sposób mezenchymalny (patrz Ryc. 1). Zapoczątkowując ruch kolektywny komórki przechodzą etap protruzji, adhezji do podłoża, enzymatycznego trawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej i skurczu ciała komórki. Końcowy

etap tego procesu, w odniesieniu do mezenchymalnego sposobu migracji zawiera ważne modyfikacje. Retrakcyjny koniec komórki nie ulega oddzieleniu od grupy komórek, ale utrzymuje międzykomórkowe połączenia, które służą przeniesieniu siły skurczu na komórki znajdujące się dalej od strefy frontalnej [8,62]. Poruszające się komórki strefy frontalnej, podobnie jak komórki poruszające się w sposób mezenchymalny, wydzielają zewnątrzkomórkowe proteazy, takie jak: MT1-MMP i MMP-2 [13]. Przeniesienie siły kurczliwej możliwe jest nie tylko dzięki zachowaniu ścisłych połączeń międzykomórkowych, ale również zachowaniu komunikacji komórek przy udziale desmosomów i innych rodzajów połączeń międzykomórkowych. Dowodem na to jest podwyższony poziom ekspresji genów koneksyny 31, 40 i 43 w migrujących na sposób mezenchymalny komórkach HeLa. Bezpośrednie połączenia międzykomórkowe są stabilizowane przez kadheryny E, N i VE oraz białka reprezentujące rodzinę immunoglobulinowych receptorów adhezyjnych, takich jak NCAM i ALCAM. W komórkach pochodzenia nabłonkowego bezpośrednio i pośrednie połączenia międzykomórkowe są podtrzymywane przez kompleksy integrynowe, w skład których wchodzi integryna $\beta 1$: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$. Proces ten kontrolowany jest w dużej mierze przez kaskady przekazywania sygnałów obowiązujące dla pojedynczo migrujących komórek. Potwierdzono dotychczas, iż ekspresja genu białka Rac jest niezbędna dla zachowania tego zbiorowego sposobu migracji komórkowej [8,62,63].

Podsumowując, widzimy, iż niewątpliwą „korzyścią” kolektywnego sposobu migracji komórkowej (z punktu widzenia rozprzestrzeniania nowotworów) jest swoisty mechanizm, polegający na torowaniu drogi migracji poprzez białka macierzy zewnątrzkomórkowej czy zdrowe tkanki organizmu oraz wytworzenie lokalnego środowiska typowego dla guza pierwotnego. *In vivo* komórki poruszają się w kierunku bogatych w składniki odżywcze naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Inwazyjność komórek nowotworowych jest więc zjawiskiem adaptacyjnym, w dużej mierze zależnym od warunków środowiska. Ostatnie badania pokazują, iż nabycie bądź utrata komponentów determinujących dany typ migracji komórkowej, czy to wskutek wyciszenia genów czy ingerencji farmakologicznej, prowadzi do zmiany wzoru i mechanizmu przemieszczania się. Do tej pory zaobserwowano następujące zjawiska potwierdzające plastyczność migracji komórek nowotworowych (Ryc. 2): przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) [64], przejście mezenchymalno-ameboidalne (MAT) oraz przejście kolektywno-ameboidalne (CAT) [12,62].

Jeśli chodzi o przejście mezenchymalno-ameboidalne (MAT), ingerencja w mechanizmy regulujące przyczepność komórek do podłoża, tworzenie miejsc adhezji do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w strukturę samej macierzy prowokuje komórki do zmiany typu poruszania się na ameboidalny. Zastosowanie inhibitorów proteaz i integryn (zwłaszcza integryny $\beta 1$) może powodować inicjację mechanizmów odpowiedzialnych za przeciskanie się komórek pomiędzy włóknami macierzy zewnątrzkomórkowej, niezależnie od proteolitycznej aktywności enzymatycznej [13,60]. Podobne czynniki wpływają na zmianę sposobu migracji z ruchu kolektywnego na ameboidalny (CAT). Do dezinte-

gracji grup przemieszczających się komórek i promowania ich ruchu indywidualnego, przyczynia się jednocześnie osłabienie przyczepności komórek oraz ograniczenie oddziaływań i komunikacji międzykomórkowej. Te ostatnie polegają na udziale mechanizmów obejmujących obniżenie ekspresji genów kadheryn i immunoglobulinowych receptorów adhezyjnych oraz mutacji w szlakach sygnałowych kontrolujących działanie kadheryn i katenin [12,65]. Przepuszczalność – zmiana typu ruchu komórkowego z kolektywnego na mezenchymalny mogłaby zachodzić w komórkach, które pozbawiono wzajemnych połączeń. Komórki te zachowując zdolność adhezji i proteolizy białek macierzy zewnątrzkomórkowej mogłyby poruszać się w sposób mezenchymalny. To przejście prezentowałoby wtedy cechy przemiany kolektywno-mezenchymalnej, jednakże jak dotychczas nie udokumentowano istnienia takiego rodzaju przejścia w sposobie poruszania się komórek nowotworowych.

WNIOSKI

Mechanizmy ruchu komórek nowotworowych poznawane są coraz bardziej szczegółowo, nadal jednak nie znamy odpowiedzi na wiele podstawowych pytań. Utrudnia to znacznie skonstruowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej, która uwzględniałaby nie tylko czynnik oporności komórek na leczenie, ale także eliminowałaby zjawisko „plastyczności” komórek nowotworowych. Cecha ta jest główną przyczyną trudnego do zahamowania rozprzestrzeniania nowotworów. Dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych molekularnych szlaków przekazywania sygnałów oraz scharakteryzowanie białek odpowiedzialnych za ruch komórek nowotworowych. Ich dokładne poznanie i scharakteryzowanie pozwoli na opracowanie nowych celów dla skutecznych terapii farmakologicznych, skierowanych jednocześnie w stronę szlaków przekazywania sygnałów wspólnych dla wszystkich typów ruchu komórek nowotworowych lub terapii skojarzonych, ukierunkowanych równocześnie w kilka różnych kaskad przekazywania sygnałów z otoczenia do komórki.

PIŚMIENNICTWO

1. Wedlich D (2005) Cell migration in development and disease. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.KGAA
2. Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C (2004) The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1890-1909
3. Crnic I, Christofori G (2004) Novel technologies and recent advances in metastasis research. *Int J Dev Biol* 48: 573-581
4. Friedl P (2009) Dynamic imaging of cancer invasion and metastasis: principles and preclinical applications. *Clin Exp Metastasis* 26: 269-271
5. Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J, Segall JE (2007) Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2-3: 143-152
6. Barr S, Thomson S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujka-Kwok I, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Gibson NW, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD (2008) Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clin Exp Metastasis* 25: 685-693
7. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* 96: 379-386
8. Wolf K, Friedl P (2006) Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol* 154: 11-15

9. Sahai E, Marshall CJ (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5: 711-719
10. Martins GG, Kolega J (2006) Endothelial cell protrusion and migration in three-dimensional collagen matrices. *Cell Motil Cytoskel* 63: 101-115
11. Mannherz HG, Mach M, Nowak D, Malicka-Błaszkiwicz M, Mazur A (2007) Lamellipodial and amoeboid cell locomotion: the role of actin-cycling and bleb formation. *Biophys Rev Lett* 2: 5-22
12. Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M (2004) Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48: 441-449
13. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P (2007) Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9: 893-904
14. Pinner S, Sahai E. (2008) Imaging amoeboid cancer cell motility *in vivo*. *J Microsc* 231: 441-445
15. Small JV, Stradal T, Vignall E, Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12: 112-120
16. Small JV, Auinger S, Nemethova M, Koestler S, Goldie KN, Hoenger A, Resch GP (2008) Unravelling the structure of the lamellipodium. *J Microsc* 231: 479-485
17. Friedl P, Wolf K (2009) Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 28: 129-135
18. Olson MF, Sahai E (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 26: 273-287
19. Charras GT (2008) A short history of blebbing. *J Microsc* 231: 466-478
20. Nowak D, Skwarek-Maruszewska A, Zemanek-Zboch M, Malicka-Błaszkiwicz M (2005) Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Acta Biochim Polon* 52: 461-468
21. Popow A, Nowak D, Malicka-Błaszkiwicz M (2006) Actin cytoskeleton and beta-actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells. *J Physiol Pharmacol* 57: 111-123
22. Radwańska A, Baczyńska D, Nowak D, Brézillon S, Popow A, Maquart FX, Węgrowski Y, Malicka-Błaszkiwicz M (2008) Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells. *Life Sci* 83: 651-660
23. Khaiflina SY (2007) Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Cell Tissue Biol* 1: 293-304
24. Ruan W, Lai M (2007) Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 385: 1-5
25. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465
26. Dos Remedios CG, Nosworthy N (2008) The role of PIP₃ in actin, actin binding proteins and disease. *Protein Reviews: Actin Binding Proteins and Disease*; Springer Science + Business Media, LCC, NY USA 8: 290-297
27. Lindberg U, Karlsson R, Lassing I, Schutt CE, Höglund AS (2008) The microfilament system and malignancy. *Semin Cancer Biol* 18: 2-11
28. Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582: 2093-2101
29. Papakonstanti EA, Stourmaras C (2008) Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 582: 2120-2127
30. Kłopocka W, Barańska J (2005) The role of Rho family proteins in controlling the migration of crawling cells. *Postepy Biochem* 51: 36-44
31. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005) Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17: 559-564
32. Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, Fischer RS, Ponti A, Hitchcock-DeGregori SE, Danuser G, Fowler VM, Wirtz D, Hanein D, Waterman-Storer CM (2005) Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol* 168: 619-631
33. Small JV, Resch GP (2005) The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 17: 517-523

34. Condeelis JS, Wyckoff JB, Bailly M, Pestell R, Lawrence D, Backer J, Segall JE (2001) Lamellipodia in invasion. *Semin Cancer Biol* 11: 119-128
35. Maloney MT, Kinley AW, Pak CW, Bamberg J (2008) ADF/cofilin, actin dynamics and disease. *Protein Reviews: Actin Binding Proteins and Disease*; Springer Science + Business Media, LCC, NY USA 8: 83-180
36. Au JK, Krendel M, Safer D (2008) The roles of thymosine β 4 in cell migration and cell-cell signaling in disease. *Protein Reviews: Actin Binding Proteins and Disease*; Springer Science + Business Media, LCC, NY USA 8: 83-180
37. Moens PDJ (2008) Profilin; *Protein Reviews: Actin Binding Proteins and Disease*; Springer Science + Business Media, LCC, NY USA 8: 200-217
38. Lai FP, Szczodrak M, Block J, Faix J, Breitsprecher D, Mannherz HG, Stradal TE, Dunn GA, Small JV, Rottner K (2008) Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J* 27: 982-992
39. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005) Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17: 559-564
40. Prass M, Jacobson K, Mogilner A, Radmacher M (2006) Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *J Cell Biol* 111: 2513-2526
41. Charras GT, Hu CK, Coughlin M, Mitchison TJ (2006) Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol* 175: 477-490
42. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 586-599
43. Fievet B, Louvard D, Arpin M (2007) ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773: 653-660
44. Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120: 3491-3499
45. Hotulainen P, Lappalainen P (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* 173: 383-394
46. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P (2008) Mechanisms of actin stress fibres assembly. *J Microsc* 231: 446-454
47. Parent CA (2001) Dictyostelium cell dynamics. *Curr Protoc Cell Biol*, rozdział 12
48. Fukui Y (2002) Mechanistics of amoeboid locomotion: signal to forces. *Cell Biol Int* 26: 933-944
49. Garcia GL, Parent CA (2008) Signal relay during chemotaxis. *J Microsc* 231: 529-534
50. Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7: 429-440
51. Paluch E, van der Gucht J, Sykes C (2006) Cracking up: symmetry breaking in cellular systems. *J Cell Biol* 175: 687-692
52. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116: 4605-4613
53. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Rev Mol Cell Biol* 10: 21-33
54. Van Troys M, Vandekerckhove, Ampe C (2008) Actin and Actin Binding Proteins in cancer progression and metastasis. *Protein Reviews: Actin Binding Proteins and Disease*; Springer Science + Business Media, LCC, NY USA 8: 229-277
55. Flanagan LA, Chou J, Falet H, Neujahr R, Hartwig JH, Stossel TP (2001) Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *J Cell Biol* 155: 511-517
56. Zhu TN, He HJ, Kole S, D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ, Bernier M (2007) Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1 correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells. *J Biol Chem* 282: 14816-14826
57. Kim EY, Ridgway LD, Dryer SE (2007) Interactions with filamin A stimulate surface expression of large-conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels in the absence of direct actin binding. *Mol Pharmacol* 72: 622-63
58. Montell DJ (2008) Morphogenetic cell movements: diversity from molecular mechanical properties. *Science* 322: 1502-1505
59. Friedl P, Wolf K (2008) Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68: 7247-7249
60. Czirok A, Zamir EA, Szabo A, Little CD (2008) Multicellular sprouting during vasculogenesis. *Curr Top Dev Biol* 81: 269-289
61. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374
62. Ewald AJ, Brenot A, Duong M, Chan BS, Werb Z (2008) Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev Cell* 14: 570-581
63. Voulgari A, Pintzas A (2009) Epithelial-Mesenchymal Transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, w druku
64. Guarino M, Rubino B, Ballabio G (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39: 305-318

Types of tumor cells movement

Agnieszka Popow-Woźniak[✉], Dorota Nowak, Maria Malicka-Błaszkiwicz

Department of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 63/77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: apopow@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: invasion, type of movement: ameoboid, mezenchymal, collective

ABSTRACT

Problems in successful cancer therapy result from an adaptive character and high plasticity in tumor cells behaviour. Their accommodation to a differentiated environment is preceded by an alteration in expression profile of several proteins. Three types of tumor cell migration were characterized so far: mezenchymal, ameoboid and collective. In mezenchymal and ameoboid types of tumor cell migration, cells move individually. Collective type of migration to a bigger extend presents characteristics of the mezenchymal one. Diverse types of tumor cell locomotion differ with cell protrusions and signaling pathways that control those processes. Mezenchymal type of movement is regulated by Cdc42 kinase. Cells that move in this manner present elongated shape with distinctly exposed lamellipodium and adhere to ECM proteins. Cellular membrane blebbing of pseudopodial character appear in ameoboid type of movement. This one is under Rho/ROCK signal transduction cascade control. Our review focuses on description of different movement types and mechanisms of their regulation.

Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu

STRESZCZENIE

Coraz więcej danych wskazuje na to, że zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) zachodzi nie tylko podczas embrionalnego rozwoju organizmu, ale też w wielu stanach patologicznych, procesie gojenia się ran, fibrozach narządowych oraz w nowotworach. Program EMT w komórkach pobudzają takie białka sygnałowe jak EGF, PDGF, HGF, TGF- β , sonic hedgehog (SHH), WNT/ β katenuina oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), które mogą stymulować proliferację i migrację komórek. Podczas progresji nowotworu proces EMT może powodować zmianę niezłośliwego nowotworu w lokalnie agresywną i inwazyjną formę. Zachodzą wówczas kompleksowe zmiany w komórkach nowotworu oraz w jego otoczeniu, które prowadzą do osłabienia powiązań międzykomórkowych, oderwania komórek od błony podstawnej oraz wzmocnienia oddziaływań między komórką nowotworową a macierzą zewnątrzkomórkową. Molekularnym zmianom zachodzącym podczas EMT towarzyszą zmiany morfologiczne, których efektem jest zmiana fenotypu epitelialnego na mezenchymalny oraz nabycie przez komórki nowotworowe wzmoczonej ruchliwości i zdolności do inwazji. Po utworzeniu przerzutu w miejscu odległym od ogniska pierwotnego, komórki nowotworowe ulegają procesowi odwrotnemu – MET, zyskując z powrotem fenotyp epitelialny. Procesowi EMT podlegają nie tylko komórki nowotworu, ale także komórki tworzące jego mikrośrodowisko, a więc obecne w zrębie komórki CAF, czyli aktywne fibroblasty, które pobudzają progresję nowotworu. Zrozumienie procesu EMT i MET w nowotworach i jego związków z komórkami macierzystymi oraz aktywowanymi fibroblastami, miofibroblastami oraz z innymi składnikami zrębu może doprowadzić do prób opracowania bardziej skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

WPROWADZENIE

Badania nad mechanizmami tworzenia przez nowotwór przerzutów zostały zapoczątkowane jeszcze w XIX wieku. Jednym z pierwszych badaczy zjawiska tworzenia wtórnych ognisk choroby był Stephen Paget, który w 1889 roku opublikował swoją hipotezę „ziarna i gleby”. Stwierdził on, że określone, ale nie wszystkie, komórki nowotworowe („ziarno”) mają specyficzne powinowactwo do zasiedlania określonych tkanek („gleba”). Tylko wtedy, gdy „ziarno” i „gleba” pasują do siebie, dochodzi do powstania wtórnego ogniska choroby. W 1929 roku, James Ewing zaproponował, że tworzenie przerzutów może być wynikiem uwięzienia komórek nowotworowych w wąskich naczyniach krwionośnych, gdzie, mając zapewniony stały dopływ substancji odżywczych, zaczynają się namnażać. W latach 70-tych XX wieku obie te teorie zostały zweryfikowane. Stwierdzono, że istotnie przerzuty powstają w wyniku namnażania komórek nowotworowych uwięzionych w naczyniach włosowatych, ale tylko w tych miejscach, w których miały ku temu korzystne warunki [1-3].

PROCES TWORZENIA PRZERZUTÓW

Nowotwór to heterogenne skupisko komórek o różnych właściwościach mogących wynikać z przypadkowych zmian genetycznych i/lub epigenetycznych w nich nagromadzonych. Komórki znajdujące się w obrębie guza mogą się między sobą różnić potencjałem proliferacyjnym, zdolnością do ulegania apoptozie czy opornością na substancje chemiczne. Podobnie jest ze zdolnością komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów – nie wszystkie komórki guza pierwotnego są zdolne do tworzenia wtórnych ognisk choroby, o czym świadczą doświadczenia przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Jedynie niewielka frakcja komórek nowotworowych wprowadzonych do krwioobiegu myszy jest zdolna do utworzenia przerzutów w płucach [4,5].

Nabycie zdolności do tworzenia przerzutów wynika z nagromadzenia się zmian genetycznych, które powodują, że niektóre z komórek w obrębie guza nabywają większej zdolności do migracji do odległych miejsc. Stwierdzono, że komórki zdolne do tworzenia przerzutów są mniej stabilne genetycznie, obserwuje się w nich więcej zmian o charakterze aberracji chromosomowych czy też stwierdza zaburzenia regulacji epigenetycznej. Sam proces tworzenia przerzu-

Monika Gos^{1,2}

Joanna Miłoszewska^{1,3}

Małgorzata Przybyszewska¹

¹Zakład Biologii Komórki Centrum Onkologii - Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa; ²obecny adres Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

³Zakład Biologii Komórki Centrum Onkologii - Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, Warszawa; e-mail: joannam@coi.waw.pl

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 23 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: przejście epitelialno-mezenchymalne, przejście mezenchymalno-epitelialne, „aktywowane” fibroblasty związane z nowotworem, zrąb komórkowy, nowotwory, przerzuty

Wykaz skrótów: EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne; MET – przejście mezenchymalno-epitelialne; CAF – fibroblasty „aktywowane”, związane z nowotworem; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa

Podziękowania: Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego finansowanego przez Polską Sieć Ruchów Komórkowych Mobilitas.pl

tów jest procesem wieloetapowym, w którym można wyróżnić następujące fazy: inicjacja, progresja i utworzenie wtórnego ogniska nowotworu. Każda z tych faz związana jest ze zmianami w ekspresji szeregu charakterystycznych genów oraz zmianami właściwości komórek nowotworowych [4,6,7].

Poszczególne etapy tworzenia przerzutów są ze sobą ściśle powiązane – zachodzą w określonej kolejności, a ich zaburzenie może zahamować cały proces. Ponadto, powstanie ogniska wtórnej choroby jest wypadkową właściwości komórek nowotworowych i reakcji organizmu na zachodzące w nim zmiany. Wydaje się, że właśnie oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem, w którym się znajdują, są jednym z ważniejszych elementów warunkujących możliwość utworzenia przerzutu [6].

Uważa się, że rozpoczęciu procesu tworzenia przerzutów sprzyja powstawanie nowych naczyń krwionośnych w obrębie pierwotnego ogniska nowotworowego, które mają zapewnić dostępność składników odżywczych do wszystkich komórek guza. Proces ten jest regulowany przez HIF (ang. *hypoxia inducible factor*) – białko ulegające aktywacji w warunkach niedotlenienia, regulujące syntezę VEGF oraz innych czynników biorących udział w procesie angiogenezy [8]. Poza wytworzeniem naczyń krwionośnych, dzięki którym komórki tworzące przerzuty mogą przemieszczać się do innych narządów, zmieniają się także właściwości samych komórek nowotworowych. Wskutek tych zmian komórki stają się bardziej ruchliwe oraz zaczynają wydzielać proteazy, które degradują macierz zewnątrzkomórkową, a tym samym umożliwiają komórkom nowotworowym lokalną inwazję i przejście do układu krążenia [6,9].

Ze względu na specyficzne warunki, jakie panują w naczyniach krwionośnych, komórki nowotworowe, które mają zasiedlić inne tkanki, muszą nabyć także zdolności do przeżycia w warunkach braku adhezji, czyli wykształcić mechanizmy zapobiegające anoikis – śmierci komórki wskutek braku kontaktu z ECM lub innymi komórkami [10,11]. Ostatnie badania wskazują na to, że istotną rolę w tym procesie może odgrywać kinaza tyrozynowa TrkB, której podwyższona synteza jest związana z przeżywaniem komórek nowotworowych w warunkach braku adhezji. Białko TrkB stymuluje aktywację kinaz fosfatydylinozytolowych, które z kolei aktywują białko AKT/PKB, co skutkuje zahamowaniem szlaku kaspaz oraz enzymów tnących DNA, a tym samym zapobiega śmierci komórki [12-15].

Ostatnim etapem tworzenia przerzutów jest zasiedlenie przez komórki nowotworowe nowych miejsc, co wymaga ich przejścia z naczyń krwionośnych do otaczających je tkanek (lokalna inwazja) i utworzenie wtórnego ogniska nowotworu. Na tym etapie komórki nowotworowe ściśle oddziałują z lokalnym mikrośrodowiskiem, często zmieniając je tak, aby było dla nich sprzyjające (np. komórki zrębu zaczynają produkować czynniki wzrostowe). Korzystne warunki w miejscu powstania przerzutu stymulują proliferację komórek i dalszy rozrost nowotworu [6].

PRZEJŚCIE EPITELIALNO-MEZENCHYMALNE

W znacznej większości przypadków (~90%) nowotwory są pochodzenia nabłonkowego – pochodzą z tkanki o ściśle określonej strukturze, w której komórki mają określoną polarność i przylegają do błony podstawnej. Ze względu na dużą ilość połączeń międzykomórkowych, jak również silny kontakt z błoną podstawną, komórki nabłonkowe nie wykazują znacznej ruchliwości, częściej zmienia się ich kształt, ale nie wymaga to od nich przemieszczania się [16].

Wydaje się, że procesem, w wyniku którego komórki nabłonkowe nabywają większej ruchliwości i zdolności do migracji jest przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT). W wyniku tego procesu komórki nabłonkowe tracą swoje charakterystyczne właściwości – zanikają oddziaływania międzykomórkowe, zaburzona zostaje polarność komórek, a w konsekwencji – zanika uporządkowanie charakterystyczne dla tkanki nabłonkowej. Związane jest to ze zmianą tempa syntezy szeregu białek, w tym markerów powierzchniowych (np. kadheryna E), białek odpowiedzialnych za kontakty międzykomórkowe i oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową (integryny, białka ECM, białka z rodziny FAK) oraz za reorganizację cytoszkieletu błony (białka z rodziny Rho). Proces EMT powoduje wyłamanie się komórek spod kontroli inhibicji kontaktowej, zaburzona zostaje kontrola podziałów komórkowych i procesy różnicowania. W wyniku tego komórki nabłonkowe zmieniają także swój fenotyp – zaczynają przypominać komórki mezenchymalne, wykazując tendencję do zwiększonej ruchliwości i inwazyjności [16].

Przejście epitelialno-mezenchymalne jest procesem fizjologicznym mającym szczególne znaczenie dla embriogenezy [17,18]. U wyższych kręgowców, proces EMT odgrywa znaczącą rolę już na etapie gastrulacji, kiedy to z nabłonka epiblastu wyodrębnia się grupa komórek o zmienionym fenotypie, które przemieszczając się wzdłuż smugi pierwotnej dają początek mezodermie pierwotnej. Proces ten regulowany jest przez czynnik wzrostu nowotworu (TGF- β), białko sygnałowe Wnt i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), które wpływając na ekspresję specyficznych genów (m.in. *Snail* kodującego czynnik transkrypcyjny) stymulują zmiany morfologii i ruchliwość komórek ektodermy [19].

Przejście epitelialno-mezenchymalne ma także miejsce w momencie różnicowania się frakcji komórek zlokalizowanej w grzbietowej części cewy nerwowej w grzebień nerwowy. Komórki tej struktury, na dalszych etapach rozwoju zarodkowego, różnicują się w komórki tkanki łącznej (kości i chrząstka), mięśnie gładkie, nerwy obwodowe, glej oraz melanocyty [20]. W dorosłych organizmach proces EMT ma miejsce m.in. w trakcie tworzenia się łożyska, procesów zapalnych i gojenia się ran (produkcja fibroblastów) [21].

Ponieważ proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego wiąże się ze znaczącymi zmianami morfologii komórek, ich oddziaływań z otoczeniem, co w konsekwencji wpływa także na zdolność komórek do migracji i inwazyjności, naturalne jest, że zmianie ulegnie synteza szeregu białek uwarunkowana, między innymi, zmianami profilu ekspresji kodujących je genów [22]. Najbardziej charakterystycznymi mar-

kerami, których synteza wzrasta w wyniku procesu EMT, są białka związane z adhezją i ruchem komórek: kadheryna N i wimentyna; czynniki transkrypcyjne (np. Snail1, Snail2, Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 i/lub E47); metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Towarzyszy temu znaczne obniżenie poziomu syntezy kadheryny E oraz przemieszczanie się specyficznych czynników transkrypcyjnych (np. β -kateniny) do jądra komórkowego. Sam proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego może być pobudzany przez różne czynniki (czynniki wzrostowe np. FGF, TGF- β , Wnt), które aktywują odpowiednie kaskady sygnałowe związane z nabyciem fenotypu komórek mezenchymalnych [23-27].

ROLA PRZEJŚCIA EPITELIALNO-MEZENCHYMALNEGO W PROGRESJI NOWOTWORÓW

Pojawiające się w ostatnich latach doniesienia sugerują, że proces EMT zachodzi także w wielu stanach patologicznych, przede wszystkim w fibrozie i w trakcie rozwoju nowotworów. Dane doświadczalne potwierdzają, że w trakcie progresji nowotworów obserwuje się ekspresję genów kodujących białka charakterystyczne dla określonych stadiów rozwoju embrionalnego, które związane są z procesem przejścia epitelialno-mezenchymalnego [28-32].

Proces tworzenia przerzutów wiąże się z oderwaniem się pojedynczych komórek od masy guza, wynikiem czego jest przerwanie połączeń międzykomórkowych i utrata przez komórki właściwości adhezyjnych [33-35]. Może to być efekt działania czynników wzrostowych HGF, EGF czy PDGF, które, aktywując swoje receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, prowadzą do fosforylacji β -kateniny związanej z wewnątrzkomórkowym rejonem cząsteczki kadheryny E. Dochodzi wówczas do reorganizacji cytoszkieletu

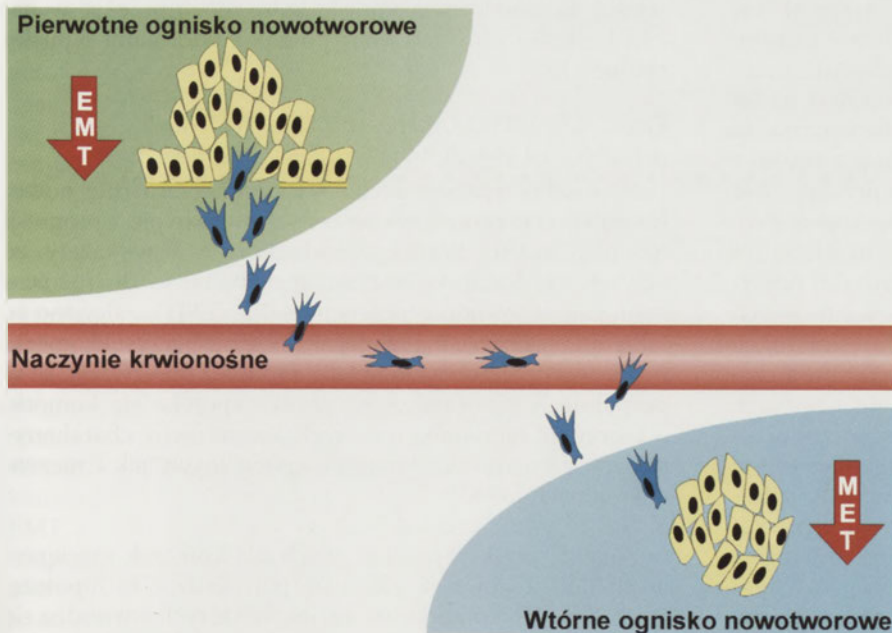
blony, przzerwania połączeń międzykomórkowych, zmian w polarności komórek i ich ruchliwości oraz kształcie. Komórki, w których zachodzą te zmiany, nabywają fenotypu mezenchymalnego, o czym świadczy pojawianie się białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych, np. wimentyny (białko cytoszkieletu błony związane z ruchem komórki), FSP1 (białko charakterystyczne dla fibroblastów), α -SMA (α aktyna mięśni gładkich) i kadheryny N oraz obniżenie poziomu kadheryny E. Wskutek procesu EMT komórki mają zwiększoną ruchliwość i inwazyjność, co sprzyja dalszej progresji nowotworu, w tym tworzeniu przerzutów do komórek do odległych miejsc (Ryc. 1) [36].

Istotnym dowodem na rolę EMT w procesie onkogenezy jest również zdolność regulatorów tego procesu do stymulowania w warunkach eksperymentalnych powstawania nowotworu i/lub przerzutów [29]. Badania przeprowadzone na myszach z nowotworem sutka wykazały, że wzrost ekspresji genu jednego z czynników transkrypcyjnych związanych z EMT, np. *Snail1* powoduje znaczny wzrost agresywności eksperymentalnie wywołanego nowotworu. Ponadto, zastosowanie przeciwciała anti-Snail1 w badaniach immunohistochemicznych wykazało, że białko to występuje w komórkach inwazyjnych nowotworów jelita grubego, żołądka, sutka oraz endometrium [37,38]. Stwierdzono także, że komórki nowotworu jelita grubego wykazują obecność β -kateniny w jądrze komórkowym oraz znaczne obniżenie poziomu kadheryny E, co może świadczyć o procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego [39].

W tworzeniu przerzutów znaczącą rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne regulujące proces EMT, np. Twist, Gooseoid i Foxc2. Twist i Gooseoid regulują ekspresję *Foxc2*, który wpływa bezpośrednio na podwyższenie poziomu transkrypcji genów związanych z nabyciem fenotypu mezenchymalnego. Wykazano, że każde z tych białek odpowiada za podwyższoną inwazyjność nowotworu u myszy; były one również wykrywane w przerzutach nowotworów człowieka. Ponadto, w badaniach *in vitro* stwierdzono, że obecność białka Twist jest wystarczająca, aby wywołać zjawisko EMT w komórkach raka sutka, zaś jego inaktywacja *in vivo* hamuje rozwój przerzutu [40].

Kadheryna E to obecne w komórkach epitelialnych białko adhezyjne zależne od Ca^{2+} , którego poziom spada w charakteryzujących się wysokim stopniem inwazyjności komórkach nowotworowych. W wielu nowotworach obserwuje się obniżenie poziomu kadheryny E, co często świadczy o ich wyższym potencjale do tworzenia przerzutów odległych [41,42]. Istnieją jednak pewne wyjątki. Komórki MDCK (pochodzące z nerki psa, zakażone wirusem mięsaka Harleja) mimo wysokiego poziomu kadheryny E, charakteryzowały się zdolnością do inwazji, zaś w pozbawionych odporności, bezgranicznych myszach *nude*, które mają

Wielki wpływ na proces EMT ma także białko MET, które jest ekspresjonowane w komórkach epitelialnych i mezenchymalnych. MET jest białkiem tyrozynowym, które może być aktywowane przez czynniki wzrostowe, takie jak HGF, które prowadzi do aktywacji szlaków sygnałowych, które mogą prowadzić do EMT. MET jest również zaangażowane w regulację motylności i inwazyjności komórek. Wskazano, że MET jest zaangażowane w regulację EMT w komórkach raka sutka i że jego ekspresja jest zwiększona w komórkach przerzutowych [43].



Rycina 1. Proces powstawania przerzutu w wyniku EMT. Komórki w pierwotnym ognisku nowotworu ulegają zjawisku EMT i, tracąc fenotyp epitelialny na rzecz mezenchymalnego, odrywają się od guza. Wędrując drogą naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych, osiągają miejsce wtórnego zasiedlenia, w którym następuje proces odwrotny, tzw. MET. Komórki powracają do fenotypu epitelialnego czego wynikiem jest rozrost nowotworu w miejscu przerzutu.

deficyt limfocytów T, tworzyły guzy i przerzuty. Zarówno guz pierwotny, jak i przerzuty wykazywały wysoki poziom kadheryny E oraz morfologiczną charakterystykę wskazującą na zróżnicowaną tkankę epitelialną [43]. Podobne zjawisko opisano w inwazyjnych nowotworach sutka, gdzie zaobserwowano syntezę trzech markerów epitelialnych: kadheryny E, α -kateniny i β -kateniny [44]. Obserwacje te sugerują, że choć zjawisko EMT niewątpliwie zachodzi podczas rozwoju nowotworu, całkowita zmiana na fenotyp mezenchymalny nie jest konieczna do inwazji i tworzenia przerzutów. Wyjaśnieniem tych obserwacji może być proces migracji kolektywnej lub kohortowej, zaobserwowanej wcześniej w rozwoju embrionalnym [45], podczas której od guza pierwotnego odrywają się agregaty komórek i migrują do odległych miejsc, tworząc przerzuty [46-48].

Przejście epitelialno-mezenchymalne w komórkach nowotworowych, podobnie jak w komórkach embrionalnych, może być pobudzane przez różne czynniki, których działanie może mieć różny efekt. Przykładowo, ekspozycja komórek z ludzkich i mysich linii komórkowych na działanie nowotworowego czynnika wzrostu TGF- β , w części z nich powoduje zmiany biochemiczne i morfologiczne charakterystyczne dla EMT, w tym obniżenie poziomu kadheryny E. W komórkach innych linii, mimo długotrwałej ekspozycji na TGF- β , nie stwierdzono pojawienia się cech mezenchymalnych, co może świadczyć o częściowej inaktywacji lub blokadzie kaskady przekazywania sygnału [49]. Badania wykazały, że w komórkach linii pochodzących z nowotworu płuca i jelita grubego, występują mutacje w genie kodującym białka rodziny Smad, powodujące inaktywację tego białka i prawdopodobnie blokujące efekt sygnalizacji TGF- β [50,51].

Przekazywanie sygnału przy udziale TGF- β może nie być konieczne dla procesu tworzenia przerzutów. Badania przeprowadzone na nowotworze skóry myszy wykazały, że synteza niefunkcjonalnej (ang. *dominant negative mutant*) formy receptora II dla TGF- β , blokowała przekazywanie sygnału przez białka Smad. Komórki nadal wykazywały obecność kadheryny E i nie dochodziło do całkowitej zmiany ich fenotypu, mimo że mogły tworzyć przerzuty. Może być to skutkiem zmian w przekazywaniu sygnału, które powodują, że niektóre reakcje w procesie EMT zachodzą, ale bez kompletnego przejścia do fenotypu mezenchymalnego [52]. Takie zjawisko obserwuje się w przypadku ekspresji onkogenów wirusowych *v-Src* i *v-Ras*, które mogą aktywować drogę transdukcji sygnału wywołującą zmiany fenotypowe związane z częściowym EMT. Ekspresja tych onkogenów w komórkach MDCK powoduje nabycie przez nie zdolności do tworzenia przerzutów. Natomiast ekspresja onkogeny *v-Src* w komórkach raka jelita grubego indukuje wzrost ruchliwości i inwazyjności, chociaż komórki te, aby przejść do kompletnego fenotypu mezenchymalnego wymagają także aktywacji poprzez inną drogę sygnałową. Ważnym czynnikiem, który może zmieniać fenotyp komórki na mezenchymalny, a jego regulacja może wpływać na organizację cytoszkieletu, formowanie filopodiów i polarność komórek jest RhoA, białko z nadrodziny Ras o aktywności GTPazy [53].

W procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego obserwuje się także aktywację mechanizmów związanych z hamowaniem apoptozy. Podczas EMT, komórki epitelialne tracą kontakt z macierzą zewnątrzkomórkową, co prowadzi do selekcji subpopulacji komórek zdolnych do przeżycia mimo braku kontaktu z ECM. W komórkach tych stwierdza się podwyższoną syntezę białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL, co sprzyja ich przeżyciu w warunkach braku adhezji i w konsekwencji – tworzeniu przerzutów, jednocześnie nie wpływając na wzrost guza pierwotnego [54,55]. Sygnały związane z zahamowaniem apoptozy w komórkach nowotworowych zachodzą najczęściej przy udziale receptorów integrynowych i kinazy tyrozynowej FAK (ang. *focal adhesion kinase*), której stała aktywacja jest wystarczająca dla przeżycia komórek epitelialnych w warunkach braku adhezji [56].

Ponadto, działanie antyapoptotyczne wykazują czynniki transkrypcyjne Slug i Snail, których aktywność jest charakterystyczna dla EMT. Białko Slug hamuje syntezę proapoptotycznego białka TP53, podczas gdy obecność Snail związana jest z obniżeniem ekspresji genu *CCND2* (kodującego cyklinę D2) i podwyższeniem poziomu transkrypcji genu kodującego inhibitor kinaz zależnych od cyklin (p21cip/WAF), który jest białkiem efektorowym dla p53. Ponadto, białko Snail aktywuje ścieżki sygnałowe MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) i PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) związane ze zdolnością komórek do przeżycia [57,58]. Inne białko charakterystyczne dla EMT, Twist, zaangażowane w tworzenie przerzutów m.in. w raku piersi, jest również negatywnym regulatorem apoptozy [59]. Wzrost poziomu syntezy powyższych czynników transkrypcyjnych w trakcie procesu EMT jest wystarczający do zahamowania śmierci komórkowej spowodowanej przez sygnał proapoptotyczny, jakim jest brak adhezji. Ich obecność prowadzi do selekcji komórek inwazyjnych, które mogą przeżyć w naczyniach obwodowych i dać początek wtórnemu ognisku choroby [60].

PRZEJŚCIE EPITELIALNO-MEZENCHYMALNE A KOMÓRKI MACIERZYSTE

W ostatnich latach podkreśla się znaczącą rolę nowotworowych komórek macierzystych w rozwoju i progresji nowotworu [61]. Ponieważ badania *in vitro* wykazały, że macierzyste komórki embrionalne zdolne są do różnicowania się w komórki mezenchymalne (EMT), założono że takiemu procesowi mogą ulegać także macierzyste komórki nowotworu. Hipoteza ta byłaby zgodna z obserwacją, że w preparatach histologicznych rzadko spotyka się komórki o fenotypie metastabilnym, wykazujące cechy charakterystyczne zarówno dla komórek epitelialnych, jak i mezenchymalnych [23,62].

Analiza markerów właściwych dla komórek macierzystych i EMT również zdaje się potwierdzać tę hipotezę. Wykazano, że komórki inwazyjne, w których stwierdza się obecność β -kateniny w jądrze, wykazują obecność markerów charakterystycznych dla komórek macierzystych, np. surwiwiny i telomerazy. Okazało się także, że komórki podlegające EMT, mają zdolność do samoodnowy [28].

W badaniach na linii ludzkich prawidłowych komórek epitelialnych pochodzących z sutka (HMLE) stwierdzono, że indukcja procesu EMT powoduje nabycie przez nie cech mezenchymalnych oraz pojawienie się markerów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Komórki takie mają również większą zdolność do formowania *in vitro* mammosfer, czyli sferycznych struktur zbudowanych ze spolaryzowanych szczytowo-podstawnie komórek potomnych wywodzących się z komórki macierzystej [63,64]. Komórki o właściwościach komórek macierzystych izolowane z ludzkich bądź mysich nowotworów sutka lub prawidłowego nabłonka syntetyzują białka charakterystyczne dla EMT, co może sugerować bezpośredni związek między EMT a epitelialnymi komórkami macierzystymi zarówno nowotworowymi, jak i prawidłowymi [63].

Komórki macierzyste sutka, dla których charakterystyczna jest obecność białek powierzchniowych CD44^{high}/CD24^{low}, wykazują duży spadek poziomu kadheryny E, znaczny wzrost poziomu fibronektyny i wimentyny oraz wysoki poziom białek FOXC2, Snail, Twist i Slug. Takie zmiany, jak w komórkach epitelialnych sutka, w poziomie syntezy wymienionych czynników transkrypcyjnych i składników macierzy zewnątrzkomórkowej obserwuje się podczas różnicowania ludzkich embrionalnych komórek macierzystych. Chociaż EMT jest procesem zachodzącym w różnicowaniu komórek macierzystych, pozwala również komórkom nowotworowym na uwolnienie się z pierwotnego guza oraz formowanie przerzutów [64-66].

Podobne wyniki wskazujące na udział komórek macierzystych nowotworu w procesie EMT uzyskano, analizując linie komórkowe raka prostaty DU-145 oraz LAPC4 i 9. Subpopulacja komórek progenitorowych CD44⁺ wyizolowanych z pełnych linii komórkowych tych nowotworów ma większy potencjał klonogeny, czyli zdolność do tworzenia w warunkach hodowli *in vitro* kolonii komórek potomnych, zdolnych do proliferacji i przeżycia, wywodzących się z jednej komórki. Subpopulacja CD44⁺ szybciej proliferuje i ma większy potencjał do tworzenia przerzutów *in vivo* i *in vitro* w porównaniu z linią wyjściową [67]. W analizie cytometrycznej w subpopulacji komórek CD44⁺ zaobserwowano duży wzrost odsetka komórek SP (ang. *side population*). Komórki SP charakteryzują się zdolnością do „wyrzucania” barwnika Hoechst, a także leków cytostatycznych oraz mniejszymi rozmiarami niż reszta populacji. Komórki SP z linii LAPC 4 oraz innych linii komórkowych, jak linia raka sutka MCF-7 i glejaka U373 syntetyzują białka związane z macierzystymi komórkami: Notch-1 i kateninę- β [67,68]. Są również bardziej klonogenne niż odpowiadająca im populacja komórek pozbawiona komórek SP, co może być dowodem na związek procesu EMT z komórkami macierzystymi nowotworu. Ostatnio bezpośrednich dowodów na związek procesu EMT z komórkami macierzystymi dostarczyły wyniki badań nad komórkami SP z raka trzustki, posiadającymi wyjątkowo duży potencjał do wchodzenia w proces EMT, inwazyjności i tworzenia przerzutów. Komórki te pod wpływem TGF- β zmieniają swój kształt na wrzecionowaty, a towarzyszą temu zmiany w ekspresji genów kodujących kadherynę E, Snail i MMP [69].

W progresji nowotworu znaczącą rolę odgrywa mikrośrodowisko: komórki zrębu oraz inne jego elementy (takie jak naczynia krwionośne, macierz zewnątrzkomórkowa) otaczające pierwotne ognisko nowotworu. Szczególnie ważną funkcję wydają się pełnić fibroblasty związane z nowotworem (CAF) oraz miofibroblasty, komórki będące źródłem czynników wzrostowych (np. VEGF, FGF), chemokin oraz innych białek, których obecność sprzyja lokalnej inwazji tkanki przez komórki nowotworowe [70]. Przykładowo, zwiększona produkcja kolagenu typu I i III oraz synteza tenascyny C przez komórki CAF powodują zmiany w strukturze ECM i mikrośrodowisku, które mogą sprzyjać szybszej progresji nowotworu. Ponadto, komórki CAF wydzielają metaloproteazy degradujące ECM, co umożliwia komórkom nowotworowym wyjście z pierwotnego ogniska guza.

Wyniki ostatnich badań dotyczących pochodzenia komórek CAF sugerują, że komórki te mogą powstawać w wyniku procesu EMT z komórek nowotworowych, prawidłowych komórek nabłonkowych otaczających guz lub komórek śródbłonka naczyń. W tym przypadku, jak wykazano w badaniach z wykorzystaniem myszy, około 40% komórek CAF powstaje w wyniku EMT z komórek zrębu, zaś obecność CD31 oraz markerów mezenchymalnych FSP1 lub α SMA wskazuje jako ich źródło komórki śródbłonka [71,72].

Związek komórek CAF z progresją nowotworu udowodniono w eksperymencie *in vivo*, podając podskórnie myszom *nude* komórki MCF-7 transformowane onkogenem Ras razem z normalnymi fibroblastami lub z CAF. Po podaniu komórek MCF-7 razem z komórkami CAF zaobserwowano powstawanie statystycznie większych guzów [70].

MET A POWSTANIE WTÓRNEGO OGNISKA NOWOTWOROWEGO

Histologiczne podobieństwo komórek nowotworowych z przerzutu do komórek z pierwotnego ogniska choroby może sugerować, że kolonizacja miejsca odległego odbywa się na zasadzie procesu odwrotnego do EMT, czyli przejścia mezenchymalno-epitelialnego – MET. Dowodem na istnienie takiego procesu może być fakt, że w przerzutach powstałych z udziałem EMT znajdują się komórki charakteryzujące się obecnością kadheryny E oraz cytoplazmatyczną lokalizacją β -kateniny [39]. Pomiedzy tymi komórkami odtwarzane są także połączenia międzykomórkowe, zaś ich fenotyp staje się epitelialny. Wiąże się to ze zmianami mikrośrodowiska w miejscu przerzutu: reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zmianami w wydzielaniu czynników wzrostowych i cytokin, tak aby zaistniały warunki korzystne dla dalszego rozwoju nowotworu.

Doświadczenia przeprowadzone na linii komórkowej PC3, charakteryzującej się dużą inwazyjnością, wyprowadzonej z komórek raka prostaty, wykazały że komórki te, które wskutek procesu EMT tracą fenotyp epitelialny, odzyskują go po umieszczeniu ich na podłożu z dodatkiem

matrigelu, czyli mieszaniny białek macierzy zewnątrzkomórkowej uzyskanego w wyniku ekstrakcji białek błony podstawnej z komórek mysiego chrząstniako-mięsaka EHS. Komórki PC3 tworzą w nim puste, groniaste sferoidy, w których obecne są połączenia międzykomórkowe i pojawiają się pęcherzyki wydzielnicze widoczne w mikroskopie elektronowym. Tym zmianom morfologicznym towarzyszy wzrost poziomu markerów specyficznych dla komórek prostaty i spadek poziomu wimentyny, co wpływa na zdolność do reagowania na sygnały z mikrośrodowiska, wpływające na funkcje i fenotyp komórki [73].

Powrót komórek mezenchymalnych w miejscu odległego przerzutu do fenotypu epithelialnego udowadnia rolę EMT w progresji nowotworu. Koncepcja MET natomiast prowadzi do zrozumienia zmian w morfologii nowotworowych komórek przerzutujących.

PODSUMOWANIE

Tworzenie przerzutów jest jednym z etapów progresji nowotworu, zaś nabycie zdolności do tego procesu wiąże się z szeregiem zmian zachodzących w komórkach nowotworowych, zarówno na poziomie DNA (mutacje somatyczne, zmiany epigenetyczne), jak i RNA czy białek (zaburzona ekspresja genów kodujących białka odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie komórek). W wyniku tych zmian zachodzących w guzie pierwotnym, komórki nowotworowe nabywają zdolności do uwalniania się z pierwotnej lokalizacji, przeżywania w warunkach braku adhezji, a tym samym – przemieszczania się siecią naczyń krwionośnych i limfoidalnych do odległych miejsc oraz zasiedlania ich.

Zrozumienie procesu EMT zachodzącego w pierwotnej lokalizacji nowotworu, jego związku z nowotworowymi komórkami macierzystymi czy udziału zrębu komórkowego w tym procesie, może doprowadzić do poznania istotnych elementów, które byłyby w przyszłości celem dla nowych terapii przeciwnowotworowych. Ewentualne terapie mogą być skierowane przeciwko fibroblastom zrębu i wydzielanym przez nie aktywatorom procesu EMT czy też tworzone w oparciu o przeciwciała i inhibitory szlaków sygnałowych związanych z tym procesem. W ostatnim okresie dużo uwagi poświęca się terapiom kombinowanym polegającym na jednoczesnym lub sekwencyjnym blokowaniu różnych ścieżek sygnałowych związanych z oddziaływaniem mikrośrodowiska na komórki nowotworowe.

PIŚMIENNICTWO

- Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J (2008) Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res* 10 Suppl 1, S2: 1-10
- T Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed" and "soil" hypothesis revised. *Nature Cancer Rev* 3: 453-458
- Kaplan RN, Rafii S, Lyden D (2006) Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 66: 11089-11093
- Lyons JG, Lobo E, Martorana AM, Myerscough MR (2008) Clonal diversity in carcinomas: its implication for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clin Exp Metastasis* 25: 665-677
- Gupta GP, Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127: 679-695
- Chiang AC, Massague J (2008) Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359: 2814-2823
- Nguyen DX, Massague J (2007) Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Rev Genet* 8: 341-352
- Morrissey C, True LD, Roudler MP, Coleman IM, Hawley S, Nelson PS, Coleman R, Wang YC, Corey E, Lange PH, Higano CS, Vessella RL (2008) Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastases. *Clin Exp Metastasis* 25: 377-388
- Lorusso G, Ruegg C (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem. Cell Biol* 130: 1091-103
- Reddig PJ, Juliano RL (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24: 425-439
- Schwartz MA (1997) Integrins, oncogenes and anchorage independence. *J Cell Biol* 139: 575-578
- Chiarugi P, Giannoni E (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage--dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76: 1352-1364
- Liotta LA, Kohn E (2004) Cancer and the homeless cell. *Nature* 430: 973-974
- Douma S, van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, van Garderen E, Peeper DS (2004) Suppression of anoikis and induction of metastasis by neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430: 1034-1040
- Geiger TR, Peeper DS (2005) The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective. *Cancer Res* 65: 7033-7036
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66: 8319-8326
- Hay ED (2005) The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Develop Dynamics* 233: 706-720
- Moustakas A, Heldin CH (2007) Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98: 1512-1520
- Nakaya Y, Sheng G (2008) Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Develop Growth Differ* 50: 755-766
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED (2007) Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 185: 7-19
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW (2007) Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213: 374-383
- Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D (2005) Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 65: 5991-5995
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2005) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. *Cancer Res* 65: 5991-5995
- Yang J, Mani SA, Weinberg RA (2006) Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 66: 4549-4550
- Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS (2008) Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 25: 643-655
- Orlichenko LS, Radisky DC (2008) Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Dev Dynamics* 234: 132-142
- LaGamba D, Nawshad A, Hay ED (2005) Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dynamics* 234: 132-142
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5: 744-749
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454

30. Laruel, Bellacosa A (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase / AKT pathways. *Oncogene* 24: 7443-7454
31. Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Chen Z, Yoshiomoto K, Mischel PS, Coughesy TF, Liao LM, Nelson SF (2006) Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 4: 607-619
32. Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Herman R, Foinser R, Beug H, Mikulitis W (2004) Molecular aspects of epithelial cell plasticity: Implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 566: 9-20
33. Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transitions. *Bioessays* 23: 912-920
34. Yin T, Getsios S, Caldelari R, Godsel LM, Kowalczyk AP, Muller EJ, Green KJ (2005) Mechanism of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 280: 40355-40363
35. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G (2005) SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 33: 6566-6578
36. Mimeault M, Batra SK (2007) Interplay of distinct growth factors during epithelial-mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Ann Oncology* 18: 1605-1619
37. Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechsmidt K, Hofler H, Sarbia M (2005) Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 17: 1-11
38. Lee JM, Dedhar D, Kalluri R, Thompson E (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172: 973-981
39. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10356-10361
40. Yang J, Mani JA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-939
41. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, Mori T (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696-1701
42. Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM (2002) Expression of E-cadherin and β -catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 8: 987-993
43. Mareel MM, Behrens J, Birchmeier W, De Bruyne GK, Vlemminckx K, Hoogewijs A, Fiers WC, Van Roy FM (1991) Down-regulation of E-cadherin expression in Madin Derby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int J Cancer* 47: 922-928
44. Hashizume R, Koizumu H, Ihara A, Ohta T, Uchikoshi T (1996) Expression of β -catenin in normal breast tissue and breast carcinoma: a comparative study with epithelial cadherin and α -catenin. *Histopathology* 29: 139-145
45. Cooper MS, D'Amico LA (1996) A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev Biol* 180: 184-198
46. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374
47. Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, Black M, Zanker KS (1995) Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants *in vitro*. *Cancer Res* 55: 4557-4560
48. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H, Koono M (1999) Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol Histopathol* 14: 1183-1197
49. Brown KA, Aakre ME, Gorska AE, Price JO, Eltom SE, Pietenpol JA, Moses HL (2004) Induction by transforming growth factor- β 1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event *in vitro*. *Breast Cancer Res* 6: r215-231
50. Yanagisawa K, Uchida K, Nagatake M, Masuda A, Sugiyama M, Saito T, Yamaki K, Takahashi T, Osada H (2000) Heterogeneities in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. *Oncogene* 19: 2305-2311
51. Salovaara R, Roth S, Loukola A, Launonen V, Sistonen P, Avizienyte E, Kristo P, Jarvinen H, Souchelnytskyi S, Sarlomo-Rikala M, Aaltonen LA (2002) Frequent loss of SMAD4/dpc4 protein in colorectal cancers. *Cut* 51: 56-59
52. Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ (2005) Distinct mechanisms of TGF- β 1 mediated epithelial to mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* 115: 1714-1723
53. Begum R, Nur E-Kamal MS, Zaman MA (2004) The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Exp Mol Med* 36: 358-366
54. Martin SS, Ridgeway AG, Pinkas J, Lu Y, Reginato MJ, Koh EY, Michelman M, Daley GQ, Brugge JS, Leder P (2004) A cytoskeleton based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. *Oncogene* 23: 4641-4645
55. Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, Chalbos D, Sonenshein GE (2007) Oestrogen signaling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target Bcl2. *Nat Cell Biol* 9: 470-478
56. McLean GW, Komiyama NH, Serrels B, Asano H, Reynolds L, Conti F, Hodivala-Dilke H, Metzger D, Chambon P, Grant SG, Frame MC (2004) Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes* 18: 2998-3003
57. Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT (2005) Slug antagonizes p53 mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 123: 641-653
58. Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes* 18: 1131-1143
59. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S (2006) A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer* 94: 13-17
60. Wu Y, Zhou BP (2008) New insight of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin* 40: 643-650
61. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y (2007) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 17: 3-14
62. Fischer AN, Fuchs E, Mikula H, Huber H, Beug H, Mikulitis W (2007) PDGF essentially links TGF- β signaling to nuclear β -catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. *Oncogene* 26: 3395-3405
63. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou Ay, Brooks M, Reinhardt F, Zhang ChCh, Shihtsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715
64. Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutook JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA (2007) Mesenchyme forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10069-10074
65. Hollier BG, Evans K, Mani SA (2009) The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14: 29-43
66. Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, Ward CM (2007) Epithelial mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* 67: 11254-11262
67. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG (2006) Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25: 1696-1708

68. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG (2005) Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65: 6207-6219
69. Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, Matsuzaki Y, Suzuki S, Izumiya M, Iizuka H, Sakai G, Hozawa S, Azuma T, Hibi T (2009) Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF- β mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int J Cancer*, w druku
70. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL secretion. *Cell* 121: 335-348
71. Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401
72. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67: 10123-10128
73. Lang SH, Sharrard RM, Stark M, Villette JM, Maitland NJ (2001) Prostate epithelial cell lines from spheroids with evidence of glandular differentiation in three dimensional Matrigel cultures. *Br J Cancer* 85: 590-599

Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression

Monika Gos^{1,2}, Joanna Miłoszewska^{1,2*}, Małgorzata Przybyszewska²

¹Cell Biology Department, Cancer Center Institute of Oncology, 5 Roentgena St., Warsaw, Poland

²Medical Genetics Department, Institute of Mother and Child, 17a Kasprzaka St., Warsaw, Poland

*e-mail: joannam@coi.waw.pl

Key words: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, cancer associated fibroblasts, stroma, cancer, metastases

ABSTRACT

According to recently published data, the epithelial-mesenchymal transition - a process important for embryonic development, may be involved in many pathological processes such as wound healing, tissue fibrosis or cancer progression. The EMT process in cell is driven by growth factors (EGF, PDGF, HGF) or other signaling proteins such as TGF- β , sonic hedgehog (Shh), Wnt/ β -catenin and extracellular matrix (ECM) components that may stimulate cellular growth and migration. During cancer progression, the EMT process is necessary for the conversion of benign tumor to aggressive and highly invasive cancer. This is due to complex changes in cancer cells and their microenvironment that lead to dissolution of intracellular junctions and their detachment from basolateral membrane, and changes in the interactions between cancer cells and ECM. The loss of adhesion is accompanied by molecular and morphologic changes in cancer cells that are essential for the phenotypic change from epithelial to mesenchymal one, and the acquirement of higher migration and invasion potential. During the colonization of distant sites, a reverse process mesenchymal-epithelial transition (MET) takes place and metastatic cancer cells again acquire the epithelial phenotype. The EMT in cancer progression is not only specific for cancer cells. It has been suggested that also cells within tumor microenvironment e.g. cancer associated fibroblasts (CAF) are generated in part from normal epithelial cells in EMT process. The understanding of the role of EMT and MET processes in cancer progression and their relationship with cancer stem cells, cancer associated fibroblasts and other stroma cells might lead to the discovery of new, targeted cancer therapies.

Regulacja dynamiki cytoszkieletu kortykalnego podczas migracji swobodnie żyjących ameb

STRESZCZENIE

Amoeba proteus (długość do ok. 600 μm) i o rząd wielkości od niej mniejsza i ewolucyjnie młodsza *Acanthamoeba castellanii* (ok. 40 μm) stanowią od lat modele do badań ruchu ameboidalnego (pełzania, ang. *crawling*), którym poruszają się również niektóre komórki organizmów tkankowych, np. fibroblasty, granulocyty czy makrofagi. Ruch ameboidalny jest nierozdzielnie związany z organizacją i dynamiką cytoszkieletu kortykalnego. O ile dość dużo wiadomo o molekularnych mechanizmach leżących u podstaw ruchliwości *A. castellanii*, to wciąż niewiele wiadomo o podstawach generacji ruchu przez *A. proteus*, mimo iż ta olbrzymia komórka od ponad stulecia jest obiektem badań biologów i fizjologów ruchu. Niniejsza praca przeglądowa opisuje dotychczasowy stan wiedzy o molekularnych aspektach generacji ruchu w obu amebach i stanowi próbę porównania funkcjonowania i regulacji cytoszkieletu kortykalnego obu swobodnie żyjących ameb.

WPROWADZENIE

Ruch komórek pełzających po podłożu można zdefiniować jako skoordynowany w czasie i przestrzeni układ zmian w ich morfologii i adhezji. Ten sposób przemieszczania się jest typowy nie tylko dla swobodnie żyjących ameb, a więc pierwotniaków, ale także dla rozmaitych komórek tkankowych, takich jak np.: komórki zarodka, fibroblasty czy komórki układu odpornościowego, granulocyty i makrofagi. W ten sposób poruszają się także inwazyjne komórki nowotworowe w procesie metastazy, co w konsekwencji prowadzi do powstawania przerzutów (ruch ameboidalny komórek nowotworowych omówiony jest w artykule Popow-Woźniak i wsp. w tym numerze „Postępów biochemii”).

Komórki tkankowe oraz jednokomórkowe organizmy poruszające się tzw. ruchem ameboidalnym są fascynującym, a zarazem jednym z najtrudniejszych obiektów badań mechanizmów ruchu. Nie posiadają one wyspecjalizowanych, trwałych narządów ruchu, lecz rozwijają przejściowe struktury lokomotoryczne, pseudopodia, o różnym kształcie i wielkości. *Amoeba proteus* formuje duże, płatkowate pseudopodia, podczas gdy *Acanthamoeba castellanii* na krawędzi wiodącej tworzy ostro zakończone drobne wypustki (podobne do liści akantu). Natomiast front komórek tkankowych jest szerokim, wachlarzowatym lamelipodium. Siła niezbędna dla ruchu generowana jest dzięki mechanizmom ściśle związanym z funkcjonowaniem podbłonowej sieci filamentów aktynowych, powiązanych z białkami wiążącymi aktynę i tworzącej cytoszkielet kortykalny, zwany także korteksem kurczliwym (Ryc. 1 i 2). Organizacja korteksu zależy od szeregu białek wchodzących w interakcje z aktyną, w tym białek motorycznych – miozyn. W ruchu niektórych komórek tkankowych, np. fibroblastów, biorą również udział mikrotubule. W ruchu małych, wyspecjalizowanych komórek, takich jak keratynocyty czy leukocyty, a także w migracji ameb (*Amoeba proteus* czy *Acanthamoeba castellanii*) mikrotubule nie biorą udziału, a więc wszystkie procesy związane z ruchliwością (migracja, endocytoza, cytokineza i transport wewnątrzkomórkowy) są tu zależne od cytoszkieletu aktynowego.

Badania migracji swobodnie żyjących ameb prowadzone są podstawowo na dwóch organizmach. Jednym z nich jest wielka, słodkowodna *Amoeba proteus*. Ta niezwykle szybko (do 10 $\mu\text{m}/\text{s}$) migrująca ameba jest od ponad stulecia komórką modelową dla badania mechanizmów ruchu. Niestety, warunki hodowli *A. proteus* uniemożliwiają uzyskanie dużych ilości komórek, co z pewnością spowodowało zastój w badaniach nad molekularnymi mechanizmami ruchu tych olbrzymich ameb. Drugim jest mała, również słodkowodna, poruszająca się znacznie wolniej (ok. 0,8 $\mu\text{m}/\text{s}$) *Acanthamoeba castellanii*, która jest przede wszystkim obiektem badań biochemicznych podstaw migracji. Wynika to przede wszystkim z możliwości uzyskania nawet do 1 kg komórek z kilkudziesięciolitrowej ich zawiesiny. Należy podkreślić, iż *Acanthamoeba* to warunkowy patogen, który w sprzyjających warunkach może spowodować zniszczenia w organizmie ssa-

Wanda Kłopocka^{1,2,3}

Maria Jolanta Rędownicz¹

Anna Wasik²

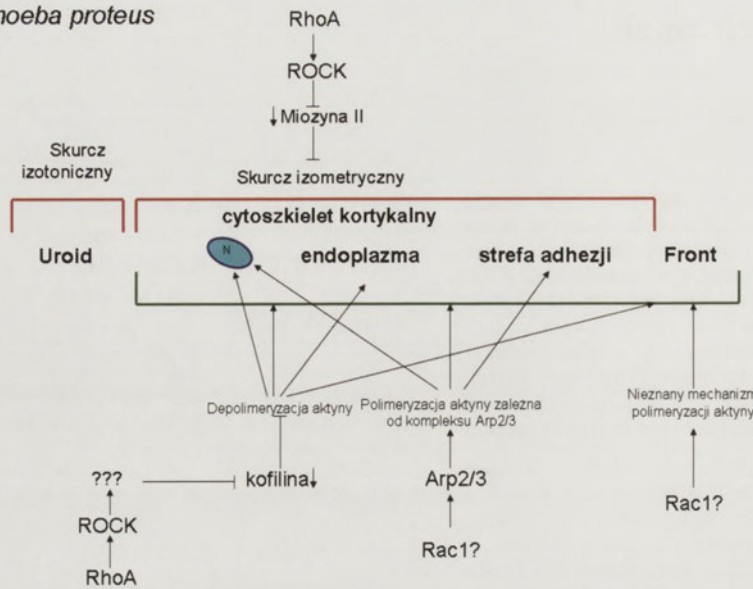
Zakład Biochemii¹ i Zakład Biologii Komórki²,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

³Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: w.klopocka@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 7 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: cytoszkielet kortykalny, migracja komórek, ameba, aktyna

Podziękowania: Praca ta została wykonana w ramach Polskiej Sieci „Mobilitas.pl” oraz działalności Statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN



Rycina 1. Schemat regulacji procesów odpowiedzialnych za migrację *Amoeba proteus*. Szczegółowe opisy przebiegu i regulacji poszczególnych procesów w tekście.

ków. Z obowiązku należy wspomnieć, iż w ostatnich dwóch dekadach głównym obiektem badań molekularnych aspektów ruchów komórkowych stał się śluzowiec *Dictyostelium discoideum*, a zwłaszcza amebowe stadium w jego złożonym cyklu życiowym. Ameby śluzowca zainteresowały biochemików i genetyków nie tylko ze względu na możliwości uzyskania dużej ilości komórek do analiz, ale głównie dlatego, iż organizm ten w jednym ze stadiów cyklu życiowego (zarodniki) jest haploidem, co umożliwiła prowadzenie manipulacji genetycznych [1].

Reorganizacja cytoszkieletu, a w konsekwencji ruch, zachodzi w odpowiedzi na stymulujące komórkę bodźce zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne, powodując zmianę w morfologii, adhezji i polaryzacji komórki. W odpowiedzi na bodźce chemotaktyczne i/lub haptotaktyczne komórki ssaków, takie jak granulocyty czy makrofagi, przylegają do podłoża, zmieniają kształt i migrują. Migrację swobodnie żyjących ameb z kolei stale inicjują fizyczne i chemiczne bodźce środowiskowe. Czynnikiem stymulującym i kontrolującym migrację są zarówno agonści receptorów powierzchniowych, niektóre jony, jak też czynniki fizyczne: pole elektryczne, bodźce mechaniczne czy świetlne. Uruchamiają one różnorodne drogi sygnałowe aktywujące albo hamujące określone białka regulatorowe, a za ich pośrednictwem określone efekторы, co w konsekwencji prowadzi do organizacji lub dezorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Odpowiedzią na bodziec może więc być polimeryzacja aktyny, czyli formowanie filamentów (F-aktyny) z monomerów aktynowych (G-aktyny) i tworzenie z filamentów struktur wyższego rzędu, takich jak wiązki i sieci, albo dezorganizacja struktur cytoszkieletu wywołana depolimeryzacją aktyny.

Ekspansja strefy frontальной, co objawia się wysuwaniem pseudopodiów, lamellipodiów czy filopodiów, związana jest z organizacją aktyny *de novo*. Natomiast przesunięcie strefy tylnej w kierunku migracji, zmiana kształtu czy prze-

bieg cytoplazmy bazują na zorganizowanych już strukturach cytoszkieletu. Przemieszczanie się komórek ruchem ameboidalnym jest kombinacją procesów polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny oraz następujących po sobie zjawisk kurczliwości i dezintegracji systemu akto-miozynowego. Przestrzenne rozdzielanie tych procesów i zjawisk w migrującej komórce związane jest z jej polaryzacją. Ta asymetria, w powiązaniu z adhezją, umożliwia komórkom przekształcanie generowanej w ich wnętrzu siły w pętlnięcie po podłożu.

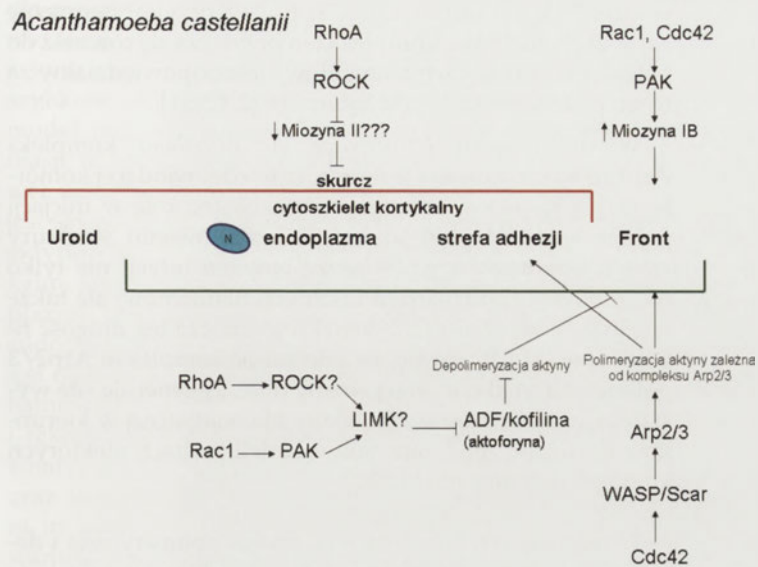
W niniejszej pracy podsumowano wyniki badań dotyczących funkcjonowania i regulacji cytoszkieletu w migrujących *Amoeba proteus* i *Acanthamoeba castellanii* oraz podjęto próbę porównania mechanizmu migracji tych swobodnie żyjących ameb.

MECHANIZM MIGRACJI AMEB

W ruchu ameboidalnym wyróżnić można trzy podstawowe zjawiska: ekspansję krawędzi wiodącej, adhezję i deadhezję oraz przesunięcie strefy tylnej. Progresa czoła komórki jest związana z polimeryzacją aktyny i formowaniem cytoszkieletu, natomiast wycofywanie strefy tylnej - ze skurczem i następującą po nim dezorganizacją cytoszkieletu akto-miozynowego.

Mechanizm przesuwania błony komórkowej w kierunku migracji nie jest do końca poznany. W filopodiach czy lamellipodiach niektórych komórek tkankowych przyłączanie monomerów do filamentów aktynowych, których końce kolczaste (+) skierowane są ku błonie komórkowej, generuje siłę wystarczającą do pokonania oporu mechanicznego błony i jej przesunięcia [2,3]. Mullins i wsp. [4,5] sugerują, że taki mechanizm ekspansji frontu występuje również u *A. castellanii*. Wyniki innych badań sugerują natomiast, że polimeryzacja aktyny przy wewnętrznej powierzchni błony jedynie stabilizuje położenie tej ostatniej, natomiast siła powodująca przesunięcie błony jest generowana przez procesy zachodzące w głębszych warstwach komórki [6,7].

Siłę motoryczną dla ekspansji krawędzi wiodącej *A. proteus*, a także niektórych komórek tkankowych, generuje aktywność kurczliwa systemu akto-miozynowego. Podczas cyklicznego zrywania połączeń pomiędzy filamentami i błoną następuje wypchnięcie błony przez napływającą endoplazmę i progresja strefy wiodącej, co wiąże się z jednoczesnym przesunięciem warstwy korykalnej w głąb komórki i jej destrukcją [6]. Takie zjawisko obserwowano także w leukocytach [8] czy makrofagach [9]. Po przesunięciu frontu jest on stabilizowany przez formowanie nowej warstwy F-aktyny przy cytoplazmatycznej powierzchni błony oraz utworzenie punktów przyczepu do podłoża. Taki mechanizm ekspansji powoduje skokową migrację, w której progresja zachodzi na zmianę z czasowym hamowaniem wysuwania frontu, a polimeryzacja aktyny służy stabilizacji położenia błony i wyznacza kierunek przemieszczania się komórki.



Rycina 2. Schemat regulacji procesów odpowiedzialnych za migrację *Acanthamoeba castellanii*. Szczegółowe objaśnienia w tekście.

Budowa i funkcjonowanie struktur adhezyjnych zależne są od rodzaju podłoża, po którym komórki pełzną, a także środowiska, w którym żyją. Swobodnie żyjące ameby rozwijają na brzusznej powierzchni u podstawy pseudopodiów mikrowypustki. Są to bogate w F-aktynę minipodia u *A. proteus* [10] czy acanthopodia u *A. castellanii* [11]. Zerwanie połączenia z podłożem jest warunkiem koniecznym dla przesunięcia tylnej strefy komórki w stronę frontu. Zarówno deadheza, jak i przesuwanie strefy tylnej zależne są od siły generowanej dzięki aktywności kurczliwej systemu akto-miozynowego. Dotychczas wykazano dla *A. castellanii*, iż w generowaniu aktywności kurczliwej biorą udział miozyny z rodzin I i II [12].

Aby funkcje kurczliwe cytoszkieletu mogły być przełożone na pracę, sieć mikrofilamentów musi być połączona z błoną. W *A. castellanii* wykryto zakotwiczone w błonie białko Acan-125, które wiąże się z domeną SH3 jednej z izoform miozyny I (IC) i pełni wraz z nią funkcje kompleksu zakotwiczonego filamety aktynowe w błonie komórkowej [13]. Dotychczas u *A. proteus* nie zidentyfikowano białek łączących F-aktynę z błoną komórkową. Analiza obrazów uzyskanych w mikroskopie elektronowym wykazała natomiast, iż tuż przy błonie tworzone są regularnie ułożone mostki [14,15], a dynamika tworzenia tych połączeń wydaje się być regulowana przez jony Ca^{2+} , w taki sposób, że wzrost stężenia tego kationu powoduje ich zerwanie [16].

STRUKTURA I REGULACJA CYTOSZKIELETU KORTYKALNEGO AMEB

Morfologiczna polaryzacja migrującej ameby wynika z rozmieszczenia spolimeryzowanej aktyny i miozyn oraz układu filamety aktynowych w cytoszkielecie korykalnym. W *A. castellanii* pod błoną frontálną zlokalizowana jest silnie rozgałęziona, dendrytyczna sieć mikrofilamety [4], podobnie jak w komórkach tkankowych. W przedniej czę-

ści migrującej *A. proteus* mikrofilamety ułożone są natomiast równolegle do błony plazmatycznej, a w rejonie tylnym i środkowym tworzą nieregularną sieć [14]. Ta różnica to jeden z czynników odpowiedzialnych za odmienny mechanizm ekspansji frontu w opisywanych komórkach.

Podczas migracji ameb w wysuwanej części frontálnej brak jest miozyny II, obecna jest ona jedynie w środkowej i tylnej strefie komórki i skoncentrowana w strefie korykalnej. Taki rozkład miozyn w komórkach migrujących wydaje się być powszechny. Dotyczy zarówno swobodnie żyjących ameb: *A. castellanii* [17,18] oraz *A. proteus* [19,20], jak też komórek tkankowych, takich jak fibroblasty [21], keratynocyty [22] czy neutrofile [23].

Miozyna II z *A. castellanii* tworzy, niezależnie od fosforylacji ciężkiego łańcucha, minifilamety złożone z ośmiu cząsteczek miozyny ułożonych parami przeciwrównolegle, które w określonych warunkach mogą tworzyć większe struktury (grube filamety) wskutek bocznych połączeń pomiędzy minifilamentami [24].

Dotychczas w *A. proteus* zsekwencjonowano jedynie łańcuch ciężki konwencjonalnej miozyny II, którego masa cząsteczkowa wynosi ok. 220 kDa [25]. Wykryto także obecność immunoanalogu miozyny VI, niekonwencjonalnej miozyny zaangażowanej w organizmach wielokomórkowych w procesy związane z migracją i transportem wewnątrzkomórkowym [26]. Białko to, tak jak miozyna VI, nie tworzy filamety i jest równomiernie rozmieszczone w postaci punktów w warstwie korykalnej oraz cytoplazmie ameb [26,27]. Najprawdopodobniej rola miozyny II polega na generowaniu naprężeń w warstwie korykalnej poza dystalnymi obszarami komórki (skurcz izometryczny) (Ryc. 1), odpowiedzialnych za deadhezę, wycofywanie uroidu, zachowanie kształtu komórki i utrzymanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w jej wnętrzu. Nie wiadomo jednak, czy immunoanalog miozyny VI bierze udział w skurczu izotonicznym (Ryc. 1), zachodzącym w urodzie migrującej ameby i związanym z dezorganizacją korteksu i jego przemianą w płynącą endoplazmę. Zaobserwowano bowiem, stosując mikroiniekcję przeciwciał skierowanych przeciw ssaczym miozynom VI, iż zablokowanie funkcji immunoanalogu prowadzi do nieznacznego tylko zablokowania migracji ameb (ok. 20%) [26], natomiast powoduje znaczne zahamowanie procesów pinocytozy i fagocytozy [28].

W generowaniu ruchu *A. castellanii* biorą udział miozyny z rodzin I i II [12]. Spośród trzech izoform miozyny I (IA, IB, IC), jedynie izoforma IB jest zlokalizowana w strefie wiodącej komórki, a zwłaszcza w szczytach filopodiów i może brać udział w generowaniu siły niezbędnej dla ekspansji [29,30,31]. Aktywacja miozyn I następuje w wyniku fosforylacji reszty seryny zlokalizowanej w domenie motorycznej poprzez specyficzną kinazę ciężkiego łańcucha miozyny, która, jak się okazało, należy do rodziny kinaz PAK zależnych od małych GTPaz Rac1 i Cdc42 (Ryc. 2) [32]. Ponieważ izoformy miozyny I występujące w *A. castellanii* zawierają

w pałeczce dodatkowe miejsce wiązania aktyny (obok klasycznego dla wszystkich miozyna miejsca wiązania aktyny w domenie motorycznej) [33] mogą wiązować filamenty aktynowe. Ponadto, obecność domeny oddziaływania z błoną komórkową umożliwia zakotwiczenie filamentów aktynowych w błonie poprzez miozyny I [34]. Sugeruje to, iż miozyny I biorą udział w generowaniu różnych rodzajów ruchu.

Z organizacją cytoszkieletu aktynowego związane jest także tworzenie miejsc przyczepu ameb do podłoża. Kompleksy F-aktyny obecne w strukturach adhezyjnych zanikają, gdy komórka traci kontakt z podłożem, a pojawiają się, gdy ponownie zaczyna do niego przylegać [10].

REGULACJA ORGANIZACJI CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO I EKSPANSJI FRONTU KOMÓRKI

Jak już wcześniej wspomniano, aktyna w komórkach migrujących ameb podlega ciągłym dynamicznym przemianom z formy filamentarnej w globularną i odwrotnie. W *A. proteus* G-aktyna lokalizuje się w płynącej endoplazmie, F-aktyna głównie w podbłonowej, żelifikowanej ekto plazmie, gdzie formuje cytoszkielet korykalny. Najsilniejsza agregacja spolimeryzowanej aktyny występuje w strefie środkowej pełzających komórek [7]. Podobnych obserwacji dokonano dla *A. castellanii* za pomocą mikroskopii elektronicznej z wykorzystaniem techniki mrożeniowej [35].

Spośród białek wiążących aktynę w *A. proteus*, oprócz miozyny II, wykazano obecność immunoanalogów α -aktyniny, winkuliny [36], spektryny [37], kaldesmonu [38], kofiliny [39], podjednostek kompleksu Arp2/3, Arp2 i Arp3 [7] i wspomnianej wcześniej miozyny VI [26]. Ostatnio sklonowano i zsekwencjonowano nowe białka wiążące aktynę o masach cząsteczkowych ok. 120 i 56 kDa, które stanowią najprawdopodobniej produkt alternatywnego składowania eksonów tego samego genu, gdyż mniejsze białko (amebina) stanowi C-kończącą część większego – ApABP-FI (od *Amoeba proteus* actin-binding protein – filamin immunoanalog) [40].

W przypadku *A. castellanii* znamy sekwencję wielu białek wiążących aktynę, co więcej, większość z tych białek udało się oczyścić z zawiesiny ameb w ilościach wystarczających do przeprowadzenia analiz umożliwiających określenie ilościowych parametrów oddziaływania z aktyną. Są to m. in.: izoformy miozyny I, II i IV [41], wspomniane już Acan125 [13], aktoforyna – białko z rodziny ADF-kofilina [42,43], aktobindyna [44], profiliny [44,45], białka żelujące o masie 120 kDa [46,47] i 260 kDa (GP-260) [48] oraz – odkryte po raz pierwszy w tym organizmie – białka kompleksu Arp2/3 [49].

W procesach polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny nie tylko u ameb biorą udział m. in. białka kompleksu Arp2/3 oraz białka z rodziny ADF-kofilina (u *A. castellanii* zwana aktoforyną). Kompleks białek Arp2/3 zawiera dwa białka o m. cz. ok. 47 i 44 kDa strukturalnie przypominające monomeryczną aktynę (ang. *actin related proteins*): odpowiednio Arp2 i Arp3 oraz pięć innych podjednostek – ARPC1-5 [4,5,49,50]. W obecności czynników inicjujących nukleację

kompleks, za pośrednictwem podjednostki Arp2, wchodzi w interakcję z profiliną, czego konsekwencją jest tworzenie zarodki filamentów. Kompleks ten przyłącza się również do boków już istniejących filamentów i jest odpowiedzialny za tworzenie odgałęzień pod kątem 70° [2,4,5,51].

W migrujących komórkach *A. castellanii* kompleks Arp2/3 zlokalizowany jest przy krawędzi wiodącej komórki [52]. Uważa się, że odgrywa on istotną rolę w inicjacji polimeryzacji aktyny, jak też w kształtowaniu struktury sieci filamentów. Arp2/3 bierze bowiem udział nie tylko w formowaniu odgałęzień bocznych filamentów, ale także wiąże je tworząc sieci lub wiązki, wyznacza też długość filamentów [5]. Uważa się, że zależna od kompleksu Arp2/3 polimeryzacja aktyny u tej ameb (Ryc. 2) generuje siłę wystarczającą do przesuwania błony plazmatycznej w kierunku migracji [4], podobnie jak w lamellipodiach niektórych komórek tkankowych [3,53].

W migrujących komórkach *A. proteus* polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny zachodzi stale w całym cytoszkiecie korykalnym, a wyniki ostatnich badań [7] wskazują, że jest ona regulowana w rozmaity sposób w różnych obszarach migrującej komórki. Spośród białek regulujących polimeryzację aktyny u *A. proteus* wykazano obecność immunoanalogów profiliny [54], kofiliny [39] oraz immunoanalogów białek Arp2 i Arp3 [7]. Dystrybucja homologów białek Arp2 i Arp3 i ich kolokalizacja z F-aktyną w migrujących amebach wskazują, że zależna od kompleksu białek Arp2/3 polimeryzacja aktyny zachodzi w cytoszkiecie korykalnym, tj. pod błoną plazmatyczną, z wyjątkiem części dystalnych komórki, wysuwanych i wycyfywanych frontów oraz uroidu, a także w strefie adhezji (obszar środkowo-przedni) oraz w cytoszkiecie perinuklearnym (Ryc. 1). Badania ultrastruktury sieci aktynowej na wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej pokazały, że filamente aktynowe w strefie środkowej migrującej ameb tworzą rozgałęzienia pod kątem 70° [7], a więc takim, jaki powstaje, gdy nowy filament jest formowany na boku istniejącego mikrofilamentu z udziałem kompleksu białek Arp2/3. Jednak w korteksie *A. proteus* końce kolczaste (+) rozgałęziających się filamentów aktyny rosną w różnych kierunkach. Nie są skierowane ku błonie komórkowej, a zależna od kompleksu Arp2/3 polimeryzacja aktyny nie służy wypychaniu błony, lecz formowaniu złożonej, bardzo dynamicznej sieci filamentów. Badania z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanej G-aktyny [55,56] pokazały niezwykle szybkie tempo wymiany monomerów aktynowych pomiędzy płynącą endoplazmą a korteksem w środkowo-przedniej strefie ameb.

Brak amebowych białek Arp2 i Arp3 w uroidzie i wycyfywanych pseudopodiach, gdzie zachodzi skurcz izotoniczny połączony z destrukcją sieci korykalnej, wydaje się oczywisty, ale brak kompleksu Arp2/3 w wierzchołkach wysuwanych pseudopodiów, gdzie zachodzi rekonstrukcja sieci aktynowej, jest raczej zaskakujący. Oznacza to, że polimeryzacja aktyny pod błoną krawędzi wiodącej *A. proteus* zachodzi niezależnie od kompleksu białek Arp2/3, a mechanizm tego procesu jest nieznan [7].

Brak kompleksu Arp2/3 oraz równoległy do błony plazmatycznej układ mikrofilamentów w strefie wiodącej wska-

zują, że polimeryzacja aktyny w *A. proteus* nie generuje siły dla progresji frontu. Także szybkość wysuwania krawędzi wiodącej i sposób, w jaki komórka się przemieszcza sugeruje inny mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko. Średnia szybkość wysuwania frontu ameby wynosi ok. 7 $\mu\text{m/s}$, a model tego ruchu można określić jako skokowy, wyróżniając w nim fazę przyspieszenia i fazę zwolnienia albo nawet zahamowania progresji. Błona frontalna przesuwana jest szybko w kierunku migracji, gdy warstwa filamentów aktynowych traci z nią połączenie, czego skutkiem jest lokalny spadek ciśnienia hydrostatycznego i przepływ endoplazmy w wyznaczonym w ten sposób kierunku. Płynąca endoplazma wypycha błonę, a warstwa mikrofilamentów jest odsuwana w głąb komórki i ulega destrukcji. Faza zahamowania progresji związana jest z polimeryzacją aktyny i rekonstrukcją warstwy mikrofilamentów pod błoną plazmatyczną [6,57]. Polimeryzację aktyny w strefie frontальной oraz wiązanie filamentów z błoną plazmatyczną regulują m. in. jony wapnia (Ryc. 1) [58,59]. W wierzchołkach wysuwanych pseudopodiów stężenie Ca^{2+} wynosi 10^{-9} – 10^{-8} M i jest znacznie niższe niż w strefie tylnej (10^7 M), co stymuluje procesy polimeryzacji aktyny i rekonstrukcji warstwy korykalnej. Jednocześnie, zachodzący lokalnie, cykliczny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} umożliwia zerwanie połączeń pomiędzy błoną i warstwą aktynową, a w konsekwencji – przesunięcie błony. Nie można wykluczyć obecności w tych amebach unikalnych izoform miozyny, które mogłyby generować siłę niezbędną do wysuwania pseudopodiów.

Blokada endogennego białka Arp3 w *A. proteus*, będąca wynikiem mikroiniekcji przeciwciała przeciw Arp3, nie miała wpływu na morfologię migrujących komórek, powodowała natomiast nieodwracalne obniżenie szybkości migracji; obserwowano ponad 40% spowolnienie wycofywania się uroidu i ekspansji frontu [7]. Obserwowane zmiany w połączeniu z redystrybucją kompleksu Arp2/3 wskazują, że spowolnienie migracji może być spowodowane zaburzeniami w formowaniu struktur adhezyjnych oraz dynamicznej reorganizacji sieci kurczliwej w środkowej strefie komórki.

Molekularne mechanizmy regulacji polimeryzacji aktyny, w tym aktywności kompleksu Arp2/3, u *A. proteus* są nadal słabo poznane. Wydaje się, że proces ten jest kontrolowany przez jeden ze szlaków sygnałowych zależnych od białka Rac, ale niezwiązany z żadną z kinaz PAK (Ryc. 1). W *A. proteus* zidentyfikowano zarówno białko podobne do ludzkiego Rac1 [60], jak też immunoanalog kinazy ciężkich łańcuchów miozyny I (ang. *Myosin I Heavy Chain Kinase*, MIHCK) [61], która należy do rodziny kinaz PAK, aktywowanych małymi GTPazami Rac1 i Cdc42 [62]. Wykazano, że frakcja cytoplazmatyczna uzyskana z ameb aktywuje proces nukleacji, zaś blokada amebowego immunoanalogu białka Rac1 (za pomocą przeciwciał) znosi ten efekt. Z kolei blokada immunoanalogu MIHCK nie ma wpływu na ten proces [61]. Struktura cytoszkieletu aktynowego tej wielkiej ameby [20] wskazuje, że forminy mogą brać udział w zależnej od białka Rac polimeryzacji aktyny, brak jednak doniesień, które by tę sugestię potwierdziły.

Rodzina białek Rho jest również włączona w regulację formowania filamentów aktynowych u *A. castellani*. Wyka-

zono, iż ludzkie białko Cdc42 kontroluje tu polimeryzację aktyny zależną od kompleksu Arp2/3 [63]. Ponadto, wiąże się ono z białkami WASP/Scar aktywując w ten sposób kompleks Arp2/3 (Ryc. 2), co inicjuje zarówno proces nukleacji, jak też formowania odgałęzień bocznych filamentów [3]. Białko Rac1 może modulować polimeryzację aktyny za pośrednictwem kinazy PAK, która fosforyluje i aktywuje kinazę LIM, która z kolei fosforyluje i inaktywuje w ten sposób aktoforynę (ADF/kofilinę) (Ryc. 2), białko depolimeryzujące filamente aktynowe. Wykazano, że w żywych amebach ok. 30% aktoforyny jest ufosforylowane na reszcie Ser1, a więc wyłączone z oddziaływania z aktyną [64]. Aktoforyna występuje głównie w części korykalnej ameb, a zwłaszcza w krawędzi wiodącej pseudopodiów [65].

W *A. castellani* obecne są dwie grupy białek oddziałujących z monomerami aktyny – aktobindyna (m. cz. ok. 13 kDa) [44,45] oraz dwie izoformy profiliny (I i II) o masach cząsteczkowych ok. 12 kDa [66,67]. Stężenie każdej z tych grup jest w komórkach podobne i wynosi $\sim 90 \mu\text{M}$ [45,67]. Aktobindyna, wiążąca się z aktyną w stosunku molowym 1:1, wydaje się hamować proces elongacji filamentu [45], natomiast profilina wiążąca aktynę w tym samym stosunku molowym, blokuje etap nukleacji przez sekwestrowanie wolnych monomerów aktyny ze związanym ADP [66]. Obie grupy białek wykazują odmienną lokalizację komórkową. Podczas gdy profilina I występuje głównie w części korykalnej cytoplazmy z wyjątkiem lamellipodiów, profilina II - w części podbłonowej, z wyjątkiem strefy frontальной wycofujących się pseudopodiów, gdzie kolokalizuje z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanem; aktobindyna natomiast obecna jest głównie u podstawy lamellipodiów [68]. Aktobindyna może stanowić w *Acanthamoeba* odpowiednik (prekursor?) tymozyny $\beta 4$ (peptydu zaangażowanego w regulację organizacji cytoszkieletu aktynowego w komórkach tkankowych), gdyż zawiera dwie domeny homologiczne do domeny tymozyny $\beta 4$ [69].

Lokalizacja immunoanalogu kofiliny w migrujących komórkach *A. proteus* wskazuje, że białko to bierze udział w procesach reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w środkowo-przednim obszarze, w podbłonowej sieci mikrofilamentów, w płynącej endoplazmie i strukturach adhezyjnych oraz w strefie frontальной (Ryc. 1). Amebowa kofilina jest natomiast nieobecna w tylnej strefie ameb, gdzie zachodzi skurcz połączony z destrukcją cytoszkieletu. Procesy fragmentacji mikrofilamentów i ich depolimeryzacji, w których bierze udział kofilina, zachodzą prawdopodobnie w endoplazmie i prowadzą do uwalniania monomerów aktynowych niezbędnych dla rekonstrukcji warstwy aktynowej na wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej wysuwanych frontów. Blokada tego białka, spowodowana podaniem drogą mikroiniekcji przeciwciała przeciw ssa-czej kofilinie, hamuje niemal całkowicie migrację ameby. Komórki nie przemieszczają się, ponieważ wydaje się być zaburzona zarówno rekonstrukcja warstwy aktynowej pod błoną frontu, organizacja kompleksów aktyny w strukturach adhezyjnych, jak też dynamiczna reorganizacja sieci korykalnej [39].

W regulacji organizacji aktyny w migrujących komórkach *A. proteus* może brać również udział zidentyfikowany w tej

amebie immunoanalog kaldesmonu [38]. Białko to kolokalizuje z filamentami aktyny w wycofywanych obszarach komórki, a więc w strefie skurczu i dezorganizacji cytoszkieletu, w obszarach polimeryzacji aktyny *de novo* i rekonstrukcji cytoszkieletu przy krawędziach wiodących, w strefie adhezji oraz w cytoszkielecie perinuklearnym. Udział immunoanalogu kaldesmonu w kontroli migracji ameb prawdopodobnie polega na (i) stabilizacji filamentów aktynowych w strefach wycofywanych; (ii) hamowaniu – poprzez blokadę oddziaływania aktyny z miozyną – procesów skurczu oraz (iii) na promowaniu polimeryzacji aktyny w strefach progresji [38].

Co ciekawe, odkryte ostatnio w *A. proteus* białka wiążące aktynę (amebina i ApABP-FI) zawierają w swojej sekwencji region α -helikalny, który wykazuje ok. 40% identyczności z sekwencją domeny ludzkiego kaldesmonu, zwanej linkerem. Badania przeprowadzone na amebinie (C-końcowa część ApABP-FI) wykazały, że wiązuje ona (podobnie jak C-końiec kaldesmonu) filamety aktynowe oraz hamuje zależną od aktyny ATPazę akto-miozyny (Rędownicz, dane nieopublikowane). Stosując przeciwciała uzyskane przeciw C-końcowi obu białek wykazano, iż występują one – wspólnie z aktyną – w części kortykalnej komórki oraz w rejonie okołojądrowym [40]. Interesującym wydaje się potwierdzenie, czy białka te stanowią amebowe prekursorzy kaldesmonu, zwłaszcza, iż przeciwciała przeciw ssaczemu kaldesmonowi wykryło w amebach dwa prążki o masach cząsteczkowych ok. 60 kDa i 120 kDa [38], a więc podobne do mas amebiny i ApABP-FI.

REGULACJA SKURCZU CYTOSZKIELETU AKTO-MIOZYNOWEGO I WYCOFYWANIA UROIDU

Podczas gdy progresja frontu migrujących komórek związana jest zawsze, niezależnie od mechanizmu odpowiedzialnego za przesunięcie błony, z formowaniem filamentów aktynowych, to wycofywanie strefy tylnej komórki i zrywanie połączeń z podłożem zależne jest od skurczu, u podstaw którego leży interakcja aktyny z konwencjonalną miozyną II. Oddziaływanie to może być regulowane poprzez fosforylację lekkiego i/lub ciężkiego łańcucha miozyny, ale także wiązanie jonów wapnia przez łańcuchy lekkie w przypadku miozyn z mięśni mięczaków [70]. Za fosforylację jednego z łańcuchów lekkich (zwanego regulatorowym) odpowiada aktywowana jonami wapnia i kalmoduliną kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK, ang. *myosin light chain kinase*) oraz kinaza zależna od małej GTPazy RhoA, ROCK i niezależna od jonów wapnia [70].

Szlak sygnałowy związany z białkiem Rho reguluje aktywność miozyn konwencjonalnych, może także kontrolować procesy polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny (opisano powyżej) [71]. Kinaza zależna od RhoA (kinaza ROCK) fosforyluje zarówno resztę Ser18 i/lub Tre19 lekkiego łańcucha miozyny (te same reszty, które fosforyluje MLCK) oraz oddziałującą z miozyną jednostkę fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny, co hamuje aktywność fosfatazy, w konsekwencji prowadząc do zwiększenia poziomu fosforylacji i aktywacji miozyny i umożliwia jej oddziaływanie z aktyną [71], a w rezultacie inicjuje skurcz sieci akto-miozynowej.

Dotychczas nie wykazano w obu omawianych amebach fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny II, ani obecności MLCK. Natomiast zarówno w *A. castellanii* [62,72], jak w *Amoeba proteus* [60,61,73] wykryto immunoanalogi Rac1 i RhoA i kinazy od nich zależne (Ryc. 1 i 2). Metody mikrokinektji i przyżyciowych obserwacji zastosowane w przypadku *A. proteus* pozwoliły na pokazanie roli szlaków sygnałowych związanych z tymi białkami w kontroli kształtu tych ameb, a także w trzech podstawowych zjawiskach składających się na ich migrację: ekspansji frontu, adhezji i wycofywania strefy tylnej komórki. Wpływ białek z rodziny Rho na ruchliwość *A. proteus* badano blokując endogenne immunoanalogi Rac i Rho [60], kinazy zależne od Rho (ROCK) [73] oraz kinazy ciężkiego łańcucha miozyny I (MIHCK) [61].

W *A. castellanii* białko Rac bierze udział przede wszystkim w regulacji aktywności miozyny I (Ryc. 2) aktywując należącą do rodziny PAK kinazę ciężkiego łańcucha tej miozyny [62]. Natomiast białko Rho być może jest zaangażowane w regulację aktywności miozyny II (Ryc. 2) [70]. Aktywność miozyny II z *A. castellanii* kontrolowana jest wyłącznie poprzez fosforylację ciężkich łańcuchów [32] w ten sposób, że fosforylacja trzech reszt serynowych (Ser1489, Ser1494, Ser1499) na końcu każdego z łańcuchów (m. cz. ok. 171 kDa) hamuje zależną od aktyny aktywność ATPazową oraz zależny od miozyny ruch filamentów aktynowych [74,75]. Brak w zasadzie doniesień dotyczących kinazy ciężkich łańcuchów miozyny II w tej amebie; przypuszcza się, że jest to kinaza należąca do rodziny kinaz zależnych od białka Rho. Immunoprecypitacja frakcji cytozolowej ameb przy pomocy przeciwciała skierowanego przeciw ludzkiej kinazie ROCK wykazała obecność autofosforylowalnego białka o m. cz. ok. 150 kDa, co wskazuje na obecność kinazy ROCK w tych komórkach [72].

Immunoanalog kinazy ROCK o podobnej masie cząsteczkowej wykryto także w *A. proteus* [73]. Wykazano również, iż w tych amebach, odmiennie niż w komórkach tkankowych, hamowanie aktywności zarówno białka Rho, jak i kinazy ROCK powoduje wzrost aktywności ATPazowej zależnej od aktyny, mierzonej dla wzbogaconej w miozynę II frakcji komórkowej [73]. Wstępne obserwacje wskazują, że ciężki łańcuch miozyny II *A. proteus* jest *in vivo* fosforylowany, a analiza jego sekwencji aminokwasowej [73] wskazuje na obecność na C-końcu reszt serynowych zlokalizowanych w rejonie przypominającym miejsca fosforylacji zidentyfikowane w miozynie II z *A. castellanii*. Badania *in vivo*, w których blokowano amebowe białko Rho [60] lub kinazę ROCK [73] pokazały, że zahamowanie tej ścieżki sygnałowej powoduje wzrost kurczliwości cytoszkieletu akto-miozynowego, prowadząc do nieodwracalnych zmian kształtu komórek i sposobu ich migracji, silnej adhezji do podłoża oraz do obniżenia szybkości migracji średnio o 50%. Taki efekt działania inhibitorów szlaku sygnałowego związanego z białkiem RhoA jest prawdopodobnie wynikiem trwałej interakcji pomiędzy miozyną II i aktyną spowodowanej defosforylacją (być może więc aktywacją) miozyny II. Obserwowane zaburzenia w ruchliwości ameb mogą być także wynikiem zmian w poziomie fosforylacji i aktywności innych białek wiążących aktynę, np. kofiliny. Szlaki sygnałowe

we Rho/ROCK oraz Rac/PAK uruchamiają mechanizmy prowadzące do inaktywacji kofiliny w wyniku jej fosforylacji za pośrednictwem kinazy LIM. W *A. proteus* blokada zarówno endogennego białka Rac1, jak i RhoA powoduje, odwrotnie niż w przypadku komórek tkankowych, podobne zmiany w sposobie migracji komórek, co prawdopodobnie wynika z odrębnego mechanizmu progresji frontu tych ameb w porównaniu z innymi komórkami przemieszczającymi się ruchem pełzającym.

W *A. proteus* skurcz warstwy korytkalnej zachodzi w reżimie izometrycznym i izotonicznym w całej komórce, z wyjątkiem wysuwanych frontów (Ryc. 1) [76,77,78]. Skurcz izometryczny odpowiedzialny jest za generowanie siły motorycznej dla wycofywania uroidu, zerwanie połączeń z podłożem oraz przepływ endoplazmy. Charakter skurczu określają zmiany stosunku F- do G- aktyny, które w tej wielkiej komórce odgrywają istotną rolę w regulacji ruchliwości [58,79]. Wzrost stosunku F- do G-aktyny odpowiada wzrostowi napięcia i jest miarą skurczu izometrycznego, natomiast spadek stosunku F- do G-aktyny wiąże się ze skurczem izotonicznym i dezintegracją systemu kurczliwego. Skurcz izometryczny zachodzi w czasie migracji *A. proteus* w środkowo-tylnej strefie komórki oraz w wycofywanych pseudopodiach (Ryc. 1) [7], a więc w regionach, w których zlokalizowano immunoanalog miozyny II [56]. W tych obszarach interakcja miozyny II z aktyną prowadzi do silnej kondensacji mikrofilamentów w wyniku skurczu i przesuwania się korteksu z rejonów dystalnych do strefy środkowej. W urodzie migrujących ameb zachodzi skurcz izotoniczny (Ryc. 1), czego odzwierciedleniem jest obniżenie stosunku F- do G-aktyny, a więc dezintegracja sieci korytkalnej i włączenie się obecnych tam białek w strumień endoplazmy. Molekularne podstawy regulacji tych dynamicznych zmian są nadal stosunkowo słabo poznane u tego pierwotniaka, mimo iż ze względu na odmienną niż w komórkach tkankowych organizację cytoszkieletu korytkalnego [20] oraz zachodzące w jego obrębie procesy wydają się unikalne dla tego organizmu, a przez to niezmiernie interesujące.

PODSUMOWANIE

W pracy tej podjęto próbę pokazania, na przykładzie swobodnie żyjących ameb, *Amoeba proteus* i *Acanthamoeba castellanii*, jak złożonym zjawiskiem jest migracja komórek pełzających, które nie tworzą stałych struktur lokomotorycznych, a jedynie przejściowe wypustki cytoplazmatyczne. Ich ruch jest związany z organizacją i dynamiką cytoszkieletu korytkalnego. Ten sposób przemieszczania się obejmuje kilka współwystępujących zjawisk: ekspansję frontu, adhezję i deadhezję oraz przesuwanie tylnej strefy komórki. U podstaw tych procesów leżą różne, nie do końca wyjaśnione mechanizmy. Celem tej pracy było także wykazanie różnic pomiędzy procesami odpowiedzialnymi za migrację w opisanych amebach. Różnice te dotyczą zarówno przebiegu poznanych procesów, ich regulacji, jak też roli w migracji. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że w *A. proteus* struktura cytoszkieletu i mechanizm migracji są wyraźnie odmienne od pozostałych komórek pełzających. Wynika to być może z jej rozmiarów — jej długość może osiągać nawet 600 μm . Techniczne ograniczenia

doprowadziły do zastoju w badaniach tego interesującego i jednocześnie unikatowego organizmu, uniemożliwiając tym samym poznanie molekularnych podstaw procesów odpowiedzialnych za generowanie siły niezbędnej dla jego przemieszczenia się. W tym miejscu pojawia się pytanie, czy w dobie eksperymentów prowadzonych na komórkach izolowanych z organizmów tkankowych i zwierzętach transgenicznych zasadne jest prowadzenie badań na pierwotniakach. Wydaje się, że tak i to nie tylko ze względów czysto poznawczych, czy ewolucyjnych; w historii badań nad migracją komórek pełzających pierwotniaki zajmują bowiem równie istotne miejsce, co komórki tkankowe. To badania prowadzone na wielkich słodkowodnych amebach, w tym *A. proteus*, ułatwiły zrozumienie wielu mechanizmów ruchu zwanego ameboidalnym, natomiast prekursorskie badania z wykorzystaniem metod biochemicznych prowadzone na *A. castellanii* przyczyniły się do poznania molekularnych podstaw organizacji i dynamiki cytoszkieletu aktynowego komórek organizmów wyższych.

PIŚMIENNICTWO

1. Rędowicz MJ (2000) Pierwotniaki w badaniach biochemicznych i genetycznych. Kosmos 49: 583-588
2. Svitkina TM, Borisy GG (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. J Cell Biol 145: 1009-1026
3. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112: 453-465
4. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD (1998a) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. Proc Natl Acad Sci USA 95: 6181-6186
5. Mullins DR, Kelleher JF, Xu J, Pollard TD (1998b) Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. Mol Biol Cell 9: 841-852
6. Grębecki A (1990) Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated *in vivo* by video-enhancement. Protoplasma 154: 98-111
7. Pomorski P, Krzemiński P, Wasik A, Wierzbička K, Barańska J, Kłopocka W (2007) Actin dynamics in *Amoeba proteus* motility. Protoplasma 231: 31-41
8. Keller H, Eggli P (1998) Protrusive Activity, Cytoplasmic Compartmentalization, and Restriction Rings in Locomoting Blebbing Walker Carcinoma Cells Are Related to Detachment of Cortical Actin from the Plasma Membrane. Cell Motil Cytoskeleton 41: 181-93
9. Hartwig JH, Yin HL (1988) The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. Cell Motil Cytoskeleton 10: 117-125
10. Grębecki A, Grębecka L, Wasik A (2001) Minipodia, the adhesive structures active in locomotion and endocytosis of amoebae. Acta Protozool 40: 235-247
11. Preston TM, King CA (1984) Ameboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. J Gen Microbiol 130: 2317-2323
12. Brzeska H (2001) Przygoda z amebą: dziwaczne miozyny i kinaza. Kosmos 50: 223-232
13. Xu P, Zot AS, Zot HG (1995) Identification of Acan125 as a myosin-I-binding protein present with myosin-I on cellular membranes. J Biol Chem 270: 25316-25319
14. Wehland J, Weber K, Gawlitta W, Stockem W (1979) Effects of the actin-binding protein DNAase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of *Amoeba proteus*. An attempt to explain amoeboid movement. Cell Tissue Res 199: 353-
15. Kłopocka W, Stockem W, Grębecki A (1988) Fine structure and distribution of contractile layers in *Amoeba proteus* preincubated at high temperature. Protoplasma 147: 117-124

16. Kawakatsu T, Kikuchi A, Shimmen T, Sonobe S (2000) Interaction of actin filaments with the plasma membrane in *Amoeba proteus*: Studies using a cell model and isolated plasma membrane. *Cell Struct Funct* 25: 269-277
17. Baines IC, Korn ED (1990) Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J Cell Biol* 111: 1895-904
18. Kong HH, Pollard TD (2002) Intracellular localization and dynamics of myosin-II and myosin-IC in live *Acanthamoeba* by transient transfection of EGFP fusion proteins. *J Cell Sci* 15: 4993-5002
19. Stockem W, Hoffmann HU, Gawlitta W (1982) Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res* 221: 505-519
20. Stockem W, Kłopocka W (1988) Amoeboid movement and related phenomena. *Int Rev Cytol* 112: 137-183
21. Kolega J, Taylor DL (1993) Gradients in the concentration and assembly of myosin II in living fibroblasts during locomotion and fiber transport. *Mol Biol Cell* 4: 819-836
22. Svitkina TM, Verkovsky AB, McQuade KM, Borisy GG (1997) Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: Mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* 139: 397-415
23. Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F, Maxfield FR (2000) Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci* 113: 1287-1298
24. Sinard JH, Pollard TD (1989) The effect of heavy chain phosphorylation and solution conditions on the assembly of *Acanthamoeba* myosin-II. *J Cell Biol* 109: 1529-1535
25. Oh SW, Jeon KW (1998) Characterization of myosin heavy chain and its gene in *Amoeba proteus*. *J Eukaryot Microbiol* 45: 600-605
26. Dominik M, Kłopocka W, Pomorski P, Kocik E, Rędowicz MJ (2005) Characterization of *Amoeba proteus* myosin VI-immunoanalogue. *Cell Motil Cytoskeleton* 61: 172-188
27. Sobczak M, Rędowicz MJ (2005) Is *Amoeba proteus* myosin VI immunoanalogue a dimeric protein? *Acta Protozool* 44: 389-394
28. Sobczak M, Kłopocka W, Wasik A, Rędowicz MJ (2008) Involvement of myosin VI immunoanalogue in pinocytosis and phagocytosis in *Amoeba proteus*. *Biochem Cell Biol* 86: 509-519
29. Yonemura S, Pollard TD (1992) The localization of myosin I and myosin II in *Acanthamoeba* by fluorescence microscopy. *J Cell Sci* 102: 629-642
30. Baines IC, Brzeska H, Korn ED (1992) Differential localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J Cell Biol* 119: 1193-1203
31. Baines IC, Corigliano-Murphy A, Korn ED (1995) Quantification and localization of phosphorylated myosin I isoforms in *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 130: 591-603
32. Brzeska H, Korn ED (1996) Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J Biol Chem* 271: 16983-16986
33. Brzeska H, Lynch TJ, Korn ED (1988) Localization of the actin-binding sites of *Acanthamoeba* myosin IB and effect of limited proteolysis on its actin-activated Mg²⁺-ATPase activity. *J Biol Chem* 263: 427-435
34. Miyata H, Bowers B, Korn ED (1989) Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *J Cell Biol* 109: 1519-1528
35. González-Robles A, Castañón G, Hernández-Ramírez VI, Salazar-Villalatoro L, González-Lázaro M, Omaña-Molina M, Talamás-Rohana P, Martínez-Palomo A (2008) *Acanthamoeba castellanii*: identification and distribution of actin cytoskeleton. *Exp Parasitol* 119: 411-417
36. Brix K, Reinecke A, Stockem W (1990) Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. III. Influence of microinjected antibodies on the organization and function of the microfilament system. *Eur J Cell Biol* 51: 279-84
37. Choi EY, Jeon KW (1989) A spectrin-like protein present on membrane of *Amoeba proteus* as studied with monoclonal antibodies. *Exp Cell Res* 185: 154-165
38. Gałola M, Kłopocka W, Grębecki A, Makuch R (2003) Immunodetection and intracellular localisation of caldesmon-like proteins in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 222: 75-83
39. Kłopocka W, Wierzbicka K, Pomorski P, Krzemiński P, Wasik A (2006) Cofilin-like protein influences the motility of *Amoeba proteus*. *Acta Protozool* 45: 449-454
40. Sobczak M, Kocik E, Rędowicz MJ (2007) A novel *Amoeba proteus* 120-kDa actin-binding protein with only 1 filamin repeat and a coiled-coil region. *Biochem Cell Biol* 85: 22-31
41. Hammer JA 3rd, Jung G (1991) Molecular cloning of protozoan myosin heavy chain genes. *J Cell Sci (Suppl)* 14: 37-40
42. Cooper JA, Blum JD, Williams RC, Pollard TD (1986) Purification and characterization of actophorin, a new 15,000-dalton actin binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 261: 477-485
43. Maciver SK, Wachsstock DH, Schwarz WH, Pollard TD (1991) The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J Cell Biol* 115: 1621-1628
44. Lambooy PK, Korn ED (1986) Purification and characterization of actobindin, a new actin monomer-binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 261: 17150-17155
45. Lambooy PK, Korn ED (1988) Inhibition of an early stage of actin polymerization by actobindin. *J Biol Chem* 263: 12836-12843
46. Maruta H, Korn ED (1977) Purification from *Acanthamoeba castellanii* of proteins that induce gelation and syneresis of F-actin. *J Biol Chem* 252: 399-402
47. Pollard TD (1981) Purification of a calcium-sensitive actin gelation protein from *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 256: 7666-7670
48. Pollard TD (1984) Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from *Acanthamoeba* that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins. *J Cell Biol* 99: 1970-80
49. Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD (1994) Purification of a cortical complex containing 2 unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity-chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127: 107-115
50. Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385: 265-269
51. Borths EL, Welch MD (2002) Turning on the Arp2/3 complex at atomic resolution. *Structure (Camb)* 10: 131-135
52. Machesky LM (1997) Cell motility: complex dynamics at the leading edge. *Curr Biol* 7: R164-167
53. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576
54. Sonobe S, Takahashi S, Hatano S, Kuroda K (1986) Phosphorylation of amoeba G-actin and its effect on actin phosphorylation. *J Biol Chem* 261: 14837-14843
55. Gawlitta W, Stockem W, Wehland J, Weber K (1980) Organization and spatial arrangement of fluorescein-labelled native actin microinjected into normal locomoting and experimentally influenced *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res* 206: 181-191
56. Stockem W, Naib-Majani W, Wohlfarth-Bottermann KE, Osborn M, Weber K (1983) Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIX. Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in *Amoeba proteus*. *Eur J Cell Biol* 29: 171-178
57. Yanai M, Kenyon CM, Butler JP, Macklem PT, Kelly SM (1998) Intracellular pressure is a motive force for cell motion in *Amoeba proteus*. *Cell Motil Cytoskeleton* 33: 22-29
58. Hellewell SB, Taylor DL (1979) The contractile basis of amoeboid movement VI. The solution-contraction coupling hypothesis. *J Cell Biol* 83: 633-648
59. Gollnick F, Meyer R, Stockem W (1991) Visualization and measurement of calcium transients in *Amoeba proteus* by fura-2 fluorescence. *Eur J Cell Biol* 55: 262-271
60. Kłopocka W, Rędowicz MJ (2003) Effect of Rho family GTP-binding proteins on *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 220: 163-172
61. Kłopocka W, Moraczewska J, Rędowicz MJ (2005) Characterisation of the Rac/PAK pathway in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 225: 77-84

62. Brzeska H, Young R, Knaus U, Korn ED (1999) Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 394-399
63. Mullins RD, Pollard TD (1999) Rho family GTPases require the Arp2/3 complex to stimulate actin polymerization in *Acanthamoeba* extracts. *Curr Biol* 9: 405-415
64. Blanchoin L, Robinson RC, Choe S, Pollard TD (2000) Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J Mol Biol* 295: 203-211
65. Quirk S, Maciver SK, Ampe C, Doberstein SK, Kaiser DA, VanDamme J, Vandekerckhove JS, Pollard TD (1993) Primary structure of and studies on *Acanthamoeba* actophorin. *Biochemistry* 32: 8525-8533
66. Reichstein E, Korn ED (1979) *Acanthamoeba* profilin. A protein of low molecular weight from *Acanthamoeba castellanii* that inhibits actin nucleation. *J Biol Chem* 254: 6174-6179
67. Pollard TD, Rimm DL (1991) Analysis of cDNA clones for *Acanthamoeba* profilin-I and profilin-II shows end to end homology with vertebrate profilins and a small family of profilin genes. *Cell Motil Cytoskel* 20: 169-177
68. Bubb MR, Baines IC, Korn ED (1998) Localization of actobindin, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil Cytoskel* 39: 134-146
69. Hertzog M, Yarmola EG, Didry D, Bubb MR, Carlier MF (2002) Control of actin dynamics by proteins made of beta-thymosin repeats: the actobindin family. *J Biol Chem* 277: 14786-14792
70. Rędowicz MJ (2001) Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 163-173
71. Rędowicz MJ (1999) Rho-associated kinase: involvement in the cytoskeleton regulation. *Arch Biochem Biophys* 364: 122-124
72. Rędowicz MJ, Korn ED (2000) Detection of Rho-family proteins in *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool* 39: 75-79
73. Kłopocka W, Rędowicz MJ (2004) Rho/Rho-dependent kinase affects locomotion and actin-myosin II activity of *Amoeba proteus*. *Protoplasm* 224: 113-121
74. Collins JH, Korn ED (1980) Actin activation of Ca²⁺-sensitive Mg²⁺-ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains. *J Biol Chem* 255: 8011-8014
75. Ganguly C, Baines IC, Korn ED, Sellers J (1992) Regulation of the actin-activated ATPase and in vitro motility activities of monomeric and filamentous *Acanthamoeba* myosin II. *J Biol Chem* 267: 20900-20904
76. Grębecki A (1981) Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications. *Europ J Cell Biol* 24: 163-75
77. Grębecki A (1982) Supramolecular aspects of amoeboid movement. *Acta Protozool* 21: 117-130
78. Grębecki A (1994) Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae. *Int Rev Cytol* 148: 37-80
79. Taylor DL, Fechtmeier M (1982) Cytoplasmic structure and contractility: the solution — contraction coupling hypothesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299: 185-97

Regulation of cortical cytoskeleton dynamics during migration of free-living amoebae

Wanda Kłopocka¹, Maria Jolanta Rędowicz¹, Anna Wasik²

Department of Biochemistry¹ and Department of Cell Biology², Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

e-mail: w.klopocka@nencki.gov.pl

Key words: cortical cytoskeleton, cell migration, amoebae, amoeboid movement, actin

ABSTRACT

Amoeba proteus and smaller by an order of magnitude (and evolutionary younger) *Acanthamoeba castellanii* have been for many years model cells for studies of amoeboid (crawling) type of movement, characteristic also for some of metazoan cells such as fibroblasts, granulocytes and macrophages. Amoeboid migration is indispensable of organization and dynamics of actin-based cytoskeleton. While there is a number of data on molecular mechanisms of motility of *A. castellanii*, there is very little known about bases of migration of *A. proteus*. Noteworthy, a large *A. proteus* (length ~ 600 μm) have been from over a century an object for studies on biology and physiology of cellular migration. This review describes the current knowledge on molecular aspects of force generation required for migration of these two amoebae and attempts to compare the functioning and regulation of actin cytoskeleton in these free-living unicellular species.

Dorota Nowak✉

Agnieszka Popow-Woźniak

Linda Raźnikiewicz

Maria Malicka-Błaszkiwicz

Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

✉Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel.: (071) 375 62 89; e-mail: dorotan@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 31 marca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 28 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: miofibroblast, α aktyna z mięśni gładkich, transformujący czynnik wzrostu β_1 , tymozyna β_4

Wykaz skrótów: α SMA – aktyna z mięśni gładkich; TGF- β_1 – transformujący czynnik wzrostu β_1 ; T β_4 – tymozyna β_4 ; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa; TCE TGF- β_1 – element kontrolny dla TGF- β_1 ; THR TGF- β_1 – region nadwrażliwości na TGF- β_1 ; TEF-1 – czynnik zwiększający transkrypcję 1; KC (ang. *keratinocyte chemokine*) – chemokina keratynocytów; MIP-2 – białka reakcji zapalnej makrofagów-2; FAK – kinaza ognisk kontaktowych

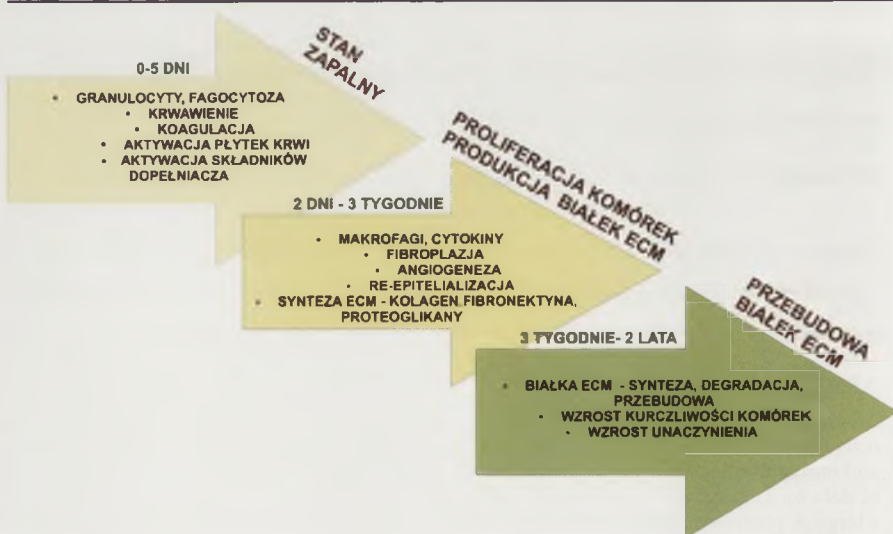
STRESZCZENIE

Gojenie ran jest ważnym procesem biologicznym, którego mechanizmy molekularne są intensywnie badane. Punktem kluczowym w procesie zablizniania jest przejście strukturalne fibroblastów w miofibroblasty, gdyż to kurczliwość miofibroblastów umożliwia późniejsze obkurczenie gojącej się rany, powodujące zbliżanie do siebie jej brzegów. Wyznacznikiem w pełni zróżnicowanych miofibroblastów jest pojawienie się jednej z sześciu izoform aktyny – α -aktyny z mięśni gładkich. Synteza tej izoformy jest ściśle regulowana przez aktywność wielu czynników wzrostowych (takich jak TGF- β_1), wyspecjalizowanych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym fibronektyny, czy też specyficznego mikrośrodowiska. Tymozyna β_4 (T β_4) należy do grupy białek oddziałujących z aktyną, jest odpowiedzialna za utrzymywanie puli aktyny monomerycznej, a ponadto wykazuje zdolność depolimeryzacji mikrofilamentów aktynowych. T β_4 może pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego, jest związana z tkankowymi procesami naprawczymi, m.in. przyspiesza angiogenezę, stymuluje migrację komórek endotelialnych oraz moduluje aktywność komórek układu immunologicznego. Peptyd ten zasługuje na większą uwagę w badaniach procesu gojenia ran.

WPROWADZENIE

Gojenie ran jest ważnym procesem biologicznym, ukształtowanym w trakcie rozwoju filogenetycznego. Dziś częściowo poznano już mechanizmy molekularne leżące u podstaw tego procesu, co stwarza możliwość monitorowania jego przebiegu. W trakcie zablizniania można wyróżnić trzy główne fazy: zapalenia, proliferacji oraz przebudowy tkanek [1-3]. Jest to podział umowny, ponieważ fazy zachodzą na siebie w czasie (Ryc. 1). Zainteresowanych szczegółowymi informacjami dotyczącymi procesu zablizniania odsyłamy do prac przeglądowych i literatury w nich zebranej [1-5].

Migracja komórek jest jednym z ważnych elementów zablizniania. I tak, już w pierwszym etapie zaktywowane komórki układu immunologicznego, takie jak neutrofile czy makrofagi poruszają się w kierunku uszkodzenia, aby usunąć resztki zniszczonych komórek i unieszkodliwić obecne w ranie mikroorganizmy, zapobiegając w ten sposób ewentualnemu zakażeniu. Migrują też keratynocyty i fibroblasty, uzupełniając ubytki tkanek. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych uzależnione jest z kolei od ruchu komórek śródbłonna. W ciągu kilku godzin od zaistnienia urazu, rozpoczyna się proces epitelializacji, obejmujący migrację przylegających do rany naskórkowych



Rycina 1. Stadia gojenia rany (przygotowano na podstawie [1-5]).

keratynocytów do wewnątrz uszkodzenia, podziały keratynocytów służące uzupełnieniu nabłonkowej warstwy skóry, różnicowanie nabłonka w nabłonek wielowarstwowy oraz przywrócenie nienaruszalności granicy błony podstawnej łączącej naskórek ze skórą właściwą. Wspomniane keratynocyty przechodzą przez szereg zmian, takich jak: spłaszczenie i wydłużenie, wytworzenie lamellipodiów, utrata kontaktów międzykomórkowych i z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) [1-5].

Z kolei procesy mające na celu przywrócenie właściwej struktury skóry obejmują etapy fibroplazji i angiogenezy. Na pierwszy z nich składają się podziały fibroblastów, ich migracja do obszaru fibrynowego skrzepu pokrywającego ranę oraz produkcja kolagenu i innych białek ECM, co przyczynia się do wytworzenia nowego zrębu, często nazywanego ziarniną, którą stanowi nowo powstała tkanka łączna zawierająca bogatą sieć naczyń włosowatych. Fibryna budująca skrzep jest stopniowo zastępowana przez włókna kolagenowe produkowane przez fibroblasty, dzięki czemu tkanka ziarninowa jest w większym stopniu odporna na rozciąganie. Zatem wczesną formą odpowiedzi fibroblastów na zranienie i na różnorodne sygnały docierające ze środowiska są ich intensywne podziały na obrzeżach rany oraz migracja po wytworzonej w obszarze rany prowizorycznej macierzy zewnątrzkomórkowej po to, by zastąpić ją macierzą zewnątrzkomórkową zbudowaną z kolagenów, kwasu hialuronowego, proteoglikanów i elastyny, konieczną dla podtrzymania napływu i wzrostu komórek. Ułatwia to m.in. nasuwanie się komórek nabłonka na powierzchnię gojącej się rany [1-6]. Drugim etapem wpływającym na przywrócenie prawidłowej organizacji skóry jest angiogeneza (neowaskularyzacja), czyli proces formowania się nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących, bez którego nie byłoby możliwe utrzymanie tkanki ziarninowej. Jest to proces złożony, wieloetapowy, zachodzący właściwie we wszystkich stadiach gojenia, dla przykładu – cytoplazmatyczne pseudopodia komórek endotelialnych są widoczne już w drugim dniu po zranieniu [1-6].

Zjawisko migracji komórkowej jest kluczowe dla procesu zabliźniania, a nierozdzielnie z tym związana reorganizacja cytoszkieletu aktynowego stanowi jego podstawę. Gęsta sieć filamentów aktynowych wraz z miozynom dostarcza siły motorycznej niezbędnej do zmiany położenia komórek, zaś proces polimeryzacji aktyny umożliwia zmiany kształtu komórek oraz tworzenie wypustek migracyjnych. W świetle powyższych faktów wydaje się zatem oczywistym wniosek, że aktyna oraz białka z nią oddziałujące pełnią kluczową funkcję w regulacji i przebiegu procesu gojenia [7-9].

CYTOSZKIELET AKTYNOWY FIBROBLASTÓW W PROCESIE GOJENIA RANY

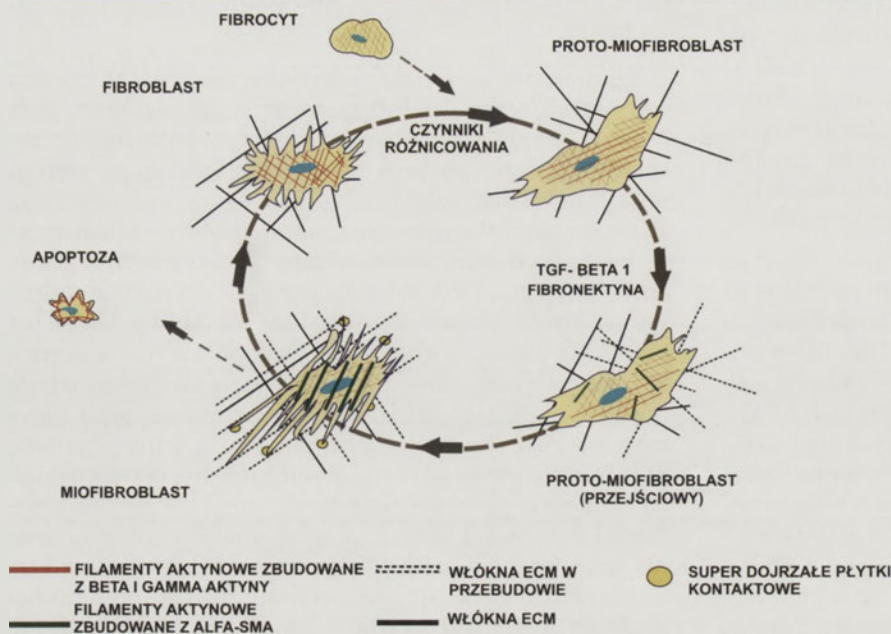
Fibroblasty są komórkami tkanki łącznej właściwej o pochodzeniu mezenchymalnym, stanowiącymi jej najliczniejszą frakcję. Wytwarzają macierz zewnątrzkomórkową złożoną ze sprężystych i siateczkowych włókien kolagenowych oraz z substancji podstawowej tkanki łącznej, w skład której wchodzi: glikozaminoglikany,

białka niekolagenowe (np. fibronektyna) i proteoglikany [5,6].

Fibroblasty w formie zaktywowanej charakteryzują się wrzecionowatym lub gwiazdzystym kształtem oraz tworzą długie i cienkie wypustki cytoplazmatyczne. W ich dużych, często wydłużonych jądrach występuje do kilku jąder, silnie rozwinięte są zarówno szorstka siateczka śródplazmatyczna, jak i aparat Golgiego oraz wakuole wydzielnicze świadczące o aktywnym wydzielaniu kolagenu, a także widoczne są liczne mitochondria. Formy spoczynkowe fibroblastów nie wydzielające już kolagenu, zwane fibrocytami, występujące np. w dojrzałej tkance łącznej, charakteryzują się m.in. zmniejszoną ilością cytoplazmy [5]. Zarówno fibroblasty, jak i fibrocyty mają zdolność do ruchu [5,6,10-12]. Inną populację fibroblastów stanowią tzw. miofibroblasty, pełniące istotną funkcję w procesie gojenia się rany [13-18]. Miofibroblasty to komórki łączące w sobie zarówno cechy komórek mięśniowych, jak i fibroblastów [14]. Umożliwia im to kurczenie się w sposób podobny do komórek mięśni gładkich i produkowanie elementów podstawowych tkanki łącznej, tak jak ma to miejsce w fibroblastach. Kurczliwość miofibroblastów umożliwia późniejsze obkurczenie gojącej się rany i zbliża jej brzegi do siebie, a zatem przejście strukturalne fibroblast-miofibroblast jest punktem kluczowym w procesie zabliźniania [15,17]. Identyfikacja miofibroblastów możliwa jest za pomocą mikroskopii elektronowej (wrzecionowaty kształt, silnie rozwinięty system błon szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, miofilamenty oraz obecność błony podstawnej), a także mikroskopii fluorescencyjnej. Wykorzystanie tej ostatniej w połączeniu ze specyficznymi przeciwciałami pozwala na identyfikację dominującej w miofibroblastach α -aktyny mięśni gładkich (α SMA) obok izoform β oraz γ , charakterystycznych dla fibroblastów [19]. Można wyróżnić niejako trzy główne cechy charakterystyczne miofibroblastów wynikające z funkcji jaką spełniają i pozwalające na wyodrębnienie ich z populacji fibroblastów. Są to skupiska kurczliwych mikrofilamentów, rozległe obszary połączeń komórka-macierz zewnątrzkomórkowa oraz obecność międzykomórkowych połączeń szczelinowych i desmosomów [14-18].

Proces przekształcania się fibroblastów w miofibroblasty składa się zasadniczo z dwóch etapów, przedstawionych schematycznie na Ryc. 2.

W następstwie uszkodzenia - prozapalne sygnały stymulują fibroblasty do rozprzestrzeniania się po prowizorycznej macierzy wytworzonej w obrębie rany. Aktywacja tych komórek prowadzi do przebudowy filamentów aktynowych i włókien naprężeniowych oraz stopniowego wzrostu ogólnej sztywności macierzy zewnątrzkomórkowej wytwarzanej przez fibroblasty – powstają tzw. proto-miofibroblasty. Aby odbudować uszkodzone tkanki, fibroblasty nabywają fenotypu migracyjnego poprzez rozwój *de novo* włókien kurczliwych, przyjmujących formę włókien naprężeniowych zbudowanych początkowo z cytoplazmatycznych izoform aktyny. Zaktywowane proto-miofibroblasty różnią się od pozostałych fibroblastów pozostających w stanie spoczynku obecnością



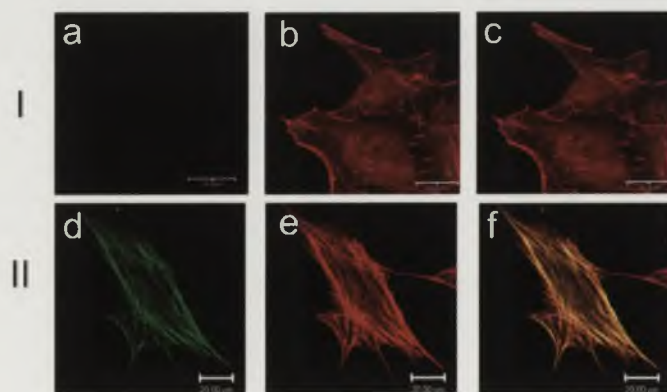
Rycina 2. Rozwój miofibroblastów zachodzący w trakcie gojenia ran i czynniki na niego wpływające (przygotowano na podstawie [16,17,20-22]).

aparatu kurczliwego [17]. Zmiana fenotypu następuje w odpowiedzi na zmiany w składzie, organizacji i zdolnościach mechanicznych macierzy zewnątrzkomórkowej [20], a także jest wynikiem działania cytokin uwalnianych lokalnie przez zaktywowane komórki układu odpornościowego [21]. Drugi etap przebudowy fibroblastów polega na wykształceniu zróżnicowanych miofibroblastów. Wraz ze wzrostem napięcia mechanicznego, związanego z reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej w wyniku działalności proto-miofibroblastów dochodzi do dojrzewania tychże do postaci w pełni zróżnicowanych miofibroblastów, których wyznacznikiem jest pojawienie się izoformy α -aktyny mięśni gładkich (α -SMA) typowej dla mięśni gładkich naczyń krwionośnych (Ryc. 3) [19]. Dodatkowo w komórkach tych pojawiać się może desmina

oraz ciężkie łańcuchy miozyny typowej dla mięśni gładkich [15]. Synteza α -SMA jest ściśle regulowana przez aktywność wielu czynników wzrostowych, takich jak TGF- β 1, wyspecjalizowanych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym fibronektyny, czy też specyficznego mikrośrodowiska [17]. α -SMA nie jest początkowo włączana w strukturę włókien naprężeniowych, lecz organizuje się w cytoplazmatyczne struktury przypominające pałeczki (ang. *rod-like structures*). Dalsze porządkowanie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej stwarza większą przestrzeń do adhezji, co z kolei umożliwia zmiany w obrębie włókien naprężeniowych i powstawanie sił kurczliwych. Gdy obszary adhezyjne miofibroblastów rozrastają się, następuje wbudowanie α -SMA do wnętrza wcześniej wytworzonych włókien naprężeniowych. Siła wytwarzana przez włókna naprężeniowe zawierające α -SMA jest znacznie większa od tej wytwarzanej przez podobne włókna zawierające w swej strukturze

cytoplazmatyczne izoformy aktyny. Włączenie α -SMA do struktury włókien naprężeniowych znacząco zwiększa aktywność i zdolności kurczliwe miofibroblastów, a ponadto jest wskazaniem, iż proces gojenia przechodzi etap obkurczania rany i zasklepiania jej brzegów [17,22,23]. Dowodem na preferencyjną rolę α -SMA w powstawaniu sił kurczliwych przez miofibroblasty są badania z zastosowaniem peptydu fuzyjnego, zawierającego N-końcowy fragment wymienionej izoformy aktyny o sekwencji Ac-EEED [24]. Jest to sekwencja, którą różnią się między sobą poszczególne izoformy aktyny [25,26]. Decyduje ona o wbudowywaniu α -SMA w strukturę włókien naprężeniowych oraz o polimeryzacji tej izoformy aktyny [24]. Poziomą syntezę α aktyny z mięśni gładkich w miofibroblastach zależy od rodzaju podłoża, na którym rosną komórki. W doświadczeniach *in vitro* udowodniono, że poziom syntezы α -SMA wzrasta wraz ze sprężystością podłoża. Doświadczenia *in vivo*, prowadzone na myszach wykazały związek pomiędzy wzrostem napięcia na brzegach rany a zwiększeniem liczby komórek zawierających tę izoformę [17].

W trakcie przemiany fibroblastów w miofibroblasty następują zmiany w obrębie ognisk kontaktowych. Klasyczne ogniska kontaktowe (2–5 μ m) typowe dla fibroblastów wydłużają się, osiągając rozmiary od 6 do 30 μ m. Ponadto, w strukturach tych pojawia się kinaza ognisk kontaktowych (FAK) oraz tensyna, białko odpowiedzialne za połączenie filamentów aktynowych z błoną komórkową. Takie rozbudowane struktury nazywane są „superdojrzałymi” ogniskami kontaktowymi [27] bądź fibronexus [28]. Tworzą się one w momencie wbudowywania α -SMA w strukturę włókien naprężeniowych, powodując wzrost zdolności adhezyjnych miofibroblastów [28]. Aktywność kurczliwa miofibroblastów i synteza α -SMA trwają aż



Rycina 3. Obraz organizacji cytoszkieletu aktynowego fibroblastów (I) i miofibroblastów (II) uzyskany z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Zdjęcia a, d – identyfikacja α -SMA za zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających tę izoformę, sprzężonych z FITC (barwa czerwoną), zdjęcia b, e – architektura mikrofilamentów aktynowych znakowanych falloidyną połączoną z rodaminą (barwa zielona), zdjęcia c, f – nałożenie obrazów odpowiednio a i b oraz d i e (wyniki badań własnych).

do chwili, gdy uszkodzona tkanka zostanie w pełni naprawiona. Wówczas poziom syntezy α -SMA spada, a niepotrzebne już miofibroblasty są usuwane w procesie apoptozy [17]. Zaburzenia w zakresie eliminacji aktywnych miofibroblastów prowadzą do zakłócenia procesów odnowy w organizmie i do schorzeń zwanych fibrozami, charakteryzującymi się przerostem tkanki łącznej. Do takich patologii należą m.in. zwłóknienie płuc, niektóre choroby nowotworowe czy choroby wątroby, takie jak marskość i chroniczne zapalenie [12,13,26,29-31].

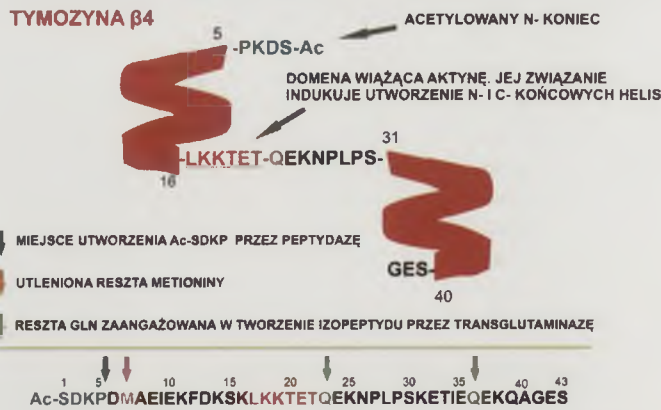
UDZIAŁ TGF- β 1 W PROCESIE ZABLIŹNIANIA

Na funkcjonowanie fibroblastów mają wpływ różnorodne czynniki wzrostowe i czynniki odpowiedzialne za różnicowanie, wydzielane przez dwie główne grupy komórek, mianowicie komórki układu odpornościowego (limfocyty, monocyty/makrofagi, komórki tuczne, eozynofile) oraz komórki nabłonkowe i śródbłonna naczyń. Czynniki te stanowią grupę naturalnie występujących biologicznych mediatorów, wpływających – po połączeniu się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek docelowych – na zachowanie poszczególnych grup komórek poprzez regulację ich podziałów i różnicowania, chemotaksji, metabolizmu czy na syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej [1-5]. Jednym z takich czynników jest transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1), regulujący m.in. syntezę α -SMA w miofibroblastach. Jego głównym źródłem są płytki krwi, komórki śródbłonna, zaktywowane limfocyty NK, limfocyty pomocnicze T oraz komórki tkanki łącznej [32-36]. Komórki produkują TGF- β 1 początkowo w formie latentnej, który następnie podlega procesowi aktywacji poprzez wycięcie peptydu sygnałowego, co w efekcie prowadzi do przejścia TGF- β 1 w formę biologicznie aktywną. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej czynnik ten wiąże się albo z receptorem typu III, który prezentuje TGF- β 1 receptorowi typu II, albo bezpośrednio z receptorem typu II na błonie komórkowej. Związanie się TGF- β 1 z receptorem typu II, powoduje przyłączenie się do tego kompleksu receptora typu I, jego fosforylację i powstanie heterotetramerycznego kompleksu receptorów. W wyniku fosforylacji dochodzi do aktywacji kinazy białkowej, która fosforyluje czynnik transkrypcyjny Smad2 lub Smad3. Następnie Smad2 lub Smad3 wiąże się ze Smad4 i kompleks ten przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórki. Tam kompleks ten oddziałuje z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulując transkrypcję genów zależnych od TGF- β 1, które uczestniczą w odpowiedzi komórkowej na działanie tego czynnika [17]. TGF- β 1 może również aktywować ekspresję genu kodującego α aktynę z mięśni gładkich w sposób niezależny od białek Smad [36]. W tym przypadku niezbędna jest regulacja przez białko Sp1/3, oddziałujące z sekwencjami DNA poprzedzającymi obszar promotora dla α -SMA. Sp1/3 łączy się z sekwencją TCE, określaną jako element kontrolny TGF- β 1, bądź z sekwencją THR, nazywaną regionem nadwrażliwości na TGF- β 1. Innym ważnym regionem DNA uczestniczącym w regulacji ekspresji genu kodującego α -SMA zarówno w miofibroblastach, jak i w komórkach tkanki mięśniowej gładkiej, jest sekwencja promotora MCAT-1, do której wiąże się TEF-1 – czynnik zwiększający transkrypcję 1 [17,36].

Aktywność biologiczna TGF- β 1 jest niezwykle zróżnicowana. Po pierwsze czynnik ten odgrywa znaczącą rolę w procesie wzrostu i różnicowania komórek [33]. TGF- β 1 należy do istotnych czynników regulujących odpowiedź immunologiczną, wykazuje działanie przeciwzapalne. Ponadto hamuje on podziały komórkowe, reguluje wejście komórek na szlak apoptozy oraz odgrywa istotną rolę w procesie angiogenezy [34]. TGF- β 1 jest silnym stymulatorem wzrostu komórek nabłonkowych, przyczyniając się do uzupełniania nabłonkowej warstwy skóry oraz inicjuje produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej przez fibroblasty i ich migrację w obszar uszkodzenia w procesach naprawy i gojenia ran [33]. O tym, jak ważną rolę w procesie gojenia ran odgrywa ten czynnik i to, że jego wpływ jest w dużej mierze uzależniony od czasu, który upłynął od powstania rany do pojawienia się tej cytokiny – może świadczyć fakt, iż zablokowanie aktywności TGF- β 1 na wczesnych etapach gojenia prowadzi do zahamowania tego procesu. Natomiast, gdy to samo postępowanie przeprowadzi się po zakończeniu procesu epitelializacji – zabliźnianie się rany zostanie ograniczone [35]. TGF- β 1 jest również głównym stymulatorem syntezy α -SMA, białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białek budujących aparat kurczliwy komórek, a tym samym warunkuje różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów.

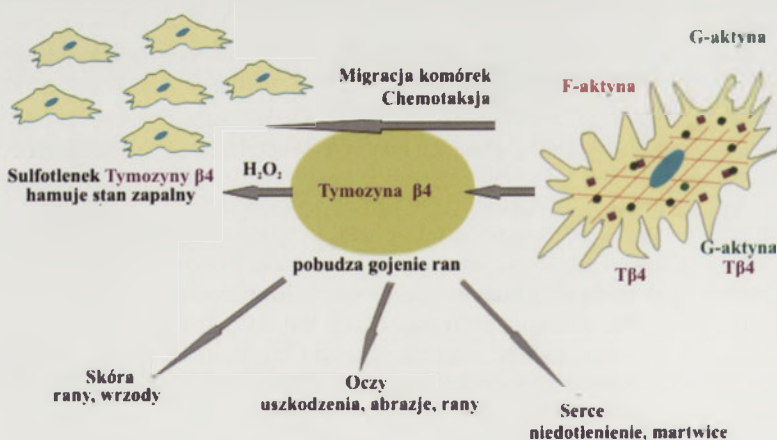
ROLA TYMOZYNY β_4 W REGULACJI POLIMERYZACJI AKTYNY PODCZAS GOJENIA RAN

Organizacja cytoszkieletu aktynowego jest regulowana przez szereg białek wiążących aktynę. Jednym z nich jest tymozyna β_4 ($T\beta_4$) [37]. Należy ona do rodziny β -tymozyn, aktywnych biologicznie polipeptydów o właściwościach podobnych do hormonów, wyizolowanych w 1966 roku z grasicy. U ludzi znani są trzej przedstawiciele tej rodziny: tymozyna β_4 , tymozyna β_{10} i tymozyna β_{15} , przy czym najpowszechniej występuje tymozyna β_4 . Peptyd ten jest obecny w zasadzie we wszystkich tkankach i komórkach krążących w krwiobiegu z wyjątkiem erytrocytów [38]. Tymozyna β_4 jest polipeptydem zbudowanym z 43 reszt aminokwasowych o zachowanej w ewolucji sekwencji, masie cząsteczkowej 4,9 kDa i pI wynoszącym 5.1 [37]. Obecność tymozyny β_4 stwierdzono zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórkowych. Prawdopodobnie dzięki niewielkim rozmiarom tymozyna β_4 może wnikać do jądra przez pory jądrowe na drodze dyfuzji. Wyjaśnienie to wydaje się jednak niewystarczające w aspekcie doniesień o znacznej ilości tego peptydu w jądrze komórkowym w porównaniu do ilości w cytoplazmie. Przypuszcza się, że $T\beta_4$ może pełnić również funkcję czynnika transkrypcyjnego [39]. Tymozyna β_4 jest peptydem odpowiedzialnym za utrzymanie puli aktywny monomerycznej w komórce poprzez tworzenie kompleksów z monomerami w stosunku 1:1, a ponadto wykazuje zdolność depolimeryzacji mikrofilamentów aktynowych [40]. Peptyd ten jest związany z tkankowymi procesami naprawczymi, m.in. przyspiesza angiogenezę i gojenie się ran. Aby $T\beta_4$ mogła pełnić swe funkcje, musi dojść do szeregu modyfikacji jej struktury, co jest uwidocznione i szczegółowo omówione na Ryc. 4 [40]. W następstwie uszkodzenia powierzchni skóry dochodzi do degradacji



Rycina 4. Struktura tymozyzny β_4 . Proteolityczna hydroliza tymozyzny (oznaczona za pomocą niebieskiej strzałki) prowadzi do powstania N-końcowego tetrapeptydu o sekwencji Ac-SDKP. Sekwencja -LKKTET-łańcucha polipeptydowego tymozyzny β stanowi miejsce wiązania G-aktyny. Jednocześnie acetylowany N-końiec tymozyzny β (obejmujący reszty 1-5) kontaktuje się z subdomeną 3 G-aktyny, a N-końcowa helisa β_4 (reszty 5-16) kontaktuje się z subdomeną 1 monomeru aktyny. Reszty znajdujące się pomiędzy N- i C-końcową helisą rozciągają się na obszar subdomeny 2, natomiast C-końcowa helisa (reszty 31-40) kontaktuje się z subdomeną 2, co może być przyczyną hamowania wymiany ADP na ATP w monomerze aktyny, niezbędnej do jej polimeryzacji (przygotowano na podstawie [37,40]).

proteolitycznej tymozyzny poprzez hydrolizę fragmentu N-końcowego o sekwencji AcSDKP. Ponadto fragment $T\beta_4$ o sekwencji -LKKTET-, zlokalizowany pomiędzy 17 a 22 resztą aminokwasową, oddziałuje z aktyną, co blokuje jej polimeryzację i jest skorelowane z uwalnianiem przez płytki krwi czynnika XIIIa kaskady krzepnięcia krwi. Czynniki te stymulują oddziaływanie $T\beta_4$ z różnymi białkami, m.in. z aktyną, kolagenem, fibryną i fibrynogenem, co jest istotne w aspekcie utrzymania właściwej struktury tkanek w miejscu zranienia. $T\beta_4$ zdolna jest ponadto do aktywowania migracji komórek endotelialnych oraz procesu angiogenezy [38,40-42].



Rycina 5. Udział tymozyzny β_4 w procesie gojenia rany. Tymozyna β_4 , która jest związana z tymczasową macierzą budującą skrzep, działa chemotaktycznie w stosunku do komórek śródbłonkowych i keratynocytów. Komórki te zdolne są do natychmiastowej migracji. Na poziomie molekularnym $T\beta_4$ związana z monomerami aktyny zwiększa, poprzez aktywację bądź zahamowanie odpowiednich szlaków, poziom TGF- β_1 , odpowiedzialnego za wykształcenie miofibroblastów i syntezę kolagenu, co prowadzi do wytworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej, po której migrują komórki. Ponadto, pod wpływem H_2O_2 uwalnianego przez zaktwowane w fazie zapalenia makrofagi, dochodzi do utlenienia reszt metioniny w $T\beta_4$ i wytworzenia jej sulfotlenku, który wykazuje działanie przeciwzapalne (przygotowano na podstawie [40-42]).

Badania prowadzone na szczurach, którym wykonano modelowe rany na grzbietach, pokazały iż miejscowe podanie zarówno hydrożelu zawierającego $T\beta_4$, jak i syntetycznego fragmentu tego polipeptydu stanowiącego domenę wiązania monomerów aktyny, prowadzi do zwiększonej produkcji tkanki ziarninowej oraz kolagenu. Stwierdzono również wzmożoną migrację keratynocytów z krawędzi rany, co przyczyniło się do stopniowego obkurczenia i tym samym zmniejszenia jej obszaru [42]. $T\beta_4$ może wpływać na proces gojenia także poprzez modulowanie aktywności komórek układu immunologicznego. Pod wpływem monocytów lub makrofagów i wydzielanego przez nie H_2O_2 , dochodzi do powstania utlenionej formy polipeptydu – sulfotlenku $T\beta_4$, który blokuje chemotaksję neutrofilów, co z kolei przyczynia się do zmniejszenia reakcji zapalnej [41]. $T\beta_4$ zmniejsza ponadto ekspresję genów dwu ważnych chemokin szpikowych: chemokiny keratynocytów KC (ang. *keratinocyte chemokine*) oraz białka reakcji zapalnej makrofagów-2, MIP-2 (ang. *macrophage inflammatory protein 2*), a jej N-końcowy fragment AcSDKP hamuje podziały komórek macierzystych szpiku, co znacząco wpływa na zmniejszenie odpowiedzi układu odpornościowego [41]. Dodatkowo, sekwencja AcSDKP odgrywa rolę w procesie odtwarzania powierzchni skóry po zranieniu, co daje możliwość regulacji rozmiaru wytworzonej blizny. Istnieją również doniesienia o tym, że aktywacja syntezy różnych, zależnych od rodzaju komórek, form $T\beta_4$ (pełnej cząsteczki czy też fragmentu AcSDKP) może być mechanizmem, poprzez który komórki układu odpornościowego kontrolują lokalną reakcję zapalną [41]. Odkryto także, iż $T\beta_4$ zwiększa stężenie metaloproteinaz w obszarze uszkodzenia, co jest niezwykle istotne w aspekcie migracji komórek uczestniczących w procesie gojenia ran skórnych (np. monocytów, komórek nabłonkowych, fibroblastów itd.). Natomiast w przypadku uszkodzenia rogówki występuje zjawisko odwrotne, tzn. zwiększone stężenie $T\beta_4$ jest

powiązane ze zmniejszeniem się stężenia trzech głównych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-9 i MT6-MMP) [41]. Można przypuszczać, że w zależności od rodzaju uszkodzonej tkanki tymozyna β_4 może aktywować lub hamować różne szlaki enzymatyczne. Przypuszcza się, że peptyd ten stymuluje migrację komórek macierzystych skóry, gdyż zaobserwowano, że $T\beta_4$ przyspiesza wzrost włosów poprzez zwiększenie migracji i różnicowania tych właśnie komórek. Istnieje także związek pomiędzy zwiększeniem poziomu mRNA dla tymozyzny β_4 i wzrostem zdolności migracyjnych i regeneracyjnych neuronów oraz komórek mięśnia sercowego uszkodzonych w wyniku niedoboru tlenu, co może świadczyć o istotnej roli tego polipeptydu w ochronie komórek przed zgubnymi efektami hipoksji [41]. Niestety nadal niewiele wiadomo na temat dokładnych mechanizmów molekularnych z udziałem $T\beta_4$ aktywowanych w procesach regeneracji uszkodzeń skóry, natomiast w przypadku uszkodzeń mięśnia sercowego w wyniku niedotlenienia $T\beta_4$ aktywuje szlak ki-

nazy AKT połączonej z integryną oraz tworzy kompleks z białkiem PINCH (ang. *Particularly Interesting New Cys-His protein*) [38,42].

Podsumowując, tymozyna β_4 odgrywa istotną rolę w procesie gojenia ran, a utrzymanie właściwego jej poziomu na poszczególnych etapach zabliźniania może mieć decydujący wpływ na jego ostateczny efekt (Ryc. 5).

PODSUMOWANIE

Prawidłowy przebieg zabliźniania warunkuje funkcjonowanie każdego organizmu. Jest to proces niezwykle złożony, składający się z wielu etapów, którego molekularny mechanizm nie jest do końca poznany. Zaburzenia przebiegu poszczególnych faz gojenia prowadzą do długotrwałego zabliźniania, przerostu blizn oraz zwłóknienia (*fibrosis*) w niektórych narządach, takich jak wątroba czy płuca. Patologiom tym towarzyszy ciągła ekspresja genu α aktyny z mięśni gładkich, związana z przekształcaniem się fibroblastów w miofibroblasty. Wydaje się, że α SMA może służyć jako marker w schorzeniach związanych z procesami zwłóknienia, na przykład w chorobach wątroby, takich jak marskość, chroniczne zapalenie, czy też niektórych chorobach nowotworowych. Badania ostatnich lat koncentrują się na poszukiwaniu nowych narzędzi terapeutycznych używanych w leczeniu ran i przyspieszaniu procesu zabliźniania. Uwaga badaczy skupia się na możliwości zastosowaniu czynników wzrostowych i cytokin oraz tymozyny β_4 , które regulują proces gojenia ran na wielu etapach.

PIŚMIENNICTWO

1. Linares HA (1996) From wound to scar. *Burns* 22: 339-352
2. Strodbeck F (2001) Physiology of wound healing. *New Inf Nurs Rev* 1: 43-52
3. Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25: 9-18
4. Brakebusch C (2005) Keratinocyte migration in wound healing. W: Wedlich D (red) *Cell migration in development and disease*. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 275-298
5. Enoch S, Price P (2004) Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acutewounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds* (czasopismo elektroniczne)
6. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker M (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453: 314-321
7. Ananthkrishnan R, Ehrlicher A (2007) The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 3: 303-317
8. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465
9. Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D (1999) Control of actin dynamics in cell motility. *J Biol Chem* 274: 33827-33830
10. Werner S, Krieg T, Smola H (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127: 998-1008
11. Gabbiani G (1994) Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract* 190: 851-853
12. Theoret CL (2005) The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin North Am Equine Pract* 21: 1-13
13. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G (2003) Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 83: 1689-1707
14. Serini G, Gabbiani G (1999) Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250: 273-283
15. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) Tissue repair, contraction and the myofibroblast. *Wound Rep Regen* 13: 7-12
16. Moulin V, Auger FA, Garrel D, Germain L (2000) Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns* 26: 3-12
17. Hinz B (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127: 526-537
18. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-363
19. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G (1986) A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 141: 227-240
20. Hinz B, Gabbiani G (2003) Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 90: 993-1002
21. Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-840
22. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001) α Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12: 2730-2741
23. Hinz B, Gabbiani G (2003) Mechanisms of force generation and transmission by miofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 14: 538-546
24. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C (2002) The NH2-terminal peptide of α -smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 157: 657-663
25. Vandekerckhove J, Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the aminoacids sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126: 783-802
26. Nowak D, Malicka-Blaszkiewicz M (1999) Actin isoforms - functional differentiation, the changes in cell pathology. *Postepy Biochem* 45: 261-269
27. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G (2001) focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 114: 3285-3296
28. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C (2003) α Smooth muscle actin is crucial for focal contact adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 14: 2508-2519
29. Chaponnier C, Gabbiani G (2004) Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 204: 386-395
30. Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Weiler A (2004) α -smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 585-591
31. Mason RJ, Schwarz MI, Hunninghake GW, Musson RA (1999) Pharmacological Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Past, Present, and Future. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1771- 1777
32. Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870
33. Clark D A, Coker R (1998) Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol* 30: 293-298
34. Stalińska L, Ferenc T (2005) Rola TGF- β w regulacji cyklu komórkowego. *Postepy Hig Med Dosw* 59: 441-449
35. Kryger ZB, Sisco M, Roy NK, Lu L, Rosenberg D, Mustoe T-A (2007) Temporal Expression of the transforming growth factor-beta pathway in the rabbit ear model of wound healing and scarring. *J Am Coll Surg* 205: 78-88
36. Moustakas A, Heldin CH (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118: 3573-3584
37. Huff T, Müller CSG, Otto AM, Netzker R, Hannappel E (2001) β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 205-220

38. Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK (2005) Thymosin β_4 : actin sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol Med* 11: 421-429
39. Rando OJ (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* 10: 92-97
40. Carlier MF (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin β_4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5034-5038
41. Huff T, Otto AM, Müller CSG, Meier M, Hannappel E (2002) Thymosin β_4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *FASEB J* 16: 691-69
42. Philp D, Goldstein AL, Kleinman HK (2004) Thymosin β_4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *Mech Ageing Dev* 125: 113-115

Actin in the wound healing process

Dorota Nowak[✉], Agnieszka Popow-Woźniak, Linda Raźnikiewicz,
Maria Malicka-Błaszczewicz

Department of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: dorotan@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: myofibroblast, α smooth muscle actin, Transforming Growth Factor β_1 , thymosin β_4

ABSTRACT

Wound healing is an important biological process of crucial value for organisms survival and retention of its proper functions. The recognition of molecular mechanisms of these phenomenon is still under investigation. The transition of mesenchymal fibroblasts to myofibroblasts is a key point in wound healing. The contraction ability of myofibroblast enables the shrinkage of a wound and closes its edges. Alpha smooth muscle actin (α -SMA), one of six actin isoforms, is a marker of completely differentiated myofibroblast. The regulation of differentiation process depends on many growth factors (especially TGF β_1), the level of active thymosin β_4 , extracellular matrix proteins – including fibronectin, and also on specificity of microenvironment. Thymosin β_4 is responsible for maintenance of pool of monomeric actin and actin filaments depolymerization. It can also act as a transcription factor, migration stimulator and immunomodulator, so this protein deserves for more attention in wound healing research field.

Udział reaktywnych form tlenu i reduktazy tioredoksyny w regulacji migracji komórek

STRESZCZENIE

Reaktywne formy tlenu (RFT) przez wiele lat uważane były za czynnik uszkodzający komórki i zaburzający wiele procesów. Jednak w ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele dowodów na to, że RFT w stężeniu fizjologicznym odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i regulują takie procesy, jak proliferacja, różnicowanie, apoptoza oraz migracja. Liczne badania wskazują, że jednym z mechanizmów, poprzez który czynniki wzrostowe i cytokiny indukują migrację komórek, jest kontrolowane wytwarzanie RFT w sposób zależny, między innymi, od oksydazy NADPH. RFT, utleniając wiele kluczowych dla przesyłania sygnałów białek, takich jak np. kinaza białkowa C, kinazy MAP, PI3K, fosfatazy tyrozynowe, fosfataza PTEN, zmieniają ich aktywność, co w znaczący sposób wpływa na reorganizację cytoszkieletu aktynowego, adhezję komórek i migrację. W artykule omówiono udział wybranych ścieżek sygnałowych zależnych od RFT, zaangażowanych w regulację aktywności ruchowej komórek zwierzęcych zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych. Opisano również układ tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny, odpowiedzialny za redukcję utlenionych przez RFT białek i przedstawiono wyniki badań dotyczące roli reduktazy tioredoksyny w regulacji migracji komórek.

WPROWADZENIE

Aktywność ruchowa komórek zwierzęcych towarzyszy wielu procesom zachodzącym w żywych organizmach. Wyróżnić wśród nich można embriogenezę [1], regenerację i gojenie się ran [2], reakcje obronne układu immunologicznego [3] oraz procesy związane z tworzeniem przerzutów przez komórki nowotworowe [4]. Ruch komórek w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe czynniki, takie jak cytokiny, chemokiny lub czynniki wzrostowe regulowany jest przez wiele białek i cząsteczek sygnałowych. Jednym z głównych mechanizmów regulacji aktywności białek związanych z migracją komórek są reakcje fosforylacji i defosforylacji, katalizowane przez takie enzymy, jak: MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*), PKC (ang. *protein kinase C*), FAK (ang. *focal adhesion kinase*), ROCK (ang. *rho-associated coiled-coil-forming kinase*), PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) i wiele innych [5-8]. Jednak, na co wskazuje wiele ostatnich badań, modyfikacja działania szlaków przekazywania sygnału w komórkach poprzez regulację aktywności niektórych białek enzymatycznych, może być również efektem ich odwracalnego utleniania przez reaktywne formy tlenu (RFT). Wpływ RFT na funkcjonowanie szlaków przekazywania sygnału w komórce zachodzi głównie poprzez zahamowanie aktywności fosfataz, między innymi fosfataz serynowo/treoninowych, tyrozynowych i fosfolipidowych, takich jak PP (ang. *protein phosphatases*), PTP (ang. *tyrosine phosphatase*) i PTEN. Utlenienie reszt cysteiny w centrum aktywnym tych fosfataz prowadzi do ich inaktywacji i – w konsekwencji – wpływa na regulację wielu kaskad sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, przede wszystkim zależnych od kinaz MAP, PI3K i PKC [9-11]. RFT mogą również bezpośrednio wpływać na aktywność wielu kinaz białkowych [9] (Ryc. 1 i 2).

Większość RFT powstaje w komórkach w toku ich fizjologicznego metabolizmu, głównie w mitochondriach wskutek „ucieczki” elektronów z łańcucha oddechowego. RFT charakteryzują się wysoką reaktywnością, dlatego też reakcje redoks zachodzą w komórkach z bardzo dużą szybkością. Szybkość i łatwość dyfuzji RFT oraz ich zdolność do niespecyficznego reagowania z wieloma składnikami komórki może prowadzić do zaburzeń funkcjonowania wielu procesów w niej zachodzących, co – w konsekwencji – może być przyczyną rozwoju licznych chorób, między innymi miażdżycy, cukrzycy, choroby Alzheimera, choroby Parkinsona oraz chorób nowotworowych [12,13]. Jednak jak wcześniej wspomniano, działanie RFT w komórkach nie ogranicza się jedynie do wywołania szkodliwych efektów. Istnieje wiele dowodów na to, że RFT w stężeniu fizjologicznym odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek

Jolanta Sroka[✉]

Zbigniew Madeja

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

[✉]Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel. (012) 664 61 43, e-mail: jolanta.sroka@uj.edu.pl

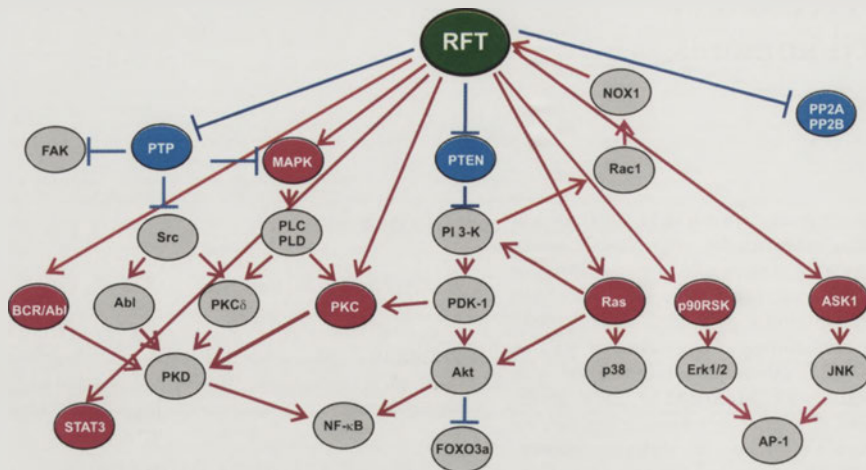
Artykuł otrzymano 30 marca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: migracja komórek, reaktywne formy tlenu, reduktaza tioredoksyny, kinaza białkowa C

Wykaz skrótów: FAK (ang. *focal adhesion kinase*) – kinaza kontaktów zogniskowanych; MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*) – kinazy aktywowane mitogenami; MMP (ang. *metalloproteinase*) – metaloproteinaza; PKC (ang. *Protein Kinase C*) – białkowa kinaza C; PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) – fosfatydyloinozytolo-3-kinaza; PIP₃ (ang. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; PMA (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*); PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*); RFT – reaktywne formy tlenu; Trx (ang. *thioredoxin*) – tioredoksyna; TrxR (ang. *thioredoxin reductase*) – reduktaza tioredoksyny

Podziękowania: Autorzy dziękują pani mgr Jadwidze Goldzie za opracowanie graficzne rycin. Praca powstała w ramach realizacji projektów badawczych N305 336434 i N301 050236 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego



Rycina 1. Drogi sygnałowej wewnątrzkomórkowej regulowane przez RFT. Wpływ RFT na poziom fosforylacji białek zachodzi głównie poprzez zahamowanie aktywności fosfataz serynowo/treoninowych PP, tyrozynowych PTP i fosfolipidowych PTEN, co wpływa na regulację wielu kaskad sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, przede wszystkim zależnych od kinaz MAPK, PI3K i PKC, prowadząc, między innymi, do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak STAT-3, NF-κB i AP-1. Czerwony kolor wskazuje na bezpośrednią aktywację poszczególnych białek pod wpływem RFT, natomiast niebieski – na zahamowanie ich aktywności. Opracowano na podstawie [9].

i regulują takie procesy, jak profileracja, różnicowanie, apoptoza oraz migracja [13-14].

ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W REGULACJI MIGRACJI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

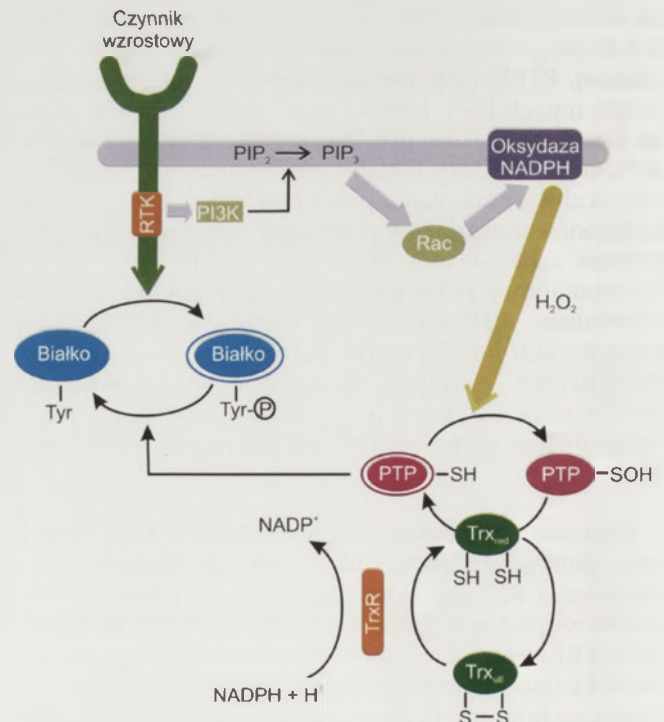
Dane literaturowe wskazują, że RFT zaangażowane są w regulację migracji wielu typów komórek zwierzęcych zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych (Tab. 1). RFT wytwarzane między innymi pod wpływem działania cytokin i czynników wzrostowych, takich jak PDGF, EGF, VEGF, TNF-α, interleukina-1 odgrywają istotną rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, adhezji komórek do podłoża, kontaktów międzykomórkowych, zmian morfologii i migracji komórek. Regulacja aktywności ruchowej komórek przez RFT może odbywać się poprzez wpływ na aktywność wielu białek, takich jak MAPK, FAK, Src, PKC, PI3K, PTEN, Rho-GTPazy, jednak mechanizm tej regulacji nie jest w pełni wyjaśniony [9,10].

OKSYDAZA NADPH

Możliwość działania wspomnianych czynników wzrostu i cytokin na migrację komórek za pośrednictwem RFT wymaga ich kontrolowanego wytwarzania. Jednym z ważniejszych enzymów zaangażowanych w wytwarzanie RFT w komórkach jest oksydaza NADPH, katalizująca powstawanie anionorodnika nadadtlenkowego w wyniku transferu elektronów z NADPH na tlen cząsteczkowy. Najlepiej scharakteryzowana jest oksydaza NADPH występująca w komórkach fagocytycznych, takich jak makrofagi, monocyty i neutrofile, odpowiedzialna za „wybuch tlenowy”, mający znaczenie w procesach obronnych organizmu. Oksydaza NADPH jest transbłonowym kompleksem podjednostek p22^{phox} i gp91^{phox}, tworzących cytochrom b558. Pozostałe podjednostki tego enzymu p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} oraz Rac1 (w monocytach i makrofagach) lub Rac2 (w neutrofilach) występują w cytoplazmie. Pod wpływem stymulacji

podjednostki p47^{phox}, p67^{phox} i p40^{phox} przemieszczają się do błony, gdzie łączą się z cytochromem b558. Ostatnim etapem aktywacji oksydazy NADPH jest przyłączenie się do utworzonego kompleksu zaktywowanego białka Rac, które bezpośrednio aktywuje oksydazę NADPH do wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego [31]. W ostatnich latach wykazano, że oksydaza NADPH występuje nie tylko w komórkach fagocytycznych. W komórkach niefagocytycznych istnieje 5 izoform oksydazy NADPH, różniących się między sobą podjednostką gp91^{phox}. Izoformy te kodowane są przez różne geny i określane są mianem Nox 1-5 (od NADPH oxidase), przy czym Nox 2 odpowiada gp91^{phox} [32]. Specyficzna lokalizacja poszczególnych izoform tego enzymu w obrębie komórki lub tkanki umożliwia lokalne wytwarzanie RFT i precyzyjną regulację zależnych od RFT dróg wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. W przeciwieństwie do „wybuchu tlenowego” podczas fagocytozy, produkcja anionorodnika nadadtlenkowego w komórkach niefagocytycznych jest niewielka i większość RFT pojawia się we wnętrzu komórki [31].

O istotnym znaczeniu udziału oksydazy NADPH w regulacji migracji komórek wydaje się również świadczyć fakt, że jest ona aktywowana przez białka Rac [33]. Biał-



Rycina 2. Regulacja jednej z wybranych ścieżek sygnałowych przez RFT. Stymulacja komórek czynnikiem wzrostowym indukuje aktywację PI3K i powstanie PIP₃, który aktywując białko Rac wpływa na wytwarzanie H₂O₂ za pośrednictwem oksydazy NADPH. H₂O₂ inaktywuje fosfatazę tyrozynową PTP, co prowadzi do wzrostu poziomu fosforylacji i aktywacji wielu białek. Kolejnym etapem tej kaskady sygnalizacyjnej jest redukcja utlenionej PTP przy udziale tioredoksyny (Trx). Utloniona tioredoksyna jest redukowana w reakcji katalizowanej przez reduktazę tioredoksyny (TrxR). Opracowano na podstawie [41].

ka Rac to małe białka G należące do rodziny białek Rho, które pełnią kluczową rolę w regulacji migracji komórek. Białka Rho, a wśród nich białka Rac, Cdc42 i Rho są GTPazami, biorącymi udział, między innymi, w przebudowie cytoszkieletu aktywnego, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia lamellipodium, filopodiów, włókien naprężeniowych oraz kontaktów zogniskowanych [8,34-36]. Białka te, podobnie jak heterotrimeryczne białka G, zmieniają cyklicznie formę aktywną związaną z GTP na nieaktywną związaną z GDP i odwrotnie. Przejście ze stanu nieaktywnego w stan aktywny wymaga udziału szeregu białek regulatorowych. Należą do nich: białka GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factors*), umożliwiające wymianę GDP na GTP, białka GDI (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*), tworzące kompleks z małymi białkami G, uniemożliwiający wymianę GDP na GTP oraz białka GAP (ang. *GTPase activating proteins*), aktywujące hydrolizę GTP do GDP. W komórkach niestymulowanych małe białka G występują w cytoplazmie w formie nieaktywnej, będącej wynikiem przyłączenia się GDI do ich izoprenylowanego C-końca, co uniemożliwia im zwiążanie się z fosfolipidami błon komórkowych lub błon wewnątrzkomórkowych. Oddysocjowanie białka GDI wskutek jego fosforylacji lub oddziaływań z białkami ERM (ang. *e_zrin/radixin/moesin*) prowadzi do zakotwiczenia GTPaz w błonie, a oddziaływanie z GEF indukuje wymianę GDP na GTP i – w konsekwen-

cji – ich aktywację. Inaktywacja małych białek G następuje natomiast przy udziale białek GAP, które zwiększają ich GTPazową aktywność, skutkiem czego jest hydroliza GTP do GDP [37,38].

FOSFATAZY I KINAZY

Migracja komórek jest procesem, który wymaga ścisłej przestrzennej i czasowej koordynacji wytwarzania wielu cząsteczek sygnałowych [39]. Przykładowo, białka Rac i Cdc42 oraz fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP₃, ang. *phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate*), będący produktem PI3K preferencyjnie lokalizują się w błonie krawędzi wiodącej migrującej komórki, natomiast fosfataza PTEN, która defosforyluje PIP₃, występuje w jej tylnej części [40,41]. Dzięki takiej lokalizacji PI3K i PTEN możliwe jest utrzymywanie gradientu PIP₃, co zapewnia polaryzację kształtu komórki i jej efektywną migrację. Wydaje się, że w wytworzeniu i utrzymaniu takiego gradientu dużą rolę odgrywają również RFT. PIP₃ powstający w wyniku aktywacji PI3K jest, między innymi, aktywatorem białek Rac, które są odpowiedzialne za wytwarzanie lamellipodium w poruszającej się komórce [42]. Inną funkcją białek Rac jest aktywacja oksydazy NADPH, prowadząca do lokalnego powstawania H₂O₂, który hamuje aktywność PTEN [43]. Ponieważ, jak już wspomniano, białka Rac lokalizują się wybiórczo w obrębie krawędzi wiodącej

Tabela 1. Czynniki stymulujące migrację komórek za pośrednictwem RFT

Typ komórki	Czynnik stymulujący	Efekty	Referencje
komórki endotelialne aorty (MAEC)	wytworzenie rany	RFT w komórkach w obrębie rany ↑, wbudowywanie monomerów aktyny do filamentów ↑, migracja ↑	[15]
komórki endotelialne aorty (AoSMC)	nitrotyrozyna	RFT ↑, receptora PDGF-B ↑, MMP-2 ↑, integryny αV i β3 ↑, ERK1/2 ↑, migracja ↑	[16]
komórki mięśniówki gładkiej ściany naczyniowej (VSMC)	bFGF	oksydazy NADPH ↑, RFT ↑, JNK ↑, fosforylacja paksyliny, MMP ↑, migracja ↑	[17]
VSMC	H ₂ O ₂ PDGF	RFT ↑, PTP ↓, chemotaksja ↑	[18]
VSMC	MCP-1	RFT ↑, ERK1/2 ↑, chemotaksja ↑	[19]
VSMC	IGF-1	Rac1 ↑, oksydaza NADPH ↑, RFT ↑, MMP-2 ↑, migracja ↑	[20]
keratynocyty HaCaT	wytworzenie rany	RFT ↑, KGFR ↑, fosforylacja c-Src, fosforylacja FRS2, migracja ↑	[21]
pępowinowe komórki endotelialne pHVEC	konstytutywnie aktywna forma Rac (Tat-RacV12)	RFT ↑, kontakty międzykomórkowe ↓, włókna naprężeniowe ↑, fosforylacja kompleksu VE-kadheryna-katenina, migracja ↑	[22]
monocyty	anionorodnik ponadtlenny	RFT ↑, RhoA ↑, Rac1 ↑, Cdc42 ↑, PKC ζ ↑, migracja ↑	[23]
makrofagi J774	anionorodnik ponadtlenny	RFT ↑, RhoA ↑, Rac1 ↑, Cdc42 ↑, PKC ζ ↑, migracja ↑	[23]
leukocyty	VCAM-1	oksydaza NADPH ↑, RFT ↑, MMP-2 ↑, MMP-9 ↑, migracja ↑	[24]
rak płaskokomórkowy SASH1	anionorodnik ponadtlenny	RFT ↑, wytwarzanie lamellipodiów, F-aktyna ↑, RhoA ↑, Rac1 ↑, Cdc42 ↑, PKC ζ ↑, migracja ↑	[23]
czerniak	kwas hialuronowy	oksydaza NADPH ↑, RFT ↑, PKC ↑, Rac1 ↑, FAK, MMP-2 ↑, migracja ↑	[25]
kostniakomięsak OST i MNNG	TNFα	RFT ↑, adhezja do lamininy ↑, MMP-9 ↑, NFκB ↑, migracja ↑	[26]
gruczolakorak HT29-D4	kwas arachidonowy	oksydaza NADPH ↑, RFT ↑, PKC δ ↑, migracja ↑	[27]
włókniamięsak HT-1080	PMA	RFT ↑, MMP-2 ↑, MMP-9 ↑, NFκB ↑, migracja ↑	[28]
wątrobiak HepG2	PMA	RFT ↑, EMT, PKC α ↑, fosforylacja ERK ↑, migracja ↑	[29]
embrionalne komórki nerki HEK-293	PMA difenylcyyna	PKC δ ↑, migracja ↑	[30]

komórki, to właśnie w tym rejonie komórki będzie miała miejsce inaktywacja fosfatazy PTEN. W konsekwencji, w przedniej części komórki PIP₃ nie będzie ulegał defosforylacji. Ponieważ aktywna forma PTEN jest przede wszystkim obecna w tylnej części komórki umożliwia to utrzymywanie wzdłuż osi komórki gradientu PIP₃ koniecznego do jej polaryzacji i kierunkowej migracji w odpowiedzi na czynnik stymulujący [39,40].

Istnieje wiele doniesień, że RFT regulują również aktywność kinaz MAP (JNK, p38 i ERK), biorących udział w regulacji nie tylko procesów proliferacji, różnicowania i śmierci, ale również migracji komórek [5,44]. Dane literaturowe wskazują, że aktywacja MAPK przez RFT stymuluje ruch keratynocytów, fibroblastów, komórek mięśni gładkich, neutrofilii i wielu innych [5]. Nie do końca znana jest odpowiedź na pytanie w jaki sposób MAPK regulują migrację komórek, wiadomo jednak, że fosforylują one między innymi paksylinę, kinazę kontaktów zogniskowanych (FAK), białka towarzyszące mikrotubulom – MAP, kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) oraz kalpainę, wpływając w ten sposób na dynamikę kontaktów zogniskowanych, na organizację aktywny i mikrotubul, czyli tych składników komórki, które bezpośrednio zaangażowane są w adhezję komórek, rozplaszczanie, tworzenie wypustek i retrakcję tylnej części poruszającej się komórki. Jedną z charakterystycznych cech modulowania migracji komórek przez kinazy MAP jest ciągła aktywacja sygnału, jak się wydaje konieczna do utrzymania odpowiedniego poziomu ekspresji genów związanych z potranslacyjną modyfikacją białek cytoszkieletarnych i adhezyjnych [5,44]. Wciąż nie wiadomo, jaka jest droga aktywacji kinaz MAP przez RFT. Jedną z możliwości jest bezpośrednia aktywacja tych kinaz przez RFT [45]. Inną z sugerowanych dróg sygnałowych jest szlak prowadzący przez PKC, której aktywacja może być również regulowana przez RFT [6,46]. Stwierdzono, między innymi, że PKC aktywuje ERK, która jest zaangażowana w regulację migracji fibroblastów [47] oraz wątrobiaka (ang. *hepatoma*) HepG2 [29].

PKC, podobnie jak kinazy MAP, należy do kinaz serynowo-treoninowych. Zidentyfikowano przynajmniej 11 izoform PKC i sklasyfikowano je ze względu na sposób ich aktywacji. Izofornie klasyczne aktywowane są przez diacyloglicerol i Ca²⁺, nowe również przez diacyloglicerol, ale bez udziału Ca²⁺, natomiast nietypowe są niezależne od diacyloglicerolu i Ca²⁺. Aktywność PKC jest regulowana przez 2 odrębne mechanizmy: fosforylację reszt tyrozyny, która reguluje centrum aktywne enzymu i jej wewnątrzkomórkową lokalizację oraz przez wtórne przekaźniki, umożliwiające związanie PKC z błoną i jej aktywację przez usunięcie pseudosubstratu z centrum aktywnego enzymu [6,48]. Specyficzna budowa cząsteczki PKC sprawia, że jest ona również podatna na działanie zarówno związków utleniających, jak i redukujących. Zarówno domena regulatorowa, jak i katalityczna zawierają wiele miejsc bogatych w cysteinę, które mogą być regulowane przez mechanizmy redoks [46,49]. Wykazano, że utlenienie PKC może prowadzić do jej aktywacji, natomiast redukcja hamuje aktywność tego enzymu. Nie wiadomo, czy możliwa jest aktywacja tą drogą wszystkich izoform PKC. Dowiedziono jednak, że izofornie α , β 1, δ ,

ϵ i ζ mogą być w ten sposób regulowane przynajmniej w niektórych typach komórek [30,48,50,51].

Wpływ PKC na morfologię i aktywność ruchową zależy od typu komórek. Z reguły jednak w wyniku aktywacji PKC następuje stymulacja migracji komórek. Reakcją taką zaobserwowano, między innymi, w przypadku fibroblastów [52], embrionalnych komórek ludzkiej nerki HEK-293 [30] oraz komórek włókniakomięsaka HT1080 [53]. Istnieje jednak grupa komórek, a wśród nich neutrofile [54] i komórki szczurzego mięsaka Walkera WC256 [55], które pod wpływem działania estru forbolu PMA, powszechnie znanego aktywatora PKC, traciły polaryzację kształtu, a ich migracja ulegała zahamowaniu.

Badania bezpośredniego zaangażowania RFT w regulację zależnej od PKC migracji przeprowadzono między innymi na komórkach wątrobiaka HepG2 [29], raka płaskokomórkowego SASH1, makrofagach J774.1, monocytach [23] i embrionalnych komórkach ludzkiej nerki HEK293 [30]. Badania Kuribayashi i współaut. [23] wykazały, że anionorodnik ponadtlenkowy znacząco stymuluje ich migrację, a obserwacja że ruch komórek SASH1 z nadprodukcją Cu-Zn SOD oraz komórek J774.1 i monocytów traktowanych NAC (powszechnie znanym przeciwutleniaczem) ulega całkowitemu zahamowaniu, potwierdziły znaczącą rolę RFT w regulacji migracji komórek w tych układach eksperymentalnych. Autorzy wykazali, że RFT indukują ruchliwość komórek poprzez regulację aktywności małych białek G z rodziny Rho. Stwierdzono także powiązanie dróg sygnałowych zależnych od białek Rho i PKC. Anionorodnik ponadtlenkowy aktywuje w tych komórkach tylko jedną izoformę PKC, a mianowicie PKC ζ , która następnie fosforyluje RhoGDI-1, co umożliwia oddysocjowanie białek Rho od tego kompleksu i ich aktywację [23]. RFT odgrywają również istotną rolę w zależnej od PKC migracji komórek wątrobiaka HepG2. Stymulowana PMA i zależna od RFT aktywacja PKC α i fosforylacja ERK w tych komórkach wpływa na obniżenie syntezy integrzyn i E-kadheryn, a w konsekwencji – indukcję przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT) oraz wzrost ich ruchliwości [29]. Z kolei Sroka i współaut. [30] wykazali wpływ reduktazy tioredoksyny, jednego z enzymów zaangażowanych w regulację stanu redoks komórki, na zależną od PKC δ migrację embrionalnych komórek ludzkiej nerki HEK-293.

ADHEZJA – INTEGRYNY I KADHERYNY

RFT pełnią również istotną funkcję w regulacji dróg sygnałowych aktywowanych przez integryny podczas adhezji komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej [56]. W komórkach endotelialnych stwierdzono istnienie ścisłej zależności pomiędzy aktywacją integrzyn a kaskadami przekazywania sygnału zależnymi od MAPK, PI3K i NF- κ B, które również regulowane są przez RFT. Badania te dowodzą, że komórki hodowane w zawiesinie w obecności PDGF mają znacznie niższy poziom wewnątrzkomórkowych RFT niż komórki przyłączone do podłoża, co sugeruje, że wytwarzanie RFT w komórkach stymulowanych czynnikami wzrostowymi jest procesem zależnym od białek adhezyjnych i ich oddziaływania z podłożem [44,57]. Dane literaturowe z ostatnich lat pod-

kreślają udział białek Rac1 w migracji poprzez ich wpływ na kontakty komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa. Wykazano, że RFT wytwarzane w fibroblastach na drodze zależnej od Rac są niezbędne do inaktywacji fosfatazy tyrozynowej LMM-PTP (ang. *low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase*) oraz aktywacji FAK, indukującej tworzenie się kontaktów zogniskowanych w komórkach, rozplaszczanie komórek i ich migrację [58]. Z kolei Nimnual i współaut. [59] stwierdzili, że wytwarzanie RFT przy udziale oksydazy NADPH wskutek aktywacji białek Rac powoduje spadek aktywności białek Rho, czego efektem było wytworzenie lamelipodium i indukcja rozplaszczania się komórek HeLa na podłożu. RFT w tym układzie hamowało aktywność LMW-PTP, a następnie powodowało wzrost fosforylacji tyrozyny i aktywację białka p190Rho-GAP, aktywującego hydrolizę GTP do GDP w białkach Rho i – w konsekwencji – ich inaktywację.

Istnieją również doniesienia, że RFT pośredniczą w koniecznej do efektywnej migracji, zależnej od białek Rac1, utracie połączeń pomiędzy komórkami endotelialnymi. Białkiem pośredniczącym tutaj w adhezji międzykomórkowej jest VE-kadheryna. Jej cytoplazmatyczna domena przylacza się do β -kateniny, związanej z aktywną za pośrednictwem α -kateniny [60]. Zerwanie kontaktów międzykomórkowych jest następstwem fosforylacji kompleksu VE-kadheryna/ β -katenina przez Src. Transfekcja komórek endotelialnych pHUVEC konstytutywnie aktywną formą białka Rac (tat-RacV12) indukowała wytwarzanie RFT, które, aktywując kinazę Src, wpływały na wzrost poziomu fosforylacji kompleksu-VE-kadheryna-katenina, której następstwem było zerwanie połączeń międzykomórkowych [22]. Wykazano także, że w miejscach kontaktów komórka-komórka lokalizują się fosfatazy PTP, między innymi PTP1B i VE-PTP, utrzymując w ten sposób niski poziom fosforylacji kompleksu VE-kadheryna/ β -katenina i stabilizując kontakty międzykomórkowe [61,62]. Dlatego też lokalne wytwarzanie RFT w miejscach kontaktów może powodować utlenienie i inaktywację fosfataz i fosforylację białek wspomnianego kompleksu.

METALOPROTEINAZY

Kolejną regulowaną przez RFT drogą przekazywania sygnału, mogącą wpływać na migrację komórek, jest aktywacja metaloproteinaz lub inaktywacja ich tkankowych inhibitorów. Jednym z obserwowanych efektów wzrostu aktywności metaloproteinaz, które posiadają zdolność trawienia większości białek macierzy zewnątrzkomórkowej jest stymulacja migracji komórek [63]. Aktywacja tych enzymów przez RFT prawdopodobnie zachodzi na drodze utleniania reszt tiolowych w ich domenach katalitycznych [64]. RFT mogą również modulować ekspresję genów tych białek albo poprzez zmianę aktywności białek Ras, albo poprzez bezpośrednią aktywację kinaz z rodziny MAP, między innymi ERK1/2 i p38 lub inaktywację fosfataz, regulujących aktywność tych kinaz [9]. Dowiedziono także, że aktywność inhibitorów metaloproteinaz, np. inhibitora aktywatora plazminogenu, może być hamowana poprzez utlenienie metioniny w jego centrum aktywnym.

ROLA REDUKTAZY TIOREDOKSYNY W REGULACJI MIGRACJI KOMÓREK

Modyfikacja aktywności białek w wyniku utleniania wymaga również istnienia mechanizmu wpływającego na powrót regulowanych białek do stanu wyjściowego poprzez redukcję utlenionych reszt aminokwasowych. Jednym z postulowanych układów enzymatycznych odpowiedzialnych za ten proces jest system tioredoksyne, na który składają się tioredoksyna (Trx) i reduktaza tioredoksyne (TrxR) [65] (Ryc. 2). Układ tioredoksyne (Trx/TrxR), oprócz ochrony przed stresem oksydacyjnym, jest zaangażowany również w szereg funkcji związanych z przesyłaniem sygnału w komórce, poprzez regulację aktywności czynników transkrypcyjnych (między innymi p53, NF- κ B, AP-1) oraz wielu enzymów, w tym fosfataz PTP1B, PP2B i PTEN oraz kinaz ASK-1 i PKC [66,67].

Tioredoksyny (Trx) stanowią grupę polipeptydów o masie cząsteczkowej 12 kDa. W komórkach ssaków wyróżnia się kilka rodzajów Trx: cytoplazmatyczną Trx1, mitochondrialną Trx2, jądrową NRX (nukleoredoksyna), dwie formy występujące w siateczce śródplazmatycznej Erdj5 oraz TMX, będącą tioredoksyną transbłonową, a także SpTrx1 i SpTrx2, zlokalizowane w plemnikach. Specyficznymi substratami dla Trx są między innymi reduktaza rybonukleotydowa, reduktaza sulfotlentku metioniny, izomeraza disiarczkowa białek (PDI) oraz, wspomniane wyżej, czynniki transkrypcyjne. Trx jest również specyficznym donorem elektronów dla peroksyredoksyn [66,67]. Pod wpływem stresu oksydacyjnego i w stanach zapalnych Trx1 i jej skrócona forma Trx-80 są również wydzielane na zewnątrz komórki, gdzie przejawiają właściwości immunomodulacyjne. Zewnątrzkomórkowa Trx1 wywołuje efekty podobne do działania autokrynych czynników wzrostowych i cytokin, indukując gromadzenie się i proliferację limfocytów oraz wzrost komórek nowotworowych, a także reguluje procesy syntezy cytokin, takich jak TNF, IL-1, IL-2, IL-6 i IL-8. Ponadto, jest czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów, neutrofilów i limfocytów T [66].

Reduktazy tioredoksyne (TrxR) są homodimerycznymi oksydoreduktazami o masie cząsteczkowej 54-58 kDa, zależnymi od NADPH i zawierającymi w centrum aktywnym selenocysteinę. W komórkach ssaków wyróżnia się 3 rodzaje TrxR: cytoplazmatyczną TrxR1, mitochondrialną TrxR2 i narządową specyficzną TGR, występującą w jądrach i posiadającą zdolność redukcji nie tylko tioredoksyne, ale również utlenionego glutationu. Dotychczasowe badania wskazują, że TrxR jest jedynym enzymem mogącym redukować utlenioną Trx, jednak Trx nie jest jedynym białkiem, które redukowane jest przez ten enzym. Poza Trx substratami dla TrxR są między innymi nadtlenki kwasów tłuszczowych, witamina K, witamina C, anionorodnik ponadtlenkowy, seleniny, selenocysteina, peroksydaza glutationowa, ubiquinon, p53 oraz PKC [66].

Jak wcześniej wspomniano, TrxR oprócz ochrony przed stresem oksydacyjnym pełni w komórce wiele znaczących funkcji. Do najważniejszych z nich należy niewątpliwie regulacja proliferacji komórek oraz hamowanie apoptozy na drodze regulacji procesów utleniania i redukcji wielu białek.

Wykazano, między innymi, zahamowanie proliferacji mysich komórek Neuro2A wykazujących nadekspresję TrxR2 [68] oraz embrionalnych komórek ludzkiej nerki HEK-293 z nadekspresją *TrxR1* lub *TrxR2* [69]. Niewiele jednak wiadomo o udziale TrxR w regulacji migracji komórek. Ponieważ RFT są zaangażowane w regulację migracji komórek można przypuszczać, że TrxR może odgrywać rolę również i w tym procesie. Dodatkowym argumentem przemawiającym za taką możliwością jest fakt, że TrxR może mieć wpływ na aktywność PKC [45], jednego z kluczowych regulatorów ruchliwości komórek.

Badania roli cytoplazmatycznej *TrxR1* w regulacji aktywności ruchowej komórek prowadzono na liniach komórek HEK-293 o trwałej nadprodukcji tego enzymu [30]. Wcześniejsze badania wykazały, że w komórkach tych aktywność *TrxR1* jest około 5-krotnie wyższa niż w komórkach kontrolnych [70]. W przeprowadzonych przez Srokę i in. [30] doświadczeniach stwierdzono, że wpływ PMA i difenylocyny, aktywatorów PKC, na morfologię i migrację badanych komórek zależy od stopnia ekspresji *TrxR1*. PMA indukowało powstawanie komórek spolaryzowanych, wytwarzających aktywne lammelipodia. Zmiany te harmonizowały z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz wzrostem aktywności ruchowej komórek, były jednak znacznie wyraźniejsze w komórkach kontrolnych niż w komórkach z nadekspresją *TrxR1*. Różnice te były jeszcze lepiej widoczne w przypadku komórek inkubowanych w obecności difenylocyny. Reakcja komórek na poziomie zmian morfologicznych, reorganizacji cytoszkieletu aktynowego i aktywności migracyjnej widoczna była jedynie w komórkach kontrolnych, a całkowicie zahamowana w komórkach z nadekspresją *TrxR1*. Stwierdzono również, że obserwowane różnice w reakcji komórek z nadekspresją *TrxR1* są związane z wpływem tego enzymu na aktywność PKC. W komórkach kontrolnych stymulacja migracji w wyniku działania difenylocyny związana była z aktywacją PKC δ . Zahamowanie aktywności PKC δ rotleryną, specyficznym inhibitorem tej izoformy lub wyciszenie genu kodującego PKC δ poprzez transfekcję komórek kontrolnych siRNA-PKC δ , znosiło efekty morfologiczne wywołane difenylocyną. W komórkach z trwałą nadekspresją *TrxR1*, w których nie obserwowano stymulacji migracji w wyniku działania difenylocyny nie obserwowano również aktywacji PKC δ . Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały, że *TrxR1* może być zaangażowana w regulację migracji komórek [30]. Hipoteza, że *TrxR1* jest zaangażowana w regulację aktywności PKC δ znalazła pełne potwierdzenie w badaniach łączących zjawisko komunikacji międzykomórkowej przez złącza szczelinowe z aktywnością reduktazy tioredoksyny [71]. Autorzy tej pracy wykazali, że difenylocyna i PMA hamują komunikację międzykomórkową w komórkach HEK-293 na drodze zależnej od PKC δ stymulacji fosforylacji koneksyny Cx43, natomiast w komórkach z nadekspresją *TrxR1* takiego efektu nie obserwowano, co może być związane z hamującym wpływem *TrxR1* na aktywację PKC δ . Wydaje się, że efekt ten związany jest z sugerowaną możliwością regulacji aktywności PKC na drodze redoks, jednak nie można wykluczyć, że hamujący wpływ *TrxR1* na PKC zachodzi na drodze pośredniej poprzez zmiany aktywności fosfataz i

kinaz, zaangażowanych w regulację aktywności tego enzymu [72].

PODSUMOWANIE

Coraz więcej dowodów wskazuje, że RFT oprócz szkodliwego działania na komórki odgrywają ważną rolę w prawidłowym ich funkcjonowaniu poprzez regulację takich procesów jak proliferacja, różnicowanie, apoptoza oraz migracja. RFT wpływają na aktywność czynników transkrypcyjnych i wielu enzymów, przede wszystkim kinaz i fosfataz. Dotychczasowe badania wyraźnie wskazują, że RFT mogą pełnić istotną funkcję w przesyłaniu sygnału w komórce. Mechanizm działania RFT w regulacji migracji komórek nie został jeszcze wystarczająco poznany. Liczne badania wskazują jednak, że RFT odgrywają istotną rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, adhezji komórek do podłoża, kontaktów międzykomórkowych, zmian morfologii i migracji komórek. Regulacja aktywności ruchowej komórek przez RFT może odbywać się poprzez wpływ na aktywność wielu białek, takich jak: MAPK, FAK, PKC, PI3K, PTEN i GTPazy Rho. Niewiele wiadomo również na temat specyficznych mechanizmów odpowiedzialnych za powrót regulowanych białek do stanu wyjściowego poprzez redukcję utlenionych reszt aminokwasowych. Dokładniejsze poznanie tych mechanizmów pozwoli na lepsze zrozumienie złożonych procesów związanych z regulacją migracji komórek.


PIŚMIENNICTWO

1. Locascio A, Nieto MA (2001) Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* 11: 464-469
2. Raja, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR (2007) Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 12: 2849-2868
3. Imhof BA, Dunon D (1997) Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm Metab Res* 29: 614-621
4. Yang J, Weinberg RA (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14: 818-829
5. Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628
6. Larsson C (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18: 276-284
7. Cain RJ, Ridley AJ (2009) Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 101: 13-29
8. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709
9. Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10: 1881-1896
10. Wu WS (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 25: 695-705
11. Genestra M (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19: 1807-1819
12. Karihtala P, Soini Y (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115: 81-103
13. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
14. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028

15. Moldovan L, Moldovan NI, Sohn RH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ (2000) Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res* 86: 549-557
16. Mu H, Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C (2008) Nitrotyrosine promotes human aortic smooth muscle cell migration through oxidative stress and ERK1/2 activation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1576-1584
17. Schröder K, Helmcke I, Palfi K, Krause KH, Busse R, Brandes RP (2007) Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1736-1743
18. Kappert K, Sparwel J, Sandin A, Seiler A, Siebolts U, Leppänen O, Rosenkranz S, Ostman A (2006) Antioxidants relieve phosphatase inhibition and reduce PDGF signaling in cultured VSMCs and in restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2644-2651
19. Lo IC, Shih JM, Jiang MJ (2005) Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemotactic protein-1-stimulated smooth muscle cell migration. *J Biomed Sci* 12: 377-388
20. Meng D, Lv DD, Fang J (2008) Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 80: 299-308
21. Li M, Firth JD, Putrins EE (2009) An *in vitro* analysis of mechanical wounding-induced ligand-independent KGFR activation. *J Dermatol Sci* 53: 182-191
22. van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, Klooster JP, Collard JG, Hordijk PL (2002) Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci* 115: 1837-1846
23. Kuribayashi K, Nakamura K, Tanaka M, Sato T, Kato J, Sasaki K, Takimoto R, Kogawa K, Terui T, Takayama T, Onuma T, Matsunaga T, Niitsu Y (2007) Essential role of protein kinase C zeta in transducing a motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide, fMLP. *J Cell Biol* 176: 1049-1060
24. Cook-Mills JM (2006) Hydrogen peroxide activation of endothelial cell-associated MMPs during VCAM-1-dependent leukocyte migration. *Cell Mol Biol* 52: 8-16
25. Kim Y, Lee YS, Choe J, Lee H, Kim YM, Jeong D (2008) CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *J Biol Chem* 283: 22513-22528
26. Harimaya K, Tanaka K, Matsumoto Y, Sato H, Matsuda S, Iwamoto Y (2000) Antioxidants inhibit TNF α -induced motility and invasion of human osteosarcoma cells: possible involvement of NF κ B activation. *Clin Exp Metastasis* 18: 121-129
27. Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H (2008) Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1783: 23-33
28. Lee KJ, Hwang SJ, Choi JH, Jeong HG (2008) Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NF- κ B activation via ROS signal pathway. *Cancer Lett* 268: 233-243
29. Wu WS, Tsai RK, Chang CH, Wang S, Wu JR, Chang YX (2006) Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C α and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. *Mol Cancer Res* 4: 747-758
30. Sroka J, Antosik A, Czyz J, Nalvarte I, Olsson JM, Spyrou G, Madeja Z (2007) Overexpression of thioredoxin reductase 1 inhibits migration of HEK-293 cells. *Biol Cell* 99: 677-687
31. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM (2008) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60: 21-28
32. Ushio-Fukai M (2009) Compartmentalization of Redox Signaling through NADPH Oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 11
33. Hordijk PL (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98: 453-62
34. Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114: 2713-2722
35. Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399
36. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410
37. Fabczak H (2001) Rodzina białek Rho a cytoszkielek. *Kosmos* 50: 283-293
38. Ivetic A, Ridley AJ (2004) Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signaling in leucocytes. *Immunology* 112: 165-176
39. Etienne-Manneville S (2008) Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* 27: 6970-6980
40. Devreotes P, Janetopoulos C (2003) Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* 278: 20445-20448
41. Merlot S, Firtel RA (2003) Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* 116: 3471-3478
42. Innocenti M, Frittoli E, Ponzanelli I, Falck JR, Brachmann SM, Di Fiore PP, Scita G (2003) Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* 160: 17-23
43. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* (53): PE1
44. Wu WS, Wu JR, Hu CT (2008) Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. *Cancer Metastasis Rev* 27: 303-314
45. Galli S, Antico Arciuch VG, Poderoso C, Converso DP, Zhou Q, Bal de Kier Joffe E, Cadenas E, Boczkowski J, Carreras MC, Poderoso JJ (2008) Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PLoS ONE* 3: e2379
46. Gopalakrishna R, Gundimeda U (2001) Protein kinase C as a molecular target for cancer prevention by selenocompounds. *Nutr Cancer* 40: 55-63
47. Nomura N, Nomura M, Takahira M, Sugiyama K (2007) Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C increased migratory activity of subconjunctival fibroblasts via stress-activated protein kinase pathways. *Mol Vis* 13: 2320-2327
48. Barnett ME, Madgwick DK, Takemoto DJ (2007) Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal* 19: 1820-1829
49. Gopalakrishna R, Gundimeda U, Schiffman JE, McNeill TH (2008) A direct redox regulation of protein kinase C isoenzymes mediates oxidant-induced neuritogenesis in PC12 cells. *J Biol Chem* 283: 14430-14444
50. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11233-11237
51. Rimessi A, Rizzuto R, Pinton P (2007) Differential recruitment of PKC isoforms in HeLa cells during redox stress. *Cell Stress Chaperones* 12: 291-298
52. Fridman R, Lacal JC, Reich R, Bonfil D, Ahn CH (1990) Differential effects of phorbol ester on the *in vitro* invasiveness of malignant and non-malignant human fibroblast cells. *J Cell Physiol* 142: 55-60
53. Keller HU, Hunziker IP, Sordat B, Niggli V, Sroka J (2000) Protein kinase C isoforms involved in regulation of cell shape and locomotion of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Int J Cancer* 88: 195-203
54. Keller HU, Zimmermann A, Cottier H (1985) Phorbol myristate acetate (PMA) suppresses polarization and locomotion and alters F-actin content of Walker carcinoma cells. *Int J Cancer* 36: 495-501
55. Wicki A, Niggli V (1999) Role of protein kinase C isoforms in locomotion of Walker 256 carcinoma cells. *Int J Cancer* 81: 255-261
56. Gregg D, de Carvalho DD, Kovacic H (2004) Integrins and coagulation: a role for ROS/redox signaling? *Antioxid Redox Signal* 6: 757-764

57. Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Rauegi G, Symons M, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G (2003) Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol* 161: 933-944
58. Chiarugi P (2008) From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *IUBMB Life* 60: 301-307
59. Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D (2003) Redox-dependent down-regulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* 5: 236-241
60. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9: 910-918
61. Balsamo J, Arregui C, Leung T, Lilien J (1998) The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J Cell Biol* 143: 523-532
62. Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U, Vestweber D (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* 21: 4885-4895
63. Stallings-Mann M, Radisky D (2007) Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells. *Cells Tissues Organs* 185: 104-110
64. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98: 2572-2579
65. Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-13966
66. Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-1312
67. Powis G, Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 421-455
68. Patenaude A, Ven Murthy MR, Mirault ME (2004) Mitochondrial thioredoxin system: effects of TrxR2 overexpression on redox balance, cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem* 279: 27302-27314
69. Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystrom C, Nordman T, Miranda-Vizuete A, Olsson JM, Eriksson L, Björnstedt M, Arner ES, Spyrou G (2004) Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem* 279: 54510-54517
70. Madeja Z, Sroka J, Nyström C, Björkhem-Bergman L, Nordman T, Damdimopoulos A, Nalvarte I, Eriksson LC, Spyrou G, Olsson JM, Björnstedt M (2005) The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 69: 1765-1772
71. Sroka J, Czyz J, Wojewoda M, Madeja Z (2008) The inhibitory effect of diphenyltin on gap junctional intercellular communication in HEK-293 cells is reduced by thioredoxin reductase 1. *Toxicol Lett* 183: 45-51
72. Deszo EL, Brake DK, Cengel KA, Kelley KW, Freund GG (2001) CD45 negatively regulates monocytic cell differentiation by inhibiting phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol* 276: 10212-10217

Reactive oxygen species in regulation of cell migration. The role of thioredoxin reductase

Jolanta Sroka , Zbigniew Madeja

Department of Cell Biology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Cracow, Poland

✉e-mail: jolanta.sroka@uj.edu.pl

Key words: migration, reactive oxygen species, thioredoxin reductase, protein kinase C

ABSTRACT

It is generally accepted that reactive oxygen species (ROS) act as signalling molecules and regulate various physiological processes, including proliferation, differentiation, apoptosis and migration. The initiation and proper functioning of several signalling pathways leading to the effective motility rely on the action of several growth factors and cytokines, which induce generation of ROS, among others by NADPH oxidase. ROS modify the activity of several key enzymes, resulting in the reorganization of actin cytoskeleton, adhesion and stimulation of migration. There is an evidence that ROS can oxidase such critical target molecules as PKC, MAPK, PI3K, tyrosine phosphatases (PTPs) and PTEN. In this review, some ROS-dependent transduction pathways, involved in regulation of cell migration are discussed. Moreover, the thioredoxin/thioredoxin reductase system, which is responsible for reduction of oxidised proteins has been described and some data concerning the effect of thioredoxin reductase on the regulation of PKC-dependent cell motility have been presented.

Rola efryn w regulacji migracji komórek nowotworowych

STRESZCZENIE

Receptory efryn (Eph) należą do największej rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych. Ich ligandami są efryny, białka na stałe związane z powierzchnią komórki. Błonowa lokalizacja obu białek decyduje o konieczności bezpośredniego kontaktu między komórkami w celu aktywacji receptora, a zarazem umożliwia dwukierunkowy przekaz sygnału. Wiele doniesień naukowych z ostatnich lat wskazuje na istotną rolę efryn i ich receptorów w rozwoju choroby nowotworowej. Niniejszy artykuł prezentuje najnowsze informacje na temat budowy i mechanizmu działania kompleksu Eph – efryny oraz roli tych białek w regulacji procesu migracji komórek nowotworowych. Przedstawione wyniki badań opartych na metodach *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* dowodzą zarówno pośredniego, jak i bezpośredniego udziału osi Eph – efryny w wewnątrzkomórkowej sygnalizacji warunkującej przemieszczanie się komórek większości typów nowotworów.

WPROWADZENIE

Aktywne przemieszczanie się komórek nowotworowych jest niezbędne w większości etapów tworzenia przerzutów, począwszy od lokalnej inwazji i przenikania przez błonę podstawną, poprzez migrację w trójwymiarowej przestrzeni macierzy zewnątrzkomórkowej, pokonanie bariery ściany naczyń krwionośnych lub limfatycznych, aż do migracji w obrębie kolonizowanego organu, w którym rozwijają się guzy wtórne [1-4]. Znaczenie aktywnej migracji w procesie tworzenia przerzutów nie budzi obecnie wątpliwości, a wiele badań wskazuje na istnienie związku pomiędzy aktywnością ruchową komórek nowotworowych i ich zdolnością do tworzenia przerzutów [5-7].

Migracja komórek nowotworowych w trakcie tworzenia przerzutów nie jest procesem przypadkowym. Na kierunek migracji oraz aktywność ruchową komórek nowotworowych wpływa wiele czynników zewnętrznych, których źródłem są prawidłowe komórki organizmu oraz same komórki nowotworowe. Do najbardziej znanych typów reakcji kierunkowych komórek zaliczamy: chemotaksję, haptotaksję, elektrotaksję i naprowadzanie przez kontakt. Osobną grupę bodźców decydujących o migracji komórek nowotworowych w czasie tworzenia przerzutów stanowią bezpośrednie oddziaływania komórka – komórka. Czynnikiem działającym w tym przypadku na migrację jest fizyczny kontakt z powierzchnią sąsiednich komórek. Szczegółowe badania tego zjawiska zostały zapoczątkowane w latach pięćdziesiątych XX wieku przez zespół M. Abercrombiego. Abercrombie i Heaysman [8] zaobserwowali, że fibroblasty migrujące po powierzchni naczynia hodowlanego przestają wędrować w obranym kierunku, gdy napotkają komórki tego samego typu, a w miejscu kontaktu następuje zahamowanie aktywności ruchowej lamellipodiów. Zjawisko to określono mianem kontaktowego zahamowania ruchu i uznano za jedno z możliwych wyjaśnień ograniczenia prędkości ruchu komórek w wyniku kolizji z komórkami sąsiednimi [8]. Stwierdzono również, że komórki nowotworowe charakteryzują się często całkowitym brakiem lub ograniczeniem kontaktowego zahamowania migracji i mogą w większym lub mniejszym stopniu poruszać się po powierzchni innych komórek, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych [9,10]. Na podstawie tych obserwacji ukształtował się pogląd, że bezpośrednie kontakty z innymi komórkami ograniczają aktywność ruchową komórek nowotworowych w znacznie mniejszym stopniu, niż ma to miejsce w przypadku komórek prawidłowych. Późniejsze badania wykazały jednak, że w niektórych przypadkach bezpośrednie homo- lub heterotypowe kontakty z innymi komórkami mogą wyraźnie zwiększać aktywność ruchową pewnych typów komórek nowotworowych, jednak podstawy molekularne tego zjawiska nie zostały do końca wyjaśnione [2-4,10-14].

Jednym z możliwych mechanizmów tłumaczących opisane wyżej zjawisko kontaktowej stymulacji migracji jest występowanie na powierzchni komórek no-

Ewa Wybieralska

Eliza Łączna

Zbigniew Madeja

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 61 42, e-mail: z.madeja@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 16 marca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: migracja, stymulacja kontaktowa, efryny, inwazyjność

Wykaz skrótów: ECM (ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa; FAK (ang. *focal adhesion kinase*) – kinaza kontaktów ogniskowanych; GPI (ang. *glycosylphosphatidylinositol*) – glikozylofosfatydyloinozytol; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenami; MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej; SH2, SH3 (ang. *Src homology domain*) – domena homologiczna do Src; siRNA (ang. *small interfering RNA*) – małe, interferujące RNA

Podziękowania: Praca powstała w ramach projektów badawczych N N301 286637 i N N302 061936 finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

wotworowych receptorów odpowiedzialnych za zwiększenie ruchliwości, dla których ligandami są białka znajdujące się na powierzchni innych komórek. Białkami działającymi według tego schematu są receptory Eph i efryny. Receptory Eph stanowią grupę receptorowych kinaz tyrozynowych odkrytą pod koniec lat osiemdziesiątych dwudziestego wieku [15]. Ich nazwa pochodzi od angielskiej nazwy linii komórkowej, z której po raz pierwszy wyizolowano cDNA tego receptora – *Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*. Ligandem receptorów Eph są efryny (ang. *ephrins* – *Eph family receptor interacting proteins*), białka trwale związane z powierzchnią komórek [16]. Błonowa lokalizacja liganda decyduje o konieczności bezpośredniego kontaktu między komórkami w celu aktywacji receptora, a zarazem umożliwia dwukierunkowy przekaz sygnału, polegający na aktywacji nie tylko komórki wykazującej syntezę receptora, lecz również komórki wykazującej ekspresję genu liganda.

Pierwotnie efrynom i ich receptorom przypisywano głównie rolę w procesie naprowadzania aksonów podczas dojrzewania układu nerwowego. Dalsze badania dowiodły jednak udziału tych białek w wielu innych procesach fizjologicznych. Poprzez regulację morfologii, adhezji i migracji komórek zaangażowane są one m.in. w procesy embriogenezy, morfogenezy, angiogenezy oraz procesy uczenia się i zapamiętywania [17,18]. Z uwagi na tak szeroki wachlarz pełnionych przez nie funkcji, zaburzenia w sygnalizacji komórkowej z udziałem efryn mogą również przyczynić się do zaistnienia szeregu zjawisk patologicznych.

Liczne dane dowodzą zaangażowania receptorów Eph w procesy nowotworzenia [18]. Znaczące zmiany w ekspresji genów receptorów Eph i/lub efryn, często powiązane ze stopniem złośliwości, stwierdzono w większości badanych typów nowotworów (Tabela 1). W odróżnieniu od znacznej części receptorowych kinaz tyrozynowych, receptory Eph zazwyczaj nie wpływają na proliferację komórek nowotworowych, jednak ich synteza sprzyja nabywaniu przez komórki nowotworowe zdolności do tworzenia przerzutów. Zaangażowanie receptorów Eph w ten proces może mieć charakter bezpośredni, poprzez wpływ na regulację adhezji i migracji komórek nowotworowych lub pośredni, na drodze stymulacji powstawania nowych naczyń krwionośnych w guzie.

BUDOWA I SYGNALIZACJA

U kręgowców znanych jest obecnie szesnaście receptorów Eph i osiem efryn. Zostały one podzielone ze względu na podobieństwa w budowie na dwie klasy, jednocześnie odzwierciedlające ich zdolność do wzajemnego oddziaływania [16,18].

RECEPTORY EPH

Dziesięć receptorów Eph należy do grupy A (EphA1-10), pozostałe – do grupy B (EphB1-B6) [36]. Receptory należące do obu grup mają podobny plan budowy (Ryc. 1). Są to białka o masie cząsteczkowej ok. 100–125 kDa, posiadające jedną domenę transbłonową. Ich zewnątrzkomórkowa część, obejmująca koniec aminowy, składa się z domeny wiążącej ligand, regionu bogatego w cysteinę (zawierającego motywy

Tabela 1. Zmiany profilu ekspresji genów efryn i Eph oraz ich wpływ na funkcję komórek w różnych nowotworach.

Rodzaj nowotworu	Receptor/ ligand	Badane linie komórkowe	Rezultaty badań	Inne	Referencje
Nowotwór jelita grubego	EphB4	wycinki guzów	ekspresja ↓, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja ↑, migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność N.D.	gen supresorowy dla rozwoju nowotworu jelita grubego.	[19]
	EphB2	wycinki guzów SW-480	ekspresja ↓, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja ↓, migracja ↑, adhezja ↑, inwazyjność N.D.	spadek ekspresji stanowi sygnał przyrząciowy dla komórek nowotworowych w małej gęstości.	[20]
	EphA2 Efryna-A1	HT-29	ekspresja N.D., powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja ↑ (po wyciszeniu – zahamowanie), migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność N.D.	zaburzony wzrost w hodowlach sferoidalnych. Stymulacja rozpuszczalną efryną-A1-Fc powoduje fosforylację EphA2, E-kadheryny i β-kateniny	[21,22]
Czerniak	EphB4 Efryna-B2	wycinki guzów, K-1735 SW-1, M-2, P, C-19, C-23	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja ↑, migracja ↑, adhezja ↑, inwazyjność ↑	nadmierna aktywacja zwiększa migrację (zależną od RhoA) oraz adhezję do fibronektyny i lamininy (przez aktywację efryny-B2)	[23,24]

Nowotwór prostaty	EphA5,A6,A7,A8,A10 DU-145 LNCaP PC-3 PC-3ML	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	[25]
	EphA2,B3,B6	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	[26]
	EphA1,B2	ekspresja ↓, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	
	Efryna-A2	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	
	EphB4	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja N.D., migracja ↑, adhezja N.D., inwazyjność ↑	[26]
	EphA2	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja N.D., migracja ↑, adhezja N.D., inwazyjność ↑	[18,27]

przywrócenie aktywności genów supresorowych p53 i PTEN oraz blokowanie aktywności EGFR i IGF-IR obniża ekspresję EphB4. Obserwowana amplifikacja genu (locus genu 7q22; odcinek 7q) często ulegającego amplifikacji w nowotworach prostaty. Zwiększona synteza podnosi zdolność uwalniania komórek z guza i tworzenia przerzutów.

Nowotwory CNS	EphA2,A3,B2,B4	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność N.D.	[28]
	EphB2	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja ↓, migracja ↓, adhezja N.D., inwazyjność ↑	[29,30]
	Efryna-B3	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja N.D., migracja ↑, adhezja N.D., inwazyjność ↑	[31]

istotna rola osi EphB2/R-Ras w inwazyjności komórek glejaka os efryna-B3/Rac1 pełni istotną rolę w inwazyjności komórek glejaka

Nowotwór piersi	EphA1,A8,B6	ekspresja ↓, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	[25]
	EphA2	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność ↑	
	EphB4	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem TAK, proliferacja – sygnał przyżyciowy, migracja ↑, adhezja N.D., inwazyjność ↑	[32]
	Efryna-A1	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność N.D.	[33]

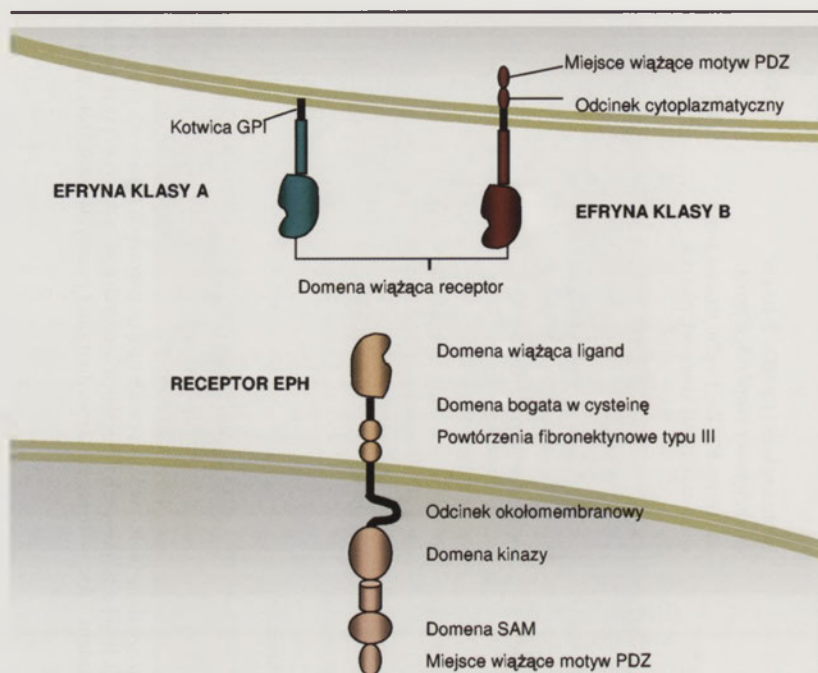
nadprodukcja efryny-A1 (liganda) redukuje inwazyjność komórek. Wzrost unaczynienia guza przez aktywację efryny-B2 na komórkach endotelium

rozwoj unaczynienia przez aktywację efryna-A1 receptora EphA2 na komórkach śródblonka oraz regulację ekspresji genu VEGF

Nowotwór jajnika	EphA1, A2 Efryna-A1 EphB2, B3, B6 Efryna-B1	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja N.D., migracja N.D., adhezja N.D., inwazyjność N.D.	[34]
	EphA2	ekspresja ↑, powiązanie ze złym rokowaniem N.D., proliferacja ↑, migracja ↑, adhezja N.D., inwazyjność N.D.	[35]

eliminacja genu indukuje apoptozę drogą aktywacji kaspazy 9. Czynniki przyżyciowy

↑ – wzrost lub ↓ – spadek intensywności danej funkcji komórki obserwowany w wyniku zmiany profilu ekspresji genu kodującego dane białko w komórkach nowotworowych (pierwsza pozycja w kolumnie „rezultaty badań”); N.D. – brak danych. Zmiany ekspresji przedstawione są w porównaniu do tkanki zdrowej (wycinki), linii komórkowych nienowotworowych o jednakowym pochodzeniu tkankowym lub wywodzących się z łagodnych zmian przednowotworowych (linie komórkowe). Powiązanie ze złym rokowaniem TAK – oznacza skrócenie czasu przeżycia pacjentów wraz ze zwiększonymi zmianami w profilu ekspresji genu badano białka (większym spadkiem lub wzrostem).



Rycina 1. Budowa receptora Eph, efryn A oraz efryn B. Budowa domenowa jest jednakowa w przypadku obu grup receptorów Eph. W oparciu o [38,39].

EGF-podobny) i dwóch powtórzeń fibronektynowych typu III. Oddzielona fragmentem transbłonowym część cytoplazmatyczna białka zawiera domenę okołomembranową, domenę o aktywności kinazy tyrozynowej, oraz domenę SAM i miejsce wiążące motyw PDZ [36,37]. Różnice pomiędzy klasami dotyczą głównie domeny zewnątrzkomórkowej wpływającej na zdolność wiązania liganda.

EFRYNY

Ligandy receptorów Eph występują w formie związanej z błoną komórkową. Efryny są stosunkowo niewielkimi białkami, ich masa cząsteczkowa zawiera się w granicach 22–65 kDa. Efryny-A (A1-A5) zakotwiczone są w błonie poprzez kotwicę glikozylofosfatydylinozytolową (GPI), natomiast efryny-B (B1-B3) to białka transbłonowe, posiadające krótką domenę cytoplazmatyczną (Ryc. 1) [16]. Domena ta nie wykazuje aktywności katalitycznej, ale obecność miejsc fosforylacji i miejsca wiążącego motyw PDZ decyduje o jej zdolności do oddziaływania z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi. Cecha ta umożliwia efrynom B po związaniu z receptorem, funkcjonowanie nie tylko jako ligand, ale również jako receptor przekazujący sygnał do wnętrza komórki. Zdolność do przesyłania sygnału wewnątrzkomórkowego wykazywano również w przypadku efryn należących do klasy A [39].

MECHANIZMY AKTYWACJI I WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

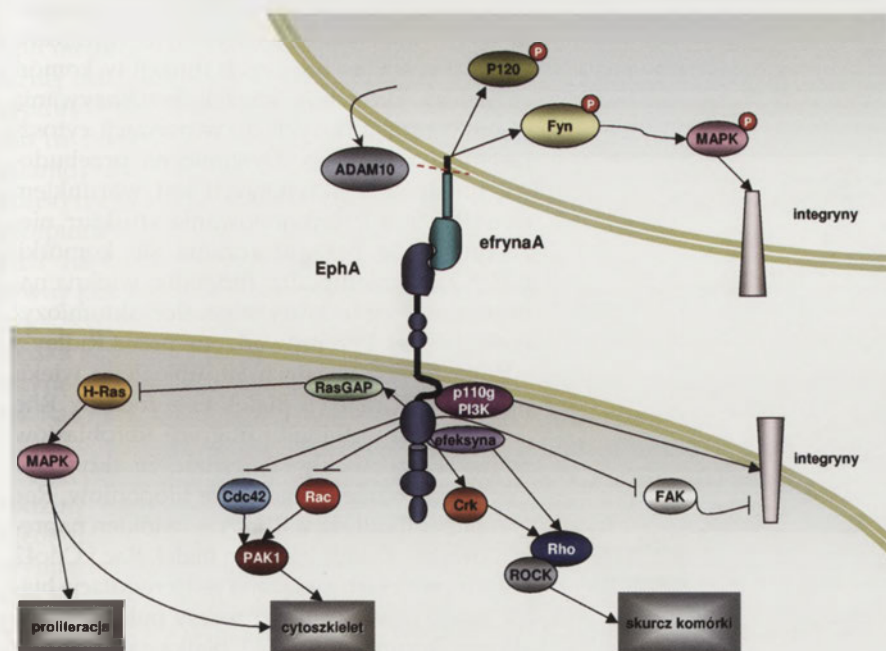
Ze względu na błonową lokalizację receptorów Eph oraz samych efryn, do aktywacji receptora dochodzi jedynie w wyniku bezpośredniego kontaktu komórka–komórka [17,27,37,41–45]. Istotną rolę w funkcjonowaniu efryn odgry-

wa ich multimeryzacja w błonie komórkowej – rozpuszczalne, monomeryczne ligandy wiążą receptor, jednak nie powodują jego fosforylacji i aktywacji [45–47]. Podczas gdy większość receptorowych kinaz tyrozynowych jest aktywowana w wyniku dimeryzacji, aktywacja receptorów Eph wymaga powstania kompleksów o wyższej formie uporządkowania. W zależności od stopnia multimeryzacji efryn, indukcji mogą ulec różne kompleksy sygnałowe receptorów Eph, co skutkuje odmiennymi efektami biologicznymi [18].

Związanie receptora Eph z ligandem i aktywacja obu cząsteczek prowadzi do wspomnianego już dwukierunkowego przekazywania sygnału [18,41,42,44,48–50]. Podobnie jak większość receptorowych kinaz tyrozynowych, po multimeryzacji receptory Eph ulegają krzyżowej fosforylacji, zwykle na dwóch zachowanych w ewolucji resztach tyrozyny w domenie cytoplazmatycznej (np. tyrozyny 596 i 602 receptora EphA4 lub tyrozyny 604 i 610 receptora EphB2) [17,27,46,51–53]. Ponadto, receptory Eph mogą być fosforylowane przez niereceptorowe kinazy tyrozynowe z rodziny Src. W wyniku fosforylacji receptora zerwane zostają wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania pomiędzy domeną okołobłonową a domeną kinazy tyrozynowej. W konsekwencji receptor przyjmuje konformację aktywną enzymatycznie, co umożliwia efektywne przekazywanie sygnału na drodze fosforylacji wewnątrzkomórkowych białek przekazywanych [17].

Drogi przekazywania sygnałów przez receptory Eph i efryny nie zostały dotąd całkowicie poznane, jednak zaproponowano kilka mechanizmów, poprzez które pełnią one swoje funkcje biologiczne. Badania *in vivo* wykazały, że w przypadku receptora EphB2 fosforylacji ulega co najmniej dziesięć reszt tyrozynowych [47]. Sugeruje się, iż reakcja ta może przebiegać również na resztach treoniny i seryny [47,52]. Ufosforylowane reszty służą jako miejsca oddziaływań z białkami sygnalizacyjnymi zawierającymi domeny SH2 i PDZ [17,48,52,54]. Zalicza się do nich: cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe Fyn i Src, białko p120RasGAP, AF6 (białko wiążące Ras), Pick1 (białko oddziałujące z kinazą C), fosfatazę fosfotyrozynową o małej masie cząsteczkowej (LMW-PTP), podjednostkę p85, fosfatydylinozytolo-3-kinazę (PI3K) oraz białka adaptorowe: Nck, Crk, Grb2, Grb4, Grb7, Grb10 i SLAP (ang. *Src-Like Adaptor Protein*) [17,48,53,55]. Wiele z tych białek stanowi składniki ścieżek sygnalizacyjnych wpływających na cytoszkielet aktywny, który bierze aktywny udział w przemieszczaniu się komórki [47]. Podsumowanie oddziaływań receptorów Eph i efryn z białkami wewnątrzkomórkowymi przedstawiają ryciny 2 i 3.

O ile stosunkowo dużo wiadomo o mechanizmach przekazywania sygnału od aktywowanych receptorów Eph, to mechanizmy przekazywania sygnału od aktywowanych związanych receptora efryn są dużo słabiej poznane [46]. Wykazano, że związanie receptora Eph przez efrynę B



Rycina 2. Postulowane drogi przekazywania sygnału od efryny A i receptorów EphA. Strzałki oznaczają aktywację, łączniki zakończone kreską – wpływ hamujący; czerwona linia przerywana – cięcie proteolityczne. W oparciu o [39,40].

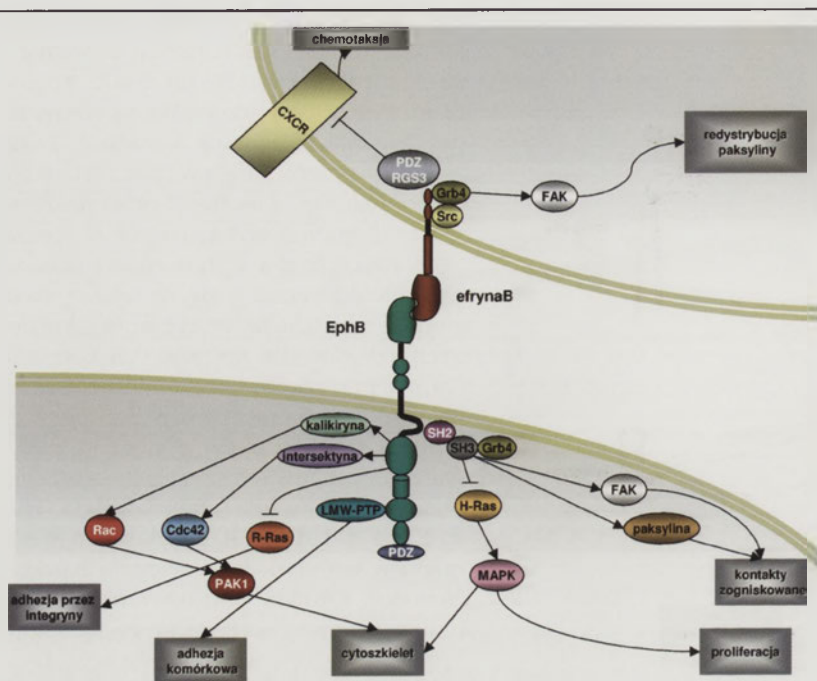
umożliwia fosforylację reszt tyrozyny w cytoplazmatycznej domenie efryny wskutek rekrutacji kinaz Src. W wyniku tego dochodzi do powstania nowych miejsc wiązania dla białek adaptorowych posiadających domeny SH2 i SH3 [23,48]. Koniec karboksylowy efryny-B zawiera także miejsca wiążące motyw PDZ [17,46]. Efryny klasy A, mimo braku cytoplazmatycznej domeny, także mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału do wnętrza komórki [47]. Podobnie jak wiele białek umocowanych na powierzchni komórki za pomocą kotwicy GPI, są one często gromadzone w tzw. tratwach lipidowych w błonie komórkowej, do których dołączane są inne kompleksy sygnalizacyjne. Możliwe zatem, że struktury te stanowią platformę do dalszego przekazu sygnału w komórce po związaniu efryny-A przez receptor.

WPŁYW EFRYN NA MIGRACJĘ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Pomimo licznych danych, wskazujących na istnienie związków między wzrostem ekspresji genów receptorów Eph a zdolnością komórek nowotworowych do lokalnej inwazji i tworzenia przerzutów (Tab. 1), mechanizm tego zjawiska nie jest do końca poznany. Z wielu funkcji komórek nowotworowych, na które może wpływać aktywacja receptorów Eph, a które związane są ze zwiększoną aktywnością metastatyczną, na pierwszy plan wysuwa się zdolność komórek nowotworowych do aktywnej migracji. Znaczenie receptorów Eph w migracji komórek nowotworowych w czasie inwazji może być związane z ich oddziaływaniem z efrynami pojawiającymi się zarówno na powierzchni innych komórek nowotworowych, jak i na powierzchni komórek prawidłowych. W pierwszym przypadku układ Eph/efryna funkcjonowałby według najbardziej klasycznego modelu działania tych białek, polegającym na ukierunkowaniu

migracji w wyniku indukowanej przez kontakt repulsji, czyli reakcji polegającej na „ucieczce” komórki od źródła sygnału, którym w tym przypadku są efryny na powierzchni sąsiednich komórek. Takie zjawisko, przebiegające w trakcie rozwoju embrionalnego, zapobiega przemieszczaniu się komórek wykazujących ekspresję genów receptorów Eph w rejonu tkankowe, charakteryzujące się wysoką syntezą efryn i umożliwia wytyczanie określonych szlaków dla migrujących komórek [43]. W przypadku komórek nowotworowych aktywacja receptorów Eph poprzez repulsję indukowaną w wyniku oddziaływania homotypowych sprzyja opuszczaniu przez komórki guza pierwotnego. Jednak rola układu Eph/efryna w regulacji migracji komórek jest znacznie bardziej złożona. Oprócz indukowania wspomnianej repulsji wykazano, że receptory Eph działają również poprzez wysyłanie pozytywnych sygnałów kierujących przemieszczanie się komórek [56]. Co więcej, w przypadku naprowadzania aksonów stwierdzono, że ten sam receptor może wywoływać różne typy reakcji w rozmaitych rodzajach komórek, a nawet w tej samej komórce [57]. Można zatem przypuszczać, że tego rodzaju oddziaływania mogą również odpowiadać za naprowadzanie komórek nowotworowych, przez komórki tkanek prawidłowych wykazujące produkcję efryn.

W wielu badaniach stwierdzono występowanie zależności pomiędzy ekspresją genów receptorów Eph a aktywnością ruchową komórek nowotworowych (Tab. 1). Przykładowo, w doświadczeniach, w których badano migrację komórek raka prostaty PC-3, stwierdzono wyraźne zahamowanie ruchu komórek po zastosowaniu siRNA i oligodeoksynukleotydów antysensownych skierowanych przeciwko receptorowi EphB4. Podobnie test migracji przez Matrigel w komorze Boydena wykazał zahamowanie ruchu komórek w następstwie wyciszenia tego receptora przy użyciu siRNA [26]. Nasreen i wsp. [35] stwierdzili, że wyciszenie receptora EphA2 w komórkach agresywnej formy mięsziak powoduje spadek migracji komórek oraz indukuje apoptozę na drodze aktywacji kaspazy 9. Z drugiej strony, nadekspresja genu tego receptora indukowała wzrost aktywności haptotaktycznej komórek [35]. Bardziej zaawansowane badania roli receptorów efryn w regulacji migracji komórek nowotworowych przeprowadzili Nakada i wsp. [30]. Autorzy dokonali porównania ekspresji genów receptorów Eph w pięciu liniach komórkowych glejaka, stwierdzając, że w stosunku do komórek stacjonarnych aktywnie migrujące komórki wykazują podniesioną ekspresję genów oraz aktywację receptora EphB2. Ufosforylowana forma receptora znajdowała się głównie w lamellipodiach, krawędzi wiodącej migrujących komórek. Stymulacja komórek efryną-B1-Fc (białko fuzyjne, umożliwiające aktywację receptora przez efrynę niezwiązaną z powierzchnią komórki) zwiększała aktywność migracyjną komórek, podczas gdy zablokowanie receptora EphB2 działało hamująco. Dodat-



Rycina 3. Drogi przekazywania sygnału od receptorów EphB i efryna klasy B oraz ich wpływ na procesy komórkowe. Strzałki oznaczają aktywację białka (procesu), tępo zakończone łączniki – hamowanie. W oparciu o [39,40].

kowym dowodem na udział tego receptora w stymulacji migracji badanych komórek była obserwacja, że transfekcja komórek wektorem kodującym EphB2 powodowała dalsze zwiększenie ich aktywności migracyjnej. Transfekowane komórki charakteryzował również niemal dwukrotnie większy potencjał migracyjny i inwazyjny w eksperymentach *ex vivo* z zastosowaniem tkanki szczurzego mózgu, co sugeruje, że receptor EphB2 pełni istotną funkcję w inwazji zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Kolejna praca tej grupy [31] wykazała istotne znaczenie ligandów receptorów Eph w przerzutowaniu komórek glejaka. Autorzy zaobserwowali związek pomiędzy poziomem ekspresji genu kodującego efrynę-B3 a stopniem złośliwości nowotworu. Zwiększone występowanie efryny-B3 było ponadto charakterystyczne dla komórek aktywnie migrujących, a zablokowanie liganda hamowało inwazję zarówno *in vitro*, jak i *ex vivo*. Podobne obserwacje, wskazujące na istotne znaczenie receptorów Eph i ich ligandów w regulacji migracji komórek nowotworowych, dotyczyły wielu innych nowotworów, m.in. jelita grubego, prostaty, centralnego układu nerwowego, piersi, jajnika oraz czerniaka i międzybłoniaka [18-35].

MECHANIZMY WPŁYWU EFRYN NA AKTYWNOŚĆ RUCHOWĄ KOMÓREK

BIAŁKA RHO

Regulacja migracji komórek przez receptory efryn może odbywać się poprzez aktywację różnych ścieżek sygnalizacyjnych. Jeden z postulowanych mechanizmów wpływu tych białek na aktywność migracyjną komórek nowotworowych zakłada ich oddziaływanie z białkami Rho (Ryc. 2 i 3). Białka te, do których zalicza się m.in. białko Rho, Rac i Cdc42, są GTP-azami należącymi do nadrodziny małych białek G. Posiadają one zdolność hydrolizy GTP i oscylują

stale pomiędzy stanem aktywnym (związane GTP) a stanem nieaktywnym (związane GDP). Do ich ważniejszych funkcji w komórce należy aktywacja ścieżek przekazywania sygnału prowadzących do reorganizacji cytoskieletu aktynowego. Dynamiczna przebudowa filamentów aktynowych jest warunkiem powstawania i funkcjonowania struktur niezbędnych do przemieszczania się komórki, takich jak: lamellipodia, filopodia, włókna naprężeniowe oraz kortykalna sieć aktomiozynowa [58,59]. Przeprowadzone przez Ridley'a i Halla [58,59] w latach 90. ubiegłego wieku badania roli małych białek G z rodziny Rho w regulacji morfologii i migracji fibroblastów Swiss-3T3 pozwoliły stwierdzić, że aktywacja Cdc42 powoduje formowanie filopodiów, Rac 1 – lamellipodiów, a Rho A – włókien naprężeniowych. Zasadnicza rola białek Rac i Cdc42 w tych procesach związana jest z regulacją białek zaangażowanych w procesy polimeryzacji aktyny [kompleks Arp2/3, białka nakrywające (czapeczkujące – ang. *capping*), kofilina], prowadzącą do powstawania struktur bogatych w spolimeryzowaną aktynę, np. filopodiów i lamellipodiów.

Z kolei znaczenie białek Rho w ruchu komórki związane jest w dużej mierze z ich wpływem na fosforylację miozyny, aktywującą układ kurczliwy biorący udział w przemieszczaniu ciała komórki. Opisane odkrycia doprowadziły w późniejszym okresie do stworzenia modelu opisującego proces migracji komórek w oparciu o kaskadową aktywację tych białek, prowadzącą do skoordynowanego tworzenia przez migrującą komórkę wypustek, następnie formowania miejsc przyczepu do macierzy zewnątrzkomórkowej, a w końcu do retrakcji komórki wywołanej skurczem struktur aktomiozynowych [60,61].

Doniesienia literaturowe wskazują, że małe białka G z rodziny Rho mogą być aktywowane przez receptory Eph. Stosując ten sam, co Ridley i Hall model fibroblastów Swiss-3T3 Harbott i wsp. [62] wykazali, że aktywacja receptorów EphB2 i EphA7 stymuluje powstawanie filopodiów, lamellipodiów i włókien naprężeniowych w sposób zależny od GTP-az z rodziny białek Rho. Stymulacja receptora EphB2 przez rozpuszczalną formę efryny-B1-Fc indukowała powstawanie lamellipodiów, podczas gdy synteza w komórkach białka N17Rac (nieaktywna forma Rac) reakcję tę hamowała. Podobny efekt obserwowano podczas aktywacji receptora EphA7 przez efrynę-A4-Fc. Jednak w tym układzie zahamowaniu tworzenia lamellipodiów przez N17Rac nie towarzyszyło zahamowanie tworzenia filopodiów. Białko N17Rac zakłócało ponadto w obu przypadkach powstawanie włókien naprężeniowych. Obserwacje te sugerowały, że powstawanie włókien naprężeniowych w wyniku aktywacji EphB2 lub EphA7 jest skutkiem zależnej od białek Rac aktywacji białek Rho. Potwierdzenie tej tezy stanowiła obserwacja, iż transferaza C3, specyficzny inhibitor białek Rho, hamowała powstawanie włókien naprężeniowych, nie wpływając jednakże na organizację lamellipodiów.

Aktywacja białek Rho w wyniku stymulacji receptorów Eph może jednak przebiegać także na innej drodze, niezależnej od białek Rac. Shamah i wsp. [63] wykazali, że receptory Eph klasy A w neuronach oddziałują bezpośrednio na białko Rho poprzez czynnik wymiany nukleotydu guanidynowego, zwany efeksyną (ang. *ephexin*), który jest konstytutywnie związany z domeną kinazy tyrozynowej receptora EphA (Ryc. 2). Czynnik ten katalizuje wymianę GDP na GTP, powodując przejście białka Rho w stan aktywny [28,39]. Aktywowane białko Rho indukuje zmiany w cytoskiecie aktynowym, co prowadzi do wycofywania stożka wzrostu neurytów. Aktywacji receptora EphA przez efrynę-A towarzyszy także zahamowanie aktywności białek Rac i Cdc42.

Receptory Eph klasy B mogą oddziaływać z białkami z rodziny Rac i Cdc42 poprzez inne czynniki wymiany nukleotydów. Intersektyna (ang. *intersectin*) jest czynnikiem wymiany nukleotydu aktywującym białko Cdc42. Ulega ona aktywacji m.in. przez EphB2. Kaliryna (ang. *kalirin*) to z kolei czynnik wymiany nukleotydu stymulujący białko Rac, również aktywowany przez Eph klasy B (Ryc. 3) [39].

Zależną od receptorów Eph aktywację białek z rodziny Rho wykazano w wielu typach komórek nowotworowych. Lawrensom i wsp. [53] stwierdzili, że w komórkach czerniaka ze zwiększoną ekspresją genu receptora EphA3 w wyniku stymulacji efryną-A5 następuje aktywacja białka RhoA, co prowadzi do reorganizacji cytoskieletu aktomiozynowego i zaokrąglenia komórki. Podobne obserwacje opisuje Nai-Ying Yang i wsp. [24]. Analiza linii komórkowych czerniaka o różnych zdolnościach tworzenia przerzutów pozwoliła stwierdzić, że ze zwiększoną zdolnością do przerzutowania i migracji powiązany jest wzrost syntezy receptora EphB4. Jego aktywacja poprzez zastosowanie rozpuszczalnej efryny-B2-Fc indukowała migrację komórek i aktywację białka RhoA. Z drugiej strony synteza nieaktywnej formy białka RhoA w pełni znosiła stymulujący efekt receptora EphB4. Wyniki te wyraźnie wskazywały, że pozytywny wpływ receptora na aktywność ruchową komórek czerniaka związany jest z aktywacją białek RhoA. Z kolei Nakada i wsp. [31] stwierdzili, że w przemieszczających się komórkach glejaka efryna-B3 kolokalizuje w lamellipodiach z białkiem Rac1 i odpowiada za jego aktywację. Co więcej, zastosowanie specyficznego siRNA hamującego ekspresję genu białka Rac1, powodowało zahamowanie zależnej od efryny-B3 migracji komórek glejaka.

Receptory efryn wykazują również wpływ na aktywność małych białek G z rodziny Ras. Chociaż uważa się, że droga przekazywania sygnału poprzez szlak Ras-MAPK zaangażowana jest przede wszystkim w regulację proliferacji, to wiele danych wskazuje na jego istotną rolę w migracji komórek, ponieważ kinazy MAP mogą fosforylować także białka związane z cytoskiecetem, wpływając bezpośrednio na jego funkcje [64]. Aktywność białek Ras może być zarówno wzmacniana, jak i hamowana przez receptory efryn. W przypadku białka H-Ras pobudzenie receptora Eph przez związanie efryny w większości komórek powoduje hamowanie jego aktywności. Inaktywacja białka H-Ras przez receptory Eph może prowadzić do, m.in., retrakcji neurytów w komórkach nerwowych

oraz zahamowania migracji zależnej od VEGF i angiopoetyny 1 w innych typach komórek [39].

INTEGRYNY

Aktywacja receptorów Eph może również regulować migrację komórek nowotworowych poprzez regulację ich adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Jedną z dróg oddziaływania receptorów efryn na adhezję komórek do ECM jest ich wpływ na aktywność integrzyn, białek adhezyjnych, których zmiany aktywności i ekspresji ich genów obserwowano w wielu typach nowotworów, co wiązano z nabywaniem przez komórki nowotworowe zdolności inwazyjnych. W przypadku komórek glejaka stwierdzono, że aktywacja receptora EphB2 obniża ich adhezję do białek ECM, co związane było z aktywacją i fosforylacją białek R-Ras. Znaczenie białek Ras w tym procesie potwierdzały obserwacje, że ich wyciszenie powodowało wzmocnioną adhezję komórek do ECM [29]. Wyniki tych badań pozostają w zgodności z pracami innych zespołów. Zou i wsp. [65] wykazali, iż aktywowany receptor EphB2 obniża przyczepienie komórek transformowanych onkogenem v-Src do fibronektyny przez fosforylację domeny efektorowej białka R-Ras, powodując tym samym redukcję stopnia adhezji komórek za pośrednictwem integrzyn $\alpha 4 \beta 1$ i $\alpha 5 \beta 1$. Z kolei Guo i wsp. [20] zaobserwowali, że wprowadzenie genu receptora EphB2 zmniejsza adhezję komórek raka jelita grubego do lamininy i fibronektyny. W komórkach raka prostaty PC-3 w wyniku aktywacji receptora EphA2 przez efrynę-A1 stwierdzono zahamowanie zależnej od integrzyn adhezji komórek do fibronektyny i lamininy. Reakcja ta była związana z rekrutacją fosfatazy fosfotyrozynowej SHP2 do aktywowanego receptora, która prowadzi do inaktywacji kluczowej dla sygnalizacji przez receptory integrzynowe kinazy FAK poprzez jej defosforylację [66]. Parri i wsp. [27] dowodzą z kolei związku pomiędzy sygnalizacją za pośrednictwem efryn a aktywacją kinazy FAK i białka Rho w komórkach raka prostaty. Stymulacja w tym modelu receptora EphA2 efryną-A1 aktywuje kinazę Src, w wyniku czego dochodzi do utworzenia kompleksu Src-FAK. Następnie kinaza FAK ulega fosforylacji na dwóch resztach tyrozynowych (Tyr 576 i Tyr 577). Autorzy sugerują, że ta wybiórcza fosforylacja może powodować repulsję komórek, podczas gdy fosforylacja innych reszt prowadziła do zwiększonej adhezji komórki. Wykazano ponadto, że powstanie kompleksu Src-FAK jest niezbędne do aktywacji białka RhoA, które następnie aktywuje kinazę fosforylującą lekki łańcuch miozyny II (MLCII), indukując skurcz aktyno-miozynowy w komórce, w wyniku którego jej ciało ulega retrakcji i odczepieniu od innych komórek. Chociaż w obu ostatnich opisanych przypadkach efektem końcowym aktywacji EphA2 przez efrynę-A1 jest repulsja komórek raka prostaty, to postulowane mechanizmy oddziaływania receptora na kinazę FAK pozostają do siebie w opozycji. Bardziej prawdopodobną wydaje się być indukowana przez EphA2 fosforylacja FAK, prowadząca do retrakcji komórki, ponieważ wyników świadczących o defosforylacji FAK w wyniku aktywacji receptora EphA2 nie udało się dotychczas powtórzyć innym grupom naukowców [27].

Wydaje się jednak, że wpływ aktywacji receptorów Eph na zależną od integrzyn adhezję komórek do ECM jest uzależ-

niony od typu badanych komórek. W fibroblastach NIH-3T3 aktywacja receptora EphA2, a w konsekwencji – fosforylacja FAK powoduje wzrost adhezji i stopnia rozplaszczania komórek na podłożu [67]. Wzrost stopnia przyczepienia do fibronektyny i lamininy stwierdzono również w komórkach czerniaka, do których wprowadzono gen efryny-B2. Transfekowane komórki ulegały rozplaszczeniu oraz tworzyły dużą ilość filopodiów i włókien naprężeniowych. Reakcja ta ulegała dodatkowo wzmocnieniu w obecności rozpuszczalnej formy receptora EphB4, dla którego efryna-B2 jest jednym z ligandów. Usunięcie domeny fosforylacji efryny-B2 prowadziło do zaokrąglenia komórek oraz redukcji adhezji [23]. W innych badaniach aktywacja receptora EphB1 w sposób zależny od dawki stymulowała aktywność integrzyn $\alpha\beta3$ i $\alpha5\beta1$ uczestniczących w adhezji komórek endotelialnych i teratocarcinoma [68], a aktywacja receptora EphA8 wzmagala aktywność integrzyn $\alpha5\beta1$ lub $\alpha\beta3$ w komórkach NIH-3T3 i HEK-293 [69]. Z kolei w komórkach NIH-3T3 i PC-3 charakteryzujących się nadprodukcją EphA2 wskutek stymulacji efryną-A1 zaobserwowano fosforylację kinazy FAK i wzmocnioną adhezję. Reakcja ta była jednak całkowicie zahamowana w komórkach FAK^{-/-}. Wynik ten potwierdza istnienie zależności aktywności kinazy FAK od receptorów Eph [28].

Podsumowując, aktywacja receptorów efryn w zależności od typu komórki i rodzaju receptora może prowadzić zarówno do aktywacji, jak i inaktywacji integrzyn i powodować tym samym wzrost lub spadek adhezji komórek. Nie pozostaje to jednak w sprzeczności z postulowaną rolą układu efrynowego w stymulacji procesu tworzenia przerzutów. Liczne badania wskazują, że w różnego rodzaju nowotworach można obserwować zarówno spadek, jak i wzrost ekspresji genów poszczególnych typów integrzyn [70]. Związane jest to z faktem, że z jednej strony synteza integrzyn będzie utrudniała komórkom nowotworowym opuszczanie guza pierwotnego, ale z drugiej strony ekspresja genów innych typów tych receptorów jest niezbędna w kolejnych etapach tworzenia przerzutu, jak np. aktywna migracja lub adhezja komórek nowotworowych do komórek śródbłonna w procesie opuszczania naczyń krwionośnych.

KADHERYNY

Inny rodzaj aktywności receptorów Eph, który pośrednio może wpływać na zdolność komórek nowotworowych do migracji, związany jest z ich wpływem na białka adhezyjne z rodziny kadheryn, odpowiedzialne za adhezję międzykomórkową. Białka te odpowiadają za utrzymywanie integralności nabłonków, a zmiany syntezy ich genów lub nieprawidłowe działanie białek jest charakterystyczne dla wielu typów nowotworów złośliwych [71]. W komórkach raka jelita grubego HT-29 wykazano, że stymulacja rozpuszczalną formą efryny-A1 (efryną-A1-Fc) powodowała fosforylację E-kadheryny i β -kateniny [21], prowadzącą do osłabienia spójności kompleksu kadherynowego, a przez to do obniżenia stopnia adhezji komórkowej [72]. Na występowanie związku pomiędzy E-kadheryną a efrynami wskazują wyniki badań, w których stwierdzono, że w komórkach raka sutka nie wykazujących syntezy E-kadheryny następowało obniżenie fosforylacji receptora EphA2 i zmiana jego lokalizacji. Przywrócenie syntezy E-kadheryny w tych komórkach prowadziło do odtworzenia poziomu fos-

forylacji oraz lokalizacji receptora EphA2 charakterystycznego dla prawidłowego nabłonka [73]. Regulację funkcji kadheryn przez receptory efryn potwierdzają również wcześniejsze badania prowadzone na komórkach embrionalnych, wskazujące na zerwanie zależnych od kadheryny połączeń adhezyjnych pomiędzy komórkami embrionalnym *Xenopus laevis* w wyniku aktywacji receptorów Eph [74,75].

Rozpatrując potencjalny wpływ receptorów efryn na regulację adhezji międzykomórkowej, warto zwrócić uwagę na fakt, że powstanie kompleksu efryna/receptor Eph powoduje również wytworzenie stosunkowo silnej adhezji pomiędzy komórkami. Zatem obserwowana najczęściej repulsja sąsiadujących ze sobą komórek musi być poprzedzona zerwaniem tak powstałych oddziaływań adhezyjnych. Jednym z możliwych mechanizmów tego zjawiska jest aktywacja enzymów proteolitycznych. Stwierdzono, że oddziaływanie efryny-A2 z receptorem EphA3 aktywuje metaloproteinazę ADAM10, dla której substratem jest zewnątrzkomórkowa domena efryny. Wskutek tego, domena ta ulega odcięciu, co prowadzi do zerwania adhezji pomiędzy komórkami i ostatecznie do ich repulsji [76]. Z kolei w oddziaływaniach poprzez receptory Eph z grupy B, zerwanie oddziaływań adhezyjnych może być wynikiem endocytozy kompleksu EphB/efryna-B przez kontaktujące się komórki [77].

PODSUMOWANIE

Wyniki badań z ostatnich lat dostarczają wielu przekonujących dowodów na temat udziału receptorów Eph w rozwoju nowotworów. Jedną z cech komórek nowotworowych, na które może wpływać aktywacja receptorów Eph jest ich zdolność do aktywnej migracji. Jednak możliwy wpływ efryn na aktywność metastatyczną komórek nowotworowych wydaje się być znacznie szerszy. Rola efryn w nowotworzeniu polega także na stymulacji procesu angiogenezy [33], blokowaniu ścieżek sygnałowych indukujących apoptozę [32], indukcji degradacji białek ECM za pomocą metaloproteinaz MMP2 i MMP9 [32] oraz, w niektórych przypadkach, stymulacji proliferacji komórek nowotworowych [23,24,35]. Białka te zdają się zatem brać udział we wszystkich najważniejszych etapach procesu wzrostu nowotworów oraz tworzenia przerzutów. Z tego względu efryny i ich receptory mogą stanowić interesujący cel terapii antynowotworowych wykorzystujących białka fuzyjne lub przeciwciała monoklonalne blokujące funkcje receptorów Eph. Opracowanie metod ograniczających rozwój nowotworów w oparciu o blokowanie działania receptorów efryn wymaga jednak pełnego zrozumienia ich złożonego wpływu na aktywność metastatyczną komórek nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

1. Chambers AF (1999) The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncology Res* 11: 161-168
2. Madeja Z, Master A, Michalik M, Sroka J (2001) Contact-mediated acceleration of migration of melanoma B16 cells depends on extracellular calcium ions. *Folia Biol (Kraków)* 49: 113-124
3. Madeja Z, Miękus K, Sroka J, Djamgoz MBA, Korohoda W (2001) Homotypic cell cell contacts stimulate the motile activity of rat prostate cancer cells. *BJU Int* 88: 776-786
4. Madeja Z, Szymkiewicz I, Żaczek A, Sroka J, Miękus K, Korohoda W (2001) Contact-activated migration of melanoma B16 and sarcoma XC cells. *Biochem Cell Biol* 79: 425-440

5. Raz A, Geiger B (1982) Altered organization of cell-substrate contacts and membrane associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. *Cancer Res* 42: 5183-5190
6. Strauli P, Haemmerli G (1984) The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev* 3: 127-141
7. Grimstad IA (1987) Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp Cell Res* 173: 515-523
8. Abercrombie M, Heaysman JEM (1953) Observation on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp Cell Res* 5: 111-131
9. Gail MH, Boone CW (1971) Density inhibition of motility in 3T3 fibroblasts and their SV40 transformants. *Exp Cell Res* 64: 156-162
10. Abercrombie M (1979) Contact inhibition and malignancy. *Nature* 281: 259-262
11. Paddock SW, Dunn GA (1986) Analysing collisions between fibroblasts and fibrosarcoma cells: Fibrosarcoma cells show an active invasive response. *J Cell Sci* 81: 163-187
12. Thomas LA, Yamada KM (1992) Contact stimulation of cell migration. *J Cell Sci* 103: 1211-1214
13. Korohoda W, Madeja Z (1997) Contact of sarcoma cells with aligned fibroblasts accelerates their displacement: computer-assisted analysis of tumour cell locomotion in co-culture. *Biochem Cell Biol* 75: 263-276
14. Miekus K, Czernik M, Sroka J, Czyz J, Madeja Z (2005) Contact stimulation of prostate cancer cell migration: the role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts in determination of the metastatic phenotype of Dunning rat prostate cancer cells. *Biol Cell* 97: 893-903
15. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238: 1717-1720
16. Eph Nomenclature Committee (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* 90: 403-404
17. Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 462-475
18. Surawska H, Ma PC, Salgia R (2004) The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 419-433
19. Davalos V, Dopeso H, Castano J, Wilson AJ, Vilardell F, Romero-Gimenez J, Espin E, Armengol M, Capella G, Mariadason JM, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Arango D (2006) EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 66: 8943-8948
20. Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X (2006) Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 27: 454-464
21. Potla L, Boghaert ER, Armellino D, Frost P, Damle NK (2001) Reduced expression of EphrinA1 (EFNA1) inhibits three-dimensional growth of HT29 colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 175: 187-195
22. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-250
23. Meyer S, Hafner C, Guba M, Flegel S, Geissler EK, Becker B, Koehl GE, Orsó E, Landthaler M, Vogt T (2005) Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol* 27: 1197-1206
24. Yang NY, Pasquale EB, Owen LB, Ethell IM (2006) The EphB4 receptor-tyrosine kinase promotes the migration of melanoma cells through Rho-mediated actin cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 281: 32574-32586
25. Fox BP, Kandpal RP (2004) Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 882-892
26. Xia G, Kumar SR, Masood R, Zhu S, Reddy R, Krasnoperov V, Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL, Pinski JK, Daneshmand S, Buscarini M, Stein JP, Zhong C, Broek D, Roy-Burman P, Gill PS (2005) EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 4623-4632
27. Parri M, Buricchi F, Giannoni E, Grimaldi G, Mello T, Raugeri G, Ramponi G, Chiarugi P (2007) EphrinA1 activates a Src/focal adhesion kinase-mediated motility response leading to rho-dependent actin/myosin contractility. *J Biol Chem* 282: 19619-19628
28. Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M (2005) Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 57: 421-431
29. Nakada M, Niska JA, Tran NL, McDonough WS, Berens ME (2005) EphB2/R-Ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion. *Am J Pathol* 167: 565-576
30. Nakada M, Niska JA, Miyamori H, McDonough WS, Wu J, Sato H, Berens ME (2004) The phosphorylation of EphB2 receptor regulate migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res* 64: 3179-3185
31. Nakada M, Drake KL, Nakada S, Niska JA, Berens ME (2006) Ephrin-B3 ligand promotes glioma invasion through activation of Rac1. *Cancer Res* 66: 8492-8500
32. Kumar SR, Singh J, Xia G, Krasnoperov V, Hassanieh L, Ley EJ, Scheinet J, Kumar NG, Hawes D, Press MF, Weaver FA, Gill PS (2006) Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol* 169: 279-293
33. Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hwang Y, Hicks D, Chen J (2006) Ephrin-A1 facilitates mammary tumor metastasis through an angiogenesis-dependent mechanism mediated by EphA receptor and vascular endothelial growth factor in mice. *Cancer Res* 66: 10315-10324
34. Herath NI, Spanevello MD, Sabesan S, Newton T, Cummings M, Duffy S, Lincoln D, Boyle G, Parsons PG, Boyd AW (2006) Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival. *BMC Cancer* 6: 144
35. Nasreen N, Mohammed KA, Antony VB (2006) Silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. *Cancer* 107: 2425-2435
36. Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 475-486
37. Pasquale EB (1997) The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9: 608-615
38. Héroult M, Schaffner F, Augustin HG (2005) Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res* 312: 642-650
39. Murai KK, Pasquale EB (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116: 2823-2832
40. GeneAssist™ Pathway Atlas Applied Biosystems <http://www4.appliedbiosystems.com/tools/pathway/>
41. Andres AC, Ziemiecki A (2003) Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4: 475-485
42. Hafner Ch, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M., Vogt T (2004) Differential Gene Expression of Eph Receptors and Ephrins in Benign Human Tissues and Cancers. *Clin Chem* 50: 490-499
43. Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG (2004) Diverse Roles of Eph Receptors and Ephrins in the Regulation of Cell Migration and Tissue Assembly. *Dev Cell* 7: 465-480
44. Georgakopoulos A, Litterst C, Gherzi E, Baki L, Xu C, Serban G, Robakis NK (2006) Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *EMBO J* 25: 1242-1252
45. Xu Q, Mellitzer G, Wilkinson DG (2000) Roles of Eph receptors and ephrins in segmental patterning. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 993-1002
46. Jensen PL (2007) Eph receptors and ephrins. *Stem Cells* 18: 63-64
47. Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG (2000) Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* 10: 400-408

48. Dodelet VC, Pasquale EB (2000) Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 19: 5614-5619
49. Himanen JP, Nikolov DB (2003) Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 26: 46-51
50. Himanen JP, Nikolov DB (2003) Molecules in focus: Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 130-134
51. Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, Holland SJ (2000) Phosphorylation of Tyrosine Residues in the Kinase Domain and Juxtamembrane Region Regulates the Biological and Catalytic Activities of Eph Receptors. *Mol Cell Biol* 20: 4791-4805
52. Lee YC, Perren JR, Douglas EL, Raynor MP, Bartley MA, Bardy PG, Stephenson SA (2005) Investigation of the expression of the EphB4 receptor tyrosine kinase in prostate carcinoma. *BMC Cancer* 5: 119
53. Lawrenson ID, Wimmer-Kleikamp SH, Lock P, Schoenwaelder SM, Down M, Boyd AW, Alewood PF, Lackmann M (2002) Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *J Cell Sci* 115: 1059-1072
54. Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, Kinch MS (2003) Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. *Am J Pathol* 162: 1037-1042
55. Elowe S, Holland SJ, Kulkarni S, Pawson T (2001) Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol* 21: 7429-7441
56. Santiago A, Erickson CA (2002) Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129: 3621-3632
57. Eberhart J, Barr J, O'Connell S, Flagg A, Swartz ME, Cramer KS, Tosney KW, Pasquale EB, Krull CE (2004) Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 24: 1070-1078
58. Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399
59. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410
60. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709
61. Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114: 2713-2722
62. Harbott LK, Marston DJ, Nobes CD (2004) Ephrin-regulated Contacty Repulsion of Growth Cones. W: Ridley AJ, Peckham M, Clark P (red) *Cell Motility* John Wiley & Sons, Ltd. str. 61-74
63. Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakov M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105: 233-244
64. Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628
65. Zou JX, Liu Y, Pasquale EB, Ruoslahti E (2002) Activated SRC oncogene phosphorylates R-ras and suppresses integrin activity. *J Biol Chem* 277: 1824-1827
66. Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E, Wang B (2000) Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* 2: 62-69
67. Carter N, Nakamoto T, Hirai H, Hunter T (2002) EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol* 4: 565-573
68. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO (1999) Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. *EMBO J* 18: 2165-2173
69. Gu C, Park S (2001) The EphA8 receptor regulates integrin activity through p110gamma phosphatidylinositol-3 kinase in a tyrosine kinase activity-independent manner. *Mol Cell Biol* 21: 4579-4597
70. Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signaling during tumor progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 816-826
71. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008) Cadherin switching. *J Cell Sci* 121: 727-735
72. Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 119-146
73. Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaiken M, Wang B, Brackenbury R, Kinch MS (1999) E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ* 10: 629-638
74. Winning RS, Scales JB, Sargent TD (1996) Disruption of cell adhesion in Xenopus embryos by Pagliaccio, an Eph-class receptor tyrosine kinase. *Dev Biol* 179: 309-319
75. Jones TL, Chong LD, Kim J, Xu RH, Kung HF, Daar IO (1998) Loss of cell adhesion in Xenopus laevis embryos mediated by the cytoplasmic domain of XLerk, an erythropoietin-producing hepatocellular ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 576-581
76. Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289: 1360-1365
77. Zimmer M, Palmer A, Köhler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5: 869-878

Role of ephrins in regulation of tumour cell migration

Ewa Wybieralska, Eliza Laczna, Zbigniew Madeja[✉]

Department of Cell Biology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Cracow, Poland

✉ e-mail: z.madeja@uj.edu.pl

Key words: migration, contact stimulation, ephrins, invasion

ABSTRACT

Eph receptors are the largest known subfamily of receptor tyrosine kinases. They interact with membrane-bound proteins called ephrins. Recently, an increasing body of evidence shows that ephrins and Eph receptors are involved in pathological processes such as carcinogenesis. Their upregulation in various types of tumors has been demonstrated, highlighting the correlation between this phenomenon and enhanced tumor progression. An exponentially growing interest in their function has resulted in a considerably advanced understanding of the role of ephrins in regulation of cell motility. This is relevant, since active migration is one of the critical cell feature in tumor invasion and metastasis. Here, we summarize recent reports concerning mechanisms of Eph/ephrin signaling and its role in tumour cell migration. Ephrins can regulate cell migration directly, by activation of cytoskeleton rearrangement, or indirectly by changes in cell-cell or cell-ECM adhesion. The relevance of these processes in tumor invasion together with the involvement of ephrins in tumor angiogenesis creates Eph/ephrins pathway as a novel target for cancer treatment.

Regulacja migracji komórek przez jony wapnia

STRESZCZENIE

Migracja komórek wymaga ścisłej regulacji ogromnej liczby szlaków przekazywania sygnałów. Poruszające się komórki muszą zarówno być zdolne do koordynacji wielu jednocześnie zachodzących procesów biochemicznych, jak i reagować na zmieniające się warunki zewnętrzne, a także odpowiadać na sygnały pochodzące z innych komórek. Jednym z najbardziej uniwersalnych systemów przekazywania informacji w organizmach żywych jest wykorzystanie w tym celu zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Niniejszy artykuł omawia rolę wolnych jonów wapnia w takich procesach warunkujących zdolność komórek do ruchu, jak kurczliwość aktomiozyny, zmiany siły adhezji do podłoża czy rearanżacja struktur cytoszkieletu. Opisuje też, w jaki sposób zjawiska mechaniczne związane z ruchem komórki mogą prowadzić do powstawania sygnału wapniowego w cytoplazmie oraz jaką rolę taki sygnał może w komórkach odgrywać.

WPROWADZENIE

Ruch to pojęcie bardzo szerokie, zazwyczaj rozumiane jako zmiany kształtu lub położenia obiektów w przestrzeni. Na potrzeby tego artykułu zakłada się, że o ruchliwości komórek mówimy wtedy, gdy zmiana położenia następuje aktywnie, a nie w wyniku działania sił zewnętrznych. A więc, fibroblast wędrujący przez sieć włókien kolagenu jest komórką ruchliwą, natomiast erytrocyt niesiony prądem krwi w naczyniu krwionośnym nią nie jest. Nie są tu omawiane procesy związane z transportem wewnątrzkomórkowym, takie jak endo- i egzocytoza. Zainteresowanych zapraszam do artykułów Kasprowicz i wsp., Olchowik i Miączyńska oraz Krzeszowiec i Gabryś zamieszczonych w tym numerze „Postępów Biochemii”

Komórki ruchliwe mogą przemieszczać się wykorzystując jeden z dwóch podstawowych sposobów lokomocji – pełzając po powierzchni podłoża lub swobodnie pływając w środowisku wodnym. W niniejszym artykule ograniczę się do omówienia regulacji przez jony wapnia pierwszego z tych sposobów.

Ruch pojedynczej komórki jest zjawiskiem równie skomplikowanym, jak ruch całego organizmu. Ruchliwa komórka musi być zdolna do przemieszczenia masy swego ciała na odległości częstokroć znacznie większe od swoich rozmiarów, musi również być zdolna do reakcji na bodźce i w odpowiedzi na nie modyfikować swoje zachowanie. Za zdolność do ruchu odpowiada przede wszystkim cytoszkielet (o udziale cytoszkieletu w migracji komórek jest mowa w szeregu artykułach w niniejszym numerze). Wbrew nazwie – nie jest to jedynie bierny składnik komórki pełniący rolę podporową. W rzeczywistości – dzięki możliwości szybkiej przebudowy swoich struktur w odpowiedzi na bodźce – cytoszkielet generuje również siłę umożliwiającą migrację. Obie te funkcje są ze sobą ściśle związane.

Rola jonów wapnia (Ca^{2+}) jako przekaźnika sygnałów wynika z istnienia bardzo dużej różnicy jego stężeń pomiędzy komórką a środowisku zewnętrznym. Stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie komórki wynosi około 100 nM, podczas gdy w środowisku pozakomórkowym przekracza zwykle 2 mM. Ta ogromna różnica w stężeniu tych jonów wynika z istnienia wydajnych mechanizmów usuwania wolnych jonów wapnia z komórki. Jony wapnia w dużym stężeniu są cytotoksyczne. Efekt ten wynika z wiązania Ca^{2+} z resztą fosforanową nukleotydów, co prowadzi do powstawania nierozpuszczalnych hydroksyapatytów wapnia. Wydaje się więc, iż system przekazywania sygnałów w komórce z udziałem jonów wapnia jest ewolucyjnym skutkiem ubocznym unikania tworzenia jego nierozpuszczalnych soli w komórce. Obecnie, po upływie miliardów lat, w komórkach istnieje zarówno duża liczba procesów zależnych od regulacji poprzez wolne jony wapnia, jak i sposoby skutecznego utrzymywania home-

Paweł Pomorski

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 4 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: sygnał wapniowy, jony wapnia, ruch komórki, adhezja

Wykaz skrótów: DOCK180 (ang. *Dedicator of Cytokinesis*) – GEF o m. cz. 180 kDa dla Rac1; FAK (ang. *Focal Adhesion Kinase*) – kinaza kontaktów ogniskowych; GAP (ang. *GTPase Activating Protein*) – białko przyspieszające hydrolizę GTP; GEF (ang. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) – czynnik wymiany nukleotydu guaninowego; h-CaD (ang. *high molecular weight caldesmon*) – kaldesmon o m. cz. 90 kDa; IP3 – 1,4,5-trifosforan inozytolu; l-CaD (ang. *low molecular weight caldesmon*) – kaldesmon o m. cz. 60 kDa; MLC (ang. *Myosin Light Chain*) – lekki łańcuch miozyny; MLCK (ang. *Myosin Light Chain Kinase*) – kinaza lekkich łańcuchów miozyny; MLCP (ang. *Myosin Light-Chain Phosphatase*) – fosfataza lekkich łańcuchów miozyny; PDGF (ang. *Platelet-derived growth factor*) – czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi; PIP2 – bisfosforan fosfatydyloinozytolu; PTK2 (ang. *Protein Tyrosine Kinase 2*) – homolg kinazy FAK; ROCK (ang. *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*) – kinaza zależna od Rho; SERCA (ang. *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*) – ATPaza wapniowa siateczki sarkoplazmatycznej (śródpłazmatycznej); SOC (ang. *Store-operated Ca^{2+} channel*) – kanał wapniowy aktywowany opróżnieniem magazynów wapniowych; SOCE (ang. *Store-operated Calcium Entry*) – pojemnościowy napływ jonów wapnia; TRP (ang. *Transient Receptor Potential*) – białko rodziny TRP, tworzące kanały jonowe; TRPC – białko rodziny TRP, aktywowane przez fosfolipazę C; VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

ostazy wapniowej w celu wykluczenia szkodliwych efektów powodowanych przez podwyższone stężenia tych jonów w komórce.

REGULACYJNA ROLA JONÓW WAPNIA

WYTWARZANIE SIŁY MECHANICZNEJ

Do przemieszczania w przestrzeni każdej masy niezbędna jest siła, a do jej generacji – energia. W komórkach siła generowana jest dzięki zamianie energii chemicznej, zgromadzonej w cząsteczce ATP na siłę mechaniczną. Odbywa się to w wyniku hydrolizy ATP przez białka zwane ATPazami (aktywność ATPazową wykazuje miozyna oraz o wiele niższą – cząsteczka aktyny). Ruch komórki odbywa się głównie dzięki dwóm procesom związanym z hydrolizą ATP. Jednym z nich jest przesuwanie się filamentów miozynowych (grubych) względem filamentów aktynowych (cienkich, mikrofilamentów) prowadzące do skurczu, a drugim – proces polimeryzacji aktyny [1]. Z obu tych procesów, to oddziaływanie filamentów miozynowych z mikrofilamentami jest kluczowym procesem odpowiedzialnym za ruch komórek, a jego regulacja jest związana ze zmianami w stężeniu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie.

MOLEKULARNE MECHANIZMY REGULACJI ODDZIAŁYWANIA AKTYNY Z MIOZYNA

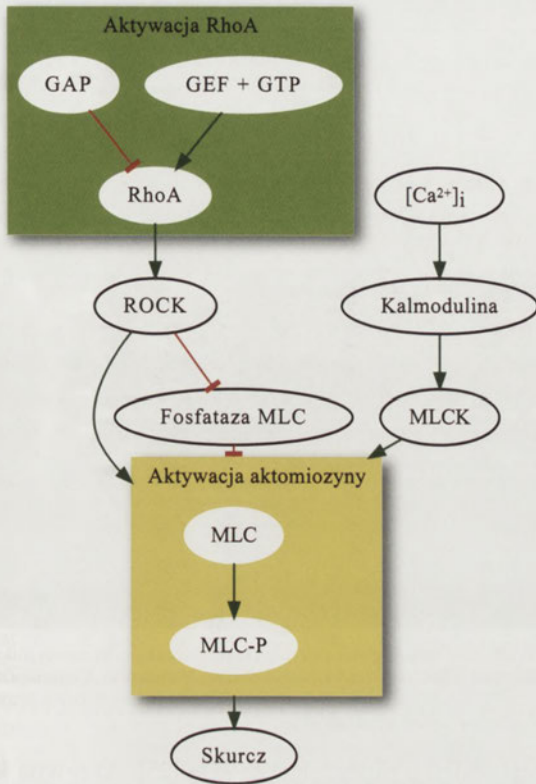
Miozyny, obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, tworzą ogromną nadrodzinę białek, składającą się od 14 [2] do 35 rodzin [3], w zależności od założeń przyjętych przez autorów klasyfikacji. Jednak to miozyna z rodziny II, zwana również konwencjonalną z racji podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego do miozyn obecnych w aparacie skurczu mięśni, jest podstawowym białkiem odpowiadającym za generowanie siły [4]. Cząsteczka miozyny II to heksamer złożony z dwóch łańcuchów ciężkich o masach cząsteczkowych ok. 200 kDa i dwóch par łańcuchów lekkich (MLC, ang. *Myosin light chain*) połączonych z łańcuchami ciężkimi siłami niekowalencyjnymi. W większości przypadków z każdym łańcuchem ciężkim związany jest tzw. jeden łańcuch regulujący (m. cz. ok. 20 kDa) i jeden łańcuch tzw. istotny (m. cz. 16–25 kDa). N-końcowa część łańcucha ciężkiego tworzy globularną główkę, zaś helikalna C-końcowa domena, zwana pałeczką, jest zaangażowana w tworzenie superhelisy z pałeczką drugiego łańcucha ciężkiego (ang. *coiled-coil*). Pałeczki miozyny biorą udział w tworzeniu filamentów miozynowych, w których cząsteczki miozyny są ułożone antyrównolegle. W główce miozyny wyróżnia się globularną domenę motoryczną, stanowiącą miejsca: wiązania i hydrolizy ATP oraz wiązania aktyny, oraz helikalną szyjkę, stanowiącą miejsce wiązania pary łańcuchów lekkich. Związanie cząsteczki ATP w domenie motorycznej wywołuje w niej zmiany konformacyjne prowadzące do oddysocjowania główki z mikrofilamentu, po czym wskutek hydrolizy ATP generującej kolejne zmiany konformacyjne następuje ponowne przyłączenie główki do mikrofilamentu, ale do następnego protomeru aktyny. W teście ruchliwości *in vitro* ustalono, że krok roboczy (czyli odległość na jaką miozyna przesuwa filament aktynowy) dla główki miozyny z mięśni szkieletowych królika wynosi ok. 10 nm. Należy podkreślić, że hydroliza ATP przez cząsteczkę miozyny jest w sposób

istotny (nawet do 500 razy) przyspieszana w obecności filamentów aktynowych.

Mechanizmy regulacji oddziaływania miozyny z aktyną (często używa się terminu aktomiozyny) poprzez jony wapnia w mięśniach poprzecznie prążkowanych oraz w komórkach niemięśniowych i mięśniach gładkich są różne. W systemach niemięśniowych (i mięśniach gładkich) podstawowym mechanizmem regulacji jest fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny poprzez specyficzną kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK ang. *Myosin light chain kinase*) zależną od jonów wapnia i kalmoduliny. Należy tu przypomnieć, iż znaczący udział w odkryciu tego mechanizmu miała prof. Renata Dąbrowska, o której wspomnienie znajduje się w tym numerze „Postępów Biochemii”. MLCK jest również obecna w mięśniach poprzecznie prążkowanych, pełni tam jedynie funkcje modulujące. Natomiast kluczowym mechanizmem w tym typie mięśni jest zależna od jonów wapnia regulacja poprzez kompleks białek filamentu cienkiego – troponina-tropomiozyna.

MLCK fosforyluje przede wszystkim resztę serynową 19 łańcucha regulującego, może również przyłączać grupę fosforanową do reszty treoninowej 18 [5]. MLCK to białko o m. cz. ok. 110 kDa, które staje się aktywne po przyłączeniu czterech cząsteczek kalmoduliny ze związanymi jonami Ca²⁺. Fosforylacja łańcucha lekkiego inicjuje zmiany konformacyjne w cząsteczce miozyny (monomerze i filamentcie) umożliwiając jej oddziaływanie z filamentem aktynowym i w konsekwencji generację ruchu. Mechanizm ten wydaje się być powszechny w organizmach wielokomórkowych, potwierdzono jego obecność w śluzowcu *Dictyostelium discoideum*. Nie wiadomo natomiast, czy występuje w organizmach jednokomórkowych. Dotychczasowe badania wskazują raczej, iż aktywność aktomiozyny regulowana jest tam przede wszystkim przez fosforylację ciężkiego łańcucha miozyny (zainteresowanych odsyłam do pracy Kłopotcka i wsp. w niniejszym numerze czasopisma).

Regulacja poprzez jony wapnia aktywności aktomiozyny w komórkach ruchliwych to nie tylko regulowanie aktywności ATPazowej aktomiozyny przez wzrost lub spadek poziomu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Aktywność ta znajduje się również pod kontrolą mechanizmu regulacyjnego zależnego od białka G, RhoA, zwanego również mechanizmem sensytyzacji aktomiozyny na sygnał wapniowy (Ryc. 1, [6]). RhoA należy do rodziny białek Rho, niewielkich białek (m. cz. 20–40 kDa) wiążących GTP, zwanych również małymi GTPazami, choć ich aktywność GTPazowa jest w zasadzie znikoma. Za wymianę GTP na GDP (i odwrotnie) odpowiedzialne są wyspecjalizowane białka GAP (ang. *GTPase activating proteins*) i GEF (ang. *Guanine nucleotide exchange factor*). Białka GEF i GAP dla białka Rho są znacznie od niego większe, np. u człowieka m. cz. GEF2 to ok. 110 kDa, GAP – 170 kDa. Białka Rho działając poprzez wiele białek efektorowych (aktywowanych właśnie związaniem białka Rho) uruchamiają kaskady sygnałowe, stąd też często noszą one nazwę przełączników molekularnych (ang. *molecular switches*). Jednym z białek efektorowych małego białka G RhoA jest kinaza zależna od białka Rho – ROCK (ang. *Rho-associated, coiled-coil containing kinase*) o m. cz.



Rycina 1. Schemat kaskady sygnałów prowadzących do aktywacji aktomiozyny. Szczegóły w tekście.

ok. 160 kDa. Aktywność tej właśnie kinazy jest głównym czynnikiem określającym podatność aktomiozyny na sygnał wapniowy w komórce, mimo iż jony wapnia nie wpływają na aktywność samej kinazy. Jak już zostało wyżej powiedziane, aktywacja aktomiozyny zależy od fosforylacji MLC, katalizowanej przez zależną od kalmoduliny i wapnia kinazę MLCK. Fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny jest procesem odwracalnym, za ich defosforylację odpowiedzialna jest przede wszystkim specyficzna fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (MLCP, ang. *Myosin light-chain phosphatase*). W wyniku jej działania (defosforylacji łańcuchów) dochodzi do zahamowania aktywności ATPazowej aktomiozyny, a więc aktywacja aktomiozyny wiąże się z niską aktywnością MLCP, co można osiągnąć poprzez dezaktywację fosfatazy wskutek fosforylacji jednej z jej podjednostek. Wykazano, że aktywacja kinazy ROCK w wyniku związania RhoA prowadzi do fosforylacji podjednostki wiążącej miozynę fosfatazy MLCP, co w konsekwencji powoduje inaktywację MLCP i wzmocnienie efektu pobudzenia przez jony wapnia kinazy lekkich łańcuchów miozyny, i w rezultacie aktywację aktomiozyny, co przekłada się na wzmocnienie kurczliwości komórki i jej ruch (Ryc. 1) Co ciekawe, kinaza ROCK fosforyluje również te same reszty aminokwasowe lekkich łańcuchów miozyny, co kinaza lekkich łańcuchów miozyny.

Komplementarność szlaków przekazywania sygnałów przez RhoA i jony wapnia została doświadczalnie udowodniona poprzez wykazanie, że sygnał wapniowy pochodzący z receptorów nukleotydowych jest w stanie częściowo rekompensować inaktywację ROCK przez specyficzny inhibitor tej kinazy Y-27632 [7].

W 1999 r. grupa Lee pokazała po raz pierwszy spontaniczne pojawianie się sygnału wapniowego w ruchliwej komórce keratynocytów ryby (komórek odpowiedzialnych za tworzenie łusek) [8]. Sygnał ten był hamowany przez inkubację komórek w roztworze gadolinu (Gd^{3+}), który hamuje aktywność kanałów wapniowych zależnych od naprężenia, obecnych w błonie komórkowej [9,10]. Ta obserwacja wskazywała na istnienie dodatkowego sprzężenia zwrotnego między sygnałem wapniowym, naprężeniami w cytoszkieletcie i powodującym je skurczem aktomiozyny. Zależność między wzrastającym stężeniem wolnych jonów wapnia w cytoplazmie a zwiększającą się siłą naprężeń w komórce została dokładniej pokazana w kolejnej publikacji tej grupy [11]. Cykl: wzrost naprężeń – sygnał wapniowy – dalszy wzrost naprężeń nie trwa jednak w nieskończoność, kończy go odklejenie się komórki od podłoża, o czym będzie mowa w dalszej części tego artykułu.

Badania aktywności MLCK bezpośrednio w ruchliwych komórkach PTK-2 (komórki nabłonka szczurowskokczków) pozwoliły określić, że jest ona najwyższa we frontalnej części komórek, natomiast efekt jej aktywności, ufosforylowane lekkie łańcuchy miozyny, był najbardziej widoczny wzdłuż aktywnych włókien naprężeniowych (ang. *stress fibers*), składających się głównie z mikrofilamentów i związanych z nimi filamentów miozyny [12]. Wynik ten uzyskano używając sondy molekularnej składającej się z MLCK połączonej z dwoma białkami fluorescencyjnymi: świecącego na zielono GFP i świecącego na niebiesko BFP. W normalnych warunkach dochodzi do transferu energii pomiędzy fluoroforami i w odpowiedzi na wzbudzenie BFP sonda odpowiadała emisją fotonu światła zielonego, charakterystycznego dla GFP. Po związaniu kalmoduliny, dochodzi do zmian konformacyjnych w cząsteczce MLCK, co powoduje odsunięcie się od siebie białek fluorescencyjnych i w konsekwencji nie następuje pomiędzy nimi transfer energii. O ile spodziewano się takiego wyniku dla włókien naprężeniowych, odpowiadających za generację sił mechanicznych powstających w migrującej komórce [13,14], to obserwacje dotyczące części frontalnej (a zwłaszcza lamellipodium) były zaskoczeniem. Uważa się (i są na to liczne dowody), że w przypadku większości komórek za wysuwanie aktywnego frontu odpowiada polimeryzacja samej aktyny, a nie kurczliwość aktomiozyny. Próbie wytłumaczenia tej obserwacji dostarcza publikacja Wei i wsp. [15], w której autorzy pokazują pojawianie się w wysuwanym lamellipodium fibroblastów z płodów ludzkich (WI-38) tzw. „rozblysków wapniowych” (ang. *calcium flickers*), czyli krótkotrwałych (poniżej sekundy) lokalnych wyrzutów wolnych jonów wapnia do cytoplazmy (źródłem jonów wapnia są tu prawdopodobnie otwierające się kanały jonowe w błonie komórkowej, choć autorzy nie badali pochodzenia sygnału wapniowego). Ich pojawianie się może być przyczyną obecności aktywnej MLCK we frontalnej części komórki, która może inicjować rekrutację białek cytoszkieletu w kierunku postępującego frontu.

WPŁYW WOLNYCH JONÓW WAPNIA NA ADHEZJĘ KOMÓRKI

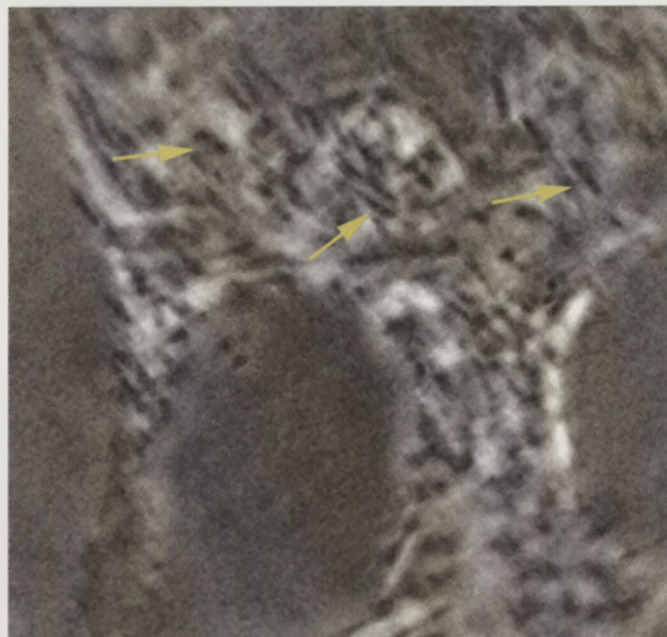
Wspomniane wyżej wytwarzanie znacznych naprężeń przez kurczący się cytoszkielet aktywny może wydawać

się dziwne w zestawieniu z obserwacjami, iż za przesuw frontu komórki odpowiada głównie polimeryzacja samej aktyny. Na fakt, że naprężenia cytoszkieletu nie są związane bezpośrednio z samym przemieszczaniem się komórki wskazują również obserwacje, że kierunek powstawania naprężeń wywołanych przez aktomiozynę wcale nie musi być zgodny z kierunkiem ruchu. W rybach keratynocytach, jednym z powszechnie stosowanych modeli komórek ruchliwych, kierunek ten jest prostopadły do kierunku ruchu, a powstawanie naprężeń nie jest niezbędne do przemieszczania się komórki [16]. Wydaje się, że rola kurczliwości aktomiozyny polega tu raczej na regulacji odrywania tylnej części komórki od podłoża [8] oraz umożliwieniu zmiany kierunku ruchu [17].

Obecność włókien naprężeniowych w komórkach jest bezpośrednio związana ze sposobem, w jaki ruchliwe komórki przylegają do podłoża. Już Archimedes, badając mechanikę, stwierdził: dajcie mi punkt oparcia, a poruszę Ziemię. Jeśli zatem komórka ma się przemieścić, to musi istnieć punkt(y) podparcia dla napędzających ją sił. W przypadku komórek pełzających jest nim podłoże, a siła naprężeń pomiędzy podłożem a cytoszkieletem przekazywana jest przez wyspecjalizowane struktury adhezyjne. Struktury te zajmują tylko część brzusznej (wentralnej) powierzchni komórki (Ryc. 2), powstają we frontalnej części komórki, podczas jej ruchu dojrzewają, przesuwać się wzdłuż jej wentralnej powierzchni i ostatecznie dochodzi do ich dezintegracji w części tylnej [18]. Proces ten jest regulowany przez dwa czynniki: zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie i siłę naprężeń cytoszkieletu.

Początkowo, niedojrzałe struktury adhezyjne powstają i zanikają w wysuwającym lamellipodium komórki. Ich powstawanie wydaje się zależne od małego białka G Rac oraz fosforylacji białka adaptorowego paksyliny (m. cz. ok. 120 kDa) i nie jest bezpośrednio związane z sygnałem wapniowym [19]. Część z tych struktur rozpada się, pozostałe zaś tworzą kontakty zogniskowane (ogniska kontaktowe, ang. *focal adhesion contacts*), co wiąże się ze stopniową zmianą ich składu białkowego, w tym związanych z nimi białek filamentów aktynowych. Pojawia się α -aktynina [20], co skutkuje tworzeniem się wiązek („kablów”) mikrofilamentów, a następnie miozyna II [21,22], a wówczas wiązki stają się włóknami naprężeniowymi, zdolnymi do generacji siły mechanicznej.

Powstawanie włókien naprężeniowych, jest procesem równoległym do tworzenia dojrzałych kontaktów zogniskowanych, wielkich i złożonych kompleksów białkowych o rozmiarach osiagających powyżej 1 μm , które łączą włókna naprężeniowe z integrzynami w błonie komórkowej i w rezultacie z macierzą pozakomórkową [23]. Wykazano, że do prawidłowego powstawania kontaktów zogniskowanych niezbędna jest siła mechaniczna, generowana przez miozynę II [24]. Sygnał wapniowy prowadzący do umacniania struktur cytoszkieletu, jakimi są włókna naprężeniowe, sprzyja też rozwojowi struktur adhezyjnych w komórce. Powstanie kontaktów zogniskowanych związane jest również z aktywacją obecnej w nich kinazy tyrozynowej FAK (ang. *focal adhesion kinase*, znanej także jako PTK2, ang. *protein tyrosine kinase 2*), zachowanego w



Rycina 2. Obraz komórki glejaka C6 uzyskany techniką odbiciowej mikroskopii interferencyjnej (IRM, ang. *Interference Reflection Microscopy*). Ciemniejsze plamy (żółte strzałki) to obszary komórki, w których błona komórkowa przylega do szkła, na którym hodowano komórki.

ewolucji białka o m. cz. ok. 125 kDa [25]. Aktywna kinaza FAK z kolei może fosforylować białko DOCK180 (ang. *dedicator of cytokinesis*), które jest aktywatorem (GEF) białka Rac, inicjującego procesy powstawania lamellipodium, i w konsekwencji – szybkiego wysuwania frontu poruszającej się komórki [26]. A zatem sygnał wapniowy, poprzez aktywację aktomiozyny, może działać na wiele elementów maszynarii ruchowej.

Nie jest to jednak jedyna droga, jaką wolne jony wapnia mogą oddziaływać na adhezję komórki do podłoża. Pierwsze doniesienie pokazujące bezpośrednią zależność ruchu komórek tkankowych od sygnału wapniowego dotyczyło roli wolnych jonów wapnia nie w tworzeniu struktur adhezyjnych, a w odrywaniu od podłoża tylnej części ciała przez wędrującą komórkę [8]. Wykazano, że do oderwania znajdujących się w tylnej części komórki kontaktów z podłożem niezbędna jest aktywacja aktomiozyny [27]. Postulat, że to kurczliwość prowadzi do oderwania kontaktów stoi jednak w sprzeczności z tezą, iż naprężenia mechaniczne prowadzą do wzmacniania tych kontaktów. Co więcej, komórki takie jak monocyty, w których nie powstają włókna naprężeniowe, również odpowiadają na sygnał wapniowy osłabieniem adhezji do podłoża [17].

O tym, że w przedstawionej koncepcji brakuje co najmniej jednego elementu świadczą badania z wykorzystaniem jonów Gd^{3+} . Gdy jony Gd^{3+} zostaną podane lokalnie w pobliżu błony komórkowej przy użyciu mikropipety, to efekt wywołanego przez nie hamowania kanałów wapniowych zależnych od naprężeń jest znacznie silniejszy jeśli robi się to we frontalnej strefie komórki, niż w jej części tylnej [28]. Skoro w części przedniej nie ma generujących naprężenia włókien, to musi istnieć drugi zależny od jonów wapnia mechanizm odpowiadający za regulację adhezji komórek do podłoża.

Wydaje się, iż mechanizmem tym jest selektywna proteoliza przez zależne od jonów wapnia proteazy z grupy kalpain. Powszechnie występujące kalpaina 1 (znana również jako m-kalpaina) oraz kalpaina 2 (często nazywana μ -kalpaina). Są to heterodimery, składające się z dużej podjednostki katalitycznej (m. cz. ok. 80 kDa) i małej, regulatorowej (m. cz. ok. 28 kDa). W cząsteczkach obu kalpain, 1 i 2, występuje wspólna podjednostka regulatorowa, kodowana przez gen *Capn4*. Cząsteczki kalpain różnią się podjednostkami katalitycznymi, kodowanymi odpowiednio przez geny: *Capn1* dla kalpaina 1 i *Capn2* dla kalpaina 2 [29]. Okazuje się, że aktywność obu kalpain jest niezbędna do wzmacniania struktury cytoszkieletu ruchliwych komórek w reakcji na stres mechaniczny i tworzenia nowych kontaktów z podłożem [30]. Co ciekawe, podczas doświadczeń, w których „wyłączono” aktywność poszczególnych kalpain przy użyciu techniki siRNA, okazało się, że tylko wspólna podjednostka regulatorowa wpływała na powstawanie naprężeń w podłożu, co wskazuje, że kalpaina mogą tu działać zamiennie. Biorąc pod uwagę proteolityczną aktywność tych enzymów, spodziewano się, że kalpaina będą mogły uczestniczyć w dezintegracji kontaktów zogniskowanych, niezbędnej między innymi do wycofywania tylnej części ruchomej komórki. Potwierdziły to badania, w których do fibroblastów szczura NIH 3T3 wprowadzono drogą transfekcji cDNA taliny, białka o m. cz. ok. 270 kDa, łączącego integryny z aktyną. Okazało się, że komórki produkujące zmutowaną talinę, niewrażliwą na działanie kalpaina, są niezdolne do oderwania kontaktów zogniskowanych od podłoża [31]. Zależna od μ -kalpaina proteoliza integryny $\beta 3$ jest również niezbędna do tworzenia wczesnych kompleksów adhezyjnych i wzmacnia aktywację Rac w aktywnych frontach ruchomych komórek [32]. Również w osteoklastach wykazano, że to wolne jony wapnia pochodzące z wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia i uwalniane z nich poprzez aktywację receptora IP3 są konieczne do aktywacji μ -kalpaina i dopiero ta aktywacja prowadzi do generacji ruchu [33].

INNE BIAŁKA WIĄŻĄCE JONY WAPNIA ZAANGAŻOWANE W REGULACJĘ RUCHU KOMÓRKI

Kaldesmon

Jest białkiem wiążącym filamenty aktynowe i regulowanym przez jony wapnia za pośrednictwem kalmoduliny. Białko wykryto początkowo w mięśniach gładkich (m. in. przez wspomnianą już prof. Renatę Dąbrowską), gdzie w sposób zależny od jonów wapnia reguluje oddziaływanie aktyny z miozyna. Kaldesmon występuje w dwóch formach, powstających na skutek alternatywnego składania jednego genu: obecny głównie w mięśniach gładkich h-CaD (ang. *high molecular weight caldesmon*) o m. cz. ok. 90 kDa i występujący powszechnie l-Cad (ang. *low molecular weight caldesmon*) o m. cz. ok. 60 kDa [34]. W nieobecności jonów wapnia h-CaD blokuje oddziaływanie aktyny z miozyna, regulując w ten sposób kurczliwość mięśni gładkich, natomiast l-CaD nie wpływa na to oddziaływanie. Wydaje się on mieć wpływ stabilizujący na mikrofilamenty, a jego aktywność zmienia się w cyklu komórkowym w wyniku fosforylacji, co koreluje z występowaniem lub zanikiem włókien naprężeniowych [35]. To, jaka jest rola wiązania jonów wap-

nia przez kompleks l-CaD-kalmodulina w regulacji ruchu komórek, wciąż pozostaje niejasne.

Żelsolina

Białko o masie 82-84 kDa, wykazujące zdolność do zależności od jonów wapnia fragmentacji filamentów aktynowych. Pod wpływem wzrostu stężenia jonów wapnia osiagających stężenie mikromolowe, żelsolina przecina mikrofilament i pozostaje na nowopowstałym końcu kolczastym (dodatnim), pełniąc funkcję białka nakrywającego (ang. *capping protein*), dopóki stężenie wolnych jonów wapnia nie spadnie do poziomu spoczynkowego [36]. Żelsolina wiąże się również z bisforanem fosfatydylo-inozytolu (PIP2, ang. *phosphatidylinositol bisphosphate*). Jeden z rodzajów PIP2, 4,5-bisfosforan fosfatydylo-inozytolu jest substratem dla fosfolipazy, w wyniku działania której powstaje 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP3, ang. *inositol 1,4,5-trisphosphate*). IP3 jest wtórnym przekaźnikiem sygnału prowadzącym do powstawania odpowiedzi wapniowej na skutek pobudzenia receptorów związanych z heterotrimerycznym białkiem G. Pobudzenie tych receptorów prowadzi do aktywacji fosfolipazy i zużycia PIP2 zawartego w błonie komórkowej, co z kolei osłabia wiązanie żelsoliny z błoną i zwiększa w ten sposób jej stężenie w cytoplazmie. Podobną, pośrednią zależność od powstawania metabolitowego sygnału wapniowego (wywołanego pobudzeniem receptorów błonowych, któremu nie towarzyszy otwieranie kanałów jonowych w błonie plazmatycznej) wykazuje inne białko fragmentujące filamenty aktynowe, kofilina [37].

ŹRÓDŁO SYGNAŁU WAPNIOWEGO

Spontaniczne okresy wzrostu stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie migrujących komórek są powszechnie obserwowane. W pracach grupy Lee [8] oraz Pletjushkiny i wsp. [38] postuluje się aktywację kanałów wapniowych zależnych od naprężeń jako źródło sygnału wapniowego w cytoplazmie. Potwierdzenie tej tezy stanowi kolejna praca grupy Lee [11], w której wykazano związek pomiędzy powstawaniem naprężeń przenoszonych z elementów cytoszkieletu na podłoże, a pojawieniem się sygnału wapniowego. Prosty model, w którym narastające naprężenie cytoszkieletu prowadzi do otwarcia kanałów zależnych od naprężenia w błonie, a to z kolei do powstania sygnału wapniowego jest jednak obarczony szeregiem niedoskonałości. Mimo iż obecność w błonie komórkowej kanałów zależnych od naprężeń postuluje się od dawna [9], to wciąż nieznaną jest tożsamość molekularna tych kanałów. Wiadomo, że w odpowiedzi na naprężenie powierzchni komórki pojawia się prąd jonowy w poprzek błony (czyli muszą otwierać się kanały jonowe), hamowany przez dodanie jonów gadolinu do środowiska. Nie wiadomo jednak, jakie białko tworzy te hipotetyczne kanały. Istnieje jedynie szereg białek podejrzewanych o pełnienie tej funkcji. Należą one do dużej i zróżnicowanej nadrodziny białek transbłonowych, zwanej TRP (ang. *Transient Receptor Potential*), wykazujących charakterystyczne przewodnictwo stwierdzone metodami elektrochemicznymi, tworzących tetrameryczne kanały jonowe w błonie komórkowej. Białka TRP, kodowane przez co najmniej 33 geny, tworzą nadrodzinę składającą się z 7 rodzin [39].

Drugim bardzo poważnym problem spójności tej hipotezy jest to, że powstawanie sygnału wapniowego zależnego od naprężenia zdaje się być oparte o mechanizm wykorzystujący siateczkę śródplazmatyczną jako źródło wolnych jonów wapnia. Lee i wsp. wykazali w badaniach ameboidalnej formy śluzowca *Dictyostelium* [40], że użycie tapsigarginy, inhibitora pompy SERCA (ang. *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*) hamuje pojawianie się sygnału wapniowego zależnego od naprężeń. SERCA jest ATPazą wapniową przenoszącą jony wapnia z cytoplazmy do cystern siateczki śródplazmatycznej. Zahamowanie jej aktywności prowadzi do opróżnienia tego ważnego magazynu wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. Wykazano także, że mutanty *Dictyostelium iplA* (linia komórkowa HM1038) nie są w stanie wytworzyć takiego sygnału. Gen *iplA* odpowiada u *Dictyostelium* za syntezę homologu receptora IP₃ (IP₃R). Jego brak również upośledza przekazywanie sygnału od receptorów błonowych związanych z heterotrimerycznym białkiem G do magazynu wapniowego, jakim jest siateczka śródplazmatyczna. Nie jest to jednak proces bezpośredni, ale wymagający aktywności fosfolipazy, której produktem jest 1,4,5-trifosforan inozytolu, wiążący się z receptorem IP₃ i za jego pośrednictwem wywołujący sygnał wapniowy. Źródłem wolnych jonów wapnia nie jest jednak wówczas przestrzeń zewnątrzkomórkowa, jak w przypadku kanałów zależnych od naprężenia, ale siateczka śródplazmatyczna. Również „rozblyski wapniowe” opisywane przez Wei i wsp. [15], zanikały po inkubacji komórek w obecności tapsigarginy oraz ksestosponginy C (inhibitora receptorów IP₃, wywołującego podobny efekt do mutacji *iplA* w *Dictyostelium*). Obie te obserwacje wskazywałyby na siateczkę śródplazmatyczną jako źródło wolnych jonów wapnia w powstawaniu spontanicznych sygnałów wapniowych komórek ruchliwych. Nie jest to jednak zgodne z wrażliwością powstawania sygnału wapniowego na obecność jonów gadolinu w przestrzeni pozakomórkowej, co wskazuje raczej na bezpośredni napływ jonów wapnia z zewnątrz komórki przez wyraźnie wyodrębnioną klasę kanałów.

Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że białka grupy TRP są podejrzewane o udział nie tylko w napływie wapnia zależnym od naprężeń. Otóż wykazano, że TRPC1, którego podjednostki mają m. cz. ok. 80 kDa, tworzący kanały zależne od naprężeń w wielu rodzajach komórek kręgowców [41], może również uczestniczyć w zjawisku pojemnościowego napływu jonów wapnia (SOCE, ang. *Store Operated Calcium Entry*) [42]. Pojemnościowy napływ wapnia jest procesem dwuetapowym, w którym uwolnienie wolnego wapnia z magazynów siateczki śródplazmatycznej prowadzi do ich opróżnienia, co z kolei powoduje napływ wolnych jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez tak zwane kanały pojemnościowe (SOC, ang. *Store-operated channels*) [43]. Napływ pojemnościowy musi jednak być wywołany czynnikiem prowadzącym do powstawania 1,4,5-trifosforanu inozytolu na skutek aktywności fosfolipazy. Paradoks polegający na tym, że pojedyncze białko TRP wydaje się uczestniczyć w dwóch tak różnych procesach, jak pojemnościowy napływ wapnia i działanie kanałów zależnych od naprężeń, może wynikać ze zdolności białek TRP do tworzenia heterotetramerów, złożonych z więcej niż jednego białka należącego do rodziny TRP [44,45].

Obserwacje takie, jak wrażliwość powstawania sygnału wapniowego na inhibitor receptorów IP₃, wskazują, że „rozblyski wapniowe” mogą być formą pojemnościowego napływu wapnia do komórki [46]. W przypadku komórek ruchliwych, szczególną rolę odgrywają tu sygnały pochodzące od czynników wzrostu, takich jak VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego), PDGF (ang. *Platelet-derived growth factor*, czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi) i inne czynniki wzrostu związane z pobudzeniem receptorowych kinaz tyrozynowych. Kinazy te zaangażowane są w liczne procesy chemotaksji, czyli kierunkowego poruszania się komórek w gradientach chemicznych [47]. Droga wywoływania przez nie sygnału wapniowego jest już w zasadzie poznana, a szczegółowe dyskusowanie tej, niezwykle złożonej kwestii dalece wykracza poza ramy tego artykułu. Receptory te wywołują sygnał wapniowy zależny od fosfolipazy C_γ oraz IP₃ [48,49].

Jeszcze więcej niejasności w zrozumieniu mechanizmu powstawania sygnału wapniowego w komórkach ruchliwych wprowadza drugi etap generowania pojemnościowego sygnału wapniowego, a mianowicie napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego po opróżnieniu magazynów wapniowych siateczki śródplazmatycznej. Wśród podstawowych kandydatów na białka mogące tworzyć kanały SOC typowane są bowiem, podobnie jak w przypadku kanałów zależnych od naprężeń, białka TRP [50]. Obserwacje te są jednak niespójne z hipotezą o roli białek TRP w tworzeniu kanałów wrażliwych na naprężenia. Uzyskane dane o białkach TRP wskazują bowiem, że tworzone przez nie kanały mogą być blokowane przez jony gadolinu, natomiast ich aktywność nie jest wówczas zależna od stopnia opróżnienia magazynów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej [51,52]. Sugestie, że kanały złożone z białek TRP są heterotetramerami utrudniają znacznie potwierdzenie przez selektywne blokowanie syntezy pojedynczych białek TRP ich roli w napływie jonów wapnia do cytoplazmy migrujących komórek.

PODSUMOWANIE

Artykuł ten porusza jedynie tę część zagadnień związanych z wapniową regulacją ruchu komórek, która wydaje się być uniwersalna. Pamiętać należy, że każda ruchliwa komórka żyje i funkcjonuje w swoim własnym mikrośrodkowisku. Inne wyzwania stoją przed komórkami układu odpornościowego, które muszą być zdolne do opuszczenia naczynia krwionośnego i dotarcia do miejsca infekcji, a inne przed fibroblastem budującym tkankę łączną. Mimo, że komórki różnią się sposobem ruchu, to opisane powyżej mechanizmy sygnalizacji wapniowej znajdziemy w prawie każdej migrującej komórce.

Wiele elementów wapniowej regulacji ruchu pozostaje wciąż nieznanymi, jednakże postęp w badaniach nad tym zagadnieniem, jaki dokonał się w ostatnich latach jest ogromny. Jest to głównie zasługą rozwoju metod mikroskopowych, pozwalających na coraz dokładniejszą, bezpośrednią (przyżyciową) obserwację sygnału wapniowego w cytoplazmie, a także pojawieniem się możliwości selektywnego

blokowania syntezy określonych białek techniką siRNA, co pozwala znacznie łatwiej ustalić rolę poszczególnych białek w migracji komórek.

PIŚMIENNICTWO


- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576
- Goodson HV, Dawson SC (2006) Multiplying myosins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3498-3499
- Odrionitz F, Kollmar M (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8: R196
- Eddinger TJ, Meer DP (2007) Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C493-508
- Pfister G (2001) Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 497-503
- Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-1358
- Targos B, Pomorski P, Krzeminski P, Baranska J, Redowicz MJ, Kłopocka W (2006) Effect of Rho-associated kinase inhibition on actin cytoskeleton structure and calcium response in glioma C6 cells. *Acta Biochim Pol* 53: 825-831
- Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K (1999) Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400: 382-386
- Guharay F, Sachs F (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352: 685-701
- Hamill OP, McBride DW Jr (1996) The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev* 48: 231-252
- Doyle A, Marganski W, Lee J (2004) Calcium transients induce spatially coordinated increases in traction force during the movement of fish keratocytes. *J Cell Sci* 117: 2203-2214
- Chew TL, Wolf WA, Gallagher PJ, Matsumura F, Chisholm RL (2002) A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows. *J Cell Biol* 156: 543-553
- Cai Y, Sheetz MP (2009) Force propagation across cells: mechanical coherence of dynamic cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 21: 47-50
- Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P (2008) Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc* 231: 446-454
- Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H (2009) Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457: 901-905
- Roy P, Rajfur Z, Jones D, Marriott G, Loew L, Jacobson K (2001) Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning. *J Cell Biol* 153: 1035-1048
- Pomorski P, Watson JM, Haskill S, Jacobson KA (2004) How adhesion, migration, and cytoplasmic calcium transients influence interleukin-1beta mRNA stabilization in human monocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 57: 143-157
- Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR (2009) Integrins in cell migration — the actin connection. *J Cell Sci* 122: 199-206
- Nayal A, Webb DJ, Brown CM, Schaefer EM, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR (2006) Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol* 173: 587-589
- Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR (2008) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* 10: 1039-1050
- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133: 1403-1415
- Hotulainen P, Lappalainen P (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* 173: 383-394
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix — cytoskeleton cross-talk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805
- Hinz B (2006) Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol* 85: 175-181
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 56-68
- Reddien PW, Horvitz HR (2000) CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 2: 131-136
- Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K (2001) RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154: 147-160
- Munevar S, Wang YL, Dembo M (2004) Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺ entry. *J Cell Sci* 117: 85-92
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801
- Undyala VV, Dembo M, Cembrola K, Perrin BJ, Huttenlocher A, Elce JS, Greer PA, Wang YL, Beningo KA (2008) The calpain small subunit regulates cell-substrate mechanical interactions during fibroblast migration. *J Cell Sci* 121: 3581-3588
- Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6: 977-983
- Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll DE, Saido TC, Fox JE (2000) Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J Cell Biol* 151: 685-696
- Yaroslavskiy BB, Sharrow AC, Wells A, Robinson LJ, Blair HC (2007) Necessity of inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor 1 and mu-calpain in NO-induced osteoclast motility. *J Cell Sci* 120: 2884-2894
- Huber PA (1997) Caldesmon. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1047-1051
- Kordowska J, Huang R, Wang CL (2006) Phosphorylation of caldesmon during smooth muscle contraction and cell migration or proliferation. *J Biomed Sci* 13: 159-172
- Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D (2004) Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 61: 2614-2623
- DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J (2005) Cofilin takes the lead. *J Cell Sci* 118: 19-26
- Pletjushkina OJ, Rajfur Z, Pomorski P, Oliver TN, Vasiliev JM, Jacobson KA (2001) Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 48: 235-244
- Guibert C, Ducret T, Savineau JP (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98: 10-23
- Lombardi ML, Knecht DA, Lee J (2008) Mechano-chemical signaling maintains the rapid movement of *Dictyostelium* cells. *Exp Cell Res* 314: 1850-1859
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185
- Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX (2002) Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L144-155
- Parekh AB, Putney JW Jr (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85: 757-810
- Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 277: 48303-48310

45. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278: 39014-39019
46. Berridge M (2004) Conformational coupling: a physiological calcium entry mechanism. *Sci STKE* 2004: pe33
47. Affolter M, Weijer CJ (2005) Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev Cell* 9: 19-34
48. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR (1991) Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca^{2+} and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 213-221
49. Cook SJ, Lockyer PJ (2006) Recent advances in Ca^{2+} -dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell Calcium* 39: 101-112
50. Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82: 429-472
51. Hu Y, Schilling WP (1995) Receptor-mediated activation of recombinant Trpl expressed in Sf9 insect cells. *Biochem J* 305 (Pt 2): 605-611
52. Hu Y, Vaca L, Zhu X, Birnbaumer L, Kunze DL, Schilling WP (1994) Appearance of a novel Ca^{2+} influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 1050-1056

Calcium regulation of cell migration

Paweł Pomorski 

Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warszawa, Poland

 e-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl

Key words: calcium signalling, calcium ions, cell motility, adhesion

ABSTRACT

Cell migration is a phenomenon requiring close regulation of numerous biochemical processes. Motile cells have to orchestrate countless symtalanous biochemical pathways as well as properly react to change in environment, and respond to stimuli generated by other cells. One of the most universal ways of subcellular information transmission is a system based on changes in concentration of cytoplasmic free calcium ion. The article summarizes the current knowledge on the role of calcium signalling in regulation of the processes indispensable of cell migration such as actomyosin contractility, cell adhesion and cytoskeleton dynamics. The possible influence of mechanical effects of cell motility on emerging of calcium signal is also discussed.

Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych

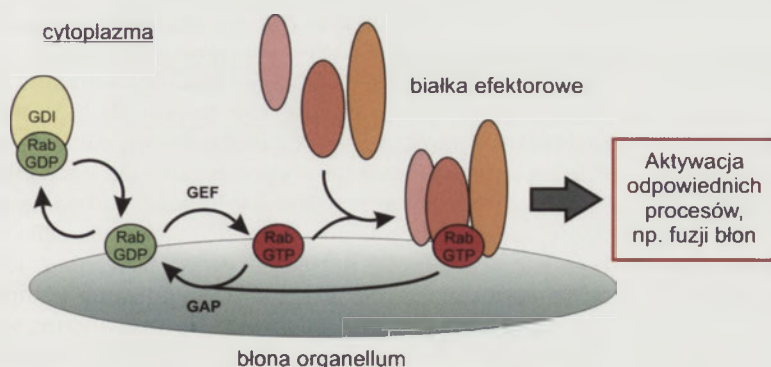
STRESZCZENIE

GTPaza Rab5 jest wielofunkcyjnym białkiem regulującym wczesne etapy endocytozy, a różnorodność jej funkcji wynika z oddziaływań z licznymi białkami efektorowymi, takimi jak: Rabaptyna-5/Rabex-5, EEA1, kinazy 3-fosfatydyloinozytolu hVPS34-p150 i p110 β -p85 α , fosfatazy 4- i 5- fosfatydyloinozytolu, Rabenozyna-5/hVPS45, Rabankryna-5, Huntingtyna-HAP40, APPL1 i APPL2. Białka te specyficznie wiążą aktywną formę Rab5, regulując procesy dokowania i fuzji błon endosomalnych, ruchu endosomów oraz przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. Scharakteryzowanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oddziaływanie białek efektorowych Rab5 z błonami wczesnych endosomów, wykazało m. in. kluczowe znaczenie fosfatydyloinozytolo-3-fosforanu (PI(3)P) w tym procesie. Przyczyniło się to do sformułowania koncepcji tzw. domen białek Rab jako modułów budujących błony endosomów, nadających tym organelom ich tożsamość biochemiczną i funkcjonalną. Z kolei badania białek efektorowych APPL1 i APPL2 wskazują na rolę Rab5 w skoordynowanej regulacji procesów endocytozy i wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów.

GTPazy TYPU RAB I MECHANIZMY ICH DZIAŁANIA

Jedną z kluczowych grup białek regulujących rozliczne aspekty procesów transportu wewnątrzkomórkowego, ruchu komórek oraz przekazywania sygnałów są małe GTPazy należące do nadrodziny Ras (ang. *small GTPases of the Ras superfamily*), obejmujące rodziny Ras, Rho, Rab, Arf i Ran [1]. Najliczniejszą grupę spośród nich stanowią białka Rab (u człowieka liczy ona 60 członków), które regulują poszczególne etapy wydzielania (egzocytozy) i endocytozy we wszystkich komórkach eukariotycznych [2,3].

Podobnie do innych GTPaz, białka Rab mają zdolność wiązania nukleotydów guaninowych i hydrolizy GTP, jednakże szybkość samoistnej wymiany nukleotydów (GDP na GTP) oraz hydrolizy GTP jest w przypadku białek Rab bardzo niska i w związku z tym mogą one istnieć w dwóch stabilnych konformacjach: aktywnej po związaniu GTP i nieaktywnej w kompleksie z GDP [4]. Oscylując pomiędzy tymi dwoma stanami, białka Rab odgrywają rolę „molekularnych przełączników” (ang. *molecular switches*) w procesach wydzielania i endocytozy. Znane są dwa typy białek regulatorowych ułatwiających białkom Rab przybranie odpowiedniej konformacji. Są to czynniki przyspieszające wymianę nukleotydu (GEF, ang. *guanine nucleotide exchange factor*), które ułatwiają dysocjację GDP i związanie GTP i w ten sposób aktywują Rab, oraz białka zwiększające aktywność GTPazową (GAP, ang. *GTPase-activating protein*), które przyspieszają hydrolizę GTP i inaktywują białka Rab [5] (Ryc. 1).



Rycina 1. Schemat działania GTPazy Rab. Białka Rab w stanie nieaktywnym są dostarczane do cytosolu do błon organeli oraz usuwane z nich za pośrednictwem białka opiekuńczego GDI. Na powierzchni błon białka Rab podlegają cyklom aktywacji i inaktywacji wynikającym z wiązania i hydrolizy nukleotydów guaninowych, katalizowanych odpowiednio przez czynniki typu GEF i GAP. Jedynie w formie aktywnej związanej z GTP, GTPazy Rab oddziałują z białkami efektorowymi na powierzchni błon organeli wewnątrzkomórkowych i aktywują regulowane przez siebie procesy, np. fuzję błon.

Marta Olchowik

Marta Miączyńska

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Pracownia Biologii Komórki, Warszawa

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Pracownia Biologii Komórki, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa; tel.: (022) 597 07 25, e-mail: miaczyńska@iimcb.gov.pl

Artykuł otrzymano 22 marca 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 23 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: GTPaza Rab5, białka efektorowe, kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, fosforan 3-fosfatydyloinozytolu, domena Rab5, białka APPL

Wykaz skrótów: GAP (ang. *GTPase-activating protein*) – białko zwiększające aktywność GTPazową; GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*) – inhibitor dysocjacji GDP (białko opiekuńcze); GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) – czynnik przyspieszający wymianę nukleotydu guaninowego; EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; kinaza PI3 – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PI – fosfatydyloinozytol, PI(3)P – fosfatydyloinozytolo-3-fosforan; PI(3,4)P₂ – fosfatydyloinozytolo-3,4-dwufosforan; PI(3,4,5)P₃ – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforan; TGF- β (ang. *transforming growth factor* β) – transformujący czynnik wzrostu β

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego na finansowanie badań wspólnych sieci naukowej „Mechanizmy Ruchów Komórkowych (Mobilias.pl)” uzyskanych z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Cechą charakterystyczną białek Rab jest ich ściśle wyznaczone rozmieszczenie w komórce [3]. Poszczególne białka tej klasy są zlokalizowane w błonach określonych organelli komórkowych i regulują dzięki temu dany etap transportu w procesie wydzielania lub endocytozy. Na przykład, białko Rab5 wiąże się z błonami wczesnych endosomów i innych organelli zaangażowanych we wstępne etapy endocytozy, białko Rab7 występuje w błonach późnych endosomów, a białka Rab1 i Rab2 lokalizują się w błonach aparatu Golgiego. Ponadto, białka Rab, które są związane z błonami jedynie w sposób peryferyjny z użyciem „kotwicy” prenylowej, mogą krążyć pomiędzy cytoplazmą a powierzchnią błon odpowiednich organelli wewnątrzkomórkowych w procesie regulowanym przez białko opiekuńcze GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*), utrzymujące GTPazy Rab w formie nieaktywnej w kompleksie z GDP [6].

Dwa cykle, którym podlegają białka Rab: zmian konformacji wynikających z wiązania i hydrolizy nukleotydów oraz wewnątrzkomórkowej redystrybucji pomiędzy cytoplazmą a powierzchnią błon organelli, są ze sobą powiązane [6]. Białka Rab w kompleksie z GDP występują zarówno w cytoplazmie, jak i na błonach, natomiast formy związane z GTP są obecne jedynie na powierzchni błon organelli (Ryc. 1). Białko Rab w kompleksie z GDP obecne w cytosolu zostaje dostarczone do odpowiedniej dla siebie błony docelowej przez białko opiekuńcze GDI, które oddysocjowuje po związaniu Rab z błoną. W obecności specyficznych czynników GEF białko Rab zakotwiczone w błonie może ulec aktywacji dzięki uwolnieniu GDP i związaniu GTP, którego stężenie w komórce jest wyższe niż GDP [5]. Tak aktywowane białko może oddziaływać z białkami efektorowymi (wykonawczymi), które są pośrednikami i rzeczywistymi wykonawcami procesów regulowanych przez białka Rab, takich jak np. fuzja błon w procesie transportu. Po wykonaniu zadania, hydroliza GTP do GDP wspomagana przez białka GAP powoduje dysocjację białek efektorowych, inaktywację białka Rab i zakończenie regulowanego przez nie procesu. Białko Rab w kompleksie z GDP może zostać usunięte z powierzchni błon za pośrednictwem białka opiekuńczego GDI, a następnie ponownie dostarczone z cytosolu do odpowiednich błon, aby aktywować kolejne procesy, np. nową rundę fuzji organelli.

IDENTYFIKACJA BIAŁEK EFEKTOROWYCH DLA GTPazy RAB5

Istotą działania białek Rab jest ich oddziaływanie z białkami efektorowymi, regulowane w czasie (poprzez cykle wiązania i hydrolizy GTP) i w przestrzeni (poprzez lokalizację na powierzchni błon specyficznych organelli). Z końcem lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia opisane zostały cykliczne zasady działania białek Rab w komórce. Na początku znane były zaledwie dwa białka efektorowe dla białek Rab: Rabaptyna-5, specyficzna dla Rab5 [7], oraz Rabfilina, specyficzna dla Rab3 [8]. Następnie odkryto dwa kolejne efekторы dla białka Rab5: Rabaptynę-5 β [9] oraz EEA1 (ang. *early endosome-associated antigen*) [10]. Białko Rab5 było uprzednio scharakteryzowane jako kluczowy regulator wczesnych etapów endocytozy oraz fuzji wczesnych endosomów *in vitro* [11,12]. Rab5 jest zlokalizowane

przede wszystkim na powierzchni błon wczesnych endosomów, a także w cytoplazmatycznej warstwie błony komórkowej oraz na błonach pęcherzyków opłaszczonych klatryną, formowanych z błony komórkowej [11]. Prawdziwym przełomem okazały się doświadczenia wykonane w grupie Marino Zerzala, opublikowane w roku 1999 i wykazujące, że białko Rab5 w kompleksie z GTP oddziałuje z dużą liczbą białek cytoplazmatycznych [13].

W doświadczeniach tych w celu identyfikacji białek efektorowych zastosowano chromatografię powinowactwa, w przebiegu której inkubowano oczyszczone rekombinowane białko fuzyjne transferazy S-glutationu (GST, ang. *glutathione S-transferase*) i Rab5 z cytozolem otrzymanym z mózgow bydlęcych [14]. Białko fuzyjne GST-Rab5 było stabilizowane w formie aktywnej związanej z GTP γ S (wolno hydrolizowanym analogiem GTP) oraz w formie nieaktywnej w kompleksie z GDP. Po odpłukaniu czynników wiążących się niespecyficznie, białka oddziałujące z aktywną lub nieaktywną formą GST-Rab5 zostały wymyte buforem zawierającym wysokie stężenie czynnika chelatującego jony magnezu, których brak powoduje uwolnienie nukleotydu związanego przez GTPazy. W ten sposób wykazano, że w przeciwieństwie do zaledwie kilku białek oddziałujących z Rab5-GDP, liczba białek obecnych w roztworze wymytem z kolumny zawierającej Rab5-GTP γ S wyniosła ponad dwadzieścia. Do chwili obecnej scharakteryzowano pod względem funkcjonalnym następujące białka: Rabex-5, Rabaptyna-5 i Rabaptyna-5 β , EEA1, kinazy hVPS34-p150 i p110 β -p85 α , fosfatazy 4- i 5- fosfatydyloinozytolu, Rabenozyna-5/hVPS45, Rabankryryna-5, Huntingtyna-HAP40, APPL1 i APPL2. Są one omówione szczegółowo poniżej, a najważniejsze informacje dotyczące tych białek zostały przedstawione w Tabeli 1.

RABAPTYNA-5 I RABEX-5

Warunkiem wiązania białek efektorowych przez GTPazę Rab jest jej uprzednia aktywacja, zachodząca (Ryc. 1) za pośrednictwem specyficznych czynników GEF. Pierwszym poznany czynnik GEF dla Rab5 był Rabex-5 [15]. Białko to nie występuje w komórce samodzielnie, lecz pozostaje zawsze w kompleksie z Rabaptyną-5 (pierwszym opisanym białkiem efektorowym dla Rab5 [7]) lub ze spokrewnioną strukturalnie i funkcjonalnie Rabaptyną-5 β [9]. Rekombinowany kompleks Rabaptyna-5/Rabex-5 zwiększa fuzję endosomów w sposób znacznie wydajniejszy niż jego pojedyncze składniki, a ponadto powiązanie z Rabaptyną-5 stymuluje aktywność Rabex-5 w wymianie nukleotydów białka Rab5 [16]. Kompleks ten jest rekrutowany do błon endosomalnych w sposób zależny od ilości obecnego w nich białka Rab5 [16]. Sama Rabaptyna-5 praktycznie nie jest zdolna do wiązania się z błonami, natomiast Rabex-5 oddziałuje z błonami w sposób niezależny od Rab5 (co, jak wykazano, może wynikać ze zdolności Rabex-5 do oddziaływania z ubikwitylowanymi białkami; [17-19]). Występowanie kompleksu Rabaptyna-5/Rabex-5 jest przykładem mechanizmu współdziałania białka efektorowego i czynnika GEF, mającym na celu maksymalizację aktywacji Rab5 i jego stabilizację w formie aktywnej (Rab5 aktywowane przez Rabex-5 jest natychmiast wiązane przez Rabaptynę-5, co zapobiega hydrolizie GTP prowadzącej do inaktywacji GTPazy). Jednocześnie Rabex-5 związany z Rabaptyną-5 może aktywować sąsia-

Tabela 1. Białka efektorowe i regulatorowe GTPazy Rab5 oraz ich funkcje

Nazwa	Masa	Domeny	Oddziałujące białka i lipidy	Funkcja
APPL1	80 kDa	BAR, PH, PTB	Rab5, DCC, AKT2, białka kompleksu NuRD/MeCP1, receptor adiponektyny, receptor hormonu folikulotropowego	znacznik odrębnej populacji wczesnych endosomów; udział w proliferacji komórek i regulacji transportu glukozy pod wpływem insuliny; przekazywanie sygnałów z endosomów do jądra
APPL2	74 kDa	BAR, PH, PTB	Rab5, białka kompleksu NuRD/MeCP1	znacznik odrębnej populacji wczesnych endosomów; udział w proliferacji komórek; przekazywanie sygnałów z endosomów do jądra
EEA1	162 kDa	palec cynkowy typu C2H2, domena o strukturze zwiniętych helis (ang. <i>coiled coil</i>), domena FYVE	Rab5, Rab22a, białka typu t-SNARE (syntaksyny 6 i 13), PI(3)P	regulacja dokowania i fuzji błon endosomalnych
Fosfataza 4- fosfatydyloinozytolu (fosfataza PI4) typu Ia	110 kDa	domena C2	Rab5	defosforylacja PI(3,4)P ₂ do monofosforanu PI(3)P
Fosfataza 5-fosfatydyloinozytolu (fosfataza PI5) typu II (fosfatazy: INPP5B i OCRL)	OCRL: 104 kDa INPP5B: 113 kDa	fosfataza INPP5B i OCRL posiadają domeny katalityczne, ASH i Rho-GAP	Rab5, APPL1, a fosfataza OCRL oddziałuje dodatkowo z klatryną	defosforylacja PI(3,4,5)P ₃ do dwufosforanu PI(3,4)P ₂ ; mutacje w fosfatazie OCRL związane są z syndromem Lowe'a
Huntingtyna-HAP40	kompleks dwóch białek, Huntingtyna: 348 kDa HAP40: 40 kDa	Huntingtyna: domeny HEAT	Huntingtyna wiąże liczne białka HIP (ang. <i>Huntingtin-interacting protein</i>) oraz HAP (ang. <i>Huntingtin-associated protein</i>) HAP40 wiąże Rab5	regulacja dynamiki wczesnych endosomów poprzez modulację ich oddziaływań z cytoskieletem aktynowym i mikrotubulami
Kinaza PI3 klasy III (hVPS34-p150)	kompleks dwóch białek, hVPS34: 101 kDa p150: 153 kDa	podjednostka katalityczna hVPS34: domena katalityczna PI3K/PI4K; podjednostka regulatorowa p150: domena kinazy serynowo-treoninowej, trzy domeny HEAT, siedem domen WD	podjednostka p150 wiąże Rab5	produkcja PI(3)P z fosfatydyloinozytolu w błonie endosomów
Kinaza PI3 klasy I (p110β-p85α)	kompleks dwóch białek, p110β: 122 kDa p85α: 84 kDa	podjednostka katalityczna p110β: domena katalityczna PI3K/PI4K; podjednostka regulatorowa p85α: domeny SH3, Rho-GAP, dwie domeny SH2	podjednostka p110β wiąże Rab5; podjednostka p85α wiąże liczne białka zawierające regiony bogate w prolinę (przez domenę SH3) lub fosforylowane reszty tyrozyny (przez domenę SH2)	fosforylacja PI(4,5)P ₂ do PI(3,4,5)P ₃ oraz PI(4)P do PI(3,4)P ₂ ; udział w fuzji heterotypowej pęcherzyków oplaszczonych klatryną i endosomów
Kinezyzna KIF16B	152 kDa	domena motoryczna typu kinezyn, domeny FHA, PX i wiązania ATP, domeny o strukturze zwiniętych helis (ang. <i>coiled coil</i>)	mikrotubule, PI(3)P	transport wczesnych endosomów w kierunku końców plus mikrotubul
Rabankryna-5	129 kDa	domena BTB/POZ, 21 powtórzeń motywu ankyryny, domena FYVE	Rab5, PI(3)P	fuzja homotypowa wczesnych endosomów, udział w procesie makropinocytozy
Rabaptyna-5	99 kDa	dwie domeny o strukturze zwiniętych helis (ang. <i>coiled coil</i>)	Rab5, Rab4, Rabex-5, γ-adaptyna	stabilizacja aktywnej formy Rab5; udział w fuzji błon endosomów i transporcie ładunku przez endosomy recykliczujące
Rabenozyzna-5	88 kDa	palec cynkowy typu C2H2, motyw NPF, domena FYVE	Rab5, Rab4, hVPS45, EHD1, PI(3)P	udział w fuzji heterotypowej pęcherzyków oplaszczonych klatryną i endosomów; regulacja transportu ładunku na szlaku recykliczacji
Rabex-5	80 kDa	palec cynkowy typu A20, domena MIU odpowiedzialna za oddziaływanie z ubikwitylowanymi białkami, domena katalityczna VPS9	Rab5, Rabaptyna-5, ubikwitylowane białka	czynnik przyspieszający wymianę nukleotydu guaninowego (GEF) dla Rab5

dujące cząsteczki Rab5, prowadząc do powstania regionu błony o dużym lokalnym stężeniu aktywnego Rab5, zdolnego do wiązania dalszych efektorów.

EEA1

Jednym z najistotniejszych białek efektorowych GTPazy Rab5 oraz regulatorem homotypowej fuzji wczesnych endosomów jest białko EEA1, powszechnie uznawane za znacznik tego przedziału komórkowego [20]. Jednocześnie EEA1 jest niezbędne w procesie heterotypowej fuzji pęcherzyków opłaszczonych klatryną i wczesnych endosomów [21]. W tym wypadku obecność EEA1 na powierzchni endosomów służy wyszczególnieniu błony docelowej, z którą nadchodzące pęcherzyki powinny się połączyć na drodze fuzji. EEA1 jest zakotwiczone w błonie endosomów swoim C-końcem, w którym znajduje się motyw FYVE wiążący fosfatydyloinozytolo-3-fosforan (PI(3)P) [22] oraz domena oddziaływać z Rab5-GTP [10,20]. Jednocześnie na N-końcu białka EEA1, które w całości ma kształt wydłużonej pałeczki (ang. *extended rod*), znajduje się druga domena zdolna do wiązania Rab5-GTP [10]. Wykorzystując obie domeny, EEA1 może przejściowo łączyć ze sobą dwie błony zawierające aktywne Rab5 w procesie rozpoznawania (dokowania; ang. *docking*) błon przed fuzją. W ten sposób EEA1 zakotwiczone w błonie wczesnych endosomów może rozpoznawać aktywne Rab5 obecne na powierzchni pęcherzyka, inicjując proces fuzji błon. W przeciwieństwie do błon endosomów wzbogaconych w PI(3)P, brak kinazy 3-fosfatydyloinozytolo (kinazy PI3) klasy III produkującej ten lipid w błonach pęcherzyków klatrynowych powoduje, że białko EEA1 nie jest wydajnie rekrutowane do błon tych organelli, pomimo obecności aktywnego Rab5 [21]. Rola EEA1 w regulacji dokowania i fuzji błon wiąże się ponadto z jego bezpośrednim oddziaływaniem z białkami typu t-SNARE, pośredniczącymi w procesie fuzji, syntaksyną 6 i 13 [23,24].

KINAZA PI3 KLASY III (hVPS34-p150)

Wśród białek wiążących Rab5-GTP γ S znajdują się dwa typy kinaz PI3: kompleks p110 β -p85 α , reprezentujący klasę I, oraz kompleks hVPS34-p150 klasy III [25]. Klasy te różnią się specyficznością substratów: klasa I preferencyjnie modyfikuje fosfatydyloinozytolo-4,5-dwufosforan (PI(4,5)P₂) oraz fosfatydyloinozytolo-4-fosforan (PI(4)P), tworząc, odpowiednio, trójfosforan PI(3,4,5)P₃ i dwufosforan PI(3,4)P₂, natomiast klasa III modyfikuje fosfatydyloinozytol (PI) do PI(3)P [26]. Wcześniejsze badania wykazały, że EEA1 posiada motyw strukturalny o nazwie FYVE, który specyficznie wiąże się z PI(3)P w błonach organelli [22], w związku z tym odkrycie enzymu produkującego ten lipid wśród białek wiążących Rab5-GTP zasugerowało istnienie mechanizmów koordynujących rekrutację EEA1 do błon zawierających aktywne Rab5 i PI(3)P. Zablokowanie aktywności kinazy PI3 hVPS34-p150 (z użyciem przeciwciał lub inhibitorów farmakologicznych) powoduje zahamowanie wiązania białka EEA1 do wyizolowanych błon endosomów, mimo że zawierają one Rab5 [25]. Oznacza to, że w warunkach fizjologicznych białko EEA1 wymaga obecności zarówno aktywnej formy Rab5, jak i PI(3)P do przyłączenia się do powierzchni błon endosomów. W warunkach zahamowanej aktywności kinazy PI3 hVPS34-p150 wiązanie EEA1 do błon endoso-

mów *in vitro* może zostać przywrócone po wprowadzeniu do błon rekombinowanego Rab5 w ilościach co najmniej dziesięciokrotnie przewyższających stężenia fizjologiczne [25]. Zablokowanie funkcji kompleksu hVPS34-p150 hamuje ponadto fuzję wczesnych endosomów *in vivo* i *in vitro*.

Rola kinazy PI3 klasy III (hVPS34-p150) jako kluczowego białka efektorowego dla Rab5, które jest niezbędne do produkcji lipidu PI(3)P, warunkującego wiązanie się dalszych białek efektorowych, została po raz pierwszy wykazana dla białka EEA1 [25]. W następnych latach okazało się, że wśród innych białek oddziałujących z Rab5-GTP są dalsze białka efektorowe posiadające motywy FYVE lub PX wiążące PI(3)P, takie jak: Rabenozyna-5 [27], Rabankryna-5 [28] i Rabip4' [29], a także niewiążąca Rab5 bezpośrednio, ale zależna od niego funkcjonalnie, kinezyna KIF16B [30]. Aktywne białko Rab5 oddziałuje z kinazą PI3 hVPS34-p150, wzbogacając dany obszar błony endosomalnej w PI(3)P i stwarzając miejsca wiązania białek efektorowych rozpoznających zarówno Rab5-GTP, jak i PI(3)P [31]. W ten sposób kinaza PI3 hVPS34-p150 okazała się kluczowym białkiem efektorowym dla Rab5, zdolnym do lokalnej modyfikacji składu błon endosomów i kierującym wiązaniem dalszych białek efektorowych.

KINAZA PI3 KLASY I (p110 β -p85 α) I FOSFATAZY 4- I 5-FOSFATYDYLOINOZYTOLU

O ile rola kinazy PI3 klasy III wśród białek wiążących Rab5-GTP została wyjaśniona w oparciu o funkcję jej produktu PI(3)P w oddziaływaniu z EEA1, to znaczenie oddziaływania kinaz PI3 klasy I (kompleksu p110 β -p85 α) z Rab5 było początkowo nieznanne. Błony pęcherzyków opłaszczonych klatryną zawierają znaczne ilości kinazy PI3 klasy I (kompleks p110 β -p85 α), podczas gdy podjednostki klasy III (kompleks hVPS34-p150) są w nich niemal niewykrywalne [25]. Proporcja ta była odwrotna w przypadku błon wczesnych endosomów, co wskazywało, że w pęcherzykach klatrynowych i wczesnych endosomach produkowane są różne formy fosfatydyloinozytolo i, co za tym idzie, rekrutowane są inne zestawy białek wiążących te lipidy. Okazało się, że kinaza klasy I (p110 β -p85 α) jest wymagana jedynie w fuzji heterotypowej pęcherzyków i endosomów, natomiast kinaza klasy III (hVPS34-p150) jest niezbędna także w fuzji homotypowej endosomów. Różne rozmieszczenie kinaz PI3 klas I i III pomiędzy pęcherzykami opłaszczonymi klatryną i endosomami sugerowało, że różne białka efektorowe mogą oddziaływać preferencyjnie z Rab5 zlokalizowanym w pewnych organellach komórkowych i regulować tylko wybrane aspekty funkcji tej GTPazy.

Dalsze badania wykazały, że kinazy PI3 nie są jedynymi enzymami regulującymi metabolizm fosfatydyloinozytolo i będącymi efektorami GTPazy Rab5. Stwierdzono, że Rab5 oddziałuje bezpośrednio również z dwoma spokrewnionymi fosfatazami 5-fosfatydyloinozytolo (fosfataza PI5) typu II (białka INPP5B i OCRL) oraz z fosfatazą 4-fosfatydyloinozytolo (fosfataza PI4) typu I α , a wiązanie Rab5 stymuluje ich aktywność enzymatyczną [32]. Co ciekawe, niezależnie od wiązania Rab5, fosfatazy PI5 INPP5B i OCRL oddziałują także z APPL1 i APPL2, kolejnymi białkami efektorowymi Rab5 opisanymi poniżej, co świadczy o sieci wzajemnych powiązań pomiędzy efektorami [33]. Fosfatazy PI5 i PI4 są

rozpuszczalnymi białkami cytoplazmatycznymi, ale po nadekspresji konstytutywnie aktywnego mutantu Rab5-Q79L (pozostającego preferencyjnie w formie aktywnej związanej z GTP) są wykrywalne także na powierzchni wczesnych endosomów, wskazując na to, że Rab5 uczestniczy w ich rekrutacji do błon. Odkrycie fosfatyz PI5 i PI4 wyjaśniło jednocześnie rolę kinazy PI3 klasy I jako efektora Rab5. Wykazano, że główny produkt kinazy p110β-p85α, PI(3,4,5)P₃, jest jednocześnie substratem dla fosfatyz PI5 INPP5B i OCRL, które przekształcają go w dwufosforan PI(3,4)P₂, będący z kolei substratem dla fosfatazy PI4 typu Ia defosforylującej go do monofosforanu PI(3)P [32]. W ten sposób Rab5, poprzez oddziaływanie z poszczególnymi enzymami, reguluje cykl produkcji PI(3,4,5)P₃ (katalizowany przez kinazę PI3 klasy I p110β-p85α), a następnie jego defosforylację do PI(3)P, który jest kluczowym lipidem dla funkcjonowania wczesnych endosomów i rekrutacji innych białek efektorowych Rab5. Wydaje się, że cykl ten jest też skoordynowany w czasie z transportem ładunku endocytarnego z błony komórkowej poprzez pęcherzyki oplaszczone klatryną do wczesnych endosomów, gdyż PI(3,4,5)P₃ jest produkowany głównie w błonie komórkowej i pęcherzykach klatrynowych, a PI(3)P występuje przede wszystkim we wczesnych endosomach. W ten sposób defosforylacja PI(3,4,5)P₃ do PI(3)P może przyczyniać się do zapewnienia kierunkowości transportu endocytarnego. Drugim, równoległym szlakiem produkcji PI(3)P regulowanym przez Rab5 jest jego bezpośrednia synteza poprzez fosforylację PI, katalizowana przez kinazę typu III hVPS34-p150.

RABENOZYNA-5/hVPS45

Jednym z białek efektorowych wchodzących w skład kompleksu zaangażowanego w fuzję endosomów jest białko Rabenozyina-5 [27]. Tak jak wcześniej opisane EEA1, posiada ono domenę FYVE i rekrutowane jest do błon wczesnych endosomów w sposób zależny od kinazy PI3 hVPS34-p150. Po zastosowaniu inhibitora kinaz PI3 (wortmaniny) Rabenozyina-5 nie wiąże się z błonami endosomów, co podkreśla fakt, że przemieszczenie się Rabenozyiny-5 z cytosolu do endosomów wymaga obecności PI(3)P. Rabenozyina występuje w kompleksie z białkiem hVPS45, ludzkim homologiem drożdżowego białka Vps45p, należącego do rodziny Sec1, która obejmuje białka regulujące funkcję białek SNARE w fuzji błon komórkowych. Rabenozyina-5 i hVPS45 są rekrutowane do błon endosomów jako kompleks, w którym jedynie Rabenozyina-5 wiąże się z Rab5, a białko hVPS45 oddziałuje z białkami typu t-SNARE: syntaksynami 4, 6 i 13. Usunięcie Rabenozyiny-5 z cytosolu hamuje fuzję homotypową wczesnych endosomów oraz heterotypową wczesnych endosomów z pęcherzykami oplaszczonymi klatryną *in vitro*, demonstrując, że kompleks Rabenozyina-hVPS45 jest niezbędny w procesie fuzji błon endosomalnych [27].

RABANKYRYNA-5

Kolejnym efektem GTPazy Rab5, zawierającym motyw FYVE jest Rabankyrina-5 [28]. Endogenna Rabankyrina-5 kolokalizuje w około 80% z EEA1 na wczesnych endosomach, gdzie jest rekrutowana poprzez oddziaływanie z Rab5 i PI(3)P. Badania z użyciem cytosolu pozbawionego Rabankyriny-5 poprzez inkubację ze specyficznymi prze-

ciwciami wykazały, że homotypowa fuzja wczesnych endosomów była w tych warunkach hamowana, natomiast fuzja heterotypowa pomiędzy wczesnymi endosomami a pęcherzykami oplaszczonymi klatryną była tylko minimalnie zaburzona. Oprócz lokalizacji Rabankyriny-5 na powierzchni wczesnych endosomów wykazano, że białko to bierze udział w procesie makropinocytozy, która jest specyficzną formą endocytozy, umożliwiającą pobieranie dużych objętości płynu zewnątrzkomórkowego [34]. Makropinocytoza może być wzbudzona poprzez stymulację czynnikami wzrostu, np. w komórkach A431 naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF; ang. *epidermal growth factor*). W komórkach tych endogenna Rabankyrina-5 lokalizowała się w powiększonych strukturach – makropinosomach, które były pozbawione internalizowanej transferyny, natomiast były wzbogacone w EGF [28]. Potraktowanie komórek wortmaniną nie spowodowało oddysocjowania Rabankyriny-5 z endosomów, jak w przypadku EEA1, sugerując, że istnieje inny czynnik powodujący wiązanie Rabankyriny-5 na powierzchni makropinosomów. Z kolejnych przeprowadzonych badań wynikało, że Rabankyrina-5 indukuje makropinocytozę w sposób zależny od GTPazy Rab5. Podwójna rola Rab5 i Rabankyriny-5 w funkcjonowaniu endosomów i makropinosomów sugeruje ich udział w skoordynowaniu tych dwóch procesów.

KINEZYNA KIF16B

W procesie regulowanym przez GTPazę Rab5 i jej efektor kinazę hVPS34, kinezyina KIF16B odpowiedzialna jest za transport wczesnych endosomów w kierunku końców plus mikrotubul [30]. Kinezyina KIF16B nie jest białkiem efektorowym Rab5, gdyż nie wykazano ich bezpośredniego wiązania, natomiast stwierdzono pomiędzy nimi wiele zależności funkcjonalnych. Nadprodukcja KIF16B powoduje zmianę lokalizacji wczesnych endosomów z okolic jądra komórkowego w pobliże błony komórkowej oraz hamuje transport ładunku endocytarnego w kierunku degradacji w lizosomach. Charakterystyczną cechą strukturalną KIF16B jest domena PX. Znajduje się ona na C-końcu białka i jest odpowiedzialna za oddziaływanie kinezyiny z wczesnymi endosomami poprzez wiązanie do PI(3)P. Doświadczenia przeprowadzone w komórkach HeLa z wykorzystaniem przeciwciał do wykrywania endogennej kinezyiny KIF16B wykazały znaczącą kolokalizację z białkiem zawierającym motyw tzw. 2xFYVE (dwa motywy FYVE w tandemie) jako znacznikiem dla PI(3)P na wczesnych endosomach. Natomiast potraktowanie komórek wortmaniną spowodowało uwolnienie KIF16B z wczesnych endosomów do cytosolu. Również nadekspresja nieaktywnego mutantu Rab5-S34N (nieulegającego aktywacji i pozostającego w formie związanej z GDP) dała taki sam efekt. Sugeruje to, że KIF16B jest lokalizowana na endosomach w sposób zależny od Rab5 i kinazy PI3 produkującej PI(3)P. Obniżenie w komórkach HeLa poziomu białka KIF16B (z użyciem interferującego RNA) spowodowało szybszą akumulację transferyny oraz opóźniło jej powrót (recyklicację) do błony komórkowej. Natomiast nadprodukcja KIF16B zapobiegła skierowaniu EGF i jego receptora na szlak degradacji, powodując ich przedłużoną akumulację we wczesnych endosomach. Wyniki te dowodzą, że kinezyina KIF16B jest odpowiedzialna za prawidłowe rozmieszczenie wczesnych endosomów w

komórce oraz ich ruch w kierunku końców plus mikrotubul, co może ułatwiać transport ładunku pomiędzy wczesnymi endosomami a błoną komórkową na szlaku recyklicacji [30].

HUNTINGTYNA-HAP40

Huntingtyna jest białkiem zmutowanym w płasawicy Huntingtona, które wiąże szereg białek HIP (ang. *Huntingtin-interacting protein*) oraz HAP (ang. *Huntingtin-associated protein*). Białko HAP40, które jest nowo poznany efektor GTPazy Rab5, oddziałuje z C-końcem Huntingtyny, a kompleks Huntingtyna-HAP40 wiąże się z aktywną formą Rab5 na wczesnych endosomach [35]. Wykazano, że ani białko HAP40, ani C-końcowy fragment Huntingtyny nie wiążą się z Rab4, Rab6, Rab7 czy Rab11, dowodząc że oddziaływanie z Rab5 jest specyficzne. Z przeprowadzonych doświadczeń wiadomo, że endogenne białko HAP40 lokalizuje się w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym, a Huntingtyna na strukturach cytoplazmatycznych, w wyniku czego kolokalizacja pomiędzy tymi dwoma białkami była bardzo słabo wykrywalna. Natomiast nadprodukcja HAP40 powodowała jego relokację na powierzchnię wczesnych endosomów wyznakowanych Rab5, gdzie bardzo wyraźnie kolokalizowało z Huntingtyną. Lokalizacja ta była jeszcze bardziej wzmocniona w przypadku zastosowania aktywnego mutanta Rab5-Q79L. Obniżenie poziomu HAP40 (z użyciem interferującego RNA), ale przy jednoczesnej nadprodukcji Rab5-Q79L, spowodowało uwolnienie Huntingtyny z powiększonych endosomów. Dowodzi to, że HAP40 jest niezbędne do rekrutowania Huntingtyny na powierzchnię pęcherzyków zawierających aktywną formę Rab5. Dodatkowo kompleks Huntingtyna-HAP40 przy nadprodukcji białka HAP40 powoduje obniżenie ruchliwości wczesnych endosomów poprzez ich uwolnienie z mikrotubul i stabilne związanie się filamentami aktynowymi. Badania przeprowadzone w komórkach pobranych od pacjentów z chorobą Huntingtona (komórki HD) wykazały, że obniżenie poziomu HAP40 powodowało przywrócenie ruchliwości endosomów, sugerując, że wysoki poziom białka HAP40 w fibroblastach HD przyczynia się do nieprawidłowego przemieszczania się pęcherzyków. Okazało się, że w fibroblastach HD wczesne endosomy zlokalizowane były na filamentach aktynowych, natomiast w komórkach kontrolnych pozostawały na mikrotubulach. Dodatkowo, nadprodukcja HAP40 powodowała obniżenie poziomu internalizacji transferyny oraz hamowała jej transport zarówno w komórkach HeLa, jak i w fibroblastach HD. Udowodniło to, że kompleks Huntingtyna-HAP40 jest bezpośrednim efektem GTPazy Rab5 regulującym dynamikę wczesnych endosomów poprzez ich relokację pomiędzy mikrotubulami a filamentami aktynowymi [35].

MODEL ORGANIZACJI FUNKCJONALNYCH DOMEN BŁONOWYCH PRZEZ ENDOCY TARNE BIAŁKA RAB

Informacje zebrane na temat poszczególnych białek efektorowych dla GTPazy Rab5 pozwoliły na sformułowanie modelu opisującego funkcję białka Rab5 na powierzchni wczesnych endosomów [3,36]. Jak przedstawiono schematycznie na Ryc. 2, białko Rab5 w formie nieaktywnej na powierzchni błony wczesnych endosomów ulega aktywacji za

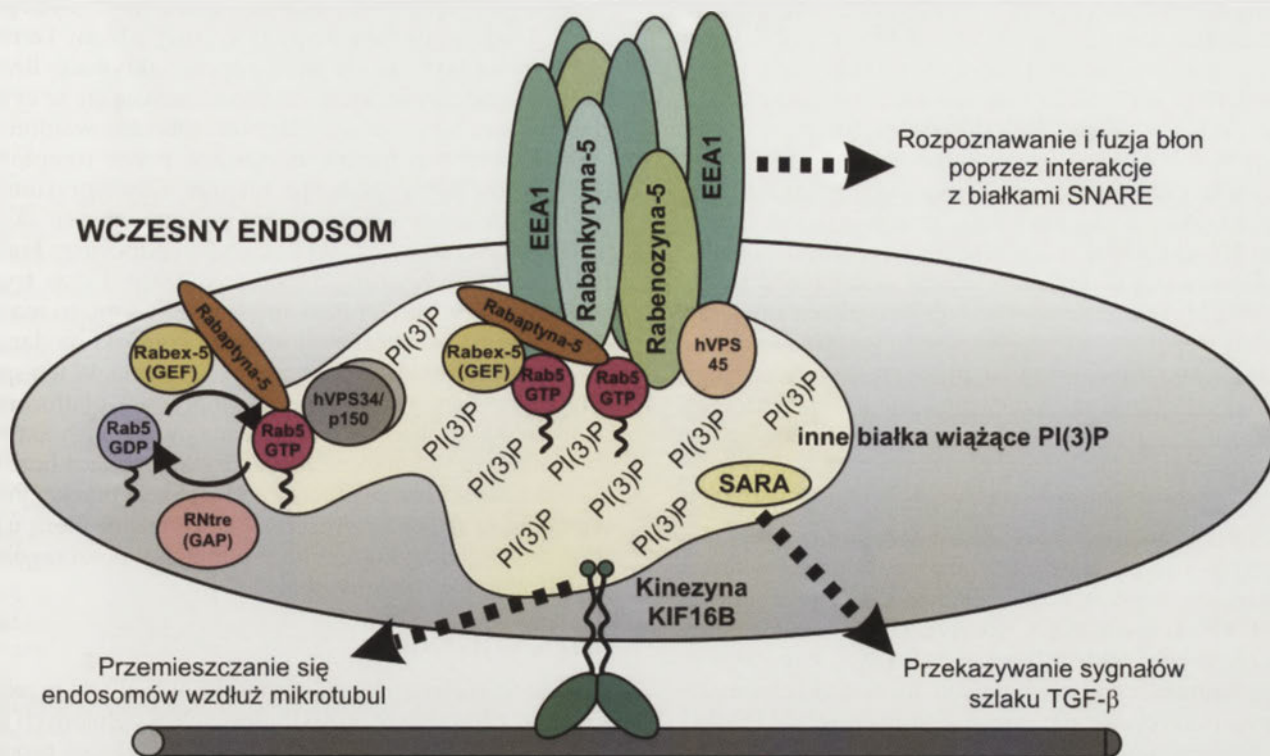
pośrednictwem czynnika GEF dla Rab5, białka Rabex-5, które aktywuje kolejne cząsteczki Rab5 poprzez stymulację wiązania GTP. Proces przeciwstawny (inaktywacja Rab5 wskutek hydrolizy GTP) jest katalizowany przez białko RNTre o charakterze GAP [37]. Rab5-GTP jest stabilizowane przez wiązanie Rabaptyny-5, pozostającej w kompleksie z Rabex-5. Rab5-GTP oddziałuje dalej z kinazą PI3 typu III (hVPS34/p150), której aktywacja powoduje lokalną produkcję PI(3)P, tworząc w ten sposób obszar (domenę) błony wzbogaconą w aktywne Rab5 i PI(3)P. Obecność tych dwóch czynników umożliwia skuteczną rekrutację z cytoplazmy białek efektorowych zawierających motywy FYVE, takich jak EEA1, Rabnozyna-5, Rabankryna-5 czy Rabip4'. Białka te mogą oddziaływać również między sobą, tworząc przejściowe struktury oligomeryczne, w których skład wchodzi także białka typu SNARE regulujące fuzję błon [23]. Struktury te są niezbędne w procesie rozpoznawania (dokowania, ang. *docking*) błon wczesnych endosomów lub pęcherzyków klatrynowych i endosomów, który poprzedza fuzję i wymaga udziału aktywnej formy Rab5.

Skoordynowana przez Rab5 lokalna produkcja PI(3)P jest niezbędna nie tylko do fuzji błon, ale zapewnia także transport endosomów wzdłuż mikrotubul (Ryc. 2). Jednym z białek motorycznych rekrutowanych do domeny błonowej wzbogaconej w Rab5 i PI(3)P jest kinezyna KIF16B, transportująca endosomy w kierunku końców plus mikrotubul. Białko(a) motoryczne regulujące ruch endosomów w przeciwną stronę nie zostało jeszcze zidentyfikowane, choć wiadomo, że proces ten wymaga również aktywności Rab5 i obecności PI(3)P w błonach endosomów [27].

Kolejną funkcją domeny błonowej wzbogaconej w Rab5 i PI(3)P jest stworzenie platformy umożliwiającej zakotwiczenie białek zaangażowanych w przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych (Ryc. 2). Jednym z przykładów jest białko SARA, posiadające motyw FYVE, które pośredniczy w przekazywaniu sygnałów wywołanych przez wiązanie transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*) do swojego receptora na powierzchni komórki [38]. Internalizacja kompleksu ligand-receptor do wczesnych endosomów umożliwia jego oddziaływanie z białkiem SARA związanym z PI(3)P, co aktywuje dalsze kaskady przekazywania sygnałów do jądra komórkowego [39].

Podsumowując, domena błonowa zorganizowana wokół aktywnej GTPazy Rab5, może skoordynować funkcje związane z fuzją błon, transportem endosomów wzdłuż mikrotubul i przekazywaniem sygnałów z błony komórkowej do jądra. Funkcje te są wykonywane w dużym stopniu przez białka efektorowe GTPazy Rab5, które są rekrutowane do domeny w sposób kooperatywny i stabilizowane na jej powierzchni przez oddziaływania typu białko-białko i białko-lipid.

Równolegle do badań *in vitro*, istnienie domen błonowych na powierzchni endosomów zostało wykazane *in vivo* metodami mikroskopowymi. Okazało się, że białka Rab5, Rab4 i Rab11 i ich białka efektorowe występujące w błonach endosomów wczesnych i recyklingowych, zajmują odrębne, choć sąsiadujące ze sobą terytoria [40]. Podobną organizacją



Rycina 2. Schemat powstawania i funkcjonowania domeny błonowej synchronizowanych przez białko Rab5 na powierzchni wczesnych endosomów. Białko Rab ulega aktywacji za pośrednictwem czynnika GEF (Rabex-5), pozostającego w kompleksie z Rabaptyną-5. Aktywowane Rab5 oddziałuje z kinazą PI3 (hVPS34/p150), stymulując produkcję PI(3)P. Lokalna akumulacja PI(3)P sprzyja wiązaniu licznych białek, posiadających motywy strukturalne oddziałujące z tą formą fosfatydylinozytolu, w tym dalszych białek efektorowych dla Rab5 (EEA1, Rabenozyryna-5/hVPS45, Rabankryryna-5). Te ostatnie, poprzez oddziaływanie z białkami SNARE, kierują procesami fuzji błon organelli endocytarnych. Inne białka oddziałujące z PI(3)P, wiążące się z domeną koordynowaną przez Rab5, ale nie będące efektorami dla tej GTPazy, takie jak SARA czy kinezyzna KIF16B, regulują odpowiednio przekazywanie sygnałów inicjowanych przez TGF-β oraz przemieszczanie się endosomów wzdłuż mikrotubul.

charakteryzują się późne endosomy, wykazując występowanie w ich błonach domen okupowanych przez białka Rab7 i Rab9 [41]. Potwierdza to hipotezę o „mozaikowej” budowie błon endosomów [36,42], które złożone są z odrębnych domen jako modułów składowych, nadających danemu organelum jego tożsamość biochemiczną i funkcjonalną. Koncepcja ta znajduje dalsze potwierdzenia doświadczalne i do chwili obecnej nie została zakwestionowana [43-45].

BIAŁKA APPL JAKO ZNACZNIKI ODREBNEJ POPULACJI WCZESNYCH ENDOSOMÓW I ICH ROLA W REGULACJI PROCESÓW PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW

Badania dotyczące niesymetrycznego rozmieszczenia białek efektorowych między pęcherzykami klatrynowymi a endosomami wykazały po raz pierwszy, że białko Rab5 może oddziaływać z odmiennymi partnerami w różnych przedziałach endosomalnych. Niemniej jednak, do roku 2004 wydawało się, że istnieje jedna, biochemicznie homogenna populacja wczesnych endosomów niosących GTPazę Rab5 i odpowiednie białka efektorowe. Opisana poniżej identyfikacja białek APPL1 i APPL2 jako białek efektorowych dla Rab5 i ich dalsza charakterystyka funkcjonalna, rzuciła nowe światło na biogenezę i rolę wczesnych endosomów w procesach przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych [46].

Białko APPL (obecnie nazywane APPL1) zostało pierwotnie opisane jako cząsteczka oddziałująca z kinazą białkową Akt [47]. APPL1 i homologiczne APPL2 zostały następnie

wyzolowane metodą chromatografii powinowactwa jako białka wiążące się specyficznym i bezpośrednio do aktywnej formy Rab5, spełniając w ten sposób kryterium białka efektorowego [14,46]. Mikroskopowe obserwacje lokalizacji wewnątrzkomórkowej z użyciem specyficznych przeciwciał wykazały, że oba białka APPL znajdują się na powierzchni cytoplazmatycznych struktur błonowych przypominających endosomy oraz, niespodziewanie, także w jądrze komórkowym. Struktury endosomalne niosące białka APPL zawierały GTPazę Rab5, ale nie inne białka efektorowe z motywami FYVE, takie jak np. EEA1. Badania z wykorzystaniem technik frakcjonowania organelli subkomórkowych wykazały, że białka APPL są zlokalizowane na powierzchni struktur błonowych odrębnych od klasycznych wczesnych endosomów niosących Rab5, EEA1 i PI(3)P. Wykorzystanie mikroskopii elektronowej ujawniło, że białko APPL1 jest obecne na powierzchni heterogennych organelli błonowych o charakterze małych pęcherzyków, wakuol lub wydłużonych cystern, odróżniających się od klasycznych endosomów zawierających receptor transferyny. Okazało się również, że białka APPL nie brały udziału w procesach homotypowej fuzji klasycznych wczesnych endosomów lub heterotypowej fuzji pęcherzyków klatrynowych i endosomów.

Obserwacje z doświadczeń biochemicznych i mikroskopowych umożliwiły sformułowanie modelu opisującego funkcje białek APPL i zajmowanego przez nie przedziału błonowego w procesach przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych [46]. Okazało się, że pod wpływem EGF lub stresu oksydacyjnego białko APPL1 oddysocjowu-

je z błon endosomów i przejściowo akumuluje się w jądrze komórkowym. Uwolnienie APPL1 z błony endosomów następuje wskutek zmiany konformacji białka Rab5 w wyniku hydrolizy GTP do GDP, gdyż Rab5 związane z GTP stanowi podstawowy czynnik determinujący błonową lokalizację białek APPL. W przypadku stymulacji komórek EGF, pewna pula tego czynnika wzrostu związanego ze swoim receptorem akumuluje się przejściowo w świetle struktur błonowych niosących na swej powierzchni białka APPL. Obserwacja ta dodatkowo potwierdziła, że struktury te pełnią funkcję endosomów, które z definicji zawierają ładunek transportowany z zewnątrz do wnętrza komórki. Dokładne szlaki transportu EGF przez endosomy zawierające białka APPL nie są znane, choć wiadomo, że docelowo EGF trafia do późnych endosomów i lizosomów, gdzie ulega degradacji.

Wśród białek wiążących APPL1 zidentyfikowano metodami spektrometrii masowej sześć z dziesięciu podjednostek kompleksu o nazwie NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase complex*), odpowiedzialnego za przebudowę chromatyny i zawierającego deacetylazy histonowe [48,49]. Oddziaływania białek APPL1 i APPL2 z tym kompleksem zostały niezależnie potwierdzone, m. in. metodą chromatografii powinowactwa z użyciem białek fuzyjnych APPL1/2 z GST. Deacetylazy histonowe są wielofunkcyjnymi enzymami, niezbędnymi m. in. w procesie proliferacji komórek [50,51]. Białka APPL mogłyby być również zaangażowane w ten proces. Obniżenie poziomu syntezy każdego z białek APPL osobno lub razem, przeprowadzone metodami interferencji RNA, spowodowało znaczące zmniejszenie liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego (mierzonego w budowywaniem analogu tymidyny, bromodeoksyurydyny; BrdU). Oddziaływanie APPL1-Rab5 (zachodzące za pośrednictwem domen BAR i PH w APPL1) jest niezbędne dla funkcji APPL1 w regulacji podziałów komórek. Oddziaływanie to jest jednocześnie konieczne do poprawnego zlokalizowania białka APPL1 w błonach endosomów. Mutanty białka APPL1 (delecyjne i punktowe) niezdolne do oddziaływań z Rab5 wykazywały brak wiązania do błon (i pozostawały rozpuszczalne w cytoplazmie), a jednocześnie po nadprodukcji wywierały hamujący efekt na proliferację komórek. Endosomalna lokalizacja białek APPL jest niezbędną częścią ich cyklu funkcjonalnego, obejmującego także przejściowy transport do jądra. Jednocześnie oznacza to, że przedział endosomalny niosący białka APPL jest koniecznym etapem pośrednim w przekazywaniu sygnałów mitogennych z błony komórkowej (np. po stymulacji czynnikami wzrostu) do jądra komórkowego, gdzie następuje przebudowa chromatyny i zmiana ekspresji genów jako ostateczna odpowiedź komórki [46]. Co ciekawe, opisuje się coraz więcej białek endocytarnych zdolnych do przemieszczania się do jądra komórkowego, gdzie biorą udział w regulacji transkrypcji [52].

KOORDYNACJA ENDOCYTOZY I PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW KOMÓRKOWYCH

W szerszym kontekście, badania białek APPL jako efektorów Rab5 rzuciły nowe światło na procesy endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych, które wcześniej badane były zwykle osobno. Obecnie wiadomo,

że procesy te są ze sobą ściśle powiązane na różnych poziomach. Tradycyjnie zakładano, że sygnały z błony komórkowej są przekazywane do jądra poprzez aktywację licznych białek sygnałowych, które rozprzestrzeniają się w cytoplazmie wyłącznie na drodze dyfuzji. Obecnie wiadomo, że przekazywanie sygnałów inicjowane przez receptory na błonie komórkowej zachodzi również wewnątrzkomórkowo na powierzchni endosomów po internalizacji aktywowanych receptorów. Szlaki i kinetyka endocytozy konkretnego receptora regulują rodzaj, lokalizację i czas trwania oddziaływań z innymi białkami sygnałowymi, co ma istotny wpływ na ostateczną odpowiedź komórki na dany bodziec, np. czynnik wzrostu czy różnicowania. W ten sposób endosomy stanowią wewnątrzkomórkowe platformy dla tworzenia kompleksów białek sygnałowych i ich aktywnego transportu w komórce. Obecnie stale rosnąca liczba doniesień potwierdza, że procesy endocytozy i przekazywania sygnałów są ze sobą nierozdzielnie związane i leżą u podstaw molekularnej komunikacji pomiędzy poszczególnymi przedziałami komórkowymi [53-60].

PODSUMOWANIE

Badania białek efektorowych Rab5 okazały się przełomowe w zrozumieniu różnorodności funkcji pełnionych przez małe GTPazy typu Rab. Stwierdzono, że wielość procesów regulowanych przez te białka wynika z ich licznych oddziaływań z białkami efektorowymi. Wiązanie kinazy PI3 przez Rab5 powoduje produkcję PI(3)P w błonie wczesnych endosomów, a akumulacja tego lipidu powoduje skoordynowaną rekrutację dalszych efektorów białka Rab5 posiadających motyw FYVE, tworząc w ten sposób domenę wzbogaconą w Rab5, jego efekторы i PI(3)P. Cykl wiązania i hydrolizy GTP przez białka Rab pozwala na ścisłą regulację oddziaływań z efektorami, a tym samym modulację procesów dokowania i fuzji błon, ruchu endosomów oraz wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów.

PIŚMIENNICTWO

1. Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004: RE13
2. Pereira-Leal JB, Seabra MC (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313: 889-901
3. Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-117
4. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11821-11827
5. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129: 865-877
6. Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 886-896
7. Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial M (1995) Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83: 423-432
8. Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, Takai Y (1993) Raphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small gtp-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular and Cellular Biology* 13: 2061-2068
9. Gournier H, Stenmark H, Rybin V, Lippe R, Zerial M (1998) Two distinct effectors of the small GTPase Rab5 cooperate in endocytic membrane fusion. *EMBO J* 17: 1930-1940
10. Simonsen A, Lippé R, Christoforidis S, Gaullier J-M, Brech A, Callaghan J, Toh B-H, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998) EEA1 links

phosphatidylinositol 3-kinase function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394: 494-498

11. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-728
12. Gorvel J-P, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915-925
13. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397: 621-625
14. Christoforidis S, Zerial M (2000) Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods* 20: 403-410
15. Horiuchi H, Lippé R, McBride HM, Rubino M, Woodman P, Stenmark H, Rybin V, Wilm M, Ashman K, Mann M, Zerial M (1997) A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90: 1149-1159
16. Lippe R, Miaczynska M, Rybin V, Runge A, Zerial M (2001) Functional Synergy between Rab5 Effector Rabaptin-5 and Exchange Factor Rabex-5 When Physically Associated in a Complex. *Mol Biol Cell* 12: 2219-2228
17. Lee S, Tsai YC, Mattera R, Smith WJ, Kostelansky MS, Weissman AM, Bonifacino JS, Hurley JH (2006) Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol Biol* 13: 264-271
18. Mattera R, Tsai YC, Weissman AM, Bonifacino JS (2006) The Rab5 guanine nucleotide exchange factor Rabex-5 binds ubiquitin (Ub) and functions as a Ub ligase through an atypical Ub-interacting motif and a zinc finger domain. *J Biol Chem* 281: 6874-6883
19. Penengo L, Mapelli M, Murachelli AG, Confalonieri S, Magri L, Musacchio A, Di Fiore PP, Polo S, Schneider TR (2006) Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* 124: 1183-1195
20. Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 271: 24048-24054
21. Rubino M, Miaczynska M, Lippe R, Zerial M (2000) Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* 275: 3745-3748
22. Gaullier J-M, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394: 432-433
23. McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98: 377-386
24. Simonsen A, Gaullier JM, D'Arrigo A, Stenmark H (1999) The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem* 274: 28857-28860
25. Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip S-C, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M (1999) Phosphoinositide-3-Kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1: 249-252
26. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272
27. Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, Hoflack B, Zerial M (2000) Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151: 601-612
28. Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Parton RG, Zerial M (2004) The Rab5 Effector Rabankyrin-5 Regulates and Coordinates Different Endocytic Mechanisms. *PLoS Biol* 2: E261
29. Fouraux MA, Deneka M, Ivan V, van der Heijden A, Raymackers J, van Suylekom D, van Venrooij WJ, van der Sluijs P, Pruijn GJ (2004) Rabip4' is an effector of rab5 and rab4 and regulates transport through early endosomes. *Mol Biol Cell* 15: 611-624
30. Hoepfner S, Severin F, Cabezas A, Habermann B, Runge A, Gillooly D, Stenmark H, Zerial M (2005) Modulation of Receptor Recycling and Degradation by the Endosomal Kinesin KIF16B. *Cell* 121: 437-450
31. Murray JT, Panaretou C, Stenmark H, Miaczynska M, Backer JM (2002) Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* 3: 416-427
32. Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P, Zerial M (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 170: 607-618
33. Erdmann KS, Mao Y, McCrea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, Modregger J, Biemesderfer D, Toomre D, De Camilli P (2007) A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. *Dev Cell* 13: 377-390
34. Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 639-649
35. Pal A, Severin F, Lommer B, Shevchenko A, Zerial M (2006) Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172: 605-618
36. Miaczynska M, Zerial M (2002) Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* 272: 8-14
37. Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, Di Fiore PP (2000) The Eps8 protein coordinates EGF receptor signaling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* 408: 374-377
38. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95: 779-791
39. Itoh F, Divecha N, Brocks L, Oomen L, Janssen H, Calafat J, Itoh S, Dijke Pt P (2002) The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells* 7: 321-331
40. Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, 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
41. Barbero P, Bittova L, Pfeffer SR (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* 156: 511-518
42. Miaczynska M, Zerial M (2006) Rab Domains on Endosomes. W: Dikic I (red) Endosomes. Landes Bioscience/Eurekah.com and Springer Science+Business Media, LLC, Georgetown (Texas) and New York, USA, str. 23-35
43. Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 721-730
44. Pfeffer S (2003) Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 112: 507-517
45. Schmidt MR, Haucke V (2007) Recycling endosomes in neuronal membrane traffic. *Biol Cell* 99: 333-342
46. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M (2004) APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 116: 445-456
47. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR (1999) Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene* 18: 4891-4898
48. Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2: 851-861
49. Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15: 827-832
50. Ahringer J (2000) NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* 16: 351-356

51. Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 17: 423-430
52. Pilecka I, Banach-Orlowska M, Miaczynska M (2007) Nuclear functions of endocytic proteins. *Eur J Cell Biol* 86: 533-547
53. Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M (2004) Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 16: 400-406
54. Raikhel N, Hicks G (2007) Signaling from plant endosomes: compartments with something to say! *Genes Dev* 21: 1578-1580
55. Fischer JA, Eun SH, Doolan BT (2006) Endocytosis, endosome trafficking, and the regulation of *Drosophila* development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 181-206
56. Di Fiore PP, De Camilli P (2001) Endocytosis and Signaling: An Inseparable Partnership. *Cell* 106: 1-4
57. Kholodenko BN (2002) MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends Cell Biol* 12: 173-177
58. Sorkin A, Von Zastrow M (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 600-614
59. Teis D, Huber LA (2003) The odd couple: signal transduction and endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 60: 2020-2033
60. Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M (2008) Signaling from endosomes: Location makes a difference. *Exp Cell Res* 315: 1601-1609

Effectors of GTPase Rab5 in endocytosis and signal transduction

Marta Olchowik, Marta Miączynska 

International Institute of Molecular and Cell Biology, Laboratory of Cell Biology, 4 Ks. Trojdena Str., 02-109 Warsaw, Poland

e-mail: miaczynska@iimcb.gov.pl

Key words: GTPase Rab5, effector proteins, phosphatidylinositol 3-kinase, phosphatidylinositol 3-phosphate, Rab5 domain, APPL proteins

ABSTRACT

Small GTPase Rab5 is a multifunctional protein, which regulates early steps of endocytosis, due to its interactions with numerous effectors such as: Rabaptin-5/Rabex-5, EEA1, phosphatidylinositol 3-kinases hVPS34-p150 and p110 β -p85 α , phosphatidylinositol 4- and 5-phosphatases, Rabenosyn-5/hVPS45, Rabankyrin-5, Huntingtin-HAP40, APPL1 and APPL2. These proteins specifically bind to the active form of Rab5, thus regulating the processes of docking and fusion of endosomal membranes, motility of endosomes and intracellular signal transduction. The characterization of molecular mechanisms underlying interactions of Rab5 effectors with membranes of early endosomes demonstrated that phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) is a key component in this process. This further led to a concept of Rab domains as functional units of endosomal membranes, contributing to the biochemical and functional identity of these organelles. In turn, studies of APPL1 and APPL2 proteins illustrated a role of Rab5 in coordinated regulation of endocytosis and signal transduction.

Endocytoza i zależny od cytoszkieletu transport składników ścian komórkowych roślin

STRESZCZENIE

Na drodze endocytozy zachodzi pobieranie i transport substancji z otoczenia, jak również wycofywanie i/lub recykling składników błony komórkowej. Przez wiele lat uważano, że proces ten nie występuje w komórkach roślinnych, w których wysokie ciśnienie osmotyczne protoplastu uniemożliwia wpuklanie błony. Ostatnie lata przyniosły jednak dowody na to, że ma tam miejsce intensywne endocytoza. Do tej pory zidentyfikowano u roślin 4 spośród 5 znanych typów endocytozy. Badania z wykorzystaniem białek markerowych dla poszczególnych przedziałów systemu błon wewnętrznych, swoistych barwników oraz inhibitorów funkcjonowania cytoszkieletu wykazały, że w odróżnieniu od komórek zwierzęcych i drożdży, endocytoza u roślin jest zależna przede wszystkim od aktywności i swoistych miozyna z klas VIII i XI. Choć podziały komórki roślinnej i zwierzęcej różnią się znacząco przebiegiem, łączy je ściśle uzależnienie od prawidłowo przebiegającej endocytozy. Wykazano, że podczas cytokinezy kluczową rolę odgrywają uzupełniające się procesy wydzielania i endocytozy, dostarczając w ukierunkowany sposób polisacharydy do powstającej przegrody pierwotnej. Co istotne, do nowych ścian komórkowych na drodze endocytozy są wbudowywane pektyny pochodzące ze ścian już istniejących.

WPROWADZENIE

Endocytozą określa się proces wpuklania błony komórkowej i włączania tak powstałych pęcherzyków do wnętrza komórki. Struktury te zawierają wiele różnych substancji zlokalizowanych zarówno w błonie, jak i wewnątrz pęcherzyka. Mogą to być białka i lipidy błony komórkowej, a także pozakomórkowe polipeptydy, cukry, płyny i cząstki zewnątrzkomórkowe, a nawet wirusy czy bakterie. Pobierany materiał jest otaczany przez niewielki obszar wpuklającej się błony komórkowej, z której jest formowany pęcherzyk ulegający następnie odłączeniu od błony i tworzący endosom. Zależnie od transportowanego materiału (cargu), jak i typu pęcherzyków (molekularnego mechanizmu ich powstania) wyróżnia się kilka rodzajów endocytozy: zależną od klatryny, zależną od kaweoliny i tratw lipidowych, niezależną od klatryny i kaweoliny, pinocytozę (endocytoza fazy płynnej) oraz fagocytozę [1].

Szlak endocytotyczny jest ważnym elementem prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek eukariotycznych. Uczestniczy w wymianie i degradacji lipidów i białek błonowych, w tym receptorów, pobieraniu związków odżywczych, transdukcji i rozprzestrzenianiu sygnałów w komórce, sygnalizacji międzykomórkowej, eliminacji patogenów oraz utrzymywaniu symbiozy [2]. Zjawisko endocytozy do niedawna było postrzegane jako charakterystyczne wyłącznie dla zwierząt. Pomimo doniesień literaturowych z przełomu lat 80. i 90. XX wieku, kwestionowano możliwość zachodzenia endocytozy u roślin, sugerując, że ciśnienie turgorowe protoplastu uniemożliwia wpuklanie błony komórkowej [3,4]. Jednakże w wielu badaniach dowiedziono istnienia procesu endocytozy w systemie roślinnym oraz poznano jego kardynalną rolę dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Było to możliwe m.in. dzięki zastosowaniu szerokiego spektrum markerów molekularnych znakujących poszczególne elementy szlaku endocytozy, barwników wiążących się do błon, takich jak FM1-43 i FM4-64 oraz nieprzenikającego przez błony biologiczne barwnika Lucifer Yellow [2,5]. U roślin zidentyfikowano dotychczas cztery rodzaje endocytozy: zależną od klatryny, zależną od tratw lipidowych, pinocytozę i fagocytozę. Jak dotąd, nie ma dowodów na istnienie systemu pęcherzyków opłaszczonych kaweoliną [2].

Istotną cechą przebiegu endocytozy, charakterystyczną dla roślin, jest ścisła zależność od F-aktywności [6,7]. Oprócz poprawnie funkcjonującego cytoszkieletu aktynowego dla zajścia endocytozy niezbędne jest jego oddziaływanie z odkrytymi niedawno, swoistymi dla komórek roślin, niekonwencjonalnymi miozyna-

Anna Kaspróvicz

Michał Michalak

Magdalena Wierzchowiecka

Michalina Maruniewicz

Przemysław Wojtaszek

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; e-mail: przemow@amu.edu.pl; tel.: (061) 829 59 72

Artykuł otrzymano 8 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: aktyna, cytokineza, endocytoza, ściana komórkowa

Wykaz skrótów: ESCRT – niezbędny dla transportu białkowy kompleks sortujący endosomy (ang. *endosomal sorting complex required for transport*), MVB – ciało wielopęcherzykowe (ang. *multivesicular body*), PCR – częściowo okryte retikulum (ang. *partially coated reticulum*), PVC – przedział przedwakuolarny (ang. *prevacuolar compartment*), RG II – ramnoga-lakturonan II, SCAMP1 – błonowe sekrecyjne białko przenośnikowe 1 (ang. *secretory carrier membrane protein 1*), TGN – sieć trans Golgiego (ang. *trans Golgi network*), VSR – wakuolarny receptor sortujący (ang. *vacuolar sorting receptor*)

Podziękowania: Prace nad endocytozą w komórkach roślinnych zostały zapoczątkowane w ramach Polskiej Sieci „Mobilitas.pl” i były lub są kontynuowane w ramach projektów badawczych finansowanych grantami Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego PBZ-KBN-110/P04/2004, N N303 294434 i N N303 360735 dla PW oraz grantu Dziekana Wydziału Biologii UAM i Stypendium DAAD dla Młodych Naukowców dla AK. Obecnie AK jest stypendystką projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2, Priorytetu VIII, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. MM jest studentem I roku studiów II stopnia kierunku Biotechnologia na Wydziale Biologii UAM

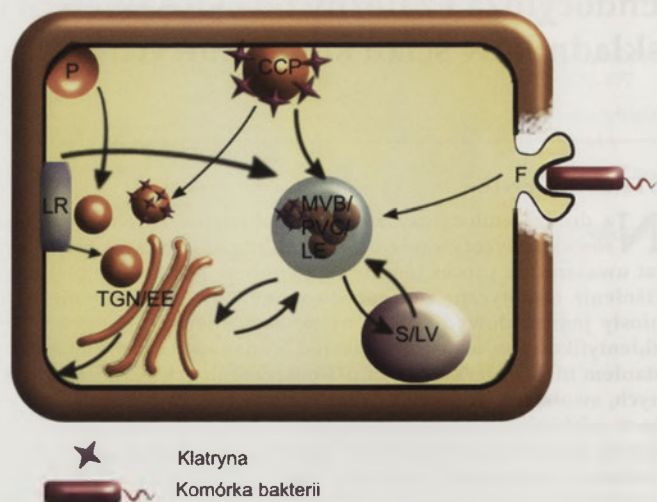
mi z klasy VIII [8]. Istotne jest także zachowanie integralności ścian komórkowych, czego dowodem jest nieukierunkowana endocytoza na całej powierzchni protoplastów [9].

Proces endocytozy i transportu pęcherzykowego ma ogromne znaczenie w życiu komórki roślinnej. Analogicznie do układów zwierzęcych, w komórkach roślin na drodze endocytozy przebiega recykling białek, lipidów i steroli zawartych w błonie komórkowej [10,11] czy pobieranie substancji rozpuszczonych w płynach zewnątrzkomórkowych [12]. Reakcje obronne roślin zachodzą m.in. dzięki internalizacji w pęcherzykach kompleksów receptora z elicytorem (cząsteczka sygnałowa, uwalniana w początkowej fazie zakażenia roślin patogenami, wywołująca reakcję obronną roślin) bakteryjnym lub grzybowym; na podobnej zasadzie odbywa się również fagocytoza bakterii glebowych [2]. Obserwowane zmiany w składzie ścian komórkowych, zachodzące podczas procesów rozwojowych i w reakcji komórek na stres, wskazują na rolę ukierunkowanego transportu polisacharydów i białek do danych rejonów ściany komórkowej. Od niedawna wiadomo, że składniki ścian pobrane drogą endocytozy ze ścian już istniejących są niezbędne do budowy przegrody komórkowej i dalej blaszki środkowej podczas podziału komórki roślinnej [13]. Endocytoza jest procesem ściśle zlokalizowanym. Do obszarów najaktywniejszych endocytotycznie należą ściany poprzeczne oraz szczytowe domeny takich komórek, jak włósniki korzeniowe i łagiewki pyłkowe.

SPECYFIKA PRZEBIEGU ENDOCYTOZY W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Najlepiej poznanym typem endocytozy u roślin jest endocytoza zależna od klatryny. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano wszystkie elementy tego systemu, takie jak łańcuchy lekkie i ciężkie klatryny, białka adaptorowe (np. AP180, α C-adaptyna), małe GTPazy oraz dynaminę. Jednakże wgłębienia oplaszczone klatryną są mniejsze niż zwierzęce (średnica 70–90 nm w porównaniu do 120 nm u ssaków), podobnie jak same pęcherzyki mające około 30 nm średnicy (bez klatryny), przy 100 nm u ssaków. Tłumaczy się to ograniczającym działaniem ciśnienia turgorowego w komórce [1,2].

Dla systemu roślinnego proponuje się odmienny niż u zwierząt model przedziałów endosomalnych (Ryc. 1) [5]. Nowo powstały pęcherzyk trafia do sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN, ang. *trans Golgi network*), która pełni funkcję zarówno wczesnego endosomu, jak i bierze udział w szlaku wydzielania [14]. Wskazuje na to położenie markerów wczesnych endosomów (np. podjednostki $\alpha 1$ H⁺-ATPazy, VHA- $\alpha 1$) oraz kolejność pojawiania się markera endocytozy – hydrofobowego barwnika FM4-64 w poszczególnych przedziałach endosomalnych [15]. Co więcej, uważane dotychczas za wczesny endosom częściowo okryte retikulum (PCR, ang. *partially coated reticulum*) wydaje się być tożsame z TGN [14]. W komórkach roślinnych TGN jest przedziałem bardziej autonomicznym niż u zwierząt i często występuje oddzielnie od diktiosomu [14,16].



Rycina 1. Proponowany model przebiegu różnych typów endocytozy u roślin. Na rycinie oznaczono pęcherzyki tworzące się zależnie od traw lipidowych (LR, ang. *lipid rafts*), pęcherzyk pinocytarny (P), wgłębienie oplaszczone klatryną (CCP, ang. *clatrin coated pit*) oraz fagocytywaną komórkę bakterii, które po internalizacji trafiają do sieci TGN, tożsamej z wczesnymi endosomami (EE, ang. *early endosome*) lub bezpośrednio do ciała wielopęcherzykowego, MVB, u roślin uznawanego za późny endosom (LE, ang. *late endosome*), nazywany też przedziałem przedwakuolarnym, PVC. W ostatnim etapie, cząsteczki mogą trafić do wakuoli spichrzowej lub litycznej (S/LV, ang. *storage/lytic vacuole*), a część materiału pobranego na drodze endocytozy zostaje wydzielona na zewnątrz komórki w procesie wydzielania.

Za późny endosom u roślin uważa się ciało wielopęcherzykowe MVB (ang. *multivesicular body*), zwane też przedziałem przedwakuolarnym, PVC (ang. *prevacuolar compartment*). MVB spełnia dwojaką funkcję: sprzyja degradacji białek błonowych i usuwa ich funkcję sygnałową, umożliwiając ewentualny powrót do wcześniejszych przedziałów [5]. W błonie tego przedziału zlokalizowano wakuolarny receptor sortujący, VSR (ang. *vacuolar sorting receptor*), zatem ładunek przeznaczony do degradacji trafia z MVB do wakuoli litycznej [17,18]. U *Arabidopsis* odkryto kompleks retromeru [19], odpowiedzialny u ssaków i drożdży za retrogradowy transport receptorów cargo wakuolarnego z MVB/PVC do TGN [20]. Ponadto, zidentyfikowano wszystkie elementy kompleksu ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*), rozpoznającego monoubikwitynowane białka i pośredniczącego w ich internalizacji do wewnętrznych pęcherzyków MVB. Białka te są następnie degradowane w wakuoli litycznej [21].

Kolokalizacja markerów endosomalnych z wydzielniczymi wskazuje na dwojaką rolę przedziałów TGN i MVB [5]. W komórkach tytoniu BY-2 w sieci TGN zlokalizowano białko błonowe – nośnik wydzielniczy SCAMP1 (ang. *secretory carrier membrane protein 1*), występujący wspólnie z markerem endosomów FM4-64 [14]. Ponadto, zidentyfikowano kilka syntaksyn SNARE (np. SYP41), zaangażowanych w wydzielanie i występujących w TGN [16]. Białka trafiające do MVB z TGN mogą być kierowane do degradacji w wakuoli litycznej lub do wakuoli gromadzącej białka, co świadczy o ścisłym powiązaniu procesów endocytozy i wydzielania [5].

ZALEŻNY OD CYTOSZKIELETU TRANSPORT PĘCHERZYKÓW ENDOCYTARNYCH

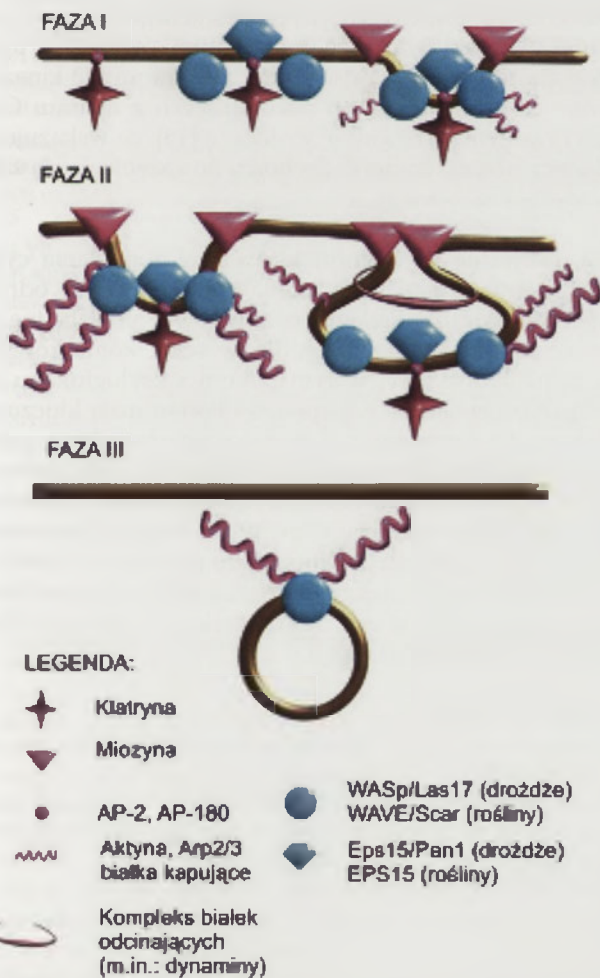
W powszechnym rozumieniu uważa się, że u roślin, podobnie jak u zwierząt, długodystansowy transport substancji w komórce na drodze endocytozy uzależniony jest od tubuliny, zaś aktyna zaangażowana jest w transport na krótszych odcinkach [22]. Eksperymenty przeprowadzone na rosnących wierzchołkowo komórkach roślinnych wskazały na istotną rolę aktyny w procesie endocytozy [7,23-25]. Zauważono, że choć ruch drobnych endosomów w rosnących szczytowo włośnikach nie jest w żaden sposób ukierunkowany przez włókna aktynowe, to wymaga jednak niezakłóconej, ciągłej polimeryzacji aktyny [23]. W odróżnieniu od endosomów zwierzęcych i grzybowych, których ruch jest kierowany przez dyneiny i kinezyiny wzdłuż mikrotubul [26,27], ruch endosomów roślinnych we włośnikach jest zależny wyłącznie od dynamiki cytoszkieletu aktynowego. Udowodniono ponadto, że we wzrastającym włośniku pobór składników potrzebnych do budowania filamentów aktynowych może przebiegać na drodze endocytozy [25,28]. Ponieważ zauważono, że najintensywniejszy ruch endosomów odbywa się w pozbawionej wiązek aktynej strefie szczytowej włośników [23,25], uważa się, że endo-

somy mogłyby stanowić miejsca inicjacji nukleacji aktyny, a co za tym idzie, polimeryzacja aktyny powodowałaby ich ruch [29,30]. Tego typu ruchy u zwierząt wymagają obecności profiliny, dynaminy, ADF i białek kompleksu Arp2/3 [28,31,32]. Białka te są obecne w wierzchołku wzrastającego włośnika [7,23,25], zaś ich mutacje, np. kompleksu Arp2/3, powodują zaburzenia wzrostu szczytowego [33]. Inne badania wykazały obecność białek podobnych do Arp3 w wierzchołkach niedojrzałych włośników oraz w przedziałach MVB [34]. Powyższe informacje pozwalają twierdzić, że za prawidłowy przebieg procesu endocytozy we wzrastającym włośniku korzeniowym odpowiada cały kompleks składający się z aktyny oraz powiązanych z nią białek.

Zaproponowany niedawno przez Galletta i Cooper'a trójfazowy model zależności między mikrofilamentami aktynowymi a przebiegiem endocytozy w komórkach drożdży, może stanowić pewną sugestię, co do potencjalnej roli niektórych białek także u roślin (Ryc. 2) [31,32]. W fazie pierwszej określone białka, m.in. klatryna, białka wiążące klatrynę (AP-2, AP-180), miozyny oraz regulujące aktywność kompleksu Arp2/3 białka WASP/Las17 i eps15/Pan1, przyłączają się do powierzchni błony komórkowej. Następnie przyłączają się białka zaangażowane w proces budowania filamentów aktynowych, takie jak: Arp 2/3, fimbryna, białka nakrywające (czapeczkujące, ang. *capping proteins*), Abp1 i inne. Pociąga to za sobą rozpoczęcie procesu polimeryzacji aktyny oraz wpuklenia błony komórkowej. Uwytklona błona komórkowa ze związanymi białkami jest następnie odcinana przez odpowiednie białko (rolę tę odgrywają m.in. dynaminy) i tworzy pęcherzyk. W ostatniej fazie nowo powstały pęcherzyk przemieszcza się w cytoplazmie, prawdopodobnie na ścieżce wytyczonej przez polimeryzującą na jego powierzchni filanty aktynowe [31,32]. Do tej pory w genomie *A. thaliana*, poza wspomnianymi wcześniej białkami wiążącymi aktynę, zidentyfikowano kilka rodzin genów kodujących białka zaangażowane w proces endocytozy, takie jak: klatryna, białka wiążące klatrynę (AP-2, AP-180), miozyny, dynamina, Eps15 [2,32,35]. Mimo że u *Arabidopsis* nie występują białka WASP, podobną funkcję mogłyby pełnić białka WAVE/Scar, które mają zdolność aktywacji kompleksu Arp2/3 [2,28,32].

Aktyna jest niezbędna podczas transportu endosomów podlegających recyklingowi, które zostają włączane do cytoplazmy na drodze retrogradowej, a następnie są transportowane z powrotem do błony komórkowej [6,36]. Dla poprawnego transportu pęcherzyków recyklujących, zależnego od aktyny, istotne znaczenie mają swoiste miozyny roślinne [10,37]. Dotychczas potwierdzono u *Arabidopsis*, że jedynie miozyny z klasy VIII i XI biorą udział w transporcie struktur wewnątrzkomórkowych, w tym także należących do przedziałów endosomalnych [37,38,39].

Transport steroli z błony komórkowej jest również zależny od filamentów aktynowych [11]. Zastosowanie cytochalazyny D – inhibitora blokującego wydłużanie końców kolczastych mikrofilamentów lub mutacja genu kodującego aktynę, skutecznie blokują pobór steroli na drodze endocytozy [11, 36]. Dowiedziono ponadto, że transport steroli jest zależny od oddziaływań aktyny z białkiem ARA6, należą-



Rycina 2. Model transportu endosomów kierowanego przez cytoszkielet aktynowy. Kolorem różowym zaznaczono białka należące do rodzin homologicznych u drożdży i roślin, zaś niebieskim białka o podobnej funkcji zlokalizowane u drożdży lub roślin.

cym do grupy specyficznych dla roślin GTPaz Rab, obecnych w błonach wczesnych endosomów [11].

Istotne znaczenie dla procesu przebudowy ścian komórkowych ma zależna od aktywności endocytozy fazy płynnej. W procesie pinocytozy następuje również pobieranie substancji odżywczych przez heterotroficzne komórki korzeni [10,40]. Hydrofilowy barwnik Lucifer Yellow wnika do apoplastu, gromadząc się głównie w pobliżu poprzecznych ścian komórkowych, a następnie obserwuje się jego punktową fluorescencję w pęcherzykach położonych we wnętrzu komórek. Wykazano, że internalizacja tego barwnika ma miejsce w plazmodesmach i polach jamkowych [10]. W tych samych punktach zaobserwowano także nagromadzenie F aktywności oraz miozyny VIII, zaś wymuszona depolimeryzacja aktywności zatrzymywała pobieranie barwnika. Ponadto zaobserwowano, że miejsca, w których pinocytoza przebiega szczególnie intensywnie są aktywne także jako centra organizacji mikrofilamentów. Proces polimeryzacji aktywności może odgrywać ważną rolę w odłączaniu się pęcherzyków i transporcie endosomów, na co wskazuje zależność transportu znakowanych fluorescencyjnie pęcherzyków od F aktywności [2]. Ponadto, oddziaływanie F aktywności-miozyna VIII wydają się niezbędne, by umożliwić endocytozę w komórkach roślinnych cechujących się wysokim turgorem [8,41].

UDZIAŁ ENDOCYTOZY W PRZEBUDOWIE ŚCIAN KOMÓRKOWYCH I PODZIALE KOMÓRKI

Komórki roślinne rosną na drodze powiększania całkowitej powierzchni błony i ściany komórkowej. Zdolność błony komórkowej do rozciągania jest stosunkowo niewielka – około 2% [42], zaś w rosnących komórkach roślinnych ściana nie robi się coraz cieńsza, co świadczy o tym, że wzrost komórek zależy od stałego dostarczania materiałów budulcowych do błony i ściany komórkowej [43]. Obserwowane zmiany w składzie ścian komórkowych, zachodzące podczas procesów rozwojowych i w reakcji komórek na stres, wskazują na rolę ukierunkowanego transportu polisacharydów i białek do określonych rejonów ściany komórkowej i kluczową rolę endocytozy dla metabolizmu ścian komórkowych [13,44]. Uważa się, że przebieg syntezy celulozy regulowany jest poprzez ukierunkowany recykling podjednostek kompleksu syntazy celulozy pomiędzy błoną komórkową i przedziałami błon wewnętrznych. Innym przykładem są białka arabinogalaktanowe, które po internalizacji i przejściu przez przedział MVB trafiają do wakuoli [45,46].

Badania nad podziałami komórek ssaczy wykazały, że cytokineza jest ściśle zależna od endocytozy, zaś recyklujące endosomy, przenoszące ładunek zarówno z wczesnych endosomów, jak i sieci TGN, dostarczają materiał do budowy błony komórkowej [47,48]. Do niedawna uważano, że jedynym źródłem materiałów budulcowych dla tworzącej się przegrody komórkowej jest ich synteza *de novo* [49]. Najnowsze badania dowodzą jednak, że cargo pochodzenia endocytotycznego stanowi większą część powstającej struktury [13]. Cytokineza stanowi poważny problem logistyczny. Zamknięcie przez pierścień kurczliwy mostu międzykomórkowego w śródciałku, kończące cytokinezę u zwierząt, wydaje się dość łatwe. Natomiast dobudowanie

około 1/3 powierzchni komórki roślinnej w postaci nowych ścian komórkowych w czasie stanowiącym jedynie 4% całego cyklu komórkowego jest już znacznie trudniejsze. Okazuje się jednak, że u wszystkich grup organizmów procesy te wymagają szybkiego i sprawnego działania systemu endosomalnego [13].

Badania prowadzone na komórkach znajdujących się w stadium interfazy wykazały, że białka błony komórkowej i pektyny zlokalizowane w ścianach komórkowych podlegają konstytutywnemu transportowi do wnętrza komórek na drodze endocytozy oraz recyklingowi między symplastem i apoplastem [6,11,50,51]. Eksperymenty z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających dimery ramnogalakturonanu typu II (RGII) [52] dostarczyły istotnych przesłanek, sugerujących udział endocytozy w transporcie pektyn do nowo powstających ścian komórkowych z istniejących już ścian komórkowych. Funkcjonalne, związane z borem dimery RGII powstają wyłącznie w warunkach kwaśnego pH i wysokim stężeniu wapnia, charakterystycznych dla środowiska ścian komórkowych [52]. Okazuje się, że przeciwciało anty-RGII wiąże się specyficznie do powstającej przegrody komórkowej. Co więcej, w obrębie powstającej przegrody komórkowej lokalizują się głównie endosomy, a nie pęcherzyki wywodzące się z aparatu Golgiego, zaś zablokowanie szlaku wydzielania zależnego od aparatu Golgiego przez brefeldynę A (inhibitor transportu anterogradowego) nie hamuje tworzenia się przegrody komórkowej. Z drugiej strony, zastosowanie wortmanniny (inhibitora PI3 kinazy), hamuje powstawanie MVB pochodzących z aparatu Golgiego i zatrzymuje również cytokinezę [13], co wskazuje że podczas podziału komórki dochodzi do zająknięcia się szlaków endo- i egzocytozy.

Zastosowanie wielu inhibitorów funkcjonowania cytoszkieletu oraz szlaku wydzielania wykazało, że w odróżnieniu od mikrotubul, filamenty aktynowe są niezbędne do internalizacji niektórych składników ścian komórkowych na szlaku endocytozy, w tym pektyn i ksyloglukanu [6, 53]. Pektyny związane z wapniem i borem mają kluczowe znaczenie dla wytrzymałości mechanicznej i struktury przestrzennej ścian komórkowych [54,55]. Tym samym, endocytoza zależna od cytoszkieletu aktynowego, wraz z procesami wydzielania, moduluje właściwości mechaniczne ścian komórkowych poprzez zmianę składu polimerów. Oznacza to również, że od przebiegu endocytozy mogą zależeć właściwości mechaniczne całych komórek, a w konsekwencji – wzrost i morfogeneza roślin.

PIŚMIENNICTWO

1. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44
2. Šamaj J, Baluška F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D (2004) Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135: 1150-1161
3. Cram WJ (1980) Pinocytosis in plants. *New Phytol* 84: 1-17
4. Oparka KJ, Wright KM, Murrant EA, Allan EJ (1993) Fluid-phase endocytosis: do plants need it? *J Exp Bot* 44: 247-255
5. Müller J, Mettbach U, Menzel D, Šamaj J (2007) Molecular dissection of endosomal compartments in plants. *Plant Physiol* 145: 293-304
6. Baluška F, Hlavacka A, Šamaj J, Palme K, Robinson DG, Matoh T, McCurdy DW, Menzel D, Volkmann D (2002a) F-actin-dependent en-

- docytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insight from Brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol* 130: 422-431
7. Baluška F, Volkmann D (2002b) Pictures in cell biology: Actin-driven polar growth of plant cells. *Trends Cell Biol* 12: 14
 8. Baluška F, Cvrčková F, Kendrick-Jones J, Volkmann D (2001) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol* 126: 39-46
 9. Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J, Satiat-Jeunemaitre B (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: Studies on PIN proteins. *J Cell Sci* 119: 1255-1265
 10. Baluška F, Šamaj J, Hlavacka A, Kendrick-Jones J, Volkmann D (2004) Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices. *J Exp Bot* 55: 463-473
 11. Grebe M, Xu J, Mobius W, Ueda T, Nakano A, Geuez HJ, Rook MB, Scheres B (2003) *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 13: 1378-1387
 12. Emans N, Zimmermann S, Fischer R (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14: 71-86
 13. Dhonukshe P, Baluška F, Schlicht M, Hlavacka A, Šamaj J, Friml J, Gadella TWJ (2006) Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev Cell* 10: 137-150
 14. Lam SK, Siu CL, Hillmer S, Jang S, An G, Robinson DG, Jiang L (2007) Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 19: 296-319
 15. Tahara H, Yokota E, Igarashi H, Orii H, Yao M, Sonobe S, Hashimoto T, Hussey PJ, Shimmen T (2007) Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures. *Protoplasma* 230: 1-11
 16. Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29: 49-65
 17. Li YB, Rogers SW, Tse YC, Lo SW, Sun SS, Jauh GY, Jiang L (2002) BP-80 and homologs are concentrated on post-Golgi, probable lytic prevacuolar compartments. *Plant Cell Physiol* 43: 726-742
 18. Tse YC, Mo B, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG, Jiang L (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* 16: 672-693
 19. Oliviussen P, Heinzerling O, Hillmer S, Hinz G, Tse YC, Jiang L, Robinson DG (2006) Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in *Arabidopsis*, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 18: 1239-1252
 20. Seaman MN (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* 15: 68-75
 21. Spitzer C, Schellmann S, Sabovljevic A, Shahriari M, Keshavaiah C, Bechtold N, Herzog M, Muller S, Hanisch FG, Hulskamp M (2006) The *Arabidopsis* elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development* 133: 4679-4689
 22. Goode BL, Drubin DG, Barnes G (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 12: 63-71
 23. Voigt B, Timmers ACJ, Šamaj J, Hlavacka A, Ueda T, Preuss M, Nielsen E, Mathur J, Emans N, Stenmark H, Nakano A, Baluška F, Menzel D (2005) Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *Eur J Cell Biol* 84: 609-621
 24. Ovečka M, Lang I, Baluška F, Ismail A, Illeš P, Lichtscheidl IK (2005) Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226: 39-54
 25. Baluška F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Šamaj J, Chua NH, Barlow PW, Volkmann D (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol* 227: 618-632
 26. Wedlich-Söldner R, Bolker M, Kahmann R, Steinberg G (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* 19: 1974-1986
 27. Marco E, Wedlich-Söldner R, Li R, Altschuler SJ, Wu LF (2007) Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* 129: 411-422
 28. Vantard M, Blanchoin L (2002) Actin polymerization processes in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 5: 502-506
 29. Taunton J (2001) Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 13: 85-91
 30. Plastino J, Sykes C (2005) The actin slingshot. *Curr Opin Cell Biol* 17: 62-66
 31. Galletta BJ, Chuang DY, Cooper JA (2008) Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS Biol* 6: 0072-0085
 32. Galletta B, Cooper JA (2009) Actin and endocytosis: mechanism and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* 21: 1-8
 33. Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hülskamp M (2003) *Arabidopsis* crooked encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* 130: 3137-3146
 34. Van Gestel K, Slegers H, Von Witsch M, Šamaj J, Baluška F, Verbelen JP (2003) Immunological evidence for the presence of plant homologues of the actin-related protein Arp3 in tobacco and maize: Subcellular localization to actin-enriched pit fields and emerging root hairs. *Protoplasma* 222: 45-52
 35. Holstein SHE (2002) Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* 3: 614-620
 36. Boutté Y, Vernhettes S, Satiat-Jeunemaitre B (2007) Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organization of higher plant cells. *Cell Biol Int* 13: 649-654
 37. Higaki T, Sano T, Hasezawa S (2007) Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 549-556
 38. Holweg C, Nick P (2004) *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10488-10493
 39. Sattarzadeh A, Franzen R, Schmelzer E (2008) The *Arabidopsis* class VIII myosin ATM2 is involved in endocytosis. *Cell Motil Cytoskelet* 65: 457-68
 40. Etxeberria E, Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Pozueta-Romero J (2005) Sucrose inducible endocytosis as a mechanism for nutrient uptake in heterotrophic plant cells. *Plant Cell Physiol* 46: 474-481
 41. Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluška F, Šamaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J* 19: 555-569
 42. Wolfe J, Steponkus PL (1981) The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 643: 663-668
 43. Miller DD, De Ruijter NCA, Emons AMC (1997) From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hairs. *J Exp Bot* 48: 1881-1896
 44. Johansen JN, Vernhettes S, Hofte H (2006) The ins and outs of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 9: 616-620
 45. Herman EM, Lamb CJ (1992) Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol* 98: 264-272
 46. Šamaj J, Šamajova O, Peters M, Baluška F, Lichtscheidl I, Knox JP, Volkmann D (2000) Immunolocalization of LM2 arabinogalactan-protein epitope associated with endomembranes of plant cells. *Protoplasma* 212: 186-196
 47. Schweitzer JK, Burke EE, Goodson HV, D'Souza-Schorey C (2005) Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis. *J Biol Chem* 280: 41628-41635
 48. Albertson R, Riggs B, Sullivan W (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol* 15: 92-101
 49. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*, fourth edition. Garland Science Publishing

50. Geldner N (2004) The plant endosomal system—its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 219: 547-560
51. Murphy AS, Bandyopadhyay A, Holstein SE, Peer WA (2005) Endocytotic cycling of PM proteins. *Annu Rev Plant Biol* 56: 221-251
52. Matoh T, Takasaki M, Takabe K, Kobayashi M (1998). Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol* 39: 483-491
53. Baluška F (2005) Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis. *Protoplasma* 225: 141-155
54. Höfte H (2001) A baroque residue in red wine. *Science* 294: 795-797
55. Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001) Modulation of the degree and pattern of methylesterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem* 276: 19404-19413

Endocytosis and actin-dependent transport of plant cell wall components

Anna Kasprowicz, Michał Michalak, Magdalena Wierzchowiecka, Michalina Maruniewicz, Przemysław Wojtaszek✉

Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

✉ e-mail: przemow@amu.edu.pl

Key words: actin, cell wall, cytokinesis, endocytosis

ABSTRACT

Endocytosis is the way of uptaking and transporting substances from the immediate surroundings, as well as the way of removal and/or recycling of the plasma membrane components. For many years, it was thought that this process was not operating in plant cells in which high turgor pressure of the protoplast prevented invagination of the plasma membrane. Recent years, however, brought the evidence for intensive endocytosis in plants. So far, four types of endocytosis, among 5 known, have been identified in plants. Use of protein markers of different compartments of the endomembrane system, specific dyes, and the cytoskeleton inhibitors, made possible demonstration that, as opposed to animal and fungal systems, endocytosis in plant cells was dependent on actin and plant-specific myosins of VIII and XI classes. Although cell divisions in plants and animals differ considerably, they both are dependent on the proper endocytosis. It has been shown that during cytokinesis secretion and endocytosis act in concert, delivering polysaccharides directionally to the growing cell plate. What is more important, new cell walls are built from e.g. pectins transported by endocytosis from existing cell walls.

Rola układu aktomiozynowego w ruchach chloroplastów indukowanych światłem niebieskim

STRESZCZENIE

Ruch chloroplastów to proces przemieszczania ich w komórce zależny od kierunku, natężenia i długości fali padającego światła. Reakcjami chloroplastów w wyższych roślinach lądowych sterują dwa fotoreceptory, fototropiny 1 i 2, natomiast układ motoryczny stanowią aktyna i miozyna. Ścieżki przekazu sygnału pozostają nieznane pomimo wyników świadczących, że wapń i fosfoinozytole pełnią funkcję wtórnych przekaźników. W pracy przedyskutowano dwa sposoby zaangażowania układu akto-miozynowego w mechanizm ruchowy. W roślinach wodnych, gdzie ruch chloroplastów zależy od światła czerwonego i jest związany z płynięciem cytoplazmy ma miejsce przebudowa cytoszkieletu aktynowego. W wyższych roślinach lądowych, np. w *Arabidopsis thaliana*, ruch chloroplastów zależy wyłącznie od światła niebieskiego. W tych gatunkach nie obserwuje się specyficznej, indukowanej światłem reorganizacji aktyny ani ruchu cytoplazmy w miększu asymilacyjnym. W *Arabidopsis* przemieszczeniom chloroplastów towarzyszy specyficzna dla światła niebieskiego relokalizacja miozyny. Zatem w wyższych roślinach lądowych kierunkowy sygnał inicjowany przez światło może być przekazywany na miozynę.

RUCHY CHLOROPLASTÓW – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Ruch chloroplastów jest aktywną, wymagającą nakładu energii odpowiedzią komórki na zmieniające się warunki świetlne. Odpowiedź ta manifestuje się przemieszczeniem chloroplastów w komórce. Zależy ono od kierunku, natężenia i długości fali padającego światła. Ruch chloroplastów jest powszechnym zjawiskiem w świecie roślin. Opisano go w komórkach glonów (*Dicyota dichotoma*, *Hormidium flaccidum*, *Mesotaenium calariorum*, *Mougeotia scalaris*, *Vauchemia sessilis*), mszaków (*Funaria hygrometrica*, *Ceratodon purpureus*), paprotników (*Adiantum capillus-veneris*, *Pteris cretica*, *Selaginella martensii*) oraz w roślinach wyższych, wodnych i lądowych (*Ajuga reptans*, *Chloropytum elatum*, *Lemna trisulca*, *Nicotiana tabacum*, *Tradescantia sp.*, *Vallisneria gigantea*, *Vicia faba*, *Spinacia oleracea*) [1-6].

Zjawisko to w szerszym kontekście opisywano wielokrotnie w pracach przeglądowych [1,6-11]. Pierwsza, obszerna praca monograficzna na temat ruchów chloroplastów ukazała się w 1908 roku [12]. Natomiast ruch chloroplastów w liściach modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika pospolitego) został scharakteryzowany po raz pierwszy w 1996 roku [13].

Wyróżnia się dwie podstawowe reakcje chloroplastów na światło. U większości gatunków kontrolowane są one przez rodzinę fotoreceptorów światła niebieskiego – fototropiny. W odpowiedzi na słabe światło niebieskie chloroplasty przemieszczają się w reakcji akumulacji do ścian komórki prostopadłych do kierunku padania światła, przyjmując tzw. położenie płaskie. Dla *Arabidopsis* natężenie światła niebieskiego wywołujące reakcję akumulacji zawiera się w przedziale od 0,07 do 3,6 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ [13]. Reakcja ucieczki od światła występuje podczas naświetlania roślin silnym światłem niebieskim. W takich warunkach chloroplasty lokują się wzdłuż ścian oświetlonych najslabiej, przyjmując tzw. położenie profilowe. Przy około 140 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ następuje wysycenie reakcji, co oznacza że maksymalna liczba chloroplastów osiąga położenie profilowe, a dalszy wzrost natężenia światła nie powoduje już zmian w układzie chloroplastów. Reakcji akumulacji towarzyszy spadek, natomiast reakcji ucieczki – wzrost transmisji światła przez liść. Zależności pomiędzy układem chloroplastów a poziomem transmisji światła przez tkankę wykorzystano do rejestracji ruchów chloroplastów metodą fotometryczną [4]. W ciemności chloroplasty zazwyczaj ułożone są pod wszystkimi ścianami mniej więcej równomiernie, zależnie od nieznanych dotąd czynników endogennych, dlatego w uproszczeniu mówi się o położeniu losowym. Jak wykazano, jest ono związane z warunkami świetlnymi niszy ekologicznej roślin [3,13]. Niedawne prace sugerują także wpływ fototropin na pozycjonowanie chloroplastów w ciemności [14].

Weronika Krzeszowiec

Halina Gabrys[✉]

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Kraków

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 63 40, e-mail: halina.gabrys@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 20 kwietnia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 6 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: cytoszkielet aktynowy, fototropiny, miozyna VIII, miozyna XI, ruch chloroplastów

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 1395/B/P01/2007/33

Jak zaznaczono wcześniej, ruchy chloroplastów w przeważającej większości gatunków są indukowane wyłącznie światłem niebieskim i bliskim UV. Dotyczy to wszystkich zbadanych gatunków roślin wyższych lądowych. Jedynie w niektórych gatunkach roślin niższych lub wyższych roślin wodnych, np. w *Mougeotia*, *Mesotaenium*, *Adiantum*, *Ceratodon* oraz *Vallisneria sp.*, w sterowaniu przemieszczaniem bierze udział także światło czerwone [1,11]. Ponieważ indukcja ruchu chloroplastów światłem czerwonym może być zablokowana daleką czerwienią, było oczywiste że w te reakcje zaangażowany jest fitochrom¹. Dalsze badania doprowadziły do odkrycia nowego, chimerycznego fotoreceptora zbudowanego z części fitochromowej i fototropinowej – neochromu [15,16].

Układ wykonawczy w ruchach chloroplastów stanowią – jak się wydaje bez wyjątku – aktyna oraz miozyna. Jest to tak zwany układ aktomiozynowy, opisany w dalszej części pracy.

Mimo badań trwających ponad 100 lat ruchy chloroplastów nie zostały w pełni poznane. Poza identyfikacją fotoreceptorów odpowiedzialnych za przemieszczenia w świetle niebieskim oraz udowodnieniem zaangażowania cytoszkieletu aktynowego, badania nad mechanizmem ruchu wciąż przynoszą nowe pytania, między innymi:

– Jakie są różnice w mechanizmach molekularnych reakcji ucieczki i akumulacji?

– W jakim stopniu ruchy cytoplazmy wpływają na ruchy chloroplastów? Czy różnice w mechanizmie przemieszczeń chloroplastów zachodzących w świetle niebieskim/czerwonym są związane z płynięciem cytoplazmy?

– Czy wyraźna reorganizacja aktyny dotyczy tylko gatunków reagujących na czerwone światło?

– Czy zaangażowanie miozyn roślinnych w ruch chloroplastów jest ograniczone tylko do wyższych roślin lądowych, czy występuje również w roślinach niższych i w wyższych roślinach wodnych?

– Czy w sterowaniu ruchem chloroplastu biorą udział sygnały wytwarzane w samej organelli?

Ścieżka transdukcji sygnału, poza wskazaniem na enzymy szlaku fosfatydyloinozytoli i jony wapnia, nie jest dotychczas poznana [17-19]. Nowe mutanty *Arabidopsis thaliana* wykazujące zaburzenia w ruchach chloroplastów: *jac1*, *pml1*, *chup1*, pomimo obiecujących wyników badań wstępnych, w dalszym ciągu nie zostały w pełni scharakteryzowane [14,20,21].

FOTOTROPINY – FOTORECEPTORY W RUCHACH CHLOROPLASTÓW

W ostatnich dziesięciu latach odkryto i scharakteryzowano dwa fotoreceptory światła krótkofalowego kontrolujące ruchy chloroplastów – fototropinę 1 (*phot1*) oraz fototropin¹fitochrom – roślinny receptor światła czerwonego i dalekiej czerwieni; sygnały przekazywane przez fitochromy do jądra prowadzą do zmian ekspresji genów i w konsekwencji do zmian we wzroście i rozwoju roślin

nę 2 (*phot2*). Stanowią one unikalną klasę roślinnych kinaz, nie występujących w żadnej innej grupie organizmów. Fototropiny zostały najpierw zidentyfikowane jako receptory odpowiedzialne za fototropizm [22]. Następnie okazało się, że biorą udział w ruchach chloroplastów [23-25], otwieraniu aparatów szparkowych [26], hamowaniu wydłużania hipokotyli² [27] oraz rozwoju liści [28].

Fototropinę 1, odkrytą w 1995 roku, początkowo scharakteryzowano jako fotoreceptor odpowiedzialny za wygięcie fototropiczne [29]. Dalsze badania ujawniły, że jest to kinaza serynowo-treoninowa wiążąca mononukleotyd flawinowy. Kinaza ta ulega autofosforylacji [22] i nie posiada domeny transbłonowej [30].

Region kodujący *phot1 Arabidopsis thaliana* zawiera 20 eksonów. Gen *Phot1* koduje białko złożone z 996 reszt aminokwasowych i masie ok. 120 kDa. Domena kinazowa *Phot1* zawiera 11 motywów kinaz należących do rodziny PVPK1 w obrębie grupy kinaz białkowych C [30,31]. N-końcowy region zawiera 110 reszt aminokwasowych i dwie domeny LOV (ang. *light-oxygen-voltage-sensing*) zaangażowane w wiązanie mononukleotydu flawinowego (FMN). Główne maksima absorpcji podstawowej formy domen LOV wynoszą 360 nm i 450 nm [32]. Ustalono, że w przypadku obu fotoreceptorów większą rolę odgrywa LOV2 [33]. W ciemności LOV2 działa jako inhibitor części kinazowej. Pierwszym produktem wzbudzenia fototropiny jest addukt FMN-cysteinyłowy, tworzony w obrębie domeny LOV2 [32,34]. Utworzenie adduktu wyłącza hamujące własności domeny LOV2. Natomiast LOV1 obniża próg fotoaktywacji LOV2 [35]. Szczegółowe badania części N i C końcowej fototropin wykazały, że fragment C-końcowy odpowiada za lokalizację fototropin w komórce [36,37].

Konstruktem *PHOT1-GFP* transformowano mutanta *phot1 Arabidopsis*, który nie zawiera mRNA genu *PHOT1*. Pozwoliło to na określenie lokalizacji fototropiny1 [28]. Wykazano podbłonowe położenie receptora. Fluorescencją GFP zaobserwowano w dzielących się i wydłużających komórkach korykalnych haczyka apikalnego³ i w strefie elongacyjnej korzenia etiolowanych⁴ siewek [28]. W komórkach epidermy, mezofilu oraz w komórkach aparatu szparkowego fotoreceptor jest zlokalizowany równomiernie. Natomiast w komórkach korzenia i korykalnych komórkach hipokotyli znajduje się głównie pod ścianami poprzecznymi. W preparatach korzeniowych *Arabidopsis* zaobserwowano także zależny od światła transport fototropiny1 od błony do cytoplazmy [38].

W 2001 roku dwie grupy zidentyfikowały *phot2* jako fotoreceptor odpowiedzialny za reakcję ucieczki (odpowiedź chloroplastów na silne światło niebieskie) [23,25]. Fototropina 2 (dawniej *npl*; *nph-like*) jest homologiem fototropiny 1. *PHOT1* i *PHOT2* mają ponad 58% identyczności oraz 67% podobieństwa; ponad 80% podobieństwa dotyczy domeny kinazowej [39]. Fototropina 2 jest zbudowana z 915 reszt aminokwasowych. Jest to, podobnie jak *PHOT1*, podbłonowe białko o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. *Phot2* działa jako odrębny receptor,

¹hipokotyl – podliscienny odcinek łodygi zarodkowej

³haczyk apikalny – szczytowa część hipokotyli

⁴etioloowana – inaczej wypłonią, rosnąca w ciemności, m.in. nie syntetyzuje chlorofilu

który może także przejmować funkcję phot1. Jest zaangażowana w otwieranie aparatów szparkowych, ruch chloroplastów i fototropizm. Razem z phot1 pośredniczy w aktywacji błonowej H⁺-ATPazy w komórkach przyszparkowych [40].

W reakcjach ruchowych chloroplastów phot1 działa przy niższych, a phot2 przy wyższych natężeniach światła. Za reakcję ucieczki odpowiada fototropina 2, natomiast reakcję akumulacji kontrolują oba fotoreceptory. Fototropiny współdziałają ze sobą w mniejszym lub większym stopniu we wszystkich procesach fizjologicznych, które kontrolują.

Jako kinazy, fototropiny wykazują zdolność do autofosforylacji *in vivo* [29] i *in vitro* [22] oraz fosforylacji innych substratów [35]. W aktywacji autofosforylacji przez światło, w obu fotoreceptorach, bierze udział domena LOV2 [33]. Dowiedziano, że istnieje współzależność między autofosforylacją a fototropiczną odpowiedzią hipokotyla. Jednak udział autofosforylacji fototropin w transdukcji sygnału nie jest jasny. Ponadto, w komórkach *Escherichia coli* kinaza phot2 z *Arabidopsis* wykazuje konstytutywną aktywność w obecności kazeiny, która jest częstym substratem w badaniach *in vitro* nad kinazami serynowo-treoninowymi. Wskazuje to na możliwość fosforylacji substratu przez fototropiny *in vivo* [35]. Do tej pory nie udało się wskazać co mogłoby być tym substratem w komórce.

Duży postęp w badaniach ruchów chloroplastów uzyskano, stosując mutanty nie zawierające fototropin:

↳ *phot1* – wymaga wyższych intensywności światła do zainicjowania obu reakcji chloroplastów [41];

↳ *phot2* – światło niebieskie wywołuje wyłącznie reakcję akumulacji chloroplastów niezależnie od intensywności [23,25];

↳ *phot1phot2* – nie wykazuje kierunkowych ruchów chloroplastów [24].

CYTOSZKIELET AKTYNOWY W RUCHACH CHLOROPLASTÓW

Obecna w komórkach roślinnych dynamiczna sieć mikrofilamentów jest zaangażowana w sterowane światłem procesy rozwojowe i ruchowe, na przykład w regulowaną światłem czerwonym odpowiedź fototropiczną szczytowych komórek mchu *Ceratodon* [42], zależny od światła ruch jądra w komórkach *Adiantum* [43] czy ruch aparatów szparkowych w *Commelina* [44].

W przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, ruchy organelli komórkowych w roślinach odbywają się za pośrednictwem cytoszkieletu aktynowego, a mikrotubule wydają się odgrywać rolę drugorzędą, głównie stabilizującą [patrz monografię dotyczące aktyny, cytoszkieletu roślinnego i polarności komórki roślinnej: 45-47].

Zaangażowanie cytoszkieletu aktynowego w ruch chloroplastów wykazano początkowo w eksperymentach z wykorzystaniem inhibitorów polimeryzacji aktyny, cytochalazyn B oraz D [18,48-51]. Zastosowanie każdego z tych inhibitorów skutkuje natychmiastowym zatrzymaniem ruchu chloropla-

stów. W kilku gatunkach kierunkowym przemieszczeniem chloroplastów towarzyszy indukowana światłem zmiana przestrzennej organizacji filamentów aktynowych. Specyficzne struktury aktynowe pojawiają się w słabym i silnym świetle w *Vaucheria* [52], *Caulerpa* [53], *Mougeotia* [54] oraz w paprociach *Selaginella* [55] i *Adiantum* [50]. Co najmniej trzy z tych gatunków wykazują ruch chloroplastów sterowany światłem czerwonym. W pozostałych dwóch przypadkach (*Caulerpa*, *Selaginella*) zakres spektralny nie został zdefiniowany, ponieważ do indukcji ruchów stosowano tylko światło białe.

Bezpośrednią zmianę organizacji cytoszkieletu wykazano w komórkach epidermy *Vallisneria* za pomocą fluorescencyjnie znakowanej falloidyny [56]. W adaptowanej do ciemności tkance *Vallisneria* chloroplasty płyną z prądem cytoplazmy podstawowej, a mikrofilamenty tworzą siatkę złożoną z cienkich włókien. Pod wpływem słabego światła czerwonego włókna aktynowe tworzą strukturę podobną do plastra miodu, w której płynące chloroplasty zostają unieruchomione przy ścianach prostopadłych do kierunku padania światła (reakcja akumulacji). Oba procesy są powolne; pełne wykształcenie charakterystycznej architektury filamentów aktynowych towarzyszącej immobilizacji chloroplastów trwa około czterech godzin. Po oświetleniu silnym światłem czerwonym lub niebieskim chloroplasty odzyskują swoją ruchliwość i są przemieszczane do ścian równoległych do kierunku padania światła. Równocześnie zachodzi reorganizacja aktyny w bardziej rozciągniętą sieć zbudowaną z grubych włókien. Naświetlenie preparatu bezpośrednio po świetle czerwonym daleką czerwienią powoduje zatrzymanie ruchu chloroplastów. DCMU (3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylo-mocznik), inhibitor niecyklicznego transportu elektronów w fotosyntezie, blokuje tworzenie struktury plastra miodu [57]. Dowodzi to udziału barwników fotosyntetycznych w sterowaniu reorganizacją cytoszkieletu, wyjątkowego w ruchach chloroplastów. Natomiast odwracalne działanie czerwieni i dalekiej czerwieni wskazuje, że rolę fotoreceptora odgrywa fitochrom. Kandasamy i Meagher wykazali bliski przestrzenny związek pomiędzy chloroplastami i cytoszkieletem w młodych komórkach mezofilu *Arabidopsis* [58]. Tkankę częściowo traktowali enzymami rozkładającymi ścianę komórkową, a cytoszkielet znakowali przeciwciałami przeciwko aktynie. Aktyna tworzyła wokół chloroplastów gęste opłoty nazwane koszykami. Nie obserwowano żadnej struktury przypominającej plaster miodu z *Vallisneria*. Latrunkulina B (inhibitor polimeryzacji aktyny) powodowała agregację chloroplastów połączoną ze zniszczeniem architektury cytoszkieletu aktynowego. Na podstawie tych wyników zaproponowano model, w którym chloroplasty migrują wzdłuż włókien aktynowych lub są przez nie ciągnięte. Ponieważ jednak w doświadczeniach nie zastosowano światła indukującego ruch chloroplastów, nie uzyskano bezpośrednich dowodów jego działania na cytoszkielet ani na zaangażowanie cytoszkieletu w przemieszczenia chloroplastów.

Kierując się wynikami reorganizacji aktyny związanej z ruchem chloroplastów w *Vallisneria*, przeprowadzono podobne eksperymenty na *Arabidopsis* i *Nicotiana* w tkance utrwalanej i znakowanej falloidyną, mykotoksyną przyłączającą się do filamentów aktynowych. Liście, przed utrwaleniem i wyznakowaniem, naświetlano światłem niebieskim silnym lub słabym, wywołującym odpowiednio reakcję ucieczki lub akumulacji

chloroplastów. Nie stwierdzono występowania zależnych od światła zmian w przestrzennej organizacji aktyny. Jako kontrolę zastosowano równokwantowe światło czerwone, silne lub słabe. Przetestowano rośliny dzikiego typu *Arabidopsis*, a także mutanty fototropinowe: *phot1* i *phot2*. Tylko w mutancie *phot2* (z zaburzoną reakcją ucieczki), zaobserwowano w świetle czerwonym statystycznie istotną reorganizację cytoszkieletu aktynowego, nie jest ona jednak związana bezpośrednio z ruchem chloroplastów [59]. Ostatnio do badań nad udziałem aktyny w przemieszczeniach użyto transgenicznego tytoniu, w którym cytoszkielet aktynowy wyznakowano, stosując białko fuzyjne plastyna-GFP. W tych doświadczeniach także nie zaobserwowano zmian architektury cytoszkieletu, które można by powiązać z kierunkowymi ruchami chloroplastów. W świetle silnym, niezależnie od długości fali (niebieskim i czerwonym) zaobserwowano poszerzenie filamentów aktynowych [19]. Ponieważ światło czerwone nie wywołuje ruchu chloroplastów w tytoniu, obserwowany efekt nie może być porównywany z przebudową cytoszkieletu w *Vallisneria* („pułapkowaniem” chloroplastów). Nie jest jednak wykluczone, że zarejestrowane „rozsnućie” filamentów ułatwia ruch. Nie można tego jednoznacznie stwierdzić, ponieważ białkiem znakowanym nie była aktyna, lecz białko które ją wiąże. Do tej pory nie zmierzono również stosunku aktyny monomerycznej (G) do aktyny filamentowej (F) w świetle wywołującym reakcję ucieczki i akumulacji. Nie wiadomo zatem czy obserwowany efekt nie jest wynikiem przemieszczeń białka fuzyjnego w obrębie filamentów.

Reasumując, wydaje się że w wyższych roślinach lądowych aktyna nie jest celem sygnałów określających kierunek ruchu chloroplastów.

MIOZYNY W RUCHU CHLOROPLASTÓW

Drugi składnik układu motorycznego przemieszczającego chloroplasty w komórce stanowią miozyny. Miozyny są rodziną pospolicie występujących, bardzo zróżnicowanych białek. Elementy cytoszkieletu znaleziono zarówno u prokariota, jak i u eukariota, natomiast miozyny wydają się być zdobyczą ewolucyjną wyłącznie organizmów eukariotycznych. Miozyny transportują różne ładunki wzdłuż włókien aktyny, mogą również przemieszczać mikrofilamenty po nieruchomych powierzchniach, np. po błonie komórkowej. Białka z tej rodziny definiuje się jako rodzinę zależnych od aktyny Mg^{2+} ATPaz z charakterystyczną ~80 kDa domeną motoryczną w części N-końcowej [60]. Składają się one z jednego lub dwóch łańcuchów ciężkich i zmiennej liczby łańcuchów lekkich. W obrębie łańcucha ciężkiego wyróżnia się trzy strukturalne fragmenty: domenę motoryczną, tzw. głowę, domenę zawierającą motywy IQ, tzw. szyjkę, oraz domenę C-końcową, tzw. pałeczkę.

Domena motoryczna jest najbardziej zachowaną w ewolucji częścią wszystkich izoform miozyny. W jej obrębie białko łączy się z aktyną i wiąże ATP. Ewolucyjna zmienność struktury w tym rejonie jest prawdopodobnie związana z hydrolizą ATP i uwolnieniem jej produktów lub z zachowaniem możliwości przenoszenia zmian towarzyszących hydrolizie nukleotydu na ruch całego białka. Co ciekawe, w obrębie domeny motorycznej zachowanej w ewolucji zlokalizowany jest fragment zaangażowany w

wiązanie nukleotydu, natomiast domena wiążąca aktynę – już nie [61].

Za globularną domeną motoryczną znajduje się szyjka: krótki, helikalny region regulatorowy. Zawiera ona zmienną liczbę motywów IQ (sekwencja IQXXXRGXXXR), które są miejscem wiązania łańcuchów lekkich i kalmoduliny.

Część C-końcową miozyny zajmuje pałeczka. Jest to najbardziej zmienna domena pod względem długości i sekwencji. Może zawierać różne funkcjonalne subdomeny: SH3 (miozyna I, IV), GAP (miozyna IX), FERM (miozyna VII, X, XV), PH (miozyna X), MTH4 (miozyna IV, VII, X, XII, XV) lub domenę kinazową (miozyna III) [60,62]. Pałeczka miozyn często zawiera sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy (ang. *coiled-coil*), które umożliwiają dimeryzację. Uważa się, że duża część zróżnicowania w obrębie rodziny miozyn pochodzi właśnie od tej domeny i że jest ona odpowiedzialna za różne funkcje tych białek. Na podstawie filogenetycznej analizy sekwencji domeny motorycznej miozyny roślinne zalicza się do trzech klas: VIII, XI i XIII [63]. Miozyny klasy VIII i XI znaleziono we wszystkich badanych organizmach roślinnych, natomiast miozyna XIII jak dotąd została odkryta tylko w glonie morskim *Acetabularia cliftonii*. Publikacje na temat miozyn *Arabidopsis* i ich przynależności do obu klas ukazały się w latach 2001 i 2003 [64-66]. Nie można wykluczyć, że obie klasy stanowią partnerów dla aktyny w mechanizmie ruchów chloroplastów roślin wyższych [17,67-69].

Wczesne doniesienia o zaangażowaniu miozyn w ruch chloroplastów pochodzą z badań z użyciem inhibitorów, wykonanych na roślinach wodnych: *Vallisneria* [70] oraz *Lemna trisulca* [51]. Przemieszczenia chloroplastów hamowano N-acetylmaleimidem, który niespecyficznie blokuje aktywność ATP-azową miozyn. W *Vallisneria* zatrzymywany był jednocześnie ruch cytoplazmy oraz ruch chloroplastów. Zatrzymanie ruchu plastydów obserwowano także w permeabilizowanych glicerynowych modelach komórkowych *Lemna*.

Ponadto, wykazano obecność miozyny na powierzchni chloroplastów *Lemna*, znakując je immunofluorescencyjnie przeciwciałami przeciwko miozynie mięśniowej w rozgniecionych członach liściowych [51]. W liściach *Arabidopsis* wyznakowano miozynę przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko miozynie roślinnej klasy VIII [68]. Dodatkowo – jak wspomniano wyżej – przeciwciałami przeciwko miozynie XI zlokalizowano miozynę na powierzchni plastydów w mezofilu kukurydzy [67]. Ze względu na brak całkowicie specyficznych przeciwciał przeciwko miozynie tylko jednej klasy nie jest możliwe w tej chwili jednoznaczne stwierdzenie, które miozyny znajdują się na powierzchni chloroplastów. Dodatkowe utrudnienie stanowi brak komercyjnych przeciwciał skierowanych przeciwko miozynom roślinnym.

MIOZYNY KLASY VIII

Pierwsze doniesienia na temat genów miozyn w *Arabidopsis* pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych. W 1994 roku Kinkema i współaut. ogłosili znalezienie 6 genów kodujących sekwencje miozynowe [71]. Siedem lat później, zidentyfikowano 17 genów miozynowych, używając zachowanej w ewolucji aminokwasowej sekwencji domeny motorycznej MYA1 [65].

Klasa VIII jest reprezentowana w *Arabidopsis* przez 4 geny: AT1G50360.1, AT3G19960.1, AT4G27370.1 oraz AT5G54280.1.

Pierwszą sklonowaną miozyną jest AT3G19960.1, w latach dziewięćdziesiątych nazywana ATM i zaklasyfikowana do nowej klasy miozyny VIII [72]. Białko przewidywane na podstawie sekwencji DNA ma 1166 reszt aminokwasowych i masę molekularną ok. 131 kDa.

Rdzeń domeny motorycznej miozyny VIII zawiera charakterystyczną sekwencję RDALAK. Inną typową dla miozyny sekwencją jest GESGAGKT. Znajduje się ona w miejscu wiązania fosforanu (ang. *P-loop*) w domenie wiążącej ATP. N-końcowy region w miozynie ATM jest dłuższy niż w innych miozynach. Zawiera on unikalny zestaw 90 pierwszych reszt aminokwasowych i pozostałą część wspólną z innymi miozynami. Region C-końcowy zawiera 4 motywy IQ, za nimi przypuszczalnie znajduje się α -helikalny region domeny *coiled-coil*. Charakterystyczne dla miozyny tej klasy jest około 150 reszt aminokwasowych końca C z dwoma regionami bogatymi w reszty serynowe oraz zlokalizowanym na samym końcu regionem z ładunkami dodatnimi. Żaden z nich nie wydaje się być miejscem wiązania ładunku (ang. *cargo*), ale C-końcowy region mógłby stanowić miejsce wiązania fosfolipidów. Hipotezę tę wysunięto na podstawie podobieństwa miozyny VIII do miozyny klasy I. Najprawdopodobniej motyw SH3 lub region z nietypową kompozycją aminokwasową, np. GPA, są zaangażowane w wiązanie miozyny roślinnych do aktyny. Należy jednak zaznaczyć, że sekwencja AT3G19960.1 nie zawiera żadnego z tych układów.

W ostatnim czasie zmieniła się koncepcja specyficznych połączeń międzykomórkowych w roślinach – plazmodesm. Badania kilku ostatnich lat określają je jako kurczliwe struktury tunelowe, których przepustowość jest silnie kontrolowana [73-75]. Obecność miozyny w plazmodesmach lub polach jamkowych korzeni różnych roślin wykazało wielu autorów [68,76-80]. Według modelu zaproponowanego przez Blackman i Overall, miozyna łączy błonę komórkową z aktyną oplatającą desmotubulę. Aktomiozynowy układ w plazmodesmach służyłby jako tory dla transportu międzykomórkowego [74,75].

Miozyna VIII wydaje się odgrywać ważną rolę w podziałach międzykomórkowych. Doświadczenia przeprowadzone na korzeniach kukurydzy i rzeżuchy ogrodowej wskazują na jej udział w zakładaniu poprzecznej ściany komórkowej z udziałem transportu pęcherzyków, tworzeniu przegrody pierwotnej i dojrzwaniu ściany komórkowej [77,81]. Doświadczenia z inhibitorem mnoksymem 2,3 butandionu (BDM), wskazują również na wpływ miozyny na organizację kortykalnej siateczki śródplazmatycznej [82]. Układ aktomiozynowy bierze udział także w zależnym od wakuol wydłużaniu komórek [78]. Kilka lat temu wysunięto interesującą hipotezę na temat zaangażowania miozyny w plazmolizie i deplazmolizie [83]. Umożliwiłyby one kontrolę objętości protoplastu oraz jego ruch ślizgowy w przestrzeni ograniczonej ścianą komórkową w poddanych stresowi osmotycznemu komórkach zielistki (*Chlorophytum comosum*).

W 2005 roku ukazała się praca wskazująca na udział miozyny VIII w kontroli odpowiedzi na sygnał grawitacyjny [68]. Przeciwciałami przeciwko ATM1 z *Arabidopsis* wyznakowano powierzchnię statolitów⁵ podczas enzymatycznej degradacji ściany statocytów⁶ w czapeczce korzeniowej kukurydzy. Zastosowanie stresu osmotycznego prowadziło do szybkiej relokacji miozyny VIII – następowało przemieszczenie miozyny z części podbłonowej komórki na statolity/amyloplasty. Do podobnego zjawiska nie dochodziło podczas enzymatycznego trawienia komórek mezofilu (protoplastowania). Autorzy postulują dwa wyjaśnienia obserwowanych efektów: 1) miozyny przemieszczają się po kablach aktynowych na powierzchnię organelli, 2) ruch miozyny może towarzyszyć aktywnej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Opisywane doświadczenia wskazują pośrednio na zaangażowanie miozyny w tworzenie połączenia pomiędzy cytoszkieletem, błoną komórkową i ścianą komórkową.

MIOZYNY KLASY XI

W roku 1994 Kinkema i Schiefelbein sklonowali gen *MYA1 Arabidopsis*. Produkt według ich przewidywań miał 173 kDa i początkowo zaliczony został do klasy V ponieważ wykazywał wysoką homologię ze zwierzęcą miozyną V [84]. Jednak w toku dalszych badań filogenetycznych wyróżniono nową klasę miozyny – XI. Ostatecznie w genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano 13 genów miozyny XI [65].

Oczyszczona z komórek zawieszinowych BY-2 tytoniu miozyna XI ma masę 175 kDa [85]. Za domeną motoryczną znajduje się region z sześcioma motywami IQ. Poniżej niego usytuowana jest domena odpowiedzialna za α -helikalną strukturę *coiled-coil*. Miozyna XI zawiera również domeny DIL o nieznannej funkcji. Na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego wiadomo, że miozyna XI tworzy dimery [85,86]. Długość pałeczki wynosi ok. 25 nm, natomiast całkowita długość białka to ok. 33 nm. Określono również odległość o jaką przesuwa się miozyna XI przy każdym kroku: jest to ok. 35 nm przy szybkości ok. 7 $\mu\text{m/s}^{-1}$ [85].

Używając przeciwciał przeciwko regionowi z pałeczki miozyny klasy XI, Wang i Pesacreta pokazali lokalizację miozyny XI w komórkach kukurydzy [67]. Kolokalizacja przeciwciał przeciwko miozynie XI i odpowiednich znaczników fluorescencyjnych wykazała, że znajduje się ona na powierzchni mitochondriów i plastydów. Brak jej natomiast na powierzchni jądra komórkowego, peroksysomów oraz błon aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [67]. Lokalizację peroksysomalną wykazano jednak rok później z użyciem mutantu *Arabidopsis mya2* [87]. Miozyna XI jest zaangażowana w rozwój włóśników i trichomów oraz w transport pęcherzyków [88-89]. Najnowsze doniesienia dowodzą obecności miozyny XI na błonach aparatu Golgiego [90]. Oprócz tego białko fuzyjne YFP-pałeczka miozyny XI lokalizuje się na powierzchni nieznanymi pęcherzyków [91]. Uważa się, że miozyny klasy XI są zaangażowane w ruch cytoplazmy, transport organelli i polarny transport auksyn. Jednak, jak widać z powyższego

⁵statolity – plastydy pełniące funkcję w odpowiedzi na sygnał grawitacyjny

⁶statocyty – komórki w czapeczce korzeniowej zawierające statolity, odpowiedzialne za reakcję grawitropiczną

zestawienia, ustalenie ich szczegółowych funkcji wymaga dalszych badań.

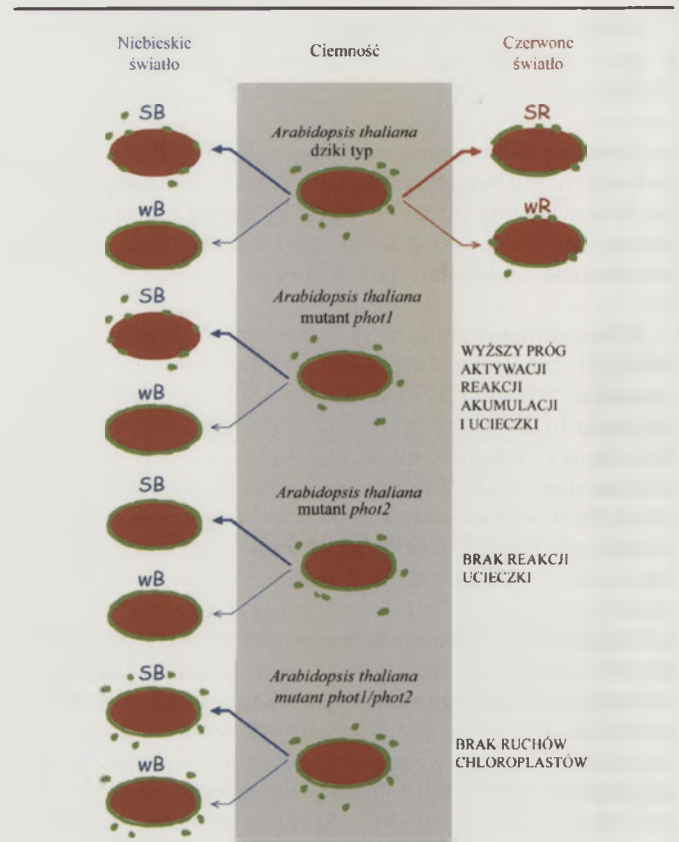
Lokalizację miozyny w dzikim typie i w mutantach fototropinowych *Arabidopsis* badano, naświetlając rośliny światłem wywołującym reakcję ucieczki i akumulacji chloroplastów (Ryc. 1) [69]. Po naświetlaniu tkanek utrwalano i znakowano przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko zwierzęcej miozynie z mięśni gładkich i szkieletowych. Stwierdzono, że lokalizacja miozyny zależy od światła niebieskiego. W komórkach naświetlanych słabym niebieskim światłem miozyna znajdowała się na powierzchni chloroplastów, natomiast po silnym świetle niebieskim – poza otoczką chloroplastów. Efektu relokalizacji miozyny nie obserwowano w silnym i słabym świetle czerwonym ani w mutancie *phot2*. Wydaje się więc, że miozyny są celem ścieżki sygnałowej zapoczątkowanej przez wzbudzoną fototropinę 2. Ich relokalizacja mogłaby być niezbędnym składnikiem mechanizmu ruchów chloroplastów w roślinach wyższych lądowych.

ZAGADNIENIA OCZEKUJĄCE NA WYJAŚNIENIE

Badania ostatnich kilkunastu lat przyniosły ogromny postęp w zrozumieniu procesów zależnych od światła niebieskiego. Dawniej wszystkie fotoreceptory światła niebieskiego nazywano kryptochromami. Obecnie wiadomo, że jest ich kilka grup, a za ruch chloroplastów odpowiadają fototropiny. Być może jednak fototropiny nie są jedynymi fotoreceptorami światła niebieskiego biorącymi udział w ruchach chloroplastów. Można tak przypuszczać, gdyż brak w komórce fototropiny 1 nie powoduje całkowitego wygaszenia reakcji akumulacji, a tylko przesunięcie progu wrażliwości na światło. Może to być spowodowane przeniesieniem funkcji na *phot2*, nie można jednak wykluczyć udziału innego, nieznanego jeszcze receptora światła niebieskiego/UV.

Przed odkryciem fototropin istnienie dwóch różnych mechanizmów dla reakcji ucieczki i akumulacji chloroplastów postulowano głównie na podstawie badań reakcji wzbudzanych światłem impulsowym. Nowsze badania wskazują, że obie reakcje różnią także ścieżki przekazu sygnału. Świadczy o tym np. inna wrażliwość reakcji akumulacji i ucieczki na hamowanie wortmaniną w komórkach *Lemma* [17]. Wortmanina nieodwracalnie blokuje aktywność kinazy fosfoinozytydu (PI3K) przez kowalencyjne wiązanie do katalitycznej domeny tego enzymu. Reakcja ucieczki jest hamowana dziesięciokrotnie wyższym stężeniem inhibitora niż reakcja akumulacji. Wskazuje to na możliwość zaangażowania różnych kinaz fosfoinozytydów w przekazie sygnału świetlnego.

Z wcześniejszych badań wynikało, że obecność jonów wapnia jest konieczna do regulacji układu aktyna-miozyna. Nie uzyskano natomiast jednoznacznych wskazówek czy wapń jest wtórnym przekaźnikiem sygnału [18,92]. Doświadczenia przeprowadzone ostatnio na tytoniu z ekspresją białka fuzyjnego plastyna-GFP potwierdziły, że jony wapnia są odpowiedzialne za spójność i funkcjonalność cytoszkieletu wymaganą do prawidłowego ruchu chloroplastów [19]. Wyniki otrzymane z użyciem trifluoperazyny, inhibitora kalmoduliny, wskazały na rolę tego białka nie tylko w zapewnieniu prawidłowej struktury sieci aktynowej, ale także w przenoszeniu informacji



Rycina 1. Zmiany lokalizacji miozyny w świetle wywołującym kierunkowe przemieszczenia chloroplastów. Liście *Arabidopsis thaliana* dzikiego typu i mutantów fotoreceptorowych naświetlano światłem niebieskim wysycającym reakcję ucieczki (SB, *strong blue*) lub akumulacji (wB, *weak blue*) chloroplastów, utrwalano i znakowano immunofluorescencyjnie. Jako kontrolę zastosowano równokwantowe światło czerwone (odpowiednio SR, *strong red* i wR, *weak red*). Czerwone elipsoidy przedstawiają chloroplasty, kolorem zielonym oznaczono miozyny. Strzałkami zaznaczono rodzaj naświetlania. W tkance zaadaptowanej do ciemności oraz w tkance poddanej naświetlaniu światłem czerwonym, niezależnie od jego intensywności, miozyny są częściowo zlokalizowane na powierzchni plastydów, a częściowo w cytoplazmie. W słabym świetle niebieskim miozyna znajduje się na powierzchni chloroplastów. Po naświetlaniu tkanki silnym światłem niebieskim miozyna przestaje być widoczna na powierzchni chloroplastów – najprawdopodobniej ją opuszcza. Efekt ten jest widoczny w roślinach rzodkiewnika dzikiego typu oraz w mutancie *phot1* posiadającym wyłącznie fototropinę 2, wykazującym normalne reakcje ruchowe chloroplastów, wymagające jednak wyższego progu aktywacji. W mutancie *phot2* posiadającym wyłącznie fototropinę 1 i wykazującym wyłącznie – także w świetle silnym – reakcję akumulacji, miozyny opłaszczają powierzchnię chloroplastu niezależnie od natężenia światła niebieskiego. Miozyny nie przemieszczają się w mutancie *phot1/phot2* (brak obu fototropin; nie wykazuje kierunkowych ruchów chloroplastów). W oparciu o [69], schemat poszerzony.

o kierunku ruchu. Co więcej, jony wapnia przywracają ruchy chloroplastów zahamowane przez wortmaninę; zatem wapń może być zaangażowany w przekaz sygnału razem z kinazami fosfoinozytydów. Dodatkowo zaproponowano udział magnezu w transdukcji sygnału jako jonu kooperującego z wapniem [19]. Pośrednim dowodem zaangażowania wapnia jako wtórnego przekaźnika sygnału jest wywoływany przez fototropiny wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce; nie wykazano jednak jego związku z ruchem chloroplastów, mimo że stosowano mutanty *phot1*, *phot2* i *phot1/phot2* [93].

Dane dotyczące zaangażowania wapnia w ruchy chloroplastów wciąż wydają się być niejednoznaczne lub niekompletne. Z tego względu dyskusja jego roli wymaga osobnego opracowania.

Powszechnie uważa się, że ruch chloroplastów jest związany z płynięciem cytoplazmy. Wykazano taki związek w glonach, przedroślach paproci i splątkach mchów. Nie wydaje się to jednak prawdopodobne w dojrzałym mezofilu roślin wyższych, takich jak *Arabidopsis* lub *Nicotiana*. W ich komórkach cytoplazma stanowi cienką warstwę pod błoną komórkową oraz tworzy pasma transwakuolarne. Sam ruch cytoplazmy jest w tych komórkach niewidoczny. Część badaczy uważa, że wystarczy śledzić wyznakowane małe organelle, np. peroksysomy. Jednak ruch peroksysomów w epidermie cebuli nie wykazuje synchronizacji, która występowałaby gdyby oba te procesy ruchowe miały jedną regulację [94].

Wydaje się prawdopodobne, że wodne rośliny, w których światło czerwone wywołuje kierunkowy ruch chloroplastów, np. *Vallisneria*, mają odrębny wykonawczy mechanizm ruchu, a jego istotną część stanowi długotrwała, obejmująca całą komórkę reorganizacja cytoszkieletu aktynowego. Taka reorganizacja może być związana z płynięciem cytoplazmy zależnym od mikrofilamentów. Na razie nie znaleziono gatunku, który umożliwiłby weryfikację tezy, że ruch chloroplastów jest związany ze specyficzną reorganizacją cytoszkieletu, jeśli przemieszczenia organelli są związane z ruchami cytoplazmy. Jak wspomniano wyżej, w dojrzałych komórkach mięksiszu asymilacyjnego *Arabidopsis* lub *Nicotiana* ruchy cytoplazmy nie są ani widoczne ani udowodnione. Co więcej, w żadnym gatunku, w którym ruch chloroplastów zależy wyłącznie od światła niebieskiego nie zaobserwowano reorganizacji aktyny związanej z ruchami chloroplastów.

Hipoteza, że w wyższych roślinach lądowych na końcu ścieżki sygnałowej znajdują się miozyny, a w roślinach wodnych, jak *Vallisneria* – aktyna wymaga dalszych badań. Pytanie jak na razie pozostaje otwarte, m.in. z powodu trudności eksperymentalnych. Doniesienia na temat relokalizacji miozyn pod wpływem światła wywołującego ruch chloroplastów wymagają nowego typu doświadczeń w celu wyjaśnienia działania układu aktomiozynowego. Badanie miozyny i jej relokalizacji w komórkach roślinnych utrudnia brak specyficznych przeciwciał przeciwko miozynom roślinnym. Ponadto, używane do badań ruchów rośliny wodne mają silnie inkrostowane liście, co blokuje wprowadzanie przeciwciał. Mają także wysoką autofluorescencję w zakresie zielonym, zwykle stosowanym w badaniach immunofluorescencyjnych.

Wiadomo, że ruch chloroplastów wpływa na optymalizację fotosyntezy, a także pełni funkcję w ochronie aparatu fotosyntetycznego przed nadmiernym oświetleniem. Jednak do tej pory nie udało się zarejestrować sygnału pochodzącego od chloroplastów, który miałby wpływ na reakcje ucieczki lub akumulacji. Istnienie takiego sygnału wydaje się prawdopodobne, ale próby znalezienia go nie dały dotychczas rezultatów.

Badania mutantów *Arabidopsis* wykazujących zaburzenia w ruchach chloroplastów, *jac1*, *pml1*, *chup1*, nie wyjaśniły żadnej z wymienionych we wstępie kwestii. *JAC1* koduje białko o nieznannej funkcji, jedna z jego domen mogłaby odpowiadać za przekaz sygnał wapniowego, ale nie zostało to udowodnione. W mutantach *pml1* ruchy chloroplastów są częściowo wyciszone. Jednak badania pokazują raczej związek z podziałami chlo-

roplastów niż z mechanizmem ich ruchu. Natomiast białko CHUP1 wiąże się wprawdzie z chloroplastami oraz aktyną, ale mutacja powoduje anomalne unieruchomienie chloroplastów w jednym obszarze komórki, a nie dotyczy ich przemieszczeń.

Podsumowując, wyjaśnienie mechanizmu ruchów chloroplastów, a zwłaszcza stworzenie modelu ścieżki przekazu sygnału świetlnego, wciąż można uznać za cele dalekie od osiągnięcia.

PIŚMIENNICTWO

- Haupt W, Scheuerlein R (1990) Chloroplast movement. *Plant Cell Environ* 13: 595-614
- Zurzycki J (1980) Blue-light-induced intracellular movements, W: Senger H (red) *The Blue Light Syndrome*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, str. 50-68
- Augustynowicz J, Gabrys H (1999) Chloroplast movements in fern leaves: correlation of movement dynamics and environmental flexibility of the species. *Plant Cell Environ* 22: 1239-1248
- Gabrys H, Walczak T (1980) Photometric study of chloroplast phototranslocation in leaves of land plant. *Acta Physiol Plant* 2: 281-290
- Augustynowicz J, Lekka M, Burda K, Gabrys H (2001) Correlation between chloroplast motility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiol Plant* 23: 291-302
- Takagi S (2003) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *J Exp Biol* 206: 1963-1969
- Haupt W (1999) Chloroplast movement: from phenomenology to molecular biology. *Prog Bot* 60: 3-36
- Kagawa T, Wada M (2002) Blue Light-Induced Chloroplast Relocation. *Plant Cell Physiol* 43: 367-371
- Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* 54: 455-68
- Gabrys H (2004) Blue light-induced orientation movements of chloroplasts in higher plants: Recent progress in the study of their mechanisms. *Acta Physiol Plant* 26: 473-478
- Suetsugu N, Wada M (2007) Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biol Chem* 388: 927-935
- Senn G (1908) *Die Gestalts- und Lageveränderung Pflanzen-Chromatophoren*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Trojan A, Gabrys H (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* 111: 419-425
- Suetsugu N, Kagawa T, Wada M (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 151-162
- Kadota A, Wada M (1999) Red light-aphototropic (rap) mutants lack red light-induced chloroplast relocation movement in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell Physiol* 40: 238-247
- Kawai H, Kanegae T, Christensen S, Kiyosue T, Sato Y, Imaizumi T, Kadota A, Wada M (2003) Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* 421: 287-290
- Malec P, Grabalska M (2004) Blue light-induced chloroplast reorientations in *Lemma trisulca* L. (Duckweed) are controlled by two separable cellular mechanisms as suggested by different sensitivity to wortmannin. *Photochem Photobiol* 79: 343-348
- Ilalka M, Gabrys H (1993) Influence of calcium on blue-light induced chloroplast movement in *Lemma trisulca* L. *Planta* 189: 491-498
- Anielska-Mazur A. „Dynamika fotoindukowanej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w transgenicznym tytoniu”, praca doktorska 2009
- DeBlasio SL, Luesse DR, Hangarter RP (2005) A plant-specific protein essential for blue-light-induced chloroplast movements. *Plant Physiol* 139: 101-114
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M (2003) CHLOROPLAST

- UNUSUAL POSITIONING is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* 15: 2805-2815
22. Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas A, Liscum E, Briggs WR (1998) *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* 282: 1698-1701
 23. Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) *Arabidopsis* NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138-2141
 24. Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K (2001) *Arabidopsis* nph1 and np11: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6969-6974
 25. Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952-954
 26. Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656-660
 27. Folta KM, Spalding EP (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* 26: 471-478
 28. Sakamoto K, Briggs WR (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723-1735
 29. Liscum E, Briggs WR (1995) Mutations in the NPH1 Locus of *Arabidopsis* Disrupt the Perception of Phototropic Stimuli. *Plant Cell* 7: 473-485
 30. Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han S, Larsen E, Briggs WR (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120-2123
 31. Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8779-8783
 32. Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39: 9401-9410
 33. Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR (2002) Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* 32: 205-219
 34. Swartz TE, Corchroy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* 276: 36493-36500
 35. Matsuoka D, Tokutomi S (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13337-13342
 36. Kong SG, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A (2007) The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J* 51: 862-873
 37. Aihara Y, Tabata R, Suzuki T, Shimazaki KI, Nagatani A (2008) Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant J* 56: 364-375
 38. Wan YL, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitschek U, Baluska F, Briggs WR (2008) The subcellular localization and blue-light induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 1: 103-117
 39. Jarillo JA, Ahmad M, Cashmore AR (1998) NPL1: a second member of the NPH serine/threonine kinase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117: 719
 40. Ueno K, Kinoshita T, Inoue S, Emi T, Shimazaki K (2005) Characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol* 46: 955-963
 41. Kagawa T, Wada M (2000) Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol* 41: 84-93
 42. Meske V, Ruppert V, Hartmann E (1996) Structural basis for the red light induced repolarization of tip growth in caulonema cells of *Ceratodon purpureus*. *Protoplasma* 192: 189-198
 43. Kagawa T, Wada M (1993) Light-dependent nuclear positioning in prothallial cells of *Adiantum capillus-veneris* L. *Planta* 196: 775-780
 44. Eun SO, Lee Y (1997) Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiol* 115: 1491-1498
 45. Staiger CJ, Baluska F, Volkmann FD, Barlow PW (2000) Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
 46. Hussey PJ (2004) The Plant Cytoskeleton in cell differentiation and development, Annual Plant Reviews, Blackwell Publishing 2004
 47. Lindsey K (2004) Polarity in Plants, Annual Plant Reviews, Blackwell Publishing
 48. Wagner G, Haupt W, Laux A (1972) Reversible inhibition of chloroplast movement by cytochalasin B in the green alga *Mougeotia*. *Science* 176: 808-809
 49. Izutani Y, Takagi S, Nagai R (1990) Orientation movements of chloroplasts in *Vallisneria* epidermal cells: different effects of light at low- and high-fluence rate. *Photochem Photobiol* 51: 105-111
 50. Kadota A, Wada M (1992) Reorganization of the cortical cytoskeleton in tip-growing fern protonemal cells during phytochrome-mediated phototropism and blue light-induced apical swelling. *Protoplasma* 166: 35-41
 51. Malec P, Rinaldi RA, Gabrys H (1996) Light-induced chloroplast movements in *Lemna trisulca*. Identification of the motile system. *Plant Sci* 120: 127-137
 52. Blatt MR, Briggs WR (1980) Blue-light-induced cortical fiber reticulation concomitant with chloroplast aggregation in the alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 147: 355-362
 53. Menzel D, Elsner-Menzel C (1989) Actin-based chloroplast rearrangements in the cortex of the giant coenocytic green alga *Caulerpa*. *Protoplasma* 150: 1-8
 54. Mineyuki Y, Kataoka H, Masuda Y, Nagai R (1995) Dynamic changes in the actin cytoskeleton during the high-fluence rate response of the *Mougeotia* chloroplast. *Protoplasma* 185: 222-229
 55. Cox G, Hawes CR, van der Lubbe L, Juniper BE (1987) High-voltage electron microscopy of whole, critical-point dried plant cells. 2. Cytoskeletal structures and plastid motility in *Selaginella*. *Protoplasma* 140: 173-186
 56. Dong XJ, Ryu JH, Takagi S, Nagai R (1996) Dynamic changes in the organization of microfilaments associated with the photocontrolled motility of chloroplasts in epidermal cells of *Vallisneria*. *Protoplasma* 195: 18-24
 57. Dong XJ, Nagai R, Takagi S (1998) Microfilaments anchor chloroplasts along the outer periclinal wall in *Vallisneria* epidermal cells through cooperation of PFR and Photosynthesis. *Plant Cell* 3: 1299-1306
 58. Kandasamy MK, Meagher RB (1999) Actin-organelle interaction: association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytoskel* 44: 110-118
 59. Krzeszowiec W, Rajwa B, Dobrucki J, Gabrys H (2007) Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biol Cell* 99: 251-260
 60. Sellers JR (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1496: 3-22
 61. Cope M, Jamie TV, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J (1996) Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* 4: 969-987
 62. Oliver TN, Berg JS, Cheney RE (1999) Tails of unconventional myosins CMLS. *Cell Mol Life Sci* 56: 243-257
 63. Reichelt S, Kendrick-Jones J (2000) Myosins, W: Staiger CJ, Baluska F, Volkmann FD, Barlow PW (red) Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 29-44
 64. Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794

65. Reddy SN, Day IS (2001) Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biol* 7: 0024.1-0024.17
66. Bezanilla M, Horton AC, Sevensen HC, Quatrano RS (2003) Phylogenetic analysis of new plant myosin sequences. *J Mol Evol* 57: 229-239
67. Wang Z, Pesacreta TC (2004) A subclass of myosin XI is associated with mitochondria, plastids, and the molecular chaperone TCP-1 α in maize. *Cell Mot Cytoskel* 57: 218-232
68. Wojtaszek P, Anielska-Mazur A, Gabryś H, Baluska F, Volkmann D (2005) Recruitment of myosin VIII towards plastid surfaces is root cap-specific and provides the evidence for actomyosin involvement in root osmosensing. *Funct Plant Biol* 32: 721-736
69. Krzeszowiec W, Gabryś H (2007) Phototropin Mediated Relocation of Myosins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 5: 333-336
70. Liebe S, Menzel D (1995) Actomyosin-based motility of endoplasmic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria* mesophyll cells. *Biol Cell* 85: 207-222
71. Kinkema M, Wang H, Schiefelbein J (1994) Molecular analysis of the myosin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 26: 1139-1153
72. Knight AE, Kendrick-Jones J (1993) A myosin-like protein from a higher plant. *J Mol Biol* 231: 148-154
73. Baluska F, Cvrckova F, Kendrick-Jones J, Volkmann D (2001) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol* 126: 39-46
74. Roberts AG, Oparka KJ (2003) Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ* 26: 103-124
75. Gillespie T, Oparka KJ (2005) Plasmodesmata – gateways for intercellular communication, W: Fleming AJ (red) *Annual Plant Reviews*, t. 16 *Intercellular Communication in Plants*. Wiley-Blackwell, str. 109-146
76. Radford JE, White RG (1998) Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J* 14: 743-750
77. Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant Journal* 19: 555-567
78. Baluska F, Barlow PW, Volkmann D (2000) Actin and myosin VIII in developing root cells, W: Staiger CJ, Baluska F, Volkmann FD, Barlow PW (red) *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 457-476
79. Overall RL, White RG, Blackman LM, Radford JE (2000) Actin and Myosin in plasmodesmata, W: Staiger CJ, Baluska F, Volkmann FD, Barlow PW (red) *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 497-515
80. Blackman LM, Overall RL (2001) Structure and function of plasmodesmata. *Aust J Plant Physiol* 28: 709-727
81. Volkmann D, Mori T, Tirlapur UK, Koenig K, Fujiwara T, Kendrick-Jones J, Baluska F (2003) Unconventional myosins of the plant-specific class VIII: endocytosis, cytokinesis, plasmodesmata/pit-fields, and cell-to-cell coupling. *Cell Biol Inter* 27: 289-291
82. Samaj J, Peters M, Volkmann D, Baluska F (2000) Effects of myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione 2-monoxime on distributions of myosins, F-actin, microtubules, and cortical endoplasmic reticulum in maize root apices. *Plant Cell Physiol* 41: 571-582
83. Komis G, Apostolakis P, Galatis B (2003) Actomyosin is involved in the plasmolytic cycle: gliding movement of the deplasmolyzing protoplast. *Protoplasma* 221: 245-256
84. Kinkema M, Schiefelbein J (1994) A myosin form a higher plant has structural similarities to class V myosins. *J Mol Biol* 239: 591-597
85. Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Orii H, Nakamori R, Katayama E, Anson M, Shimmen T, Oiwa K (2003) Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35nm steps at high velocity. *EMBO J* 22: 1263-1272
86. Yamamoto K, Kikuyama M, Sutoh-Yamamoto N, Kamitsubo E, Katayama E (1995) Myosin from alga *Chara*: unique structure revealed by electron microscopy. *J Mol Biol* 254: 109-112
87. Hashimoto K, Igarashi H, Mano S, Nishimura M, Shimmen T, Yokota E (2005) Peroxisomal localization of a myosin XI isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46: 782-789
88. Peremyslov VV, Prokhnovsky AI, Avisar D, Dolja VV (2008) Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 146: 1109-1116
89. Ojangu EL, Jarve K, Paves H, Truve E (2007) *Arabidopsis thaliana* myosin XIK is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. *Protoplasma* 230: 193-202
90. Li JF, Nebenführ A (2007) Organelle targeting of myosin XI is mediated by two globular tail subdomains with separate cargo binding sites. *J Biol Chem* 282: 20593-20602
91. Reisen D, Hanson MR (2007) Association of six YFP-myosin XI-tail fusions with mobile plant cell organelles. *BMC Plant Biology* 9: 6
92. Tlałka M, Fricker M (1999) The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemma trisulca* L. *Plant J* 20: 461-473
93. Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1456-1461
94. Matur J, Matur N, Hülskamp M (2002) Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol* 128: 1031-1045

The role of actomyosin in blue light-induced chloroplast movements

Weronika Krzeszowiec, Halina Gabryś[✉]

Jagiellonian University, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Department of Plant Physiology and Biochemistry, 7 Gronostajowa St., 30-387 Krakow, Poland

✉ e-mail: halina.gabrys@uj.edu.pl

Key words: actin cytoskeleton, chloroplast movements, myosin VIII, myosin XI, phototropins

ABSTRACT

Chloroplast redistribution in the cell depends on direction, fluence-rate and spectral composition of the incident light. Two photoreceptors, phototropin 1 and 2, control the chloroplast responses in higher land plants. Actin and myosin form the motor system. Although numerous results point to calcium and phosphoinositides as the secondary messengers, the signal transduction pathways remain unidentified. Two possible roles of the acto-myosin system in the mechanism of chloroplast redistribution have been discussed. Reorganization of the actin cytoskeleton has been observed in water plants where the chloroplast movements depend on red light. This reorganization appears to be associated with cytoplasmic streaming. In higher land plants, e.g. in *Arabidopsis thaliana*, the chloroplast responses depend only on blue light. Neither specific light-induced reorganization of actin nor cytoplasmic streaming have been observed in the mesophyll of these species. A blue light-specific relocalization of myosins accompanies the chloroplast responses in *Arabidopsis*. Thus myosins might be potential targets of light signaling in higher land plants.

Roślinna twarz formin – organizatorów cytoszkieletu aktynowego

Michalina Maruniewicz

Anna Kasprócz

Przemysław Wojtaszek

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; e-mail: przemow@amu.edu.pl, tel.: (061) 829 59 72

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: aktyna, cytoszkielet, formina, kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoszkielet

Wykaz skrótów: ABP – białko wiążące aktynę (ang. *actin binding protein*); ECM – matriks zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*); WMC – kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoszkielet (ang. *cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum*); FH1 – domena homologiczna formin 1 (ang. *formin homology domain 1*); FH2 – domena homologiczna formin 2 (ang. *formin homology domain 2*); PTEN – homolog fosfatazy i tensyny (ang. *phosphatase and tensin homolog*); RhoGAP – białko aktywujące GTPazę typu Rho (ang. *Rho GTPase-Activating Proteins*)

Podziękowania: Prace nad forminami zostały zapoczątkowane w ramach Polskiej Sieci „Mobilitas.pl” i są kontynuowane w ramach projektów badawczych finansowanych grantami Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego PBZ-KBN-110/P04/2004, N N303 294434 i N N303 360735 dla PW oraz grantem Dziekana Wydziału Biologii UAM dla AK. Obecnie AK jest stypendystką projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2, Priorytetu VIII, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

STRESZCZENIE

Reorganizacja cytoszkieletu aktynowego umożliwiającą komórkom prawidłowe funkcjonowanie w warunkach normalnych, a także przystosowywanie się do zmian w środowisku zewnętrznym. Forminy są białkami wiążącymi aktynę, odpowiedzialnymi za nukleację aktyny, a dalej – elongację mikrofilamentów. Spośród innych białek wiążących aktynę wyróżnia je obecność zachowanej w ewolucji domeny FH2 (ang. *formin homology domain 2*), a także dodatkowych domen, charakterystycznych dla różnych klas formin. W komórkach zwierzęcych udowodniono udział formin, między innymi, w procesie cytokinezy, czy utrzymaniu kształtu i polarności komórki, a także kształtowaniu filopodiów, endocytozie oraz w wielu innych procesach. Obecność formin w komórkach roślinnych udokumentowano dopiero niedawno. Jak dotąd, udowodniono, że biorą one udział we wzroście wierzchołkowym oraz w procesie cytokinezy. Ze względu na różną organizację funkcjonalną komórek roślinnych i zwierzęcych można przypuszczać, że i zakres funkcji formin będzie odmienny. Jedną z proponowanych jest rola białka łącznikowego w obrębie kontinuum WMC (ang. *cell wall-plasma membrane-cytoskeleton*). Jednak stan wiedzy o funkcjonowaniu formin jest znacznie uboższy niż w przypadku formin zwierzęcych czy z drożdży.

WPROWADZENIE

Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu wielokomórkowego niezbędne jest zapewnienie ciągłej wymiany informacji między poszczególnymi komórkami, a także dynamicznej odpowiedzi na bodźce zarówno zewnętrzne, jak i pochodzące z wnętrza komórki. Taką plastyczność zapewniają komórkom zwierzęcym m.in. cytoszkielet oraz matriks zewnątrzkomórkowa (ECM, ang. *extracellular matrix*). Cytoszkielet, poprzez odpowiednie odkształcanie błony komórkowej, wpływa bezpośrednio na jej kształt, natomiast ECM stanowi strukturalnie ukształtowane otoczenie, umożliwiające z jednej strony bezpośrednie zakotwiczenie cytoszkieletu, a z drugiej – przekazywanie sygnałów, wpływających na procesy życiowe, do wnętrza komórek. Funkcjonalnym, a do pewnego stopnia również strukturalnym, odpowiednikiem ECM u roślin jest ściana komórkowa [1]. Idea kontinuum WMC (ang. *cell wall-plasma membrane-cytoskeleton*), spajającego komórki mechanicznie i funkcjonalnie, znana jest od dawna wśród badaczy komórek zwierzęcych czy grzybowych, jednak istnienie takiego kontinuum w komórkach roślinnych zasugerowano dopiero w latach 90. XX wieku [2]. Poprawne działanie kontinuum WMC jest możliwe dzięki białkom łączącym ze sobą poszczególne jego elementy, a za jednego z potencjalnych kandydatów u roślin uważane są forminy [3].

Cytoszkielet aktynowy jest strukturą bardzo dynamiczną. Decyduje jednak o tym nie stan dynamicznej równowagi między pulą aktyny występującą w formie globularnej a pulą spolimeryzowaną w formie mikrofilamentów, lecz przede wszystkim występowanie dużej puli białek wiążących aktynę (ABP, ang. *actin binding proteins*). Białka te można podzielić na różne grupy funkcjonalne ze względu na formę aktyny, z którą oddziałują, a także proces, w jakim biorą udział (np.: białka wiążące monomery aktyny; białka odpowiedzialne za nukleację czy białka kontrolujące depolimeryzację) [4]. Polimeryzacja aktyny jest procesem wymagającym nakładu energetycznego. Szczególnie niekorzystny z termodynamicznego punktu widzenia jest etap nukleacji, czyli wytworzenia pierwszego dimeru lub trimeru aktyny. Stąd też procesy te inicjują i wspomagają białka ABP uczestniczące w nukleacji, a następnie w elongacji mikrofilamentu aktynowego [5]. Jak dotąd zidentyfikowano kilka białek odpowiedzialnych za nukleację aktyny u zwierząt. Są to: kompleks Arp2/3, Spire, Cordon-bleu, lejomodyna oraz, wspomniane już, białka z grupy formin [6,7]. Istnieją wyraźne różnice w organizacji cytoszkieletu u organizmów roślinnych i zwierzęcych, jak i funkcji, jakie poszczególne elementy pełnią u tych organizmów. Aktyna u roślin jest odpowiedzialna za integrację transportu wewnątrzkomórkowego, w przeciwieństwie do zwierząt, gdzie główną rolę odgrywa cytoszkielet tubulinowy [8]. Zarówno u roślin, jak i u zwierząt cytoszkielet aktynowy jest zlokalizowany w okolicy jądrowej, a także w części koro-

wej komórki, kontaktując się z błoną komórkową [9]. Z uwagi na obecność ściany komórkowej zakotwiczenie cytoszkieletu w błonie komórkowej, a dalej w ścianach komórek roślin wydaje się być szczególnie istotne między innymi dla przekazywania sygnałów mechanicznych do wnętrza komórki. Brak bezpośrednich homologów integryn i oddziałujących z nimi białek cytoplazmatycznych w genomie *Arabidopsis* sugeruje, że u roślin muszą istnieć inne białka zaangażowane w szlaki przekazywania sygnału. Błonowa, charakterystyczna dla roślin, lokalizacja formin predystynuje je do pełnienia funkcji łącznika między środowiskiem zewnętrznym a cytoszkieletem. W przypadku komórek roślinnych możliwa jest nukleacja aktyny w pobliżu błony komórkowej, a także dośrodkowa elongacja mikrofilamentów. Do takiej reorientacji mikrofilamentów mogłoby dochodzić np. w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne przekazywane do wnętrza komórki między innymi przez forminy.

BUDOWA FORMIN

Forminy definiowane są przez obecność zachowanej w ewolucji domeny FH2 (ang. *formin homology domain 2*), a także domeny FH1 (ang. *formin homology domain 1*) [10]. Domena FH2 zlokalizowana jest na końcu C białka i ma długość około 400–500 reszt aminokwasowych. Wiąże się ona z szybko rosnącym końcem kolczastym filamentu aktynowego i jest kluczowa dla procesu nukleacji i elongacji aktyny. Domena FH1, wykazuje znacznie niższy poziom zachowania sekwencji, jest bogata w reszty prolinowe i odpowiada za wiązanie kompleksu wolnej aktyny z profiliną [11].

Analiza bioinformatyczna, polegająca na przeszukaniu baz danych sekwencją domeny FH2, pozwoliła na wydzielenie odrębnych grup formin zwierząt i grzybów oraz roślin, wśród których znajdują się białka zlokalizowane w błonie komórkowej [7,12]. Choć istnieją zasadnicze różnice pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej rodziny, można wnioskować, że białka z domeną forminową występują powszechnie u eukariontów oraz że pojawiły się w ewolucji jeszcze przed rozdzieleniem linii roślinnej i zwierzęcej. Mimo intensywnych analiz bioinformatycznych na dostępnych 597 genomach prokariotycznych, do tej pory nie zdołano zidentyfikować u nich formin [13].

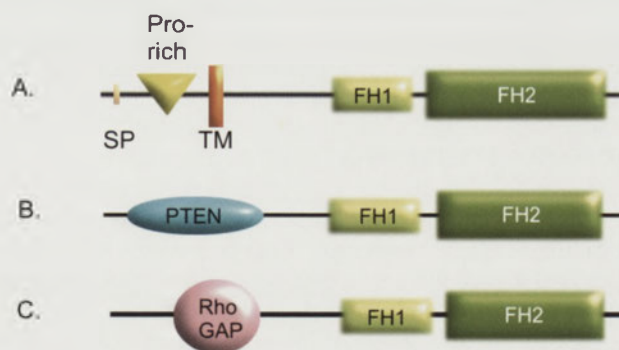
W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano 21 genów kodujących forminy, które zaliczono do dwóch klas. Dodatkowe porównanie sekwencji innych roślin umożliwiło wyróżnienie jeszcze jednej klasy, typowej dla roślin niższych. Schematyczną budowę formin roślinnych przedstawiono na rycinie 1. U **formin z grupy I** (AtFH1-AtFH11) zwraca uwagę przede wszystkim obecność domeny transbłonowej w pobliżu końca N białka. Przed domeną transbłonową jest zlokalizowana domena bogata w reszty prolinowe oraz peptyd sygnałny. Taka organizacja umożliwia zakotwiczenie białek z tej grupy w błonie komórkowej i wyeksponowanie fragmentu N-końcowego do przestrzeni między ścianą komórkową a błoną komórkową [12].

Forminy z klasy II (AtFH12-AtFH21 u *Arabidopsis*) zawierają charakterystyczne dla rodziny formin domeny FH2 oraz FH1. W przeciwieństwie do formin z klasy I białka te nie zawierają domeny transbłonowej. Natomiast u niektó-

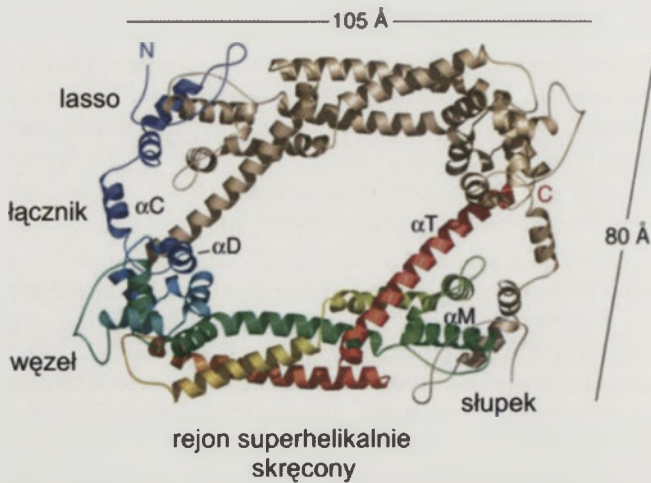
rych przedstawicieli tej grupy zidentyfikowano na końcu N domenę PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*), która u zwierząt cechuje się aktywnością fosfatazy w stosunku do licznych substratów, takich jak białka czy lipidy. Co ciekawe, u formin roślinnych aktywność ta wydaje się być utracona w wyniku mutacji obejmującej kluczowe reszty aminokwasów [12,14]. Domeny podobne do PTEN obecne są także w tensynach zwierzęcych – białkach również wiążących się z szybko rosnącym końcem aktyny [15].

Najpóźniej wyodrębniona i najłabiej zanalizowana jest **klasa III formin**. Do tej pory zidentyfikowano zaledwie cztery geny należące do tej klasy. Są to: Selmo2a/b (*Selaginella moellendorffii*), Phypa7 (*Physcomitrella patens*) oraz Osta1 i Ostlu1 (po jednym genie u dwóch różnych przedstawicieli *Ostreococcus* sp.). Białka z tej grupy wykazują pewne podobieństwo sekwencji do formin z klasy I. Charakteryzuje je jednak brak rejonu transbłonowego oraz obecność dodatkowej domeny RhoGAP (ang. *Rho GTPase-Activating Proteins*) na końcu N białka. Dokładna analiza sekwencji domeny RhoGAP ujawniła mutację w rejonach kluczowych dla wiązania białek Rho czy Rab, zaangażowanych w aktywację GTPazy. Mimo to wydaje się, że funkcja wiązania RhoGTP mogła zostać zachowana. Umieszczałoby to forminy z klasy III na szlaku sygnalizacji przebiegającym z udziałem RhoGTP [14].

Dzięki badaniom krystalograficznym rozwiązano strukturę przestrzenną domeny FH2 dla białka Bni1p z *S. cerevisiae* [16]. Ustalono także strukturę białka w kompleksie z aktyną znakowaną na końcu C tetrametylorodaminą [17]. Najnowsze badania wskazują [18], że domena FH2 białka ludzkiej forminy DAAM1 formuje dimer, co może być potwierdzeniem modelu proponowanego dla Bni1p. Mimo widocznych różnic w budowie formin, zachowana jest ogólna architektura cząsteczki. W obrębie domeny FH2 wyróżniono pięć subdomen (Ryc. 2). Są to: struktura N-końcowa przypominająca *lasso*; fragment łącznikowy (ang. *linker*), złożony z 17 reszt aminokwasowych; struktura węzła (ang. *knot*), rejon superhelisy (ang. *coiled-coil*) oraz C-końcowy „słupek” (ang. *post*). W dimerze podjednostki oddziałują ze sobą w orientacji głowa-ogon, z wykorzystaniem struktury *lasso* z jednej podjednostki i słupka z drugiej (*lasso* otacza słupek). Rejon łącznikowy jest na tyle elastyczny, że umożliwia wzajemne przesuwanie podjednostek względem siebie [16-18]. Domena FH2 graniczy od strony N-końcowej z



Rycina 1. Schematyczna organizacja domen roślinnych białek z rodziny formin: A – formina z klasy I; oprócz domen FH1 i FH2, zawiera peptyd sygnałny (SP), rejon bogaty w reszty prolinowe (Pro-rich) oraz rejon transbłonowy (TM); B – formina z klasy II; dodatkowa domena PTEN zlokalizowana na końcu N; C – białko z klasy III; dodatkowa domena RhoGAP.



Rycina 2. Diagram wstęgowy obrazujący ogólną architekturę dimeru domen FH2. Jedna podjednostka jest zaznaczona w kolorach spektrum światła widzialnego (od niebieskiego na N-końcu do czerwonego na C-końcu), druga podjednostka jest przedstawiona w kolorze brązowym. Na rysunku oznaczono struktury: lasso, łącznika, węzła, rejonu superhelikalnie skręconego oraz słupka, a także przybliżoną wielkość dimeru. Oznaczono także końce C i N, oraz poszczególne helisy α . Warto zwrócić uwagę na sposób, w jaki lasso jednej podjednostki otacza słupek drugiej podjednostki. Przedruk z: Xu Y, Moseley J, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode B, Eck M (2004) „Crystal structures of Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture.” Cell 116: 711-723, za zgodą Elsevier.

domeną FH1, która jest identyfikowana u niemal wszystkich odkrytych formin (wyjątek stanowi białko ForC ze śluzowca *Dictyostelium discoideum*) [19]. Domeny FH1 znacznie różnią się długością, określaną od 50 do 300 reszt aminokwasowych. Domena FH1 nie wykazuje uporządkowania strukturalnego, ani jednoznacznej sekwencji zgodnej. Charakteryzuje ją natomiast obecność odcinków o wysokiej zawartości proliny (35–100%) [11]. Fizjologiczną funkcją domeny FH1 jest wiązanie z kompleksem profilina-aktyna i odpowiednie pozycjonowanie podjednostek aktyny względem domeny FH2 odpowiedzialnej za nukleację i elongację. Liczba powtórzeń bogatych w prolinę wpływa na wydajność procesu. Wykazano, że w warunkach *in vitro* poszczególne forminy z różną wydajnością oddziałują z różnymi izoformami profiliny, tworząc swoiste pary katalityczne. Mógłby to być ciekawy przykład regulacji wydajności procesu elongacji filamentów aktynowych [20,21]. W budowie formin zwierzęcych i grzybowych, w zależności od grupy, do której należą, wyróżniane są także dodatkowe domeny, których nie zidentyfikowano w forminach roślinnych, co sugeruje, że mechanizm regulacji polimeryzacji mikrofilamentów u roślin może być znacząco odmienny.

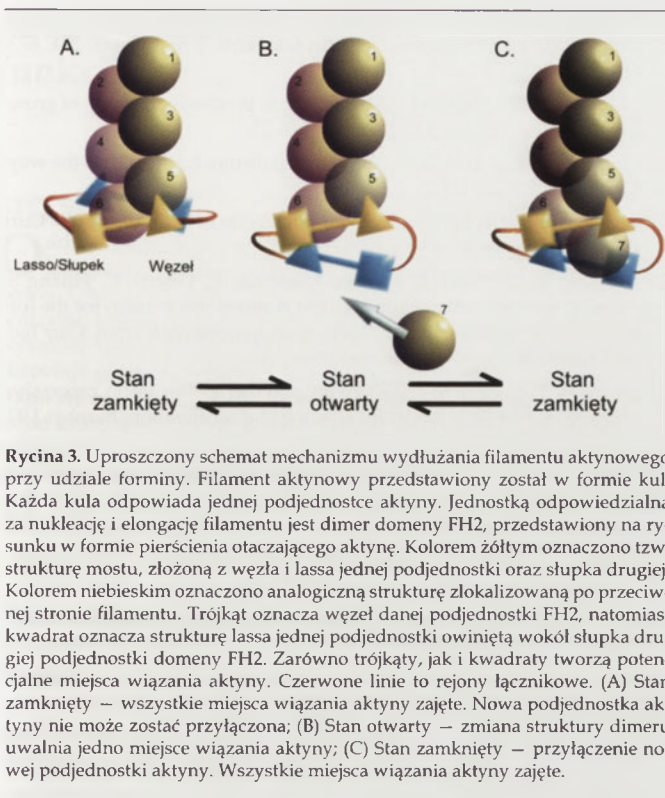
MECHANIZM DZIAŁANIA

Forminy wiążą się do kolczastego, szybko rosnącego końca filamentu aktynowego. Udowodniono, że formina podczas elongacji filamentu pozostaje związana z rosnącym końcem (a nie dysocjuje i przyłącza się w trakcie elongacji), pozwalając na dołączanie kolejnych monomerów aktyny (jest to tak zwany *processive capping* albo *leaky capping*) [22]. Dzięki wiązaniu z końcem filamentu forminy chronią rosnącą wiązkę przed białkami nakrywającymi (czapeczkującymi – ang. *capping proteins*), takimi jak np. ludzkie białko capZ. Białka nakrywające wiążą się z szybko rosnącym końcem

aktyny, uniemożliwiając dołączenie kolejnych podjednostek aktyny, a tym samym – uniemożliwiając wydłużanie filamentu. Po związaniu forminy do kolczastego końca filamentu aktynowego niemożliwe jest przyłączenie się białka nakrywającego.

Cechą wspólną wszystkich zanalizowanych formin jest spowalnianie zarówno polimeryzacji, jak i depolimeryzacji filamentów aktynowych. Stopień, w jakim wiązanie forminy ma wpływ na dynamikę aktyny, zależy jednak znacznie od typu forminy. Dwa skrajne przykłady to Cdc12 z *S. pombe*, która niemal całkowicie blokuje elongację, oraz mDia1 z myszy, która nie ma wpływu na tempo elongacji [23,24]. Spowolnienie polimeryzacji filamentu aktynowego to koszt ochrony przed białkami nakrywającymi i możliwości tworzenia długich struktur nierozgałęzionych. Coraz liczniejsze doniesienia o udziale formin w tworzeniu wiązek filamentów wskazują, że ich rola nie ogranicza się jednak do tworzenia prostych włókien aktynowych. Tworzenie form wiązkowych aktyny jest związane z odmiennym mechanizmem wiązania formin. W tym przypadku formina nie wiąże się z końcem rosnącej wiązki. Dochodzi raczej do jej dysocjacji i wiązania z boczną stroną wiązki aktynowej. Właściwości takie zaobserwowano dla mDia2, FRL1 (z *Mus musculus*), Bnr1p (z *S. cerevisiae*) oraz dla AtFH1 (z *A. thaliana*) [25].

Należy podkreślić, że mechanizm działania formin został poznany, przynajmniej częściowo, jedynie w przypadku formin zwierzęcych i pochodzących z komórek grzybów. Jak dotąd nie stworzono jednak jednego, powszechnie uznanego modelu ich działania. Na uwagę zasługuje propozycja opierająca się na przechodzeniu forminy między konformacją otwartą i zamkniętą zaproponowana przez Otomo i wsp. [17], a rozwinięta przez Shemesh'a i wsp. [26]. W modelu tym (Ryc. 3) jednostką odpowiedzialną za nukleację i elongację filamentu jest dimer domen FH2 z czterema potencjalnymi miejscami wiązania aktyny. W modelu tym przyjmuje się istnienie jednostki strukturalnej składającej się ze struktury lasso, wychodzącej z węzła jednej podjednostki i wiążącej słupek drugiej. Jednostka ta łączy dwa monomery aktyny, została więc nazwana mostem. Ułożenie struktury mostu względem wbudowanych podjednostek aktyny warunkuje otwarty lub zamknięty stan konformacyjny, w którym znajduje się białko. Przejścia między stanami konformacyjnymi umożliwiają wydłużanie wiązek aktyny. Przyłączenie domeny FH2 do szybko rosnącego końca filamentu wymusza rotację trzech kolejnych podjednostek o 180°. Taka konformacja zapewnia wiązanie aktyny przez domenę FH2 wszystkimi dostępnymi miejscami i uniemożliwia dołączenie kolejnej podjednostki. Wspomniany model zakłada, że przejście domeny FH2 do stanu otwartego, czyli zdolnego do wiązania nowej podjednostki aktyny, jest poprzedzone częściową dysocjacją domeny i jej translokacją wzdłuż końca filamentu. Prowadzi to do relaksacji filamentu i zmniejszenia kąta rotacji do 167°, co umożliwi wiązanie nowych podjednostek. Najnowsze obserwacje [27] wprowadzają pewne zmiany w zaproponowanym modelu. Stwierdzono bowiem, że dodanie nowej podjednostki do filamentu poprzedza translokację domeny. Wydaje się więc, że sama relaksacja filamentu związana z wydłużaniem odcinka łącznikowego między poszczególnymi domenami FH2 bez translokacji domeny, jest wystarczająca dla jego elongacji.



Rycina 3. Uproszczony schemat mechanizmu wydłużania filamentu aktynowego przy udziale forminy. Filament aktynowy przedstawiony został w formie kul. Każda kula odpowiada jednej podjednostce aktyny. Jednostką odpowiedzialną za nukleację i elongację filamentu jest dimer domeny FH2, przedstawiony na rysunku w formie pierścienia otaczającego aktynę. Kolorem żółtym oznaczono tzw. strukturę mostu, złożoną z węzła i lassa jednej podjednostki oraz słupka drugiej. Kolorem niebieskim oznaczono analogiczną strukturę zlokalizowaną po przeciwnej stronie filamentu. Trójkąt oznacza węzeł danej podjednostki FH2, natomiast kwadrat oznacza strukturę lassa jednej podjednostki owiniętą wokół słupka drugiej podjednostki domeny FH2. Zarówno trójkąty, jak i kwadraty tworzą potencjalne miejsca wiązania aktyny. Czerwone linie to rejonny łącznikowe. (A) Stan zamknięty – wszystkie miejsca wiązania aktyny zajęte. Nowa podjednostka aktyny nie może zostać przyłączona; (B) Stan otwarty – zmiana struktury dimeru uwalnia jedno miejsce wiązania aktyny; (C) Stan zamknięty – przyłączenie nowej podjednostki aktyny. Wszystkie miejsca wiązania aktyny zajęte.

ROLA FORMIN

Liczne badania, prowadzone głównie na komórkach zwierząt i drożdży wskazują, że aktywność formin jest ściśle związana z procesami wymagającymi prawidłowego funkcjonowania cytoszkieletu aktynowego. Należą do nich między innymi: cytokineza, w trakcie której forminy są lokalizowane we wrzecionie podziałowym, endocytoza, formowanie filopodiów czy utrzymanie polarności komórki. Forminy odgrywają także rolę w szlaku sygnalizacji opartym na RhoGTP [10,28].

Budowa formin roślinnych zaliczanych do klasy I predestynuje je do pełnienia funkcji łączników w procesie przekazywania sygnałów z otoczenia do wnętrza komórki. Zgodnie z modelem tensegralnym komórka jest zdolna do odbierania bodźców mechanicznych poprzez wyspecjalizowane białka receptorowe zlokalizowane w błonie komórkowej. Białka receptorowe oddziałują następnie z cytoszkieletem przenikającym cytoplazmę. Poszczególne elementy cytoszkieletu pełnią w tym modelu różne funkcje. I tak, mikrofilamenty aktynowe przeciwdziałają siłom rozciągającym, podczas gdy mikrotubule przeciwdziałają się kurczeniu. Kształt komórki zwierzęcej jest więc w pewnej mierze wypadkową stanu wstępnego naprężenia struktur cytoszkieletu, jak i stanu równowagi dynamicznej między mikrofilamentami i mikrotubulami [29,30]. W komórkach roślinnych kształt jest determinowany przez wzajemne oddziaływanie ciśnienia osmotycznego (turgoru) protoplastu i ścian komórkowych o zróżnicowanych właściwościach mechanicznych. Z powyższych względów zakłada się, że cytoszkielet nie ma bezpośredniego wpływu na odkształcenia komórki roślinnej. Konieczne zdaje się zatem istnienie elementów umożliwiających przekazywanie bodźców mechanicznych ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. W komórkach zwierzęcych białka z rodziny integrzyn

pełnią funkcję łącznika strukturalnego między matriks zewnątrzkomórkową, błoną komórkową i cytoszkieletem. Z uwagi na fakt, że do tej pory u roślin nie zidentyfikowano białek homologicznych do integrzyn oraz białek łączących je z cytoszkieletem, forminy wydają się być odpowiednimi kandydatami do roli białek łącznikowych w obrębie kontinuum WMC [3,31].

W przeciwieństwie do formin występujących u zwierząt czy grzybów, forminy roślinne są bardzo słabo scharakteryzowane. Większość informacji pochodzi z badań *in silico* i wymaga weryfikacji. Dostępne wyniki badań doświadczalnych dotyczą jedynie kilku formin z grupy I. Badania te potwierdziły lokalizację błonową wybranych formin [32-34], zwłaszcza w obrębie poprzecznych ścian komórkowych (Formina 4) [34]. Poprzeczne ściany komórkowe komórek organów osiowych, takich jak korzeń czy łodyga, łączą sąsiadujące komórki przy udziale plazmodesm, a także są zaangażowane w przekazywanie sygnałów. Są to rejonny o podwyższonej zawartości aktyny, co może być zaskakujące, gdyż nie są to rejonny, w których dochodzi do wzrostu wydłużeniowego komórki. Z uwagi na intensywny przepływ błon w tym obszarze, Baluška [9] zaproponował dla tych rejonów koncepcję synapsy, analogicznej do synapsy neuronalnej, zdolnej do szybkiego przekazywania sygnałów. Lokalizacja formin w rejonie poprzecznych ścian komórkowych wskazuje na ich potencjalną rolę w kontroli cytoszkieletu aktynowego, a przez to być może i właściwego funkcjonowania całej komórki. Nadekspresja genów Forminy 1 [32] oraz Forminy 8 [34] prowadziła do zaburzeń polarnego wzrostu takich struktur, jak łagiewka pyłkowa czy włosniki. Nieprawidłowy wzrost związany był z zaburzeniami w obrębie cytoszkieletu aktynowego. Także Formina 6 wydaje się być zaangażowana w reakcje wzrostowe komórek. Należy podkreślić, że badania przeprowadzono w szczególnych warunkach – w trakcie wzrostu komórki wywołanego zakazaniem nicieniem. Wykazano, że w komórkach olbrzymich cytoszkielet przyjmuje postać grubych, przypadkowo rozmieszczonych wiązek przenikających cytoplazmę i część korową komórek [35]. Formowanie komórek olbrzymich w trakcie infekcji wymaga także zmiany składu ściany komórkowej. Wiązki aktyny mogłyby więc służyć jako szlaki dla przemieszczania pęcherzyków niosących składniki ściany komórkowej na obrzeża komórki.

Coraz więcej przesłanek przemawia za udziałem cytoszkieletu aktynowego i związanych z nim białek, w tym formin, w słabo dotychczas poznanych szlakach przekazywania sygnału u roślin oraz utrzymaniu integralności komórki. Badanie funkcji specyficznych formin roślinnych – białek o zróżnicowanej budowie, kodowanych przez geny należące do rodziny wielogenowej, stanowi intrygujące, choć nietatwe wyzwanie dla naukowców. Nie ulega wątpliwości, że znaczące różnice w mechanizmie działania oraz lokalizacja subkomórkowa poszczególnych białek z rodziny formin są ściśle powiązane z szerokim spektrum procesów, w które są zaangażowane.

PIŚMIENNICTWO

1. Wojtaszek P (2000) Czym jest komórka roślinna? Miejsce ścian komórkowych. *Post Biol Kom* 27: 315-324
2. Wyatt SE, Carpita NC (1993) The plant cytoskeleton-cell wall continuum. *Trends Cell Biol* 3: 413-417
3. Baluška F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. *Emerging links revisited*. *Plant Physiol* 133: 482-491

4. van der Honing HS, Emons AMC, van Ketelaar T (2007) Actin based processes that could determine the cytoplasmic architecture of plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1773: 604-614
5. Renault L, Bugyi B, Carlier MF (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol* 18: 494-504
6. Chhabra E, Higgs H (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9: 1110-1121
7. Liu R, Linardopoulou E, Osborn G, Parkhurst S (2008) Formins in development: Orchestrating body plan origami. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.016
8. Boutte Y, Vernhettes S, Satiat-Jeuemaitre B (2007) Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organization of higher plant cells. *Cell Biol Int* 31: 649-654
9. Baluška F, Hlaváčka A (2005) Plant formins come of age: something special about cross-walls. *New Phytol* 168: 499-503
10. Faix J, Grosse R (2006) Staying in shape with formins. *Dev Cell* 10: 693-706
11. Higgs H (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* 30: 242-253
12. Cvrčková F, Novotný M, Picková D, Žárský V (2004) Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BMC Genomics* 5: 44
13. Chalkia D, Nikolaidis N, Makarowski W, Klein J, Nei M (2008) Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments. *Mol Biol Evol* 25: 2717-2733
14. Grunt M, Žárský V, Cvrčková F (2008) Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC Evol Biol* 8:115
15. Lo SH, Janmey PA, Hartwig JH, Chen LB (1994) Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. *J Cell Biol* 125: 1067-1075
16. Xu Y, Moseley J, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode B, Eck M (2004) Crystal structures of Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116: 711-723
17. Otomo T, Tmochick D, Otomo C, Panchal S, Machius M, Rosen M (2005) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433: 488-494
18. Yamashita M, Higashi T, Suetsugu S, Sato Y, Ikeda T, Shirakawa R, Kita T, Takenawa T, Horiuchi H, Fukai S, Nureki O (2007) Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain. *Genes to Cells* 12: 1255-1265
19. Wallar B, Alberts A (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13: 435-446
20. Kovar D (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18: 11-17
21. Neidt E, Scott BJ, Kovar D (2009) Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments. *J Biol Chem* 284: 673-684
22. Watanabe N, Higashida C (2004) Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res* 301: 16-22
23. Harris ES, Higgs HN (2004) Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Curr Biol* 14: R520-R522
24. Zigmund S (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 16: 99-105
25. Michelot A, Derivery E, Paterski-Boujema R, Guérin C, Huang S, Parcy F, Staiger C, Blanchoin L (2006) A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr Biol* 16: 1924-1930
26. Shemesh T, Kozlov M (2007) Actin polymerization upon processive capping by formin: a model for slowing and acceleration. *Biophys J* 92: 1512-1521
27. Paul A, Pollard T (2008) The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr Biol* 18: 9-19
28. Young K, Copeland J (2008) Formins in cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.017
29. Ingber D (2003a) Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* 116: 1157-1173
30. Ingber D (2003b) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* 116: 1397-1408
31. Blanchoin L, Staiger Ch (2008) Plant formins: Diverse isoforms and unique molecular mechanism. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.015
32. Cheung A, Wu H (2004) Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* 16: 257-269
33. Favery B, Chelysheva L, Lebris M, Jammes F, Marmagne A, de Almeida-Engler J, Lecomte P, Vaury C, Arkowitz R, Abad P (2004) *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein up-regulated in giant cell induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* 16: 2529-2540
34. Deeks M, Cvrčková F, Machesky L, Mikitová V, Ketelaar T, Žárský V, Davies B, Hussey P (2005) *Arabidopsis* group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *New Phytol* 168: 529-540
35. de Almeida Engler J, Van Poucke K, Karimi M, De Groodt R, Gheysen G, Engler G, Gheysen G (2004) Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J* 38: 12-26

At the plant side of formins – organizers of the actin cytoskeleton

Michalina Maruniewicz, Anna Kasprovicz, Przemysław Wojtaszek

Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznan, Poland

e-mail: przemow@amu.edu.pl

Key words: actin, cytoskeleton, formin, cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum

ABSTRACT

Rearrangements of actin cytoskeleton enable proper functioning of the cells under normal conditions, and also cellular adaptations to changes in the direct surroundings. Formins are actin binding proteins, responsible for actin nucleation and further elongation of microfilaments. The distinguishing feature of formins is the presence of conserved FH2 (formin homology domain 2) domain, as well as other domains typical for distinct formin classes. In animal cells formins are involved in cytokinesis and determination and maintenance of the cell shape and polarity, but also in the formation of filopodia, endocytosis and many other processes. The presence of proteins from the formin family in plant cells, and their involvement in the tip growth and cytokinesis, has been determined only recently. As the functional organization of plant and animal cells is different, one can assume that the range of putative functions of plant formins might also be diverse. One of such proposed functions for formins in plants is the role of linker protein within WMC continuum (cell wall-plasma membrane-cytoskeleton). Unfortunately, for that moment the state of knowledge about plant formins in comparison with animal or fungal ones is much poorer.

Rola izoform tropomiozyny w różnicowaniu funkcji filamentów aktynowych

STRESZCZENIE

Oddziaływania aktyny z miozyną oraz dynamiczna polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych stanowią podstawę dla różnorodnych form ruchliwości komórkowej. Oba mechanizmy ruchliwości są pod kontrolą białek regulatorowych, wśród których centralne miejsce zajmują białka z rodziny tropomiozyn. Wśród tropomiozyn są izoformy o wysokiej specyficzności tkankowej oraz izoformy obecne w komórkach różnego typu. Wzór ekspresji genów kodujących izoformy tropomiozyny jest uzależniony od typu komórki oraz etapu jej rozwoju. W pojedynczej komórce jednocześnie może współwystępować kilka izoform, które zlokalizowane są w odrębnych przedziałach komórkowych. Poprzez specyficzne rozmieszczenie tropomiozyny determinują oddziaływania filamentów aktynowych z białkami wiążącymi aktynę, a dzięki temu warunkują różnorodne funkcje filamentów.

WPROWADZENIE

Aktyna to białko obecne w większości komórek eukariotycznych, odpowiedzialne za realizację licznych funkcji życiowych komórek. Aktyna może istnieć w formie monomerycznej bądź też polimeryzować i w ten sposób tworzyć filamenty, które przybierają postać dwóch helikalnie zwiniętych łańcuchów. W komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych filamenty aktynowe wraz z filamentami miozynowymi są regularnie zorganizowane w jednostki kurczliwe [1]. W komórkach niemięśniowych aktyna tworzy różnorodną sieć mikrofilamentów niezbędnych dla realizacji funkcji, takich jak na przykład postępowy ruch komórki, cytokineza, endocytoza, rozwój stożków wzrostu neuronów, transport organelli wewnątrzkomórkowych. Funkcje te są realizowane poprzez dwa mechanizmy. Jeden z nich polega na oddziaływaniach aktyny z motorami molekularnymi należącymi do rodziny miozyn, drugi to dynamiczna polimeryzacja i depolimeryzacja mikrofilamentów. Obydwa procesy podlegają ścisłej regulacji przez białka wiążące aktynę, wśród których centralne miejsce zajmuje tropomiozyna (TM) [2].

Pod względem różnorodności izoform aktyny i TM, filamenty aktynowe komórek niemięśniowych są bardziej złożone niż filamenty odpowiedzialne za skurcz mięśni. W aparacie kurczliwym mięśni funkcjonują cztery izoformy α aktyny – izoforma α_1 szkieletowa, α sercowa oraz izoformy α_2 i α_3 mięśni gładkich. Towarzyszy im pięć izoform TM (trzy izoformy mięśni poprzecznie prążkowanych i dwie mięśni gładkich). Mikrofilamenty cytoszkieletu powstają przy udziale dwóch izoform aktyny (β i γ) oraz około czterdziestu izoform TM [3]. Daje to potencjalnie możliwość tworzenia dużej liczby kombinacji izoform obu białek, które mogą wykazywać wysoki poziom funkcjonalnej specjalizacji. Określenie składu białkowego kompozycji mikrofilamentów, ich komórkowej przedziałowości i funkcjonalnej specyfiki, to wyzwania, które są aktualnie podejmowane przez naukowców na całym świecie.

IZOFORMY TROPOMIOZYN

TM jest ściśle związana z filamentami aktynowymi zarówno w komórkach mięśniowych, jak i niemięśniowych. Cząsteczki TM tworzą wydłużony, superhelikalnie zwinięty dimer. Dzięki oddziaływaniom typu „głowa-ogon” pomiędzy resztami aminokwasowymi końców C i N sąsiadujących cząsteczek TM przybiera formę długich łańcuchów układających się po obu stronach filamentu aktynowego [4]. Tropomiozyny w komórkach ssaków tworzą liczną rodzinę białek o podobnej strukturze, które podzielono na dwie klasy – izoformy o długości około 284 reszt aminokwasowych i dużej masie molekularnej oraz izoformy o długości około 248 reszt aminokwasowych i odpowiednio mniejszej masie molekularnej. W literaturze klasy te są określane jako HMW (ang. *high molecular weight*) lub izoformy długie oraz LMW (ang. *low molecular weight*) lub krótkie. Izofomy długie rozciągają się wzdłuż siedmiu podjednostek aktyny, natomiast

Joanna Moraczewska[✉]

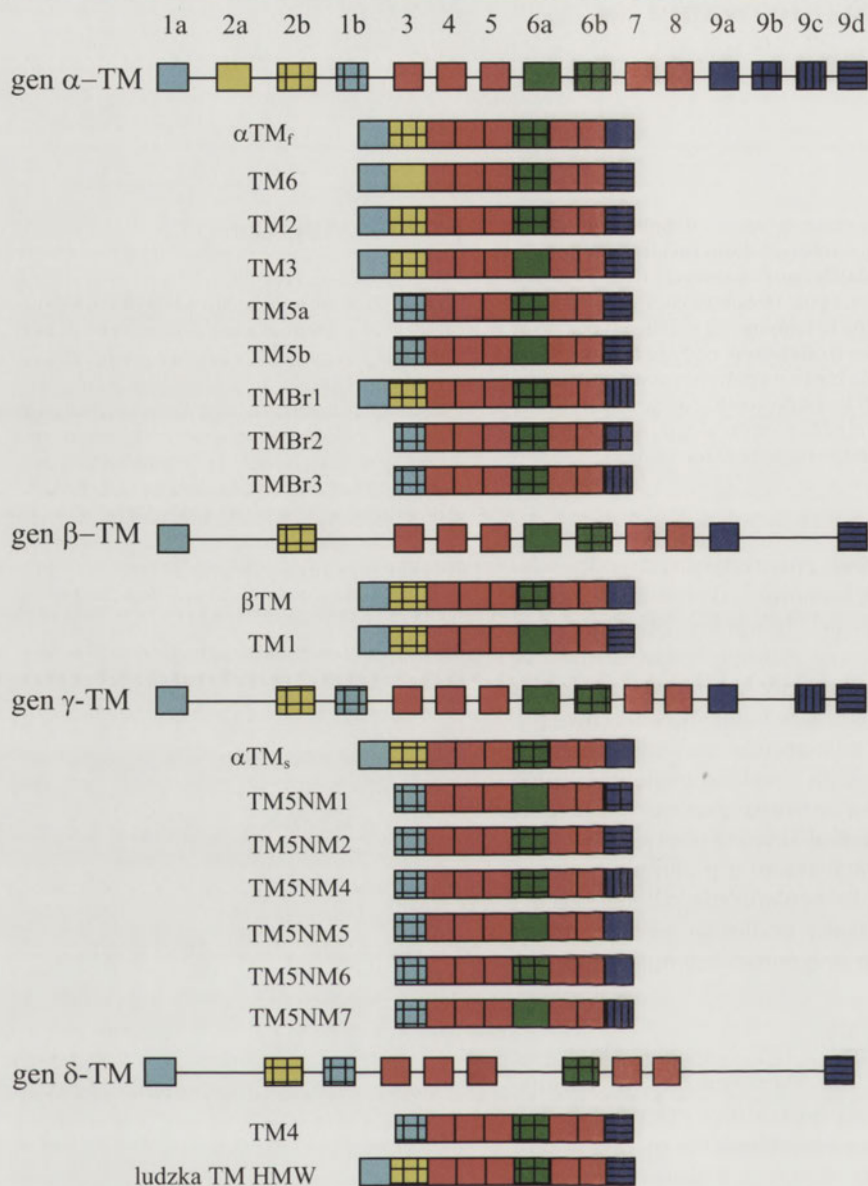
Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Bydgoszcz

[✉]Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz; e-mail: moraczjo@ukw.edu.pl; tel. (052) 341 92 89

Artykuł otrzymano 26 marca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 22 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: aktyna, ruchliwość komórkowa, tropomiozyna, izoformy



Rycina 1. Struktura genów kodujących tropomiozyny oraz ich produktów białkowych. U ssaków cztery geny kodujące tropomiozyny wykazują niewielkie różnice w budowie. Schematy genów pokazują organizację genów α - i β -*TM* szczura oraz genów γ - i δ -*TM* człowieka. Eksony są zaznaczone w formie prostokątów. Kolorem czerwonym wypełnione są eksony konstytutywne, które ulegają ekspresji we wszystkich izoformach *TM*. Eksony alternatywne zaznaczono odmiennymi kolorami, a ich kopie zostały zacieniowane. Alternatywne promotory mieszczą się w rejonach niekodujących poprzedzających ekson 1a oraz 1b. Produkty białkowe powstałe wskutek alternatywnego składania eksonów są umieszczone pod każdym z genów od którego pochodzą. Na rycinie są pokazane jedynie te izoformy, które zostały omówione w tekście.

izoformy krótkie mają długość pozwalającą na oddziaływanie z sześcioma podjednostkami aktywy [2,3,5].

Różnorodność wśród izoform *TM* powstaje na drodze kilku mechanizmów. Po pierwsze, w komórkach ssaków istnieją cztery geny: α -, β -, γ -, i δ -*TM* (w genomie człowieka nazwano je odpowiednio *TPM1*, -2, -3, i -4). Trzy geny (α -, β -, γ -*TM*) zawierają alternatywne eksony, które kodują dwa rejonu wewnętrzne oraz rejon C-końcowy. Wybór alternatywnego eksonu w czasie dojrzewania mRNA pozwala na tworzenie licznych izoform, produktów jednego genu, które różnią się sekwencjami w ściśle określonych rejonach cząsteczki (Ryc. 1). Liczba kodowanych przez te geny izoform jest dodatkowo zwiększana dzięki możliwości wybo-

ru jednego z dwóch promotorów transkrypcji. Wybór pierwszego promotora prowadzi do powstania długich izoform *TM*, natomiast rozpoczęcie transkrypcji z promotora drugiego umożliwia ekspresję krótkich izoform, w których sekwencja N-końcowego segmentu kodowanego przez eksony 1a i 2 jest zastąpiona przez sekwencję kodowaną przez ekson 1b (Ryc. 1). Gen δ -*TM* koduje u ssaków pojedynczą krótką izoformę *TM*. Różnorodność tropomiozyn jest zwiększona dzięki ich zdolności do tworzenia heterodimerów (np. izoformy α i β *TM* mięśni szkieletowych). Geny α -, β -, γ -*TM* ulegają ekspresji zarówno w komórkach mięśniowych, jak i niemięśniowych, zaś gen δ -*TM* – tylko w komórkach niemięśniowych [2,3,5].

SPECYFICZNOŚĆ TKANKOWA IZOFORM TROPOMIOZINY

Badania określające poziom mRNA w komórkach oraz użycie specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko określonym epitopom *TM* pozwoliły na stwierdzenie, że niektóre izoformy wykazują wysoką specyficzność tkankową, podczas gdy inne są szeroko rozpowszechnione w tkankach różnego typu.

Do izoform o wysokiej specyficzności należą tropomiozyny α , β oraz γ (zwana też wolną *TM* α ze względu na jej występowanie w wolnych włóknach) mięśni szkieletowych [6,7]. Występowanie tych izoform jest ograniczone do filamentów obecnych w sarkomerze. Zatem są one bezpośrednio odpowiedzialne za skurcz komórki mięśniowej. Względna ilość α i β *TM* zależy od typu włókien mięśniowych. Przesunięcie na korzyść przewagi ilościowej izoformy α jest powiązane ze zwiększoną szybkością skurczu włókna [8]. Ta tendencja jest również zachowana w mięśniu sercowym. U małych zwierząt, u których serce bije z dużą częstotliwością, jedyną formą *TM* jest izoforma

α [6]. W wolniejszych sercach dużych zwierząt i człowieka, oprócz dominującej izoformy α , istnieją również izoformy β i γ . Wysoką specyficzność tkankową wykazują izoformy α i β mięśni gładkich. Białka te są produktami genów α - i β -*TM*, ale różnią się od izoform z mięśni szkieletowych i sercowego sekwencjami w obrębie dwóch rejonów łańcucha polipeptydowego (Ryc. 1) [9]. W większości zbadanych mięśni gładkich obie izoformy występują w prawie równych ilościach, tworząc heterodimer α/β [10].

Izoformy z mózgu – długa izoforma TMBR1 oraz krótkie TMBR2 i TMBR3, znaleziono jedynie w komórkach neuronów. Wszystkie izoformy z mózgu są produktami genu α .

Wczesne badania wykazały, że w mózgu dojrzałych szczurów TMBr3 ulega syntezie na dużo wyższym poziomie niż TMBr1 i TMBr2 [11]. W późniejszych pracach wykazano, że poziom syntezы wszystkich trzech izoform z mózgu jest uzależniony od etapu rozwoju komórki [12].

Zdecydowana większość izoform TM ma charakter niespecyficzny. Liczne izoformy zlokalizowane zostały w wielu rodzajach komórek. W pojedynczej komórce może jednocześnie występować kilka izoform. Na przykład, w fibroblastach człowieka istnieje przynajmniej osiem izoform TM, a w komórkach nabłonka jelita jednocześnie może istnieć kilkanaście izoform [13,14]. Profil syntezы izoform zależy od rodzaju komórki oraz etapu rozwoju. W niektórych tkankach izoformy TM są ograniczone tylko do pewnego rodzaju komórek budujących tkankę. Przykładem może być śledziona, która barwi się równomiernie przeciwciałami specyficznymi wobec TM4, natomiast przeciwciała skierowane przeciw TM2 i TM specyficznej dla mięśni gładkich daje zabarwienie tylko w obrębie beleczek, czyli włóknistej części śledziony. W miążdże białej (zawierającej limfocyty) i czerwonej (wypełnionej przez erytrocyty i makrofagi) nie wykazano obecności tych izoform [15].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA SEGREGACJA IZOFORM TROPOMIOZYNY

Przestrzenna segregacja izoform TM w obrębie pojedynczej komórki po raz pierwszy została wykazana w komórkach fibroblastów. Długie izoformy zlokalizowano we włóknach naprężeniowych (ang. *stress fibers*), czyli pęczkach filamentów aktynowych, które są zakotwiczone w rejonie płytek przylegania tworzących połączenia pomiędzy cytoskieletem i podłożem. Natomiast krótka izoforma TM została wykryta zarówno we włóknach naprężeniowych, jak i w części podbłonowej fibroblastów [16].

Dalsze prace pokazały, że w fibroblastach osiem izoform TM lokuje się w różnych przedziałach komórkowych – włóknach naprężeniowych, podbłonowej strefie komórki oraz pęcherzykach Golgiego w przestrzeni okołojądrowej. Co więcej, segregacja izoform podlega zmianie podczas przechodzenia komórki do kolejnych faz cyklu komórkowego. We wczesnej fazie G1 długie izoformy TM, produkty genu α -TM, wiązały się z γ aktyną w obrębie włókien naprężeniowych [15,17], natomiast krótkie izoformy TM5a/b wykazywały tendencję do lokowania się na peryferiach komórek, w obrębie ruchliwych struktur krawędzi wiodącej komórki, w których znajduje się aktyna β [15]. Produkty genu γ -TM w tej fazie cyklu komórkowego lokowały się w przestrzeni okołojądrowej [17]. Przejście do późnej fazy G1 było związane z przesunięciem tych izoform do włókien naprężeniowych. Wyjątek stanowiła izoforma TM5NM2, która pozostawała związana z pęcherzykami aparatu Golgiego [18].

Przedziałowość izoform TM bardzo dobrze została udokumentowana w komórkach nerwowych. Wykazano, że tropomiozyny nie tylko lokują się w oddzielnych przedziałach w komórkach dojrzałych, lecz również wykazują czasową zmienność podczas rozwoju komórek. Użycie szerokiego spektrum przeciwciał pozwoliło na skonstru-

owanie schematu ekspresji genów izoform TM w hodowlach komórek nerwowych *in vitro* [14]. W rosnących aksonach różnicujących neuronów embrionalnych znaleziono izoformy TM5NM1/2, które w dojrzałych neuronach przemieszczały się do przedziału somatodendrytycznego. Zauważono, że ta zmiana lokalizacji TM5NM1/2 zachodziła wraz z pojawianiem się w aksonach izoformy TMBr3 [19]. Zmianę w lokalizacji podczas dojrzewania komórek wykazywała również izoforma TM4. W neuronach embrionalnych izoforma ta koncentrowała się w stożkach wzrostu, a po osiągnięciu dojrzałości komórek lokowała się w rejonach postsynaptycznych [20].

Podobne dynamiczne zmiany ekspresji genów kodujących izoformy TM związane z procesami dojrzewania komórek nerwowych obserwowano w natywnej tkance. Lokalizacja izoform TM w tkance mózgowej wykazała, że w neuronach kory mózgowej dorosłej myszy następuje wyraźne przestrzenne rozdzielanie izoform kodowanych przez gen γ -TM. Dendryty pierwszorzędowe reagowały z przeciwciałami skierowanymi przeciwko sekwencji TM kodowanej przez ekson 9d (TM5NM1/2), natomiast aksony lepiej reagowały z przeciwciałami skierowanymi przeciwko sekwencji kodowanej przez ekson 9c (TM5NM4/7). W dojrzałych komórkach poziom ekspresji izoform, w których koniec C jest kodowany przez ekson 9a (np. TM5NM5/6), był niski. Odwrócenie wzoru ekspresji obserwowanego u dorosłych zwierząt wykazano w korze mózgowej pięciodniowych myszy, u których procesy różnicowania układu nerwowego są jeszcze bardzo aktywne. Części somatyczne dendrytów reagowały głównie z przeciwciałami skierowanymi przeciwko sekwencjom kodowanym przez eksony 9a i 9c, natomiast przeciwciała specyficzne wobec sekwencji 9d barwiło aksony [21]. Podsumowując, można stwierdzić, że pojawianie się specyficznych izoform TM w określonym miejscu i czasie umożliwia modulowanie funkcji mikrofilamentów, co jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju komórek nerwowych.

Innym rodzajem komórek, które zostały szczegółowo przeanalizowane pod kątem ekspresji genów kodujących izoformy TM, są komórki nabłonkowe. W komórkach embrionalnych nabłonka jelita izoformy krótkie, produkty genów α - i γ -TM, zajmują odpowiednio część szczytową lub okołojądrową, natomiast długie izoformy lokują się w części bazolateralnej. W dojrzałych komórkach następuje dalsza polaryzacja izoform, w wyniku której wszystkie krótkie izoformy przesuwały się do części apikalnej, a długie do bazolateralnej [3,14]. Izoformy TM5a i TM5b preferencyjnie wiążą się z mikrofilamentami związanymi z transbłonowym regulatorem mukowiscydozy (CFTR, ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator*), a zatem mogą wpływać na regulację kanału chlorkowego [22].

Najnowsze badania prowadzone na komórkach mięśni szkieletowych pozwoliły na zdefiniowanie odrębnych przedziałów komórkowych wyznaczanych przez izoformy TM. Oprócz znanych od dawna izoform TM α i β , które są ściśle związane z sarkomerem, w sarkoplazmatycznej części mięśni stwierdzono występowanie izoform niemięśniowych. Analiza przekrojów poprzecznych włókien mię-

śniowych ujawniła, że w wąskim obszarze po obu stronach linii Z, struktury oddzielającej sąsiednie sarkomery, lokują się TM5NM1 [23] oraz TM4 [24]. Wspólnie z izoformą γ -aktyny TM5NM1 i TM4 biorą udział w kształtowaniu architektury linii Z. TM4 wykryto również w filamentach cytoszkieletowych ułożonych równolegle w stosunku do sarkomerów. Filamenty te pojawiają się w czasie wzrostu i regeneracji mięśni, co wskazuje na to, że TM4 uczestniczy w procesach rozwojowych [24].

Ciekawym obiektem badań są komórki kościogubne, osteoklasty, których funkcją jest resorpcja tkanki kostnej. Zarówno powstawanie osteoklastów z komórek prekursorowych, monocytów i makofagów, jak i proces resorpcji kości, są uzależnione od dynamiki i integralności mikrofilamentów [25]. Osteoklasty mogą wytwarzać dwa rodzaje struktur adhezyjnych – podosomy lub strefę przylegania (ang. *sealing zone*). Podosomy powstają, gdy komórka osteoklastu przytwierdza się do powierzchni szklanej. Zawierają one bardzo dynamiczne, krótkie filamente aktynowe uformowane w wiązki, które za pośrednictwem białek towarzyszących łączą się z integrzynami, białkami błony komórkowej odpowiedzialnymi za przyleganie komórek do podłoża. Mineralne podłoże, jakie stanowi kość, indukuje powstanie szerokiego i gęstego pasma aktyny, które poprzez integryny tworzy szczelną obręcz wyznaczającą obszar aktywnej resorpcji kości [26]. Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że izoformy TM w specyficzny sposób wiążą się z określonymi populacjami filamentów w osteoklastach. Wysoki poziom ekspresji genów TM2 i TM3 i ich lokalizacja w obrębie całej komórki wyznacza stan dojrzałości osteoklastów. Krótkie TM5a/b są obecne w komórkach prekursorowych, jednak ich poziom w osteoklastach jest wielokrotnie wyższy. Izoforny te są rozmieszczone w całej komórce, ale szczególnie wysokie stężenie obserwowano w strefie podbłonowej. Bliższe analizy pozwoliły na stwierdzenie, że TM5a/b najliczniej pojawiają się w strukturach adhezyjnych, u podstawy podosomu oraz w strefie przylegania. W strukturach adhezyjnych znaleziono również duże nagromadzenie TM4. Jednak, w odróżnieniu od TM5a/b, które miały tendencję do gromadzenia się w zewnętrznych partiach aktynowego rdzenia podosomu, TM4 lokowała się w samym rdzeniu [27]. Zaburzenia w strukturze filamentów aktynowych skupionych w strefie uszczelnienia i podosomach obserwowano w osteoklastach, w których obniżono poziom syntezy izoformy TM4 [28].

Opisane powyżej przykłady stanowią silne dowody na to, że izoformy TM są przemieszczane do odrębnych, przestrzennie oddzielonych populacji mikrofilamentów. Zatem w komórce cytoszkielet aktynowy może być rozpatrywany jako zbiór filamentów, których właściwości, a co za tym idzie funkcje, są wyznaczane przez izoformy TM związane z odrębnymi populacjami aktyny. Badania nad funkcjonalnym efektem nadprodukcji lub niedoboru określonych izoform TM, które są obecnie prowadzone w wielu laboratoriach, pozwalają na pozytywne zweryfikowanie tezy głoszącej, że wytworzenie dużej liczby izoform TM w toku rozwoju ewolucyjnego było podyktowane koniecznością zwiększenia funkcjonalnej różnorodności filamentów aktynowych [3].

UDZIAŁ IZOFORM TM W MIGRACJI KOMÓRKI

Ruch komórek migrujących zależy od dynamiki sieci filamentów aktynowych, które są tworzone w wypustkach zlokalizowanych w przedniej części komórki. Białka wiążące aktynę nadają charakterystyczną strukturę filamentom aktynowym i definiują przedziałowość wypustek. Przód komórki migrującej zajmuje przedział zwany lamellipodium, w którym filamente aktynowe są krótkie, rozgałęzione i ulegają dynamicznej polimeryzacji i depolimeryzacji. Ten przedział komórkowy charakteryzuje się obecnością białka Arp2/3 (ang. *actin related protein*), które zapoczątkowuje syntezę nowych filamentów w miejscach rozgałęzień, oraz ADF/kofiliny, która, fragmentując filamente, wytwarza wolne końce zdolne do wzrostu i zwiększa pulę monomerów aktynowych włączanych do filamentów w podbłonowej strefie wzrostu [29]. W rejonie odsuniętym od krawędzi wiodącej lamellipodium przechodzi w lamellę, gdzie filamente aktynowe są dłuższe i nierozgałęzione. Strukturą wytwarzaną przez komórki ruchliwe są też filopodia, cienkie wypustki wypełnione wiązkami filamentów aktynowych [30]. Wiele badań wskazuje na to, że strefa lamellipodium jest pozbawiona TM [31-33]. TM jest natomiast obecna w lamelli i filopodiach, gdzie, poprzez działanie antagonistyczne wobec Arp2/3 i ADF/kofiliny, przyczynia się do powstawania długich i nierozgałęzionych filamentów [29,33,34]. Taki skład białkowy lamelli i lamellipodium w prosty sposób tłumaczy architekturę i funkcje filamentów. Jednakże inne badania komplikują ten pogląd na rolę TM w kształtowaniu przedziałów w obrębie krawędzi wiodącej komórki. Dokładniejsze analizy umożliwiły bowiem wykrycie TM również w lamellipodium. Znakowane fluorecencyjnie przeciwciała skierowane przeciwko długim izoformom barwiły komórke aż po samą krawędź wiodącą, chociaż ich stężenie w lamellipodium wyraźnie ulegało zmniejszeniu [35]. Ponieważ w lamellipodium stężenie białek powodujących depolimeryzację aktyny jest bardzo wysokie, niewielkie ilości TM mogą być konieczne dla stabilizacji filamentów i utrzymania odpowiedniej równowagi pomiędzy aktyną monomeryczną i filamentową.

Pewne izoformy TM mogą również wykazywać zdolność do wybiórczej rekrutacji białek regulujących stan spolimerizowania aktyny. W komórkach nabłonka czuciowego, w których wywołano zwiększoną ekspresję genu kodującego izoformę mózgową TMBR3, czynnik depolimeryzujący aktynę (ADF) gromadził się w rejonie lamellipodium. W komórkach z nadprodukcją TM5NM1 ADF był wykluczony z tego rejonu komórki. Jednak, gdy komórki syntetyzujące TM5NM1 poddano przejściowej transfekcji TMBR3, wówczas ADF gromadził się w wąskim obszarze poprzedzającym lamellę [36]. Z nadprodukcją izoform TM5NM1 oraz TMBR3 związane były wyraźne zmiany w kształcie i ruchliwości komórek. Podniesienie poziomu syntezy TM5NM1 powodowało dwukrotne zwiększenie powierzchni komórki i, w stosunku do komórek kontrolnych, silnie spowalniało ruchliwość komórki. TM5NM1 lokowała się we włóknach naprężeniowych rozciągających się w poprzek komórki. W przeciwieństwie do TM5NM1, TMBR3 akumulowała się w przestrzeni perinuklearnej i na peryferiach komórki. Komórki z nadprodukcją TMBR3 były mniejsze od kontrolnych i poruszały się ze zwiększoną prędkością. Bardzo interesują-

cy wynik otrzymano, gdy komórki wykazujące zwiększoną syntezę TM5NM1 poddano transfekcji genem kodującym TMBr3. Włókna naprężeniowe zawierające TM5NM1 tych komórek ulegały rozpadowi i komórki zaczynały wytwarzać ogromne lamellipodia [36]. Wynik tego doświadczenia jest świetnie związany z obserwacją, że w różnicujących neuronach TMBr3 konkuruje z TM5NM1 o filamenty aktywne nadając im odmienne właściwości.

Inne badania wykazały, że tropomiozyny są w stanie prowadzić specyficzną rekrutację miozyny. Mikroiniekcja szkieletowej izoformy TM do komórek nabłonka prowadziła do poważnej reorganizacji filamentów aktynowych polegającej na eliminacji strefy lamellipodium i tworzeniu w to miejsce wiązek filamentów. Filamenty zawierające TM szkieletową na całej swej długości były udekorowane miozyną IIa, białkiem motorycznym, którego brak było w strefie podbłonowej komórek kontrolnych [32]. W komórkach nerwowych, w których zwiększono poziom syntezy TM5NM1, izoforma miozyny IIa wiązała się z filamentami tworzącymi włókna naprężeniowe, powiązanymi z TM5NM1. Do włókien naprężeniowych nie była natomiast rekrutowana izoforma miozyny IIb, która podobnie jak w komórkach kontrolnych, pozostawała w formie rozproszonej [36].

Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że izoformy TM wyznaczają aktywność ruchową komórek poprzez rekrutowanie na powierzchni filamentów różnych białek wiążących aktyne.

ROLA TM W CYTOKINEZIE

Na poziomie molekularnym proces cytokinezy jest niezwykle skomplikowany. Ocenia się, że w komórkach dzielących się drożdży (*Schizosaccharomyces pombe*) oraz *Drosophila* cytokineza zależy od aktywności produktów ponad 60 genów. Centralną strukturą warunkującą podział komórki na dwie potomne jest pierścień kurczliwy. Głównymi białkami tej struktury są aktyna i miozyna II. W pierwszym etapie składania pierścienia kurczliwego w paśmie równikowym komórki tworzone są podbłonowe węzły białkowe (ang. *nodes*), zawierające, między innymi, formyny – białka inicjujące polimeryzację aktyny, oraz miozynę II. Polimeryzacja *de novo* aktyny prowadzi do powstania filamentów pomiędzy węzłami. Kondensacja filamentów i ich powiązanie z tropomiozyną kończą proces tworzenia pierścienia podziałowego [37]. Postęp cytokinezy powoduje zaciskanie i zmniejszanie pierścienia. Procesowi temu towarzyszy depolimeryzacja aktyny przy udziale białka depolimeryzującego, ADF/kofiliny [38].

Rolę izoform TM w cytokinezie badano poprzez zwiększanie poziomu wybranych izoform w komórkach dzielących się. Badania nad komórkami jajnika chomika (CHO), w których sztucznie zwiększono poziom syntezy TM5a/b, wykazały, że izoforma ta przyspiesza cytokinezę poprzez aktywację oddziaływań aktyny z miozyną w rejonie pierścienia podziałowego [39]. Odmienne mechanizmy regulacji wykazano w doświadczeniach z TM1. Komórki astrocytów, do których wprowadzono gen *TM1* metodą transfekcji, nie były w stanie doprowadzić do końca podziału, co w konsekwencji prowadziło do tworzenia komórek wielojądrowych.

Bliższe analizy wykazały, że TM1 nie wpływała na ilość miozyny, za to poważnie zmniejszała akumulację kofiliny w pierścieniu kurczliwym. Zwiększenie poziomu ekspresji genu kofiliny w tych komórkach cofało nieprawidłowości w cytokinezie wywołane przez TM1 [40]. Doświadczenia te dobitnie wykazują, że dla prawidłowego przebiegu procesu cytokinezy konieczna jest odpowiednia równowaga pomiędzy izoformami TM w komórce.

UWAGI KOŃCOWE


Może się wydawać, że ze względu na swą superhelikalną budowę tropomiozyna jest białkiem wykazującym małą zmienność strukturalną. Zatem duża liczba izoform TM produkowanych w komórkach eukariotycznych mogłaby być wynikiem pewnej ewolucyjnej rozrzućności, która doprowadziła do powstania rodziny białek, w której różnorodność sekwencji nie idzie w parze z różnorodnością funkcjonalną. Jednakże, wyniki badań nad ekspresją genów kodujących izoformy tropomiozyny, ich specyficznością tkankową, wewnątrzkomórkową lokalizacją i przystosowaniem do regulacji określonych procesów komórkowych wskazują na to, że duża liczba izoform jest niezbędna dla precyzyjnego dostrojenia cytoszkieletu aktynowego do funkcjonalnej specyfiki komórek. Funkcjonując w różnorodnych środowiskach wewnątrzkomórkowych izoformy tropomiozyny, wspólnie z innymi białkami wiążącymi aktyne, kształtują skomplikowaną architekturę mikrofilamentów. Złożoność ta jest warunkiem koniecznym dla realizacji skomplikowanego programu życiowego specjalistycznych komórek, tkanek i całych organizmów.

PIŚMIENNICTWO

1. Strzelecka-Gołaszewska H (1997) Molekularny mechanizm skurczu mięśniowego. W: Biofizyka dla Biologów. Byszewska M, Leyko W (red.) PWN, Warszawa, 244-280
2. Lin JJ, Warren KS, Wamboldt DD, Wang T, Lin JL (1997) Tropomyosin isoforms in nonmuscle cells. *Int Rev Cytol* 170: 1-38
3. Gunning P, O'Neill G, Hardeman E (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev* 88: 1-35
4. Moraczewska J (2001) Tropomiozyna – białko regulatorowe filamentów aktynowych. *Kosmos* 50: 263-270
5. Pittenger MF, Kazzaz JA, Helfman DM (1994) Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 6: 96-104
6. Cummins P, Perry SV (1974) Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. *Biochem J* 141: 43-49
7. Bronson DD, Schachat FH (1982) Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J Biol Chem* 257: 3937-3944
8. Heeley DH, Dhoot GK, Frearson N, Perry SV, Vrbova G (1983) The effect of cross-innervation on the tropomyosin composition of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 152: 282-286
9. Helfman DM, Feramisco JR, Ricci WM, Hughes SH (1984) Isolation and sequence of a cDNA clone that contains the entire coding region for chicken smooth-muscle alpha-tropomyosin. *J Biol Chem* 259: 14136-14143
10. Jancsó A, Graceffa P (1991) Smooth muscle tropomyosin coiled-coil dimers. Subunit composition, assembly, and end-to-end interaction. *J Biol Chem* 266: 5891-5897
11. Lees-Miller JP, Goodwin LO, Helfman DM (1990) Three novel brain tropomyosin isoforms are expressed from the rat alpha-tropomyosin gene through the use of alternative promoters and alternative RNA processing. *Mol Cell Biol* 10: 1729-1742

12. Gunning P, Hardeman E, Jeffrey P, Weinberger R (1998) Creating intracellular structural domains: spatial segregation of actin and tropomyosin isoforms in neurons. *Bioessays* 20: 892-900
13. Perry SV (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 5-49
14. Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC (2005) Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol* 15: 333-341
15. Schevzov G, Vrhovski B, Bryce NS, Elmir S, Qiu MR, O'Neill GM, Yang N, Verrills NM, Kavallaris M, Gunning PW (2005) Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J Histochem Cytochem* 53: 557-570
16. Lin JJ, Hegmann TE, Lin JL (1988) Differential localization of tropomyosin isoforms in cultured nonmuscle cells. *J Cell Biol* 107: 563-572
17. Percival JM, Thomas G, Cock TA, Gardiner EM, Jeffrey PL, Lin JJ, Weinberger RP, Gunning P (2000) Sorting of tropomyosin isoforms in synchronised NIH 3T3 fibroblasts: evidence for distinct microfilament populations. *Cell Motil Cytoskeleton* 47: 189-208
18. Percival JM, Hughes JA, Brown DL, Schevzov G, Heimann K, Vrhovski B, Bryce N, Stow L, Gunning PW (2004) Targeting of a tropomyosin isoform to short microfilaments associated with the Golgi complex. *Mol Biol Cell* 15: 268-280
19. Weinberger R, Schevzov G, Jeffrey P, Gordon K, Hill M, Gunning P (1996) The molecular composition of neuronal microfilaments is spatially and temporally regulated. *J Neurosci* 16: 238-252
20. Had L, Faivre-Sarraillh C, Legrand C, Mery J, Brugidou J, Rabie A (1994) Tropomyosin isoforms in rat neurons: the different developmental profiles and distributions of TM-4 and TMB-3 are consistent with different functions. *J Cell Sci* 107: 2961-2973
21. Vrhovski B, Schevzov G, Dingle S, Lessard JL, Gunning P, Weinberger RP (2003) Tropomyosin isoforms from the gamma gene differing at the C-terminus are spatially and developmentally regulated in the brain. *J Neurosci Res* 72: 373-383
22. Dalby-Payne JR, O'Loughlin EV, Gunning P (2003) Polarization of specific tropomyosin isoforms in gastrointestinal epithelial cells and their impact on CFTR at the apical surface. *Mol Biol Cell* 14: 4365-4375
23. Kee AJ, Schevzov G, Nair-Shaliker V, Robinson CS, Vrhovski B, Ghodussi M, Qiu MR, Lin JJ, Weinberger R, Gunning PW, Hardeman EC (2004) Sorting of a nonmuscle tropomyosin to a novel cytoskeletal compartment in skeletal muscle results in muscular dystrophy. *J Cell Biol* 166: 685-696
24. Vlahovich N, Schevzov G, Nair-Shaliker V, Ilkovski B, Artap ST, Joya JE, Kee AJ, North N, Gunning PW, Hardeman EC (2008) Tropomyosin 4 defines novel filaments in skeletal muscle associated with muscle remodelling/regeneration in normal and diseased muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 73-85
25. Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508
26. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O (2006) Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 85: 195-202
27. McMichael BK, Kotadiya P, Singh T, Holliday LS, Lee BS (2006) Tropomyosin isoforms localize to distinct microfilament populations in osteoclasts. *Bone* 39: 694-705
28. McMichael BK, Lee BS (2008) Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive capacity in osteoclasts. *Exp Cell Res* 314: 564-573
29. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465
30. Small JV, Stradal T, Vignall E, Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12: 112-120
31. DesMarais V, Ichetovkin I, Condeelis J, Hitchcock-DeGregori SE (2002) Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci* 115: 4649-4660
32. Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, Fischer RS, Ponti A, Hitchcock-DeGregori SE, Danuser G, Fowler VM, Wirtz D, Hanein D, Waterman-Storer CM (2005) Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol* 168: 619-631
33. Iwasa JH, Mullins RD (2007) Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* 17: 395-406
34. Cooper JA (2002) Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr Biol* 12: R523-525
35. Hillberg L, Zhao Rathje LS, Nyäkern-Meazza M, Helfand B, Goldman RD, Schutt CE, Lindberg U (2006) Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells. *Eur J Cell Biol* 85: 399-409
36. Bryce NS, Schevzov G, Ferguson V, Percival JM, Lin JJ, Matsumura F, Bamberg JR, Jeffrey PL, Hardeman EC, Gunning P, Weinberger RP (2003) Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol Biol Cell* 14: 1002-1016
37. Pollard TD (2008) Progress towards understanding the mechanism of cytokinesis in fission yeast. *Biochem Soc Trans* 36: 425-430
38. Bamberg JR (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 185-230
39. Eppinga RD, Li Y, Lin JL, Lin JJ (2006) Tropomyosin and caldesmon regulate cytokinesis speed and membrane stability during cell division. *Arch Biochem Biophys* 456: 161-174
40. Thoms JA, Loch HM, Bamberg JR, Gunning PW, Weinberger RP (2008) A tropomyosin 1 induced defect in cytokinesis can be rescued by elevated expression of cofilin. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 979-990

Role of tropomyosin isoforms in diversification of actin filaments functions

Joanna Moraczewska 

Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Experimental Biology, Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, 30 Chodkiewicza St., 85-064 Bydgoszcz, Poland

e-mail: moraczjo@ukw.edu.pl

Key words: actin, cell motility, tropomyosin, isoforms

ABSTRACT

Actin interactions with myosin as well as dynamic polymerization and depolymerization of actin filaments underlie various forms of cellular motility. Both mechanisms are under control of regulatory proteins, among which tropomyosins take a central position. Tropomyosin isoforms can be tissue-specific or constitutive, expressed in different cell types. Tropomyosin expression pattern depends on the cell type and developmental stage. Several tropomyosin isoforms can simultaneously co-exist in a single cell, and they are subjected to sorting to different cellular compartments. Due to specific localization, tropomyosins determine interactions of the filaments with actin binding proteins, and ascertain various filaments functions.

Białka aktynowego szkieletu komórki i błony partnerami lipidów

STRESZCZENIE

Wiele białek szkieletu komórkowego oddziałuje z lipidami lub podlega regulacji przez szczególną ich klasę, fosfatydyloinozytyle. Białka mogą wiązać się z błonami poprzez specyficzne domeny, amfipatyczne helisy lub przez niezdefiniowane dotąd motywy, oddziałujące za pomocą interakcji elektrostatycznych czy hydrofobowych. Oddziaływanie określonych białek z wybranymi lipidami wpływa na stabilizację mikrodomen lipidowych, które mogą stanowić miejsce przyczepu dla białek szkieletu komórkowego. Białka, które fragmentują lub depolimeryzują filamenty aktynowe: żelsolina, wilina, kofilina i profilina, ulegają *in vitro* inaktywacji przez PI(4,5)P₂. Natomiast białka takie, jak np. winkulina, talina, α-aktylina, ezryna, N-WASP, WAVE, które inicjują polimeryzację aktyny oraz sieciują filamenty aktynowe, ulegają aktywacji przez ten lipid. Również funkcje głównych składników szkieletu błonowego erytrocytów: spektryny i białka 4.1 oraz ich nieerytrocytarnych odpowiedników podlegają regulacji poprzez oddziaływanie z lipidami.

BIAŁKA AKTYNOWEGO SZKIELETU KOMÓRKI I BŁONY PARTNERAMI LIPIDÓW

Ruch komórkowy oraz odporność na stresse mechaniczne są w dużej mierze zależne od szkieletu komórkowego, który stanowi wewnętrzne rusztowanie komórek eukariotycznych, determinuje kształt komórki i bierze udział w wielu ważnych biologicznie procesach. Sieć filamentów aktynowych, głównie zlokalizowana podbłonowo jest szczególnie wrażliwa na sygnały powstające w zeknięciu błony i cytozolu. Występują tu białka wiążące aktynę, odpowiedzialne za inicjację lub terminację polimeryzacji, jak również białka łączące filamenty aktynowe ze sobą lub z błoną. Zmiany zachodzące w sieci filamentów aktynowych są niezbędne nie tylko w ruchu komórkowym, ale również odgrywają ważną rolę podczas transportu pęcherzykowego, w lokalizacji i przekazywaniu sygnałów. Regulacja powyższych procesów jest związana z faktem odwracalnego zakotwiczenia struktur szkieletu komórkowego w błonie. Obecnie wiele prac dotyczy roli lipidów błonowych w werbowaniu białek szkieletu komórkowego do domen błonowych. Liczne badania dowodzą, że różne białka szkieletu komórkowego oddziałują *in vitro* z lipidami czy też podlegają regulacji przez fosfatydyloinozytyle. Białka mogą wiązać się z błonami poprzez specyficzne domeny, amfipatyczne helisy lub przez niezdefiniowane dotąd motywy, oddziałujące za pomocą interakcji elektrostatycznych czy, częściej, hydrofobowych. Posttranslacyjne modyfikacje, takie jak mirystylacja czy palmitylacja, również mogą odgrywać kluczową rolę w wiązaniu się z błonami [1,2].

Wyniki doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro* oraz z wykorzystaniem hodowli komórkowych wykazują, że lipidy inozytowe głównie oddziałują z białkami wiążącymi aktynę, odpowiedzialnymi za zmiany w szkielecie komórkowym. Szczególnie PI(4,5)P₂ może aktywować lub hamować proces wiązania filamentów aktynowych przez różne białka, a także wpływać na aktywność tworzenia wiązek aktynowych. Wzrost poziomu komórkowego PI(4,5)P₂ promuje polimeryzację aktyny, natomiast usunięcie lub hydroliza PI(4,5)P₂ prowadzi do jej depolimeryzacji. Aktywność białek, które fragmentują lub depolimeryzują filamenty aktynowe, np. żelsolina, wilina, kofilina i profilina, ulega *in vitro* obniżeniu przez PI(4,5)P₂. Natomiast białka, takie jak winkulina, talina, α-aktylina, ezryna, N-WASP, WAVE i miozyna 10, które inicjują polimeryzację aktyny oraz łączą filamenty aktynowe ze sobą lub z błoną, ulegają aktywacji przez ten lipid [3,4].

Szkielet błonowy erytrocytu jest jedyną strukturą szkieletową tej komórki i elastyczną strukturą stanowiącą element cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej, odpowiedzialną za mechaniczne właściwości i spójność błony oraz utrzymywanie normalnego kształtu komórki. Główne elementy szkieletu błonowego erytrocytów spektryna i białko 4.1 oraz ich nieerytrocytarnie odpowiedniki oddziałują z lipidami dwuwarstwy, w tym z fosfatydyloinozytolami [6,7].

Ewa Bok¹

Anita Hryniewicz-Jankowska²

Aleksander F. Sikorski^{2,3}

¹Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Biologii Molekularnej, Zielona Góra

²Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, Zakład Cytobiochemii, Wrocław

³Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, Zakład Cytobiochemii, ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław; e-mail: afsbc@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 10 marca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 30 kwietnia 2009 r.

Słowa kluczowe: oddziaływanie białek z lipidami, szkielet komórkowy, filamenty aktynowe, fosfatydyloinozytyle, miejsce wiązania lipidów

Wykaz skrótów: Arp – białko podobne do aktyny; BPA – białko przenoszące aniony; CH1-CH2 – domena wiązania aktyny = domeny homologiczne do kalponiny; DG – dystroglikan; domena FERM – domena wiążąca błonę, występująca w białku 4.1, ezrynie, radyksynie, moezynie; DPG – difosfatydyloglicerol; ERM – rodzina białek-ezryna, radyksyna, moezyna; GPC – glikoforyna C; OAG – 1-oleilo-2-acetyloglicerol; PA – kwas fosfatydowy; PC – fosfatydylocholina; PE – fosfatydyloetanolamina; PG – fosfatydyloglicerol; PH – domena homologiczna do plekstryny; PI – fosfatydyloinozytol; PI(4)P – fosfatydyloinozytolomonofosforan; PI(4,5)P₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PIP₃ – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; POPC – 1-palmitoilo-2-oleilofosfatydylocholina; PS – fosfatydyloseryna; WASP – białko zespołu Wiskott-Aldrich

Precyzyjna organizacja szkieletu błony i komórki wymaga ścisłej przestrzennej i czasowej regulacji procesów związanych z polimeryzacją i tworzeniem struktur wyższego rzędu, wiązek filamentów aktynowych lub włókien miozynowo-aktynowych. Zrozumienie fizjologicznej roli oddziaływań białek z lipidami dostarczy z pewnością ważnych informacji dotyczących funkcji błon w kształtowaniu szkieletu aktynowego i być może – udziału szkieletu błony i komórki w determinacji właściwości błon.

BIĄŁKA ODPOWIEDZIALNE ZA FRAGMENTACJĘ LUB DEPOLIMERYZACJĘ FILAMENTÓW AKTYNOWYCH

ŻELSOLINA

Żelsolina jest monomerycznym białkiem, o masie 84 kDa, wiążącym aktynę. Podlega regulacji przez jony Ca^{2+} , H^+ oraz lipidy inozytowe. Żelsolina zawiera sześć homologicznych domen (G1-6) [8]. Aktywowana przez jony Ca^{2+} wiąże się z dwoma przyległymi monomerami aktyny i poprzez rozzerwanie niekowalencyjnych wiązań pomiędzy nimi przerywa filament aktynowy, a następnie pozostaje związana z szybko rosnącym końcem jednego z dwóch nowo powstałych filamentów. W wyniku oddziaływań żelsoliny związanej z fosfatydyloinozylami, takimi jak $\text{PI}(4)\text{P}$, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ lub $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, następuje jej oddysocjowanie, co z kolei może zapoczątkować polimeryzację filamentu [9,10].

Żelsolina wiąże $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ze stałą dysocjacji (K_D) na poziomie mikromolowym, oddziaływanie to ulega aktywacji przez jony Ca^{2+} i duże stężenia jonów H^+ [11]. Dwa główne miejsca wiązania $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ są zlokalizowane w regionie łączącym domeny G1 i G2 i obejmują reszty 135-149 i 150-169. Te dwa regiony zawierają ugrupowania reszt zasadowych pośredniczące w oddziaływaniach z fosfatydyloinozylami i, co ciekawe, pokrywają się z miejscami wiązania G-(reszty 1-149) lub F-aktyny (150-406). Dodatkowe miejsca wiązania $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ wykryto w obrębie C-końcowej części żelsoliny, w regionie łączącym domeny G5 i G6 (reszty 620-634) oraz w C-końcowym odcinku obejmującym 23 reszty aminokwasowe 732-755 [12,13].

W oddziaływaniach z lipidami inozytowymi biorą udział zarówno oddziaływania elektrostatyczne, jak i hydrofobowe. Fragment obejmujący reszty 150-169 ma zdolność „wyciągania” poszczególnych cząsteczek $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ z błony lipidowej i tworzenia ścisłych, hydrofobowych połączeń z nimi. Oddziaływania te wpływają na siłę wiązania żelsoliny z aktyną, prowadząc do dysocjacji kompleksu. Procesowi temu towarzyszy przejście konformacyjne fragmentu 150-169 żelsoliny ze struktury β do α -helisy [14].

Prawdopodobnie w sytuacjach, kiedy stężenie $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ jest niskie, miejsca wiązania fosfatydyloinozytoli mogą być zajmowane przez inne lipidy. Żelsolina wiąże się z małymi, jednowarstwowymi liposomami PG/PC, a wiązanie to nie eliminuje zdolności aktywacji polimeryzacji aktyny, ale ogranicza jej zdolność do fragmentacji filamentów aktynowych w środowisku kwaśnym. Wykazano również, że żelsolina zwiększa ilość filamentów aktynowych związanych z liposomami PG/PC. Te obserwacje wskazują na jednoczesne wiązanie filamentu aktynowego i liposomów,

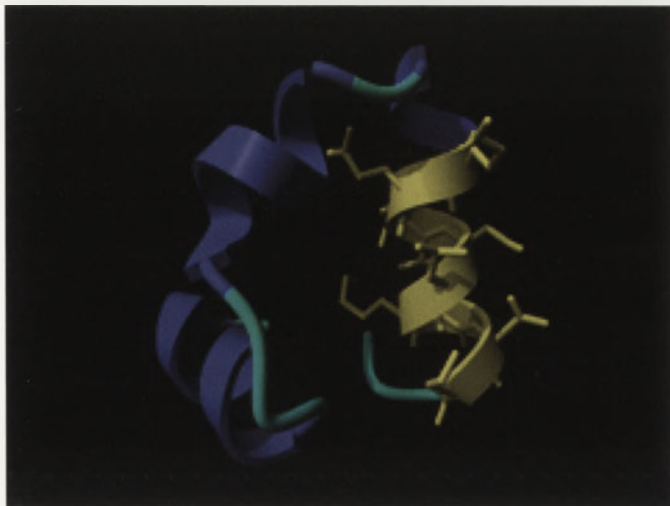
a wiązanie to nie prowadzi do rozdysocjowania kompleksu żelsoliny-aktyny. Prawdopodobnie białko to posiada jeszcze jedno dodatkowe miejsce wiązania lipidów w wydłużonym regionie łączącym domeny G3 i G4, czego dowodem może być zahamowanie proteolitycznego trawienia w tym miejscu w obecności lipidów. Doświadczenia nad wygaszaniem wewnętrznej fluorescencji tryptofanu we fragmencie G4 i G6 w obecności liposomów Br-PC/PG sugerują, że region ten może penetrować dwuwarstwą lipidową niezależnie od fosfatydyloinozytoli w roztworach o niskim pH [15].

WILINA

Podobnie jak żelsolina, wilina należy do rodziny białek odpowiedzialnych za fragmentację filamentów aktynowych, charakteryzującej się występowaniem domen zachowanych w ewolucji. Wilina składa się z części rdzeniowej, zbudowanej z sześciu homologicznych względem siebie domen i z części C-końcowej, którą tworzy mała domena o masie 8,5 kDa, tzw. „główką” [16]. Miejsca wiązania $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ występują zarówno w części rdzeniowej, jak i w obrębie „głóWKI” [17,18].

Wykazano, że wilina człowieka wiąże $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ z K_D 39,5 μM . Celem dokładniejszej charakterystyki miejsc wiążących $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ skonstruowano mutanty delecyjne i punktowe wiliny, obejmujące przypuszczalne miejsca wiązania tego fosfatydyloinozytoli. Analizy te wykazały obecność trzech miejsc wiążących $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, dwa z nich znajdują się w części rdzeniowej (reszty 112-118 oraz 138-146), a trzecie w „głóWce” (reszty 816-824). Miejsca wiążące fosfatydyloinozyle zawierają ugrupowania reszt zasadowych, wśród których jedno jest identyczne z miejscem wiązania F-aktyny w domenie odpowiedzialnej za fragmentację filamentów i tworzenie „czapeczki” na końcach filamentów, a kluczową resztą jest R138 [19]. Syntetyczne peptydy, odpowiadające temu fragmentowi sekwencji zarówno wiliny, jak i żelsoliny, oddziałują z $\text{PI}(4)\text{P}$ i $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ zarówno w postaci micelli, jak i liposomów, mogą konkurować z żelsoliną o wiązanie lipidów inozytowych, a także mogą powodować dysocjację kompleksu żelsoliny- $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, przywracając żelsolinie aktywność fragmentacji filamentów aktynowych [18]. Pozostałe dwa miejsca wiązania $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ częściowo pokrywają się z opisanymi wcześniej miejscami wiązania aktyny [20]. Badania metodą dichroizmu kołowego wykazały, że $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ indukuje strukturalne zmiany w pierwszej domenie wiązania fosfatydyloinozytoli, co z kolei może utrudniać wiązanie się wiliny z F-aktyną i w ten sposób hamować proces przerywania filamentów aktynowych. Obserwacje sugerują, że pod wpływem oddziaływania z $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ w trzeciej domenie wiązania tych lipidów, położonej w obrębie „głóWki”, struktura α -helikalna przechodzi w strukturę β , wzmacniając funkcję tworzenia wiązek filamentów aktynowych przez wilinę [19].

Oddziaływanie wiliny z $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, jak również (po fosforylacji) z enzymem hydrolizującym ten lipid, fosfolipazą C- γ_1 (PLC- γ_1) sugeruje, że wilina może być zaangażowana nie tylko w organizację aktyny, ale również w regulację procesu przekazywania sygnałów za pośrednictwem fosfatydyloinozytoli. Katalityczna aktywność PLC- γ_1 podlega kon-



Rycina 1. Struktura C-końcowej domeny wilyny (kod PDB-1UNC) [22]. Miejsca oddziaływania z PI(4,5)P₂, zaznaczone żółtym kolorem, a łańcuchy boczne reszt aminokwasowych przedstawiono stylem pałeczkowym. Ryc. 1-8 przygotowano w programie YASARA View (<http://www.yasara.org/>).

kurencyjnemu hamowaniu przez wilinę wskutek wiązania PI(4,5)P₂ zależnie od stężenia [21] (Ryc. 1).

KOFILINA

Kofilina (również ADF, ang. *actin depolymerizing factor*) jest małym białkiem, o masie 19 kDa, szeroko rozpowszechnionym w komórkach eukariotycznych, o trzeciorzędowej strukturze podobnej do struktury powtarzającego się segmentu białek z rodziny żelsolin. Kofilina kooperatywnie oddziałuje z filamentem aktynowym, reguluje polimeryzację, depolimeryzację i fragmentację filamentów aktynowych w zależności od pH, zatem reguluje dynamikę aktyny *in vivo*. Odgrywa ważną rolę podczas cytokinezy i ruchu komórkowego [23].

PI, PI(4)P i PI(4,5)P₂ hamują zdolność kofiliny do zależnego od stężenia wiązania i depolimeryzacji aktyny, podczas gdy I(1,4,5)P₃, OAG (1-oleilo-2-acetyloglicerol), PS i PC mają bardzo mały, lub w ogóle nie mają wpływu na te procesy [24]. Zaobserwowano, że sekwencja miejsca wiązania aktyny w kofilinie, obejmująca reszty W104-M115 jest również odpowiedzialna za wiązanie fosfatydyloinozytoli [25]. Sekwencja W104-M115 zawiera dwie zasadowe reszty K112 i K114, które mogą być zaangażowane w oddziaływania z polarnymi „głowami” lipidów inozytolowych. Dane uzyskane w wyniku analizy mutacyjnej sugerują, że obydwie reszty (K112 i K114) są zaangażowane w oddziaływanie z PI(4,5)P₂, ale K114 w mniejszym stopniu [26].

Wykazano, że mutant kofiliny pozbawiony C-końcowego fragmentu, obejmującego reszty 100-166, jest nadal zdolny do wiązania aktyny, a ponadto zarówno on, jak i peptydy obejmujące reszty 9-25 i 26-36 N-końcowego regionu kofiliny znoszą hamujące działanie PI(4,5)P₂ na wiązanie aktyny z kofiliną. Wyniki te sugerują że, oprócz już wcześniej opisanego miejsca w regionie C-końca, również w N-końcowej części kofiliny znajduje się miejsce wiązania aktyny kontrolowane przez fosfatydyloinozytyle [27,28].

Mutacje R96A/K98A i R109A/R110A drożdżowej kofiliny okazały się istotne dla wiązania PI(4,5)P₂ także u innych organizmów. Reszty te są usytuowane w obrębie zachowanej w ewolucji sekwencji, długiej α-helisy 3 kofiliny. Pozostałe trzy mutacje odpowiedzialne za znacznie obniżone powinowactwo tego białka do PI(4,5)P₂ są zlokalizowane w innych regionach drożdżowej kofiliny. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że miejsce wiązania PI(4,5)P₂ tworzą zarówno reszty znajdujące się w rejonie α-helisy 3, jak i w innych częściach kofiliny. To sugeruje, że kofilina prawdopodobnie równocześnie oddziałuje z kilkoma cząsteczkami PI(4,5)P₂ albo że oddziaływanie z PI(4,5)P₂ jest dynamiczne i nie jest związane z jednym specyficznym miejscem w kofilinie [28].

Analiza strukturalna NMR kofiliny kury wykazała, że 29 reszt aminokwasowych bierze udział w oddziaływaniu z PI(4,5)P₂ i są to: reszty D66, Y68, T69, V72 w regionie N-końca białka oraz L99, K132-V137, K144-R146, T148-V158, L161, E162, K164 i L166, tworzące ciągły obszar w obrębie C-końcowej części białka. Dwie reszty aminokwasowe K132 i H133 całkowicie zachowane w sekwencji kofiliny kręgowców bezpośrednio kontaktują się z wiązaniem lipidem, prawdopodobnie poprzez swoiste oddziaływania z fosforylowanym pierścieniem inozytoli [29].

Badania wykazały, że PI(4,5)P₂ w znaczący sposób przyspiesza proces oligomeryzacji kofiliny, co może sugerować, że inaktywacja kofiliny przez PI(4,5)P₂ jest związana z jej oligomeryzacją. Proces wiązania monomerów kofiliny może stanowić mechanizm, który chroni przed depolimeryzacją aktyny lub zamienia aktywność depolimeryzacji na aktywność tworzenia wiązek aktynowych [30].

PROFILINA

Profilina, białko o masie 15 kDa, powszechnie występujące we wszystkich komórkach eukariotycznych, początkowo opisywana jako białko odpowiadające za depolimeryzację aktyny, ale obecnie uważa się, że odgrywa również ważną rolę w procesach jej polimeryzacji. Ta podwójna funkcja profiliny jest kluczową dla procesów związanych z dynamiką szkieletu i ruchem komórki [31]. Wykazano, że profilina I oddziałuje specyficznie z PI(4,5)P₂ zarówno w formie micelli, jak i liposomów, ale zarówno PI(3,4)P₂, jak i PI(3,4,5)P₃ wiążą się z profiliną z większym powinowactwem niż PI(4,5)P₂ [32,33]. Badania *in vitro* wskazują na to, że wiązanie PI(4,5)P₂ przez profilinę powoduje dysocjację kompleksu aktyna-profilina, co sugeruje, że oddziaływanie to może mieć jednocześnie wpływ na kontrolę procesu polimeryzacji aktyny i procesów związanych z przekazywaniem sygnałów [34,35].

Dla profilin ssaków zaproponowano dwa odrębne regiony odpowiedzialne za oddziaływanie z fosfatydyloinozytolami. Pierwszy, częściowo pokrywający się z miejscem wiązania aktyny, i drugi, zlokalizowany w pobliżu miejsca wiązania sekwencji poliprolinowych. Dla profiliny ludzkiej, w pierwszym regionie najważniejszą rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne z resztami: K69, R88 i K90, natomiast drugi region wiąże PI(4,5)P₂ poprzez oddziaływania

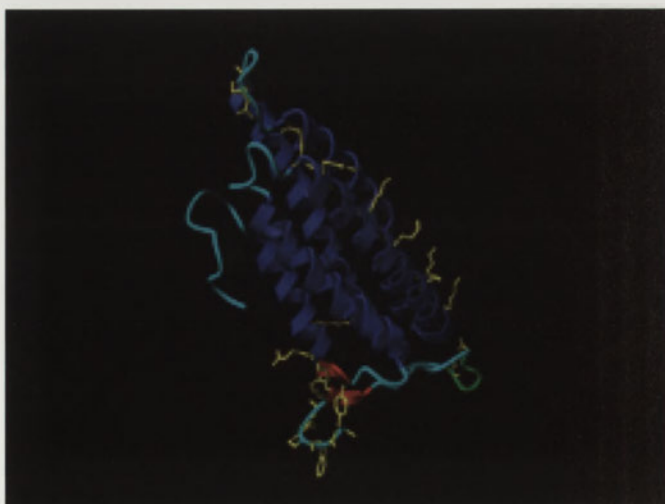


Rycina 2. Struktura profiliny I (kod PDB-1FIK) [39]. Dalsze objaśnienia jak w opisie Ryc. 1.

elektrostatyczne i hydrofobowe, a znaczącą rolę odgrywają reszty: R135, R136 i K125 [34,36-38] (Ryc. 2).

Istnienie drugiego miejsca wiązania fosfatydyloinozytoli potwierdzają badania z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenезy, mutant R136D wiąże aktynę z powinowactwem podobnym do dzikiego typu, co wskazuje na fakt, że miejsca wiązania aktyny i PI(4,5)P₂ tylko częściowo się pokrywają. Dane te sugerują również związek pomiędzy wiązaniem PI(4,5)P₂ a wiązaniem ligandów bogatych w prolinę, ponieważ mutant profiliny IIa W3A pozbawiony zdolności wiązania sekwencji poliprolinowych wykazuje zwiększone powinowactwo względem PI(4,5)P₂ [40].

Ostatnio wykazano, że PI(4,5)P₂ stanowi wspólny sygnał do zwolnienia profiliny II z kompleksu z dynaminą I, jak również z kompleksu z aktyną, co sugeruje, że lokalne zmiany w stężeniu PI(4,5)P₂ są ściśle związane z przestrzenną i czasową koordynacją polimeryzacji aktyny [41].



Rycina 3. Struktura domeny VT winkuliny (kod PDB-1ST6) [49]. Łańcuchy boczne reszt oddziałujących z fosfolipidami przedstawiono stylem pałeczkowym i zaznaczono na żółto.

Organizacja PI(4,5)P₂ w błonie plazmatycznej jest inna niż w micellach, dlatego też wiązanie profiliny do błon może się różnić od wiązania z PI(4,5)P₂ w formie micelli. Istnieje możliwość, że oddziaływanie profiliny z błoną zaczyna się od jednej cząsteczki PI(4,5)P₂ i to zapoczątkowuje rekrutację dodatkowych cząsteczek PI(4,5)P₂ przez profilinę i formowanie małych agregatów PI(4,5)P₂. Inna hipoteza zakłada, że wiązanie profiliny do błony wymaga obecności małych zgrupowań PI(4,5)P₂. Wykazano, że wiązanie profiliny do fosfatydyloinozytoli w stężeniach poniżej krytycznego stężenia micelaryzacji jest znacząco słabsze od wiązania profiliny do micelli i liposomów. Również wyniki badań oddziaływań z wielkimi jednowarstwowymi liposomami sugerują, że profilina rekrutuje sąsiadujące cząsteczki PI(4,5)P₂, stabilizując w ten sposób swoje oddziaływanie z błoną lipidową [42].

BIAŁKA ODPOWIEDZIALNE ZA POLIMERYZACJĘ AKTYNY

WINKULINA

Winkulina jest ważnym składnikiem połączeń adhezyjnych typu komórka-komórka i komórka-substancja zewnątrzkomórkowa, kotwicząc filamenty aktynowe w błonie komórkowej. Winkulina składa się z domeny o masie 90 kDa, tzw. „globularnej głowy” (VH), i domeny o masie 30 kDa, tzw. „ogona” (VT), które są połączone regionem bogatym w reszty prolinowe, zapewniającym całej cząsteczce dużą elastyczność. Aktywacja winkuliny prowadząca do „otwarcia” cząsteczki może zachodzić poprzez oddziaływanie domeny VH z fragmentami taliny lub poprzez wiązanie domeny VT z fosfolipidami anionowymi, szczególnie z PI(4,5)P₂ [43-45].

Wykazano, że domena VT winkuliny ulega akumulacji na powierzchni dwuwarstwy lipidowej poprzez oddziaływanie elektrostatyczne, które następnie są stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe, pozwalające na zagłębienie się fragmentu białka w dwuwarstwie lipidowej [46]. W roztworach o fizjologicznym pH i sile jonowej domena VT kosedymentuje z liposomami PS i PC/PI(4,5)P₂ (a nie z liposomami PC), przy czym reakcja ta nasila się wraz ze wzrostem zawartości PI(4,5)P₂ [47]. Określenie struktury krystalicznej domeny VT (Ryc. 3) pozwoliło na dokładniejszą charakterystykę miejsc wiążących lipidy. Strukturę domeny VT tworzy pięć amfipatycznych helis formujących przeciwrównoległą wiązkę. Dwa zasadowe elementy na powierzchni domeny to: „zasadowa drabina”, uformowana głównie przez łańcuchy boczne helisy H3, w tym reszty K944, R945, K952, K956, R963, K966, K970, R978, R1008 i R10049, oraz „zasadowy pierścień” otaczający C-końców strukturę „spinki do włosów”, obejmujący reszty R910, K911, R1039, K1049, R1060 i K1061. Wykazano, że C-końcowe „ramię” domeny VT jest niezbędne do wiązania fosfolipidów anionowych w warunkach fizjologicznych. Zawiera ono trzy reszty zasadowe oraz hydrofobową „spinkę do włosów”, obejmującą reszty 1062-1066 (TPWYQ), gdzie reszty tryptofanu i tyrozyny mogą tworzyć motyw penetrujący liposomy anionowe [48] (Ryc. 3).

Wprowadzenie mutacji punktowych w obrębie „zasadowego pierścienia” (K911A i K924A) lub „drabiny” (K952A) powoduje osłabienie wiązania z PI(4,5)P₂, podczas gdy mutacje dwóch zasadowych reszt w sąsiedniej helisie nie dają żadnego efektu [49]. K911 i K924 leżą w bliskim sąsiedztwie H906, która odgrywa kluczową rolę podczas zmian konformacyjnych domeny VT indukowanych przez PI(4,5)P₂ [50]. Ponieważ miejsce wiązania PI(4,5)P₂ jest tylko częściowo osłonięte w całej cząsteczce winkuliny zaproponowano kinetyczny model aktywacji, w którym związanie PI(4,5)P₂ i wynikające z tego zmiany konformacyjne powodują przejściowe uwolnienie domeny VT od domeny VH, co z kolei pozwala na związanie taliny lub α -kateniny z domeną VH, czy związanie odpowiednich ligandów z regionem bogatym w reszty prolinowe [49]. Regiony wiążące F-aktynę w winkulinie obejmują reszty 884-1012 i 1012-1066, częściowo pokrywając się z miejscami wiązania fosfolipidów, co skutkuje blokowaniem miejsca wiązania aktyny przez PI(4,5)P₂ [51].

Mutanty winkuliny pozbawione możliwości wiązania fosfolipidów z zachowaną aktywnością wiązania F-aktyny ekspresjonowane w komórkach lokalizują się w miejscach połączeń adhezyjnych, ale proces rozplaszczania i migracji komórek jest znacznie osłabiony, a zależne od PI(4,5)P₂ przerywanie połączeń adhezyjnych ulega zniesieniu [52].

TALINA I INNE BIAŁKA Z DOMENĄ FERM

Talina jest członkiem rodziny białek 4.1, grupy wiążącej się z fosfolipidami błonowymi poprzez domenę FERM. Do grupy tej należą również białko szkieletu błonowego erytrocytów 4.1, ezryna, radyksyna, moezyna, merlina oraz niektóre fosfatazy tyrozynowe [53,54]. Talina – białko o masie 235 kDa jest głównym łącznikiem pomiędzy integrzynami i szkieletem aktynowym. Jest szeroko rozpowszechnionym białkiem występującym w różnych typach komórek ssaczych, gdzie jest skupiona w rejonach połączeń adhezyjnych na granicy komórka/matriks zewnątrzkomórkowa i w wypustkach komórkowych. Endogenna proteaza, może rozciąć talinę na dwie części, N-końcową globularną domenę, tzw. „głowę”, o masie 47 kDa i C-końcową pałeczkowatą domenę o masie 190 kDa. Funkcjonalną formą taliny jest homodimer, w którym monomery ułożone są przeciwrownolegle [55,56]. Oddziaływanie z fosfolipidami jest związane z domeną o masie 47 kDa, a w szczególności z jej N-końcową częścią, stanowiącą domenę FERM (por. poniżej).

Wykazano, że oddziaływanie taliny z PI(4,5)P₂ powoduje zmianę konformacji tego białka i jego aktywację, co prowadzi do ekspozycji miejsc wiązania integrzyn w talinie, zatem proces przekazywania sygnałów zależny od PI(4,5)P₂ moduluje tworzenie ognisk adhezyjnych poprzez regulację kompleksu integryna-talina [57].

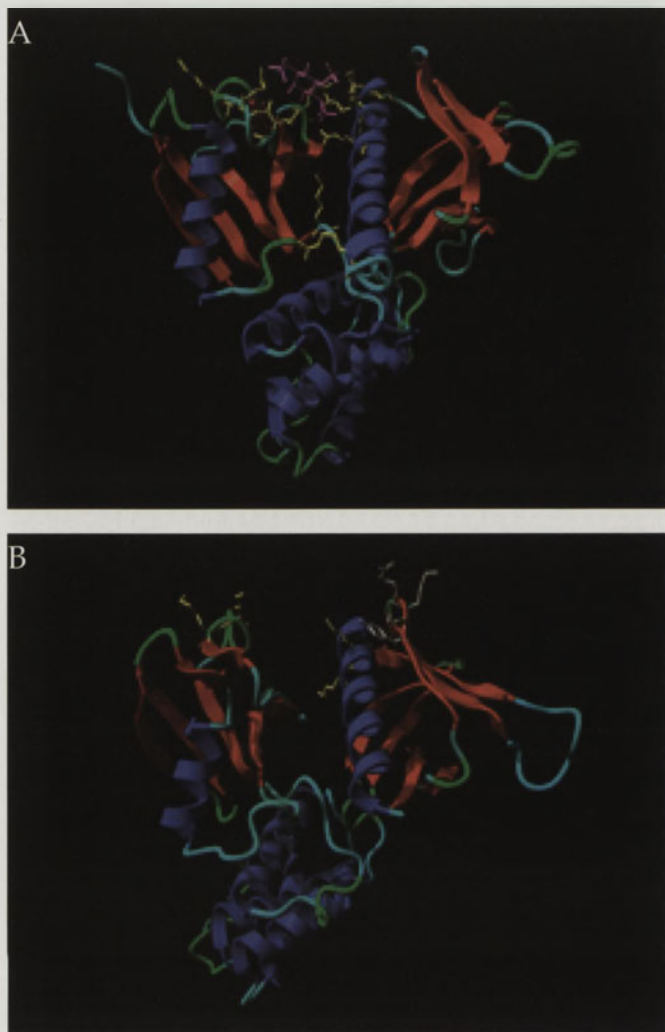
In vivo talina występuje w równowadze pomiędzy formą związaną z błoną a cytosolem. Lipidy na cytoplazmatycznej powierzchni błony mogą stanowić matriks do zakotwiczenia taliny, oddziaływania z nimi mogą ułatwiać oddziaływania z docelowymi białkami, takimi jak np. integryny i lalilina. Na podstawie analizy teoretycznej oraz doświadczeń wskazano dwa fragmenty zlokalizowane w N-końcowej

domenie taliny, które mogą działać jako potencjalne miejsca oddziaływań z błoną. Fragmenty S19 (reszty aminokwasowe 21-39) i H17 (385-406) penetrują obdarzone ujemnym ładunkiem mono- i dwuwarstwy o składzie POPC/POPG (3/1), przybierając częściowo lub całkowicie strukturę α -helikalną. Fragment H17 ze specyficzną kombinacją pięciu reszt izoleucyny tworzących hydrofobową powierzchnię oraz pięciu reszt K zebranych na C-końcu, może zanurzać się w obojętne i ujemnie naładowane błony. Energia swobodna (ΔG_0) oddziaływania hydrofobowego dla peptydu H17 jest porównywalna do energii białek, które kotwiczą w błonach. Udział ładunku elektrostatycznego pięciu reszt K w tym oddziaływaniu jest zależny od pH [58]. Fragment ten ze względu na swą amfipatyczność może wykazywać zdolność do destabilizacji dwuwarstwy fosfolipidowej, a w konsekwencji – do fuzji błon, co wykazano przy użyciu mikroskopii krioelektronowej [59]. W przypadku taliny zaobserwowano zdolność do odwracalnego tworzenia porów w wielkich liposomach utworzonych z lipidów obojętnych i kwasowych [60]. Sekwencja S19 również może brać udział w kotwiczeniu taliny do błony poprzez oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe [57].

Talina oraz inne białka tej rodziny zawierają w N-końcowej części domenę FERM (por. poniżej), za pośrednictwem której mogą oddziaływać z błonami lipidowymi, co sugeruje, że ta domena może być ważna dla aktywności tworzenia porów w błonach. Badania wykazały, że również białko 4.1, ezryna i moezyna są zdolne do wytwarzania stabilnych porów w liposomach. PI(4,5)P₂, który wiąże się z domeną FERM i rozrywa wewnątrzcząsteczkowe wiązanie pomiędzy N-końcową i C-końcową domeną białek z rodziny 4.1, wpływa hamująco na tworzenie porów. Wyniki te wskazują na to, że to wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie odgrywa kluczową rolę w tej aktywności [61].

DOMENA FERM

Domena FERM (Ryc. 4) składa się z trzech subdomen A, B i C, które, oddziałując ze sobą, tworzą globularną strukturę o kształcie liścia koniczyny. Struktura kompleksu krystalicznego domeny FERM z I(1,4,5)P₃ mysiej radyksyny ujawniła, że I(1,4,5)P₃ lokuje się w centrum zasadowej szczeliny pomiędzy subdomenami A i C. Ta dodatkowo naładowana szczelina jest uformowana przez C-końcową helisę (α 1C) subdomeny C i wystającą pętlę pomiędzy elementami β 3A i β 4A subdomeny A. Ładunek dodatni pochodzi od siedmiu reszt K i czterech R w tym regionie. W analizowanym kompleksie reszty K60, K63 oraz N62 z subdomeny A i K278 z subdomeny C kontaktują się z trzema grupami fosforanowymi I(1,4,5)P₃. Taka orientacja domeny FERM radyksyny związanej z błoną pozwala na oddziaływanie obdarzonej ładunkiem dodatnim powierzchni pomiędzy subdomenami A i C z ujemnie naładowaną powierzchnią błony [62]. Niezbędne dla związania PI(4,5)P₂ w cząsteczce ezryny reszty K253, 254, 262 i 263 są sekwencjami zachowanymi w ewolucji wśród białek rodziny ERM (ezryna-radyksyna-moezyna). Jak wynika z analizy struktury krystalicznej cząsteczki moezyny, te cztery reszty lizyny są zlokalizowane w subdomenie C, przypominającej domenę plekstrynową (PH), eksponowane są na powierzchni cząsteczki i tworzą trójkąt z resztami K63 i 64, zamykając względnie płaską powierzchnię [63]. Ułożone są jednak zbyt



Rycina 4. Struktura domen FERM. A. Domena FERM radyksyny (kod PDB-1GC6) [62]. Częsteczkę I(1,4,5)P₃ przedstawiono w kolorze różowym. B. Domena FERM białka 4.1 (kod PDB-1GG3) [65]. Reszty oddziałujące z PS zaznaczono w kolorze srebrnym. Pozostałe szczegóły jak w opisie Ryc. 1.

daleko od reszt K63 i K64, aby jednocześnie mogły się kontaktować z pojedynczą „głową” fosfolipidu. Na podstawie tych wyników zaproponowano dla ezryny istnienie kilku różnych miejsc wiązania współdziałających w oddziaływaniach z lipidami [64]. Jedno miejsce jest zlokalizowane w strefie kontaktu subdomen A i C [62], a inne są położone w subdomenie C i tworzą dwie pętle strukturalne typu PH.

BIAŁKA ERM (EZRYNA, RADYKSZYNA, MOEZYNA)

Do rodziny białek ERM zaliczamy trzy blisko spokrewnione ze sobą białka, ezrynę (~82 kDa), radyksynę (~80 kDa) i moezynę (~75 kDa), sekwencje których są w 75% identyczne względem siebie. Białka ERM działają jako łączniki pomiędzy błoną komórkową a szkieletem aktynowym, są zaangażowane w procesy związane z adhezją, ruchliwością i morfogenezą komórek, biorą również udział w przekazywaniu sygnałów. W strukturze białek rodziny ERM można wyróżnić trzy główne regiony: N-kończącą domenę FERM (nazywaną również N-ERMAD), środkową domenę tworzącą pęczek helis (~200 reszt aminokwasowych) i domenę C-kończącą (C-ERMAD, ~100 reszt) wiążącą aktynę. W cytoplazmie białka ERM są utrzymywane w nieaktywnej konformacji poprzez wewnątrz-

cząsteczkowe oddziaływanie pomiędzy domenami N- a C-kończącą. Aktywacja białek ERM jest rezultatem konformacyjnych zmian, które powodują zwolnienie wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania i odsłonięcie miejsc wiązania dla innych białek [66,67].

Rekombinowana ezryna w warunkach fizjologicznej siły jonowej (130 mM KCl) silnie wiąże liposomy zawierające 20% PI(4,5)P₂ i 80% PC, a oddziaływanie to, w przeciwieństwie do oddziaływań z innymi pokrewnymi lipidami, jak PI(4)P, PI i PS, nie jest wrażliwe na wzrastającą siłę jonową i występuje nawet przy względnie niskim poziomie PI(4,5)P₂ (5-20%) w dwuwarstwie. Wykazano również, że nie całe białko, ale N-kończący konstrukt ezryny obejmujący domenę FERM (por. powyżej) oddziałuje wybiórczo z liposomami zawierającymi PI(4,5)P₂ [68].

Konstrukt obejmujący pierwsze 310 reszt ezryny z mutacjami K253N, K254N, K262N i K263N wprowadzony do komórek linii epitelialnych i fibroblastycznych lokalizował się głównie w cytosolu, nie zaobserwowano kolokalizacji z F-aktyną, a wiązanie do błony plazmatycznej było słabe. Takie wyniki sugerują, że bezpośrednie oddziaływanie ezryny z PI(4,5)P₂ jest niezbędne w kierowaniu ezryny do określonych struktur błonowych [69].

Badania wykazały, że PI(4,5)P₂ ułatwia oddziaływanie pomiędzy ezryną a niektórymi białkami błony, np. CD44 [70], ICAM-1 oraz ICAM-2 [71], a oddziaływanie z PI(4,5)P₂ i fosforylacja T567 są niezbędne do właściwej lokalizacji ezryny w apikalnej domenie błony komórek epitelialnych [72-74]. Wyniki analiz tych dwóch procesów w przypadku ezryny pozwoliły stwierdzić, że PI(4,5)P₂ nie jest głównym partnerem w oddziaływaniach z błoną, ale jego związanie jest niezbędne do konformacyjnej aktywacji ezryny, która z kolei powoduje odsłonięcie innych miejsc wiązania z błoną. Okazało się, że związanie PI(4,5)P₂ przez N-kończącą część ezryny jest wstępnym warunkiem fosforylacji reszty T567, co sugeruje, że oddziaływanie to indukuje zmianę konformacyjną niezbędną do fosforylacji [74].

BIAŁKO 4.1

Białko 4.1 (4.1R) jest głównym składnikiem szkieletu błonowego krwinek czerwonych, który odgrywa ważną rolę w utrzymaniu i modulowaniu morfologii erycyty oraz mechanicznych właściwości i integralności błony. Białko 4.1 zawiera cztery funkcjonalne domeny: N-kończącą domenę (FERM) o masie 30 kDa (por. powyżej), domenę o masie 16 kDa, domenę wiązania spektryny o masie 10 kDa oraz C-kończącą domenę o masie 22/24 kDa.

Dzięki domenie FERM białko 4.1 oddziałuje z mieszanymi błonami fosfolipidowymi zawierającymi PS, PE i PC oraz z odwróconymi błonami erycytów. Szczególnie duże powinowactwo zaobserwowano względem liposomów zawierających PS [54,75,76].

Dalsze badania wykazały, że białko 4.1 penetruje monowarstwę PS, PC, DOPE, PI i 1,3-DOG na podobnym poziomie, o czym świadczą uzyskane wartości $\Delta\pi$ (zmiana ciśnienia powierzchniowego monowarstwy), nawet przy początkowym

ciśnieniu powyżej 30 mN/m. Natomiast wzrost fluorescencji spowodowany wyciekaniem znacznika fluorescencyjnego zaobserwowano tylko w przypadku obdarzonych ładunkiem ujemnym liposomów PS oddziałujących z białkiem 4.1. Wykazano także, że białko 4.1 powoduje wzrost przepuszczalności liposomów przypominających składem wewnętrzną powierzchnię dwuwarstwy lipidowej, ale nie wpływa na liposomy o składzie charakterystycznym dla jej zewnętrznej powierzchni [76,77]. Dla określenia oddziaływania białka 4.1 znakowanego ^{125}I z liposomami PS wyznaczono stałą dysocjacji $K_D = 3,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ [78].

Wiązanie białka 4.1R do liposomów PS jest, jak wykazano, procesem dwuetapowym. Obdarzone ładunkiem dodatnim reszty YKRS w N-końcowej domenie FERM i ujemnie naładowana reszta polarna PS odgrywają kluczową rolę w zainicjowaniu tego oddziaływania, późniejsza hydroliza polarnej reszty PS przez fosfolipazę D lub C nie powoduje dysocjacji białka 4.1R od liposomów PS. Podczas drugiego etapu dochodzi do wytworzenia ścisłych, hydrofobowych oddziaływań pomiędzy białkiem 4.1R a resztami kwasów tłuszczowych. Białka 4.1R nie można oddysocjować od liposomów PS pod wpływem wysokiej siły jonowej, wymaga to hydrolizy przez fosfolipazę A_2 , co oznacza, że głównie łańcuchy acylowe PS są odpowiedzialne za to oddziaływanie [79]. W przeciwieństwie do niektórych wcześniejszych danych [78] wykazano, że wiązanie białka 4.1R do PS nie osiąga wysycenia. „Dziiki” typ białka GFP-4.1R odznacza się szeroką dystrybucją w transfekowanych komórkach COS-7, lokalizuje się nie tylko w błonie plazmatycznej, ale również w cytoplazmie czy jądrze [80], natomiast mutant GFP-4.1R YRKS->AAAA ulega akumulacji w siateczce śródplazmatycznej. Ponieważ ten mutant nie może wiązać PS wysunięto hipotezę, że problemy z sortowaniem białka 4.1R są wynikiem braku oddziaływań pomiędzy 4.1R a PS. Co ciekawe, motyw YRKS w białku 4.1R jest podobny do sekwencji YRRF [79], którą wykryto w cytoplazmatycznej domenie integryny $\beta 2$ i która działa jako sygnał odpowiedzialny za sortowanie do błony plazmatycznej [81]. Tak więc, oddziaływania białka 4.1R z fosfolipidami mogą odgrywać rolę w jego sortowaniu, utrzymaniu prawidłowej lokalizacji i regulacji jego funkcji [79].

Wykazano, że białko 4.1R oddziałuje również z liposomami zawierającymi $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ poprzez N-końcową domenę FERM, a reszty K63, 64 oraz K265 i 266 stanowią potencjalne miejsce wiązania dla tego lipidu. Badania z wykorzystaniem metody FRET pozwoliły stwierdzić, że tylko po związaniu $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ N-końcowa domena podlega zmianom konformacyjnym. $\text{PI}(4)\text{P}$ jest mniej efektywny, a PI i $\text{I}(1,4,5)\text{P}_3$ nie powodują ich w ogóle. Zaangażowanie różnych motywów w obrębie domeny FERM białka 4.1 w wiązanie PS i $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Ryc. 4B) podkreśla swoistość tych oddziaływań i wskazuje na ich odmienne funkcje. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ znacząco zwiększa powinowactwo białka 4.1R do glikoforyny C, a obniża do białka przenoszącego aniony i nie wpływa na oddziaływanie z p55 [82].

BIAŁKA RODZINY SPEKTRYNA- α -AKTYNINA-DYSTROFINA

SPEKTRYNA

Spektryna jest głównym składnikiem szkieletu błonowego krwinki czerwonej [83]. W komórkach nieerytrocytar-

nych spektrynę można znaleźć również w wielu innych błonach i przedziałach komórkowych. Taka lokalizacja sugeruje, że spektryna może być zaangażowana w różne procesy komórkowe, takie jak powstawanie i specjalizacja domen błonowych, kierowanie swoistych białek do tych domen, sortowanie białek, transport pęcherzykowy, endocytoza, egzocytoza w obrębie zakończeń nerwowych i uwalnianie neuroprzekazników, morfogeneza [6,84,85], a być może nawet funkcje związane z regulacją procesów jądrowych [86]. Spektryna zazwyczaj występuje w formie tetrameru utworzonego poprzez oddziaływanie dwóch identycznych heterodimerów powstałych w wyniku przeciwrównoległego wiązania się podjednostek α i β . Podjednostka α o masie 280 kDa składa się z N-końcowego regionu odpowiedzialnego za wiązanie się heterodimerów, środkowego regionu, zawierającego 21 trójhelikalnych segmentów spektrynowych (stanowiących homologiczny, powtarzalny motyw o długości 106 reszt aminokwasowych), domeny SH3 (domena homologiczna do kinaz src) w segmencie 10 i C-końcowej domeny homologicznej do kalmodyliny. Podjednostka β o masie 247 kDa dla formy erytrocytarnej i 274 kDa w przypadku formy nieerytrocytarnej zawiera N-końcową domenę wiązania aktyny (zbudowaną z dwóch domen CH, dlatego określaną często jako CH2), środkowy region składający się z 17 segmentów spektrynowych, zawierający domenę wiązania ankiryiny, obejmującą helisę C segmentu 14 i segment 15 oraz region C-końcowy, zawierający domenę plekstrynową PH u niektórych (dłuższych) form spektryny $\beta \text{ I}$ i $\beta \text{ II}$. Spektryny $\beta\text{-H}$ (heavy) *D. melanogaster*, *C. elegans* i ludzkie $\beta \text{ V}$ zamiast 17 zawierają 30 trójhelikalnych segmentów [6,84].

Badania prowadzone już od wczesnych lat 70. wykazały, że oczyszczona spektryna ma zdolność do wiązania hydrofobowych i amfipatycznych ligandów. Przeprowadzono wiele badań dotyczących oddziaływań spektryny erytrocytarnej z naturalnymi błonami erytrocytów, liposomami i monowarstwami fosfolipidowymi z wykorzystaniem różnych technik [7,87,88]. Doświadczenia prowadzone od szeregu lat przez różne zespoły, w tym nasz, z zastosowaniem różnych metod, pozwoliły scharakteryzować to oddziaływanie [89-94]. W naszym laboratorium wykazano również, że spektryna nieerytrocytarna wiąże fosfolipidy błonowe, a najwyższe powinowactwo (stałe dysocjacji na poziomie submikromolowym) zaobserwowano dla liposomów zawierających aminofosfolipidy, ale również lipidy anionowe [95-97].

Wykazano, że spektryna nieerytrocytarna (mózgowa) oddziałuje wydajniej od spektryny erytrocytarnej z monowarstwami zbudowanymi z fosfolipidów anionowych (PI , PA , PG , DPG). Zaobserwowano natomiast znacznie słabszą penetrację przez spektrynę mózgową monowarstw zawierających $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ niż w przypadku innych fosfolipidów anionowych [98]. Dane uzyskane z badań nad oddziaływaniem naturalnych błon całkowicie pozbawionych białek peryferyjnych oraz usuniętych za pomocą proteaz pozabłonowych części białek integralnych, wskazują na obecność niezależnego od białek receptora dla spektryn w natywnych błonach [99].

Zaobserwowano, że oczyszczona ankiryna hamuje kompetycyjnie oddziaływanie spektryny erytrocytarnej z lipo-

somami oraz monowarstwami, największy efekt stwierdzono w przypadku wiązania liposomów PE/PC – 60% hamowania, podczas gdy dla liposomów PS/PC efekt był mniejszy – 10-20% hamowania [100-102]. Również w przypadku oddziaływania spektryny mózgowej z monowarstwą PE/PC zaobserwowano podobny poziom hamowania tego oddziaływania przez ankiryne, jak w przypadku spektryny erytrocytarnej [97]. Co więcej, oddziaływanie erytrocytarnej i nieerytrocytarnej podjednostki β z monowarstwą PE/PC jest bardziej wrażliwe na hamowanie przez ankiryne niż oddziaływanie natywnego heterodimeru spektryny [97,102].

Fizjologiczne znaczenie obserwowanej współzależności oddziaływań dwuwarstwy lipidowej i ankiryne ze spektryną może wyjaśniać wcześniej proponowany model ankiryne:PE [87,103]. Wiadomo, przynajmniej w błonach erytrocytów, że w niektórych stanach fizjologicznych dochodzi do sytuacji, w których brakuje ankiryne lub jej powinowactwo do spektryny jest obniżone, np. kiedy ankiryne ulega fosforylacji [104]. Zakładamy, że tetramery spektryny wiążą ankiryne w miejscu o najwyższym powinowactwie, ale kiedy nie ma wystarczającej ilości funkcjonalnej ankiryne, tetramery spektrynowe wiążą domeny lipidowe bogate w PE, co pozwala na zachowanie mechanicznych właściwości błony [7,87,103].

Domena wiązania ankiryne obejmuje C-końcówę helisy segmentu 14 i 15 segment podjednostki β obu spektryn [105,106]. Kontynuując badania, w naszym zespole przeprowadzono analizę oddziaływań rekombinowanego białka odpowiadającego domenie wiązania ankiryne spektryny erytrocytarnej oraz jej mutantów delecyjnych z mono- i dwuwarstwami bogatymi w PE w celu zmapowania i charakterystyki miejsca wiązania fosfolipidów w obrębie tej domeny. Wykazano, że zarówno domena wiązania ankiryne pełnej długości, jak i jej mutant delecyjny z nienaruszoną N-końcówą częścią wiążą mono- i dwuwarstwy PE/PC z umiarkowanie wysokim powinowactwem, penetrują monowarstwy i konkurują ze spektryną o liposomy. Natomiast mutanty delecyjne pozbawione 38 lub 8 reszt z N-końca w porównaniu do domeny pełnej długości wykazują niższe powinowactwo do lipidów. Wykazano również, że ekspresjonowana domena wiązania ankiryne indukuje niewielkie obniżenie parametru uporządkowania błony PE/PC podobnie do efektu indukowanego przez oczyszczoną spektrynę, podczas gdy mutant pozbawiony 38 N-końcowych reszt indukuje niewielki wzrost parametru uporządkowania, podobnie do BSA. Oddziaływanie rekombinowanego białka odpowiadającego pełnej długości domeny wiązania ankiryne oraz jego mutantu zawierającego N-koniec z monowarstwą PE/PC ulega hamowaniu przez ankiryne. Natomiast, wpływ ankiryne na oddziaływanie mutantów pozbawionych 8 i 38 reszt z N-końca domeny z monowarstwą PE/PC jest odpowiednio zredukowany lub zniesiony [107].

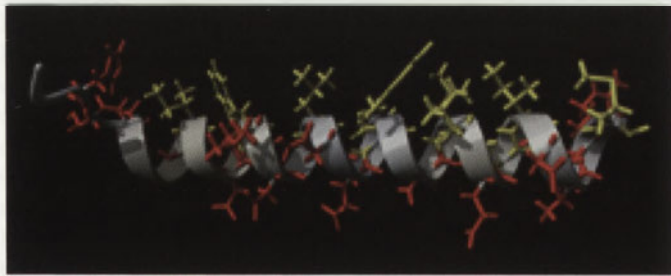
Ponieważ N-końcówę część domeny wiązania ankiryne w przypadku znanych izoform spektryn β jest sekwencją zachowaną w ewolucji, można było się spodziewać, że wyniki dotyczące nieerytrocytarnej spektryny β II będą podobne. Rzeczywiście, sklonowany i rekombinowany fragment podjednostki β spektryny nieerytrocytarnej obejmujący sekwencję domeny wiązania ankiryne, podobnie jak mu-

tant delecyjny z zachowaną jej częścią N-końcówą wiążą mono- i dwuwarstwy w sposób podobny do całej cząsteczki spektryny nieerytrocytarnej czy też do domeny wiązania ankiryne spektryny erytrocytarnej, natomiast mutanty ze skróconą N-końcówą częścią domeny wykazują obniżone powinowactwo do fosfolipidów. Ankiryne kompetycyjnie hamuje oddziaływanie z monowarstwą w przypadku całej domeny wiązania ankiryne oraz jej mutantu z zachowaną częścią N-końcówą [108].

Przejęciowa nadprodukcja całej domeny wiązania ankiryne spektryny erytrocytarnej i nieerytrocytarnej sprzężonej z GFP w komórkach HeLa powoduje zmiany w morfologii komórki i agregację szkieletu błonowego. Takich zmian nie zaobserwowano w przypadku komórek transfekowanych konstruktem zawierającym skróconą od N-końca część domeny wiązania ankiryne sprzężoną z GFP, ani w komórkach transfekowanych wektorem kodującym tylko GFP. Wyniki uzyskane dla całej domeny wiązania ankiryne spektryny nieerytrocytarnej i jej mutantu delecyjnego sprzężonych z GFP, nadekspresjonowanych w kolejnych dwóch liniach komórkowych: HEK293 i B16 są analogiczne do tych uzyskanych na komórkach HeLa. Obserwuje się charakterystyczny wzrost punktowej agregacji, ale tylko w przypadku nadprodukcji pełnej długości domeny wiązania ankiryne [108].

Systematyczne analizy oddziaływania poszczególnych regionów spektryn alfa i beta erytrocytarnej i nieerytrocytarnej z liposomami PS wykazały, że w spektrynie erytrocytarnej miejsca wiązania lipidów są zlokalizowane wewnątrz segmentów 8-10 podjednostki α I i segmentów 2-4, 12-14 i w N-końcówę, niehomologicznej domenie podjednostki β I. W przypadku spektryny nieerytrocytarnej miejsca wiążące PS są zlokalizowane wewnątrz segmentów 9-11 i na N-końcu podjednostki α II oraz w segmentach 2, 3 i w N-końcówę domenie podjednostki β II [109]. Wyniki powyższych eksperymentów zarówno naszego zespołu, jak i zespołu Mohandasa wykazały, że w spektrynie erytrocytarnej miejsce wiązania lipidów jest zlokalizowane w obrębie domeny wiązania ankiryne (N-końcówę część domeny wiązania ankiryne obejmuje C-końcówę helisy segmentu 14 β I). Różnice dotyczą spektryny nieerytrocytarnej, nasze badania wskazują na podobne powinowactwo do lipidów w przypadku obu spektryn β , natomiast w zespole Mohandasa nie zaobserwowano aktywności wiązania liposomów PS w przypadku segmentu β II 14, co jest wynikiem raczej nieoczekiwanym ze względu na wysoką homologię tej domeny w obu typach izoform spektryn β [105,106,108,109].

Analizy teoretyczne wykazują, że wrażliwe na ankiryne miejsce wiązania lipidów w domenie wiązania ankiryne strukturalnie odpowiada wzorcowi trójhelikalnych powtórzeń spektrynowych i obejmuje C-końcówę helisy segmentu 14 [105,106]. Przeprowadzone ostatnio w naszym laboratorium badania pozwoliły scharakteryzować strukturę tego odcinka dzięki skonstruowaniu serii pojedynczych i podwójnych znakowanych spinowo peptydów na bazie fragmentu spektryny β I. W uzyskanych peptydach analizowano odległości spinowe metodami spektroskopii EPR i dekonwolucji Fouriera. Wyniki wskazują na to, że cały fragment posiadający zależną od ankiryne aktywność wiązania

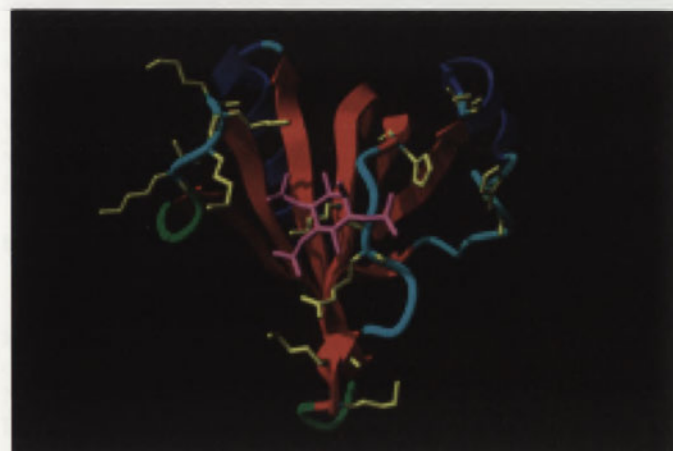


Rycina 5. Fragment struktury domeny wiązania ankiryiny spektryny β I, obejmujący reszty 1760-1790 (kod PDB-3F57) [5]. Fragment ten wykazuje aktywność wiązania lipidów i pokrywa się z odcinkiem C segmentu 14, tworząc helisę o amfipatycznym charakterze [107,110,111]. Reszty hydrofilowe przedstawiono na czerwono, a hydrofobowe na żółto.

lipidów tworzy strukturę α -helikalną z wyraźnym udziałem helisy 3_{10} w części N-końcowej. Na podstawie uzyskanych odległości zaproponowano model, w którym miejsce wiązania lipidów jest wysoce amfipatyczną helisą. Wykazano również, że struktura drugorzędowa tego segmentu nie przechodzi żadnych znaczących zmian podczas oddziaływań z fosfolipidami lub detergentem, ale prawdopodobne są zaburzenia struktury pęczka potrójnej helisy indukowane przez lipidy [110,111] (Ryc. 5).

Za oddziaływanie C-końcowego regionu spektryny β II z błonami jest odpowiedzialne bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy N-końcowym fragmentem domeny PH i lipidami błonowymi [112]. Białko fuzyjne GFP-domena PH spektryny β II lokalizowało się podobnowo w komórkach COS7, podczas gdy białko GFP dawało jedynie rozproszoną cytoplazmatyczną fluorescencję, co podkreśla rolę domeny plektrynowej w kierowaniu do błony *in vivo* [113].

Na podstawie badań, w których równocześnie wykorzystano spektroskopię CD i NMR oraz krystalografię, określono dokładnie strukturę domeny PH spektryny β w kompleksie z $I(1,4,5)P_3$. Miejsce wiązania $I(1,4,5)P_3$ w domenie PH spektryny β znajduje się w środku dużej, obdarzonej dodatnim ładunkiem powierzchni. Ten obszar jest raczej płaski i ma trójkątny kształt, można go podzielić na trzy ugrupowania reszt z łańcuchami bocznymi obdarzonymi ładunkiem dodatnim. Pierwszy tworzą reszty K16 i K17, drugi H24, H51 i K39, a trzeci K70, K71, K72 i K73. Zapro-



Rycina 6. Struktura domeny PH spektryny β (kod PDB-1BTN) [114]. Szczegóły jak w opisie Ryc. 4.

ponowano model, w którym wiązanie do $PI(4,5)P_2$ związanego z błoną ułatwiają oddziaływania pomiędzy obdarzonymi ładunkiem dodatnim resztami powierzchni domeny PH (domena homologiczna do plekstryny) a obdarzonymi ładunkiem ujemnym, polarnymi „głowami” dwuwarstwy lipidowej. Domena PH w kompleksie z $PI(4,5)P_2$ jest połączona z powierzchnią błony poprzez mostki solne i wiązania wodorowe. Obecność grup fosforanowych-4,5 inozytoli jest kluczowa dla tego wiązania. Cząsteczka $I(1,4,5)P_3$ oddziałuje z resztami zlokalizowanymi w pętlach łączących nici β 1 i 2 oraz 5 i 6 domeny PH. Dla kompleksu domeny PH spektryny β z $I(1,4,5)P_3$ wyznaczono stałą dysocjacji $K_D=40 \mu M$ [114]. Wykazano również, że domena plektrynowa spektryny β wiąże $PI(3,4,5)P_3$ i $PI(4,5)P_2$ z powinowactwem na podobnym poziomie ($K_D \sim 30-50 \mu M$) i raczej małą specyficznością [115], poza tym domena PH może słabo oddziaływać z PS [116] (Ryc. 6).

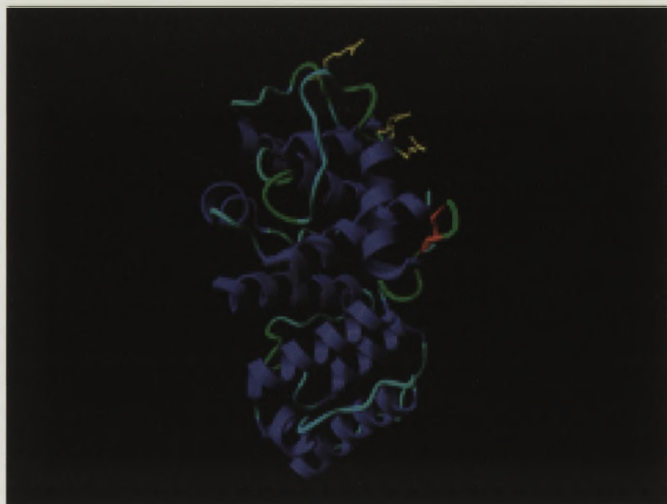
Innym miejscem specyficznym względem fosfatydyloinozytoli może być fragment domeny CH1-CH2 (domena wiążąca aktynę). Zaobserwowano, że oddziaływanie białka 4.1R z N-końcowym fragmentem spektryny β I, obejmującym reszty 1-301, jest silnie stymulowane przez $PI(4,5)P_2$. Usunięcie części domeny CH1-CH2, która zawiera to przypuszczalne miejsce wiązania $PI(4,5)P_2$ promuje wiązanie białka 4.1R. Na tej podstawie wywnioskowano, że w nieobecności $PI(4,5)P_2$ N-końcowa domena spektryny β I przyjmuje „zamkniętą” konformację, która otwiera się po związaniu $PI(4,5)P_2$ [117].

α -AKTYNINA

α -Aktynina występuje zarówno w komórkach mięśniowych, gdzie jest związana z włóknami naprężeniowymi i ogniskami adhezyjnymi, jak i w komórkach mięśniowych, w dyskach Z sarkomerów. Zapewnia bezpośrednie połączenie pomiędzy mikrofilamentami a receptorami integrzyn w obrębie ognisk adhezyjnych. α -Aktynina występuje w formie ułożonego przeciwrównolegle homodimeru, jest w dużej mierze homologiczna do spektryny i dystrofiny. Każdy monomer zawiera trzy regiony: N-końcową domenę wiązania aktyny (CH1-CH2), cztery segmenty spektrynowe o długości 122 reszt i C-końcową domenę podobną do kalmoduliny [118,119].

α -Aktynina oddziałuje selektywnie z błonami zawierającymi poszczególne fosfolipidy w następującym porządku DOPG>PS>PI. Okazało się również, że α -aktynina oddziałująca z fosfolipidami jest bardziej odporna na trawienie α -chymotrypsyną, co może wynikać ze zmian konformacyjnych indukowanych przez fosfolipidy lub zanurzenia w błonie wrażliwych na proteolizę wiązań peptydowych [120].

Analiza teoretyczna mająca na celu wyznaczenie miejsc zdolnych do przyłączania lub zagłębiania się w błonie wykazała, że dwa fragmenty wykazywały takie cechy: reszty 281-300 w obrębie pierwszego i 720-739 w obrębie czwartego segmentu spektrynowego. Analizy oddziaływania syntetyzowanych białek fuzyjnych zawierających te fragmenty z liposomami DMPG/DMPC (1:1) wskazywały na części-



Rycina 7. Struktura domeny wiązania aktyny α -aktyliny (kod PDB-1WKU) [125]. Łańcuchy boczne aminokwasów zidentyfikowanych jako przypuszczalne ligandy dla PI(4,5)P₂ przedstawiono stylem paleczkowym i zaznaczono na żółto.

wą, hydrofobową penetrację lipidowej dwuwarstwy przez te białka [121].

PI(3,4,5)P₃ wiąże się z α -aktyniną i powoduje zanik jej oddziaływań z podjednostką β integryn, skutkiem czego w komórkach dochodzi do zniszczenia połączeń adhezyjnych pomiędzy włóknami naprężeniowymi a substancją zewnątrzkomórkową [122]. Wykazano także, że zarówno PI(4,5)P₂, jak i PI(3,4,5)P₃ hamują aktywność tworzenia wiązek filamentów aktynowych przez α -aktyninę, ale PI(3,4,5)P₃ jest bardziej efektywny, może nawet niszczyć już powstałe wiązki filamentów [123].

Analiza mutacyjna wykazała, że fosfatydyloinozytole oddziałują z domeną wiązania aktyny (CH1-CH2) α -aktyliny. Zamiana trzech dodatnio naładowanych reszt w obrębie miejsca wiązania fosfatydyloinozytoli powoduje 80% obniżenie powinowactwa do tych lipidów. W fibroblastach ekspresjonujących takie mutanty zaobserwowano pojawienie się nadmiernej liczby wiązek filamentów aktynowych [124].

Również badania strukturalne domeny CH1-CH2 ujawniły trzy reszty, R170, R176 i R199 jako najbardziej prawdopodobne ligandy dla PI(4,5)P₂. Te reszty odpowiadają wzorowi, jaki został ustalony dla struktur wiążących grupy fosfolipidowe, średnia dostępność polarnych łańcuchów bocznych dla rozpuszczalnika wynosi 53%, a średnia odległość pomiędzy atomami C ^{β} wynosi 12 Å, dzięki czemu mogą formować odpowiednią platformę do wiązania PI(4,5)P₂. Taka triada dodatnio naładowanych reszt występuje tylko w domenie CH1-CH2 izoform α -aktyliny, w regionie otaczającym tzw. trzecie miejsce wiązania aktyny (ABS3) [125]. Wiązanie PI(4,5)P₂ w zaproponowanym układzie orientuje reszty kwasów tłuszczowych w kierunku, który pozwala na ich oddziaływanie z regionem łączącym domenę wiązania aktyny z pierwszym segmentem spektrynowym [125,126], regulując w ten sposób oddziaływanie domeny podobnej do kalmoduliny z titiną [127], które to oddziaływanie odpowiada za swoistą lokalizację α -aktyliny w dyskach Z sarkomerów. Zaproponowany układ jest również w zgo-

dzie z obserwacjami, że sama polarna „głowa” fosfolipidu jest niewystarczająca do pełnej aktywacji miejsca wiązania titiny, niezbędne są również reszty kwasów tłuszczowych [125] (Ryc. 7).

DYSTROFINA

Dystrofina występuje w mięśniach poprzecznie prążkowanych, jest zlokalizowana w strukturach zwanych kostamerami, stanowi część kompleksu DG, który jest odpowiedzialny za mechaniczną i osmotyczną stabilność sarkolemmy. Częsteczka dystrofiny ma masę 427 kDa i składa się z czterech domen: N-końcowej domeny wiązania aktyny (CH1-CH2), takiej samej jak w spektrynie, α -aktyninie i wielu innych białkach, środkowej domeny złożonej z 24 segmentów spektrynowych o długości 110 reszt każda, C-końcowej domeny bogatej w reszty cysteiny i domeny oddziałującej z dystroglikanem, które kotwiczą dystrofinę w sarkolemmie [128,129].

W badaniach *in vitro* oddziaływania dystrofiny, izolowanej z błony organu elektrycznego (specjalny organ elektryczny, który składa się z wielu zmodyfikowanych komórek mięśniowych, które są spłaszczone i ułożone jedna na drugiej) *Torpedo marmorata* z aktyną zaobserwowano hamowanie tego oddziaływania przez PI(4,5)P₂ [130], podczas gdy w przypadku oddziaływania wieloskładnikowego kompleksu dystrofina-glikoproteiny, izolowanego z mięśni królika z F-aktyną nie zaobserwowano żadnej zmiany, więc może to różnice w sekwencji dystrofiny są przyczyną odmiennej wrażliwości na PI(4,5)P₂ [131].

Wykazano, że fragment dystrofiny obejmujący drugi segment domeny złożonej z powtórzeń spektrynowych oddziałuje z fosfolipidami. Badania wykazały, że poprawnie sfaldowany fragment (117 reszt) wiąże lipidy ze znacznie większym powinowactwem niż nieco krótszy fragment bez stabilnej struktury przestrzennej. Analizy oddziaływań wspomnianych powyżej fragmentów z liposomami metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego wykazały najsłabsze oddziaływanie w przypadku liposomów PC, silniejsze dla liposomów PC/PE, natomiast najlepiej badane fragmenty wiązały liposomy PC/PS czy PE/PS. Oddziaływanie narastało wraz z siłą jonową roztworu. Poprawnie sfaldowany fragment oddziałował z filmem lipidowym o składzie zbliżonym do wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej, nie obserwowano natomiast oddziaływań pomiędzy niesfaldowanym fragmentem a monowarstwą lipidową [132]. O wysokim powinowactwie całej dystrofiny do błony mogą świadczyć mutanty dystrofiny, pozbawione domeny wiązania dystroglikanu, które migrują do błony plazmatycznej [133,134], podobnie jak dystrofina syntetyzowana w komórkach COS, pozbawionych DG również lokalizuje się przy błonie [135].

Badania mające na celu określenie właściwości reszt tryptofanu oraz ich dostępności w dwóch rekombinowanych polipeptydach obejmujących drugie powtórzenie spektrynowe wskazują na to, że w obecności małych liposomów, obdarzonych ładunkiem ujemnym, charakterystyka fluorescencji zmienia się znacznie w przypadku natywnego fragmentu, co świadczy o tym, że reszty tryptofanu znajdują się

w bardziej hydrofobowym środowisku, natomiast stosunkowo niewielkie zmiany obserwuje się dla fragmentu niekompletnie pofałdowanego. Doświadczenia z wykorzystaniem wygaszaczy związanych z błoną wyraźnie wskazują na to, że reszty tryptofanu są zlokalizowane na powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Cztery z pięciu reszt tryptofanu są usytuowane w trzeciej helisie segmentu, tak więc można wywnioskować, że segment leży wzdłuż powierzchni błony. Ponieważ nie obserwuje się zmian fluorescencji w testach z liposomami, w skład których wchodzi tylko obojętne fosfolipidy, można się spodziewać że prawdopodobnie elektrostatyczne oddziaływania odgrywają rolę w zapoczątkowaniu formowania kompleksu, które potem mogą być stabilizowane zarówno przez oddziaływania hydrofobowe, jak i elektrostatyczne [136].

Powinowactwo fragmentu do dużych jednowarstwowych liposomów o małym stopniu krzywizny błony jest znacznie mniejsze w porównaniu do małych jednowarstwowych o dużej krzywiznie. Jest to prawdopodobnie spowodowane powstawaniem dużych odstępów pomiędzy polarnymi głowami cząsteczek lipidów w zewnętrznej warstwie małych, jednowarstwowych liposomów, które pozwalają na penetrację hydrofobowej części dwuwarstwy liposomów przez łańcuchy boczne tryptofanu. W przypadku dużych jednowarstwowych liposomów wprowadzenie PE i cholesterolu wpływa na wzrost powinowactwa fragmentu dystrofiny do błony, ponieważ w obecności tych lipidów dochodzi do modyfikacji upakowania łańcuchów acylowych [137].

Ostatnie badania wykazały, że dwie subdomeny dystrofiny, region obejmujący segmenty 1-3 i region obejmujący segmenty 20-24, charakteryzują się znacząco różnymi właściwościami w wiązaniu lipidów. Region 1-3 położony blisko N-końcowej domeny wiązania aktyny silnie oddziałuje z lipidami anionowymi, podobnie jak segment 2, co wykazywano już wcześniej [132,136]. Przeciwnie, dla segmentu 23 i regionu 20-24, zlokalizowanego w pobliżu C-końcowego fragmentu bogatego w reszty cysteiny, nie zaobserwowano oddziaływania z lipidami. Region obejmujący segmenty 1-3 i sam segment 2 są znacznie mniej stabilne i łatwiej ulegają rozfałdowaniu w porównaniu do segmentu 23 i regionu obejmującego segmenty 20-24, które wykazują dużą stabilność konformacji. Na podstawie takich wyników stwierdzono, że dwie badane subdomeny tworzą dwie podjednostki specyficzne strukturalnie, a różnice w ich oddziaływaniach z lipidami, stabilności i szybkości fałdowania mogą dostarczać pewnych wskazówek dotyczących ich biologicznej funkcji. Przeciwstawne właściwości tych dwóch subdomen świadczą o tym, że segmenty spektrynowe w obrębie dystrofiny nie mogą funkcjonować zamiennie [138].

BIĄŁKA ZAWIERAJĄCE DOMENĘ BAR

Białka zawierające domenę BAR tworzą rodzinę białek zdefiniowaną dzięki obecności homologicznej, α -helikalnej domeny o długości od 250 do 280 reszt aminokwasowych. Nazwa rodziny pochodzi od jej pierwszych członków: białka Bin1, amfifizyny i białka Rvs167 (BAR). Uważa się, że białka rodziny BAR biorą udział w wielu różnorodnych procesach komórkowych, między innymi w: endocytozie, polaryzacji

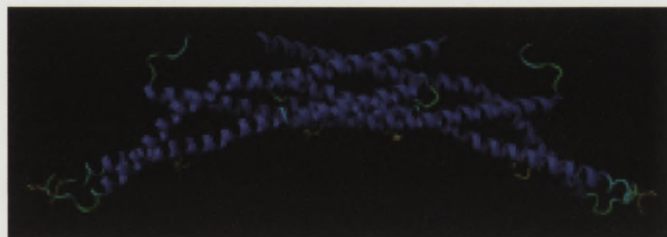
komórek, regulacji szkieletu komórkowego, fuzji komórek, przekazywaniu sygnałów czy apoptozie [139].

Dotychczasowe obserwacje wykazały, że domena BAR wiąże liposomy o małej krzywiznie błony *in vitro* i przekształca je w tubule o dużym zakrzywieniu błony [140], poza tym sama domena charakteryzuje się zakrzywionym kształtem (kształt banana), w związku z czym może działać jako sensor względem błon o określonej krzywiznie i równocześnie w sposób aktywny wpływać na ich krzywiznę [141]. Porównania strukturalne ujawniły dodatkowo podobieństwo domeny BAR do białek wiążących GTP-azy, stąd następną funkcją jaką mogą pełnić te białka jest wiązanie GTP-az [142]. Domena BAR została wykryta wśród wielu białek związanych z dynamiką błony, dlatego może funkcjonować jako jedno z głównych połączeń pomiędzy błonami a aktywnym szkieletem komórkowym [143].

Strukturalna analiza amfifizyny muszki owocowej (Ryc. 8) wykazała, że domenę BAR tworzy dimer w kształcie banana, uformowany przez dwa monomery. Każdy z monomerów zawiera trzy długie α -helisy w formie superhelisy. Zakrzywienie dimeru jest spowodowane tym, w jaki sposób dwa monomery wzajemnie się krzyżują oraz przez zakrzywienie helis 2 i 3. Opierając się na danych strukturalnych oraz wynikach eksperymentów wiązania liposomów i tubulacji, zaproponowano ogólny mechanizm wiązania domeny BAR do błony oraz zakrzywania błony przez tę domenę. Wykazano, że zasadowe reszty zlokalizowane na końcu (K161 i 163) i wewnątrz wklęsłej powierzchni dimeru (R65, 68, 140 i K137) są kluczowe dla wiązania i tubulacji błony. Elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy dimerem a ujemnie naładowanymi lipidami błony, takimi jak PS czy PI(4,5)P₂, w zestawieniu ze sztywnością struktury domeny BAR są prawdopodobnie czynnikami wystarczającymi do wygięcia błony.

Analiza mutacyjna amfifizyny potwierdza tę hipotezę, bowiem zamiana par reszt aminokwasowych obdarzonych dodatnim ładunkiem (K i R) na reszty kwasu glutaminowego redukuje wiązanie domeny BAR do liposomów i hamuje tubulację liposomów [141,144] (Ryc. 8).

Domena BAR często występuje w zestawieniu z drugą sekwencją wiążącą błonę, taką jak: amfipatyczna α -helisa, domena PH lub domena PX (domena homologiczna do phox) [141,142]. Wstępne badania grupy amfifizyn i endofilin sugerują, że krótki odcinek sekwencji, przyległy do N-końca domeny BAR, jest również ważny dla wiązania lipidów i formowania tubuli [145]. Ta sekwencja na N-końcu tworzy amfipatyczną helisę, wydłużając jeszcze helikalny rdzeń na



Rycina 8. Struktura domeny BAR amfifizyny (kod PDB-1URU) [141]. Szczegóły jak w opisie Ryc. 3.

końcach dimeru. W połączeniu z domeną BAR ten motyw został oznaczony jako N-BAR i występuje w jednej z podgrup rodziny białek BAR, do której zaliczamy amfifizyny, endofiliny i nadryny. Ostatnie dane wskazują na to, że domena N-BAR jest wymagana tylko do wiązania liposomów i to niezależnie od stopnia ich krzywizny, ale formowanie tubuli w jej obecności jest bardziej efektywne [141]. Uważa się, że dodatkowa domena PH lub PX, wiążąca specyficzne fosfatydyloinozytole w białkach zawierających domenę BAR, pozwala na kierowanie tych białek do mikrodomen błonowych o specyficznej krzywiznie błony i składzie lipidowym [139].

PODSUMOWANIE

Aktynowy szkielet komórkowy jest dynamiczną siecią utworzoną przez ponad 100 regulatorowych i strukturalnych białek, która pozwala komórce na regulację jej kształtu czy tworzenie i rearanżację takich struktur, jak: filopodia, połączenia adhezyjne, pęcherzyki endo- i egzocytarne. Formowanie filamentów aktynowych jest związane zarówno z błoną plazmatyczną, jak i błonami wewnątrz komórki, dlatego ważne jest zrozumienie w jaki sposób powstają i funkcjonują różne połączenia aktyna-błona.

Oprócz powyżej scharakteryzowanych, można wymienić jeszcze wiele innych białek szkieletu komórkowego oddziałujących z lipidami. Należą do nich aneksyny, oddziałujące z ujemnie naładowanymi fosfolipidami. Aneksyny biorą udział w regulacji przekazywania sygnałów związanej z jonami Ca^{2+} oraz w licznych procesach, takich jak: organizacja i stabilizacja domen błonowych, transport pęcherzykowy, endo- i egzocytoza czy inicjacja procesu naprawy błony plazmatycznej [146,147]. Innym przykładem są białka WASP, N-WASP i WAVE, odpowiedzialne za regulację polimeryzacji aktyny. Białka te zawierają zasadową domenę odpowiadającą za wiązanie $PI(4,5)P_2$ [148,149]. Również kompleks Arp2/3, odgrywający kluczową rolę w kontrolowaniu dynamiki aktyny [150], zawiera sekwencję penetrującą hydrofobowy region błony lipidowej [151]. Kolejnym przykładem są białka MARKS, które wykorzystują dwa różne miejsca do oddziaływania z błoną. Związaną z N-końcem resztę mirystylową i grupę 13 reszt zasadowych oddziałujących elektrostatycznie z anionowymi lipidami błony [152]. Do białek oddziałujących z fosfolipidami można także zaliczyć miozyny zarówno „konwencjonalne”, jak i „niekonwencjonalne” [153,154].

Jak widać z powyższego przeglądu, coraz więcej danych wskazuje na wielką rolę, jaką odgrywają oddziaływania białek szkieletu błony i komórki z lipidami. Mogą one pełnić zarówno funkcję w utrzymywaniu mechanicznych właściwości błony, jak i w regulacji oddziaływań pomiędzy poszczególnymi elementami szkieletu. Bezpośrednie wiązanie białek z lipidami może mieć niebagatelne znaczenie biologiczne, sugeruje się, że może stabilizować oddziaływanie pomiędzy szkieletem błonowym a dwuwarstwą lipidową, ale również może wzmacniać zdolność szkieletu błonowego do rearanżacji a tym samym wpływać na zdolność błony do odkształceń, odpowiadać za tworzenie domen błonowych, ułatwiać oddziaływania z docelowymi białkami integralnymi czy też stanowić alternatywę w sytuacjach, gdy tych

białek brakuje lub nie funkcjonują poprawnie. Molekularna podstawa tych oddziaływań jak na razie nie została do końca wyjaśniona. Zrozumienie fizjologicznej roli oddziaływania białko-lipid jest ciągle ograniczone, wiele pytań pozostaje jeszcze bez odpowiedzi, dlatego też dalsze wnikliwe badania w tej dziedzinie, z wykorzystaniem hodowli komórkowych, izolowanych błon czy też systemów modelowych są niezbędne.

PIŚMIENNICTWO

1. Hurley JH, Misra S (2000) Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 49-79
2. Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451: 1-16
3. Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 658-666
4. Niggli V (2005) Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 57-795.
5. Ipsaro JJ, Huang L, Mondragon A (2009) Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. *Blood w druku*
6. Bennett V, Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81: 1353-1392
7. Sikorski AF, Czogalla A, Hryniewicz-Jankowska A, Bok E, Plażuk E, Diakowski W, Chorzalska A, Kolondra A, Langner M, Grzybek M (2008) Interactions of erythroid and nonerythroid spectrins and other membrane-skeletal proteins with lipid mono- and bilayers. W: Leitmannova Liu A (red) *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, t VI. Elsevier Inc, East Lansing, str. 81-102
8. McGough A, Staiger CJ, Min J-K, Simonetti KD (2003) The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett* 552: 75-81
9. Janmey PA, Stossel TP (1987) Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 325: 362-364
10. Janmey PA (1994) Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol* 56: 169-191
11. Lin KM, Wenegieme E, Lu PJ, Chen CS, Yin HL (1997) Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J Biol Chem* 272: 20443-20450
12. Xian W, Janmey PA (2002) Dissecting the gelsolin-polyphosphoinositide interaction and engineering of a polyphosphoinositide-sensitive gelsolin C-terminal half protein. *J Mol Biol* 322: 755-771
13. Feng L, Mejillano M, Yin HL, Chen J, Prestwich GD (2001) Full-contact domain labeling: identification of a novel phosphoinositide binding site on gelsolin that requires the complete protein. *Biochemistry* 40: 904-913
14. Liepina I, Czaplewski C, Janmey P, Liwo A (2003) Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biopolymers* 71: 49-70
15. Mere J, Chahinian A, Maciver SK, Fattoum A, Bettache N, Benyamin Y, Roustan C (2005) Gelsolin binds to polyphosphoinositide-free lipid vesicles and simultaneously to actin microfilaments. *Biochem J* 386: 47-56
16. Arpin M, Pringault E, Finidori J, Garcia A, Jeltsch JM, Vandekerckhove J, Louvard D (1988) Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J Cell Biol* 107: 1759-1766
17. Janmey PA, Matsudaira PT (1988) Functional comparison of villin and gelsolin. Effects of Ca^{2+} , KCl, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 263: 16738-16743

18. Janmey PA, Lamb J, Allen PG, Matsudaira PT (1992) Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin. *J Biol Chem* 267: 11818-11823
19. Kumar N, Zhao P, Tomar A, Galea CA, Khurana S (2004) Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 279: 3096-3110
20. Friederich E, Vancompernelle K, Louvard D, Vandekerckhove J (1999) Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of *in vivo* effects to its biochemical activities *in vitro*. *J Biol Chem* 274: 26751-26760
21. Panebra A, Ma SX, Zhai LW, Wang XT, Rhee SG, Khurana S (2001) Regulation of phospholipase C-gamma(1) by the actin-regulatory protein villin. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1046-C1058
22. Vermeulen W, Vanhaesebrouck P, Van Troys M, Verschueren M, Fant F, Goethals M, Ampe C, Martins JC, Borremans FA (2004) Solution structures of the C-terminal headpiece subdomains of human villin and advillin, evaluation of headpiece F-actin-binding requirements. *Protein Sci* 13: 1276-1287
23. DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J (2005) Cofilin takes the lead. *J Cell Sci* 118: 19-26
24. Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H (1990) Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and Deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem* 265: 8382-8386
25. Yonezawa N, Homma Y, Yahara I, Sakai H, Nishida E (1991) A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem* 266: 17218-17221
26. Moriyama K, Yonezawa N, Sakai H, Yahara I, Nishida E (1992) Mutational analysis of an actin-binding site of cofilin and characterization of chimeric proteins between cofilin and destrin. *J Biol Chem* 267: 7240-7244
27. Kusano K, Abe H, Obinata T (1999) Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin. *Mol Cell Biochem* 190: 133-141
28. Ojala PJ, Paavilainen V, Lappalainen P (2001) Identification of yeast cofilin residues specific for actin monomer and PIP₂ binding. *Biochemistry* 40: 15562-15569
29. Gorbatyuk VY, Nosworthy NJ, Robson SA, Bains NP, Maciejewski MW, Dos Remedios CG, King GF (2006) Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP₂ regulates the cofilin-actin interaction. *Mol Cell* 24: 511-522
30. Pfannstiel J, Cyrklaff M, Habermann A, Stoeva S, Griffiths G, Shoeman R, Faulstich H (2001) Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity. *J Biol Chem* 276: 49476-49484
31. Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M (2007) The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159: 131-149
32. Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Baldassare JJ, Pollard TD (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247: 1575-1578
33. Lu PJ, Shieh WR, Rhee SG, Yin HL, Chen CS (1996) Lipid products of phosphoinositide-3 kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry* 35: 14027-14034
34. Lassing I, Lindberg U (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314: 472-474
35. Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16: 465-472
36. Chaudhary A, Chen J, Gu QM, Witke W, Kwiatkowski DJ, Prestwich GD (1998) Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem Biol* 5: 273-281
37. Lambrechts A, Verschelde JL, Jonckheere V, Goethals M, Vandekerckhove J, Ampe C (1997) The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP₂ and proline-rich sequences. *EMBO J* 16: 484-494
38. Skare P, Karlsson R (2002) Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett* 522: 119-124
39. Fedorov AA, Pollard TD, Almo SC (1994) Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 241: 480-482
40. Lambrechts A, Jonckheere V, Dewitte D, Vandekerckhove J, Ampe C (2002) Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P₂ binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochemistry* 3: 12
41. Gareus R, Di Nardo A, Rybin V, Witke W (2006) Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J Biol Chem* 281: 2803-2811
42. Moens PD, Bagatolli LA (2007) Profilin binding to sub-micellar concentrations of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1768: 439-449
43. Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 16: 453-460
44. Weekes J, Barry ST, Critchley DR (1996) Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J* 314: 827-832
45. Izzard T, Evans G, Borgon RA, Rush CL, Bricogne G, Bois PR (2004) Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature* 427: 171-175
46. Johnson RP, Niggli V, Durrer P, Craig SW (1998) A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry* 37: 10211-10222
47. Johnson RP, Craig SW (1995) The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 159-164
48. Bakolitsa C, de Pereda JM, Bagshaw CR, Critchley DR, Liddington RC (1999) Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell* 99: 603-613
49. Bakolitsa C, Cohen DM, Bankston LA, Bobkov AA, Cadwell GW, Jennings L, Critchley DR, Craig SW, Liddington RC (2004) Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430: 583-586
50. Miller GJ, Ball EH (2001) Conformational change in the vinculin C-terminal depends on a critical histidine residue (His-906). *J Biol Chem* 276: 28829-28834
51. Steimle PA, Hoffert JD, Adey NB, Craig SW (1999) Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem* 274: 18414-18420
52. Chandrasekar I, Stradal TE, Holt MR, Entschladen F, Jockusch BM, Ziegler WH (2005) Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J Cell Sci* 118: 1461-1472
53. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchnan M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ Jr, Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Hoover KB, et al (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23: 281-282
54. Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF (2006) Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton, and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol* 44: 231-248
55. Critchley DR (2000) Focal adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12: 133-139
56. Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16: 94-98
57. Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C (2001) Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* 276: 21217-21227
58. Seelig A, Li Blatter X, Frentzel A, Isenberg G (2000) Phospholipid binding of synthetic talin peptides provides evidence for an intrinsic membrane anchor of talin. *J Biol Chem* 275: 17954-17961

59. Isenberg G, Doerhoefer S, Hoekstra D, Goldmann H (2002) Membrane fusion induced by the major lipid-binding domain of the cytoskeletal protein talin. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 636-643
60. Saitoh A, Takiguchi K, Tanaka Y, Hotani H (1998) Opening-up of liposomal membranes by talin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1026-1031
61. Takeda S, Saitoh A, Furuta M, Satomi N, Ishino A, Nishida G, Sudo H, Hotani H, Takiguchi K (2006) Opening of holes in liposomal membranes is induced by proteins possessing the FERM domain. *J Mol Biol* 362: 403-413
62. Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita Sh, Tsukita Sa, Hakoshima T (2000) Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19: 4449-4462
63. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101: 259-270
64. Niggli V (2001) Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 604-611
65. Han BG, Nunomura W, Takakuwa Y, Mohandas N, Jap BK (2000) Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat Struct Biol* 7: 871-875
66. Louvet-Vallée S (2000) ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* 92: 305-316
67. Niggli V, Rossy J (2008) Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 344-349
68. Niggli V, Andreoli C, Roy C, Mangeat P (1995) Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett* 376: 172-176
69. Barret C, Roy C, Montcourrier P, Mangeat P, Niggli V (2000) Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) binding site in the NH₂-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol* 151: 1067-1079
70. Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita Sh, Tsukita Sa (1996) Regulation mechanism of ERM protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135: 37-51
71. Heiska L, Alfthan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273: 21893-21900
72. Nakamura F, Huang L, Pestonjamsk K, Luna EJ, Furthmayr H (1999) Regulation of F-actin binding to platelet moesin *in vitro* by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol Biol Cell* 10: 2669-2685
73. Yonemura S, Matsui T, Tsukita S, Tsukita S (2002) Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides *in vivo*. *J Cell Sci* 115: 2569-2580
74. Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, Arpin M (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* 164: 653-659
75. Takakuwa Y (2000) Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythrocyte cells. *Int J Hematol* 72: 298-309
76. Sato SB, Ohnishi S (1983) Interaction of a peripheral protein of the erythrocyte membrane, band 4.1, with phosphatidylserine-containing liposomes and erythrocyte inside-out vesicles. *Eur J Biochem* 130: 19-25
77. Shiffer KA, Goerke J, Duzgunes N, Fedor J, Shohet SB (1988) Interaction of erythrocyte protein 4.1 with phospholipids. A monolayer and liposome study. *Biochim Biophys Acta* 937: 269-280
78. Cohen AM, Liu SC, Lawler J, Derick L, Palek J (1988) Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* 27: 614-619
79. An XL, Takakuwa Y, Manno S, Han BG, Gascard P, Mohandas N (2001) Structural and functional characterization of protein 4.1R-phosphatidylserine interaction: potential role in 4.1R sorting within cells. *J Biol Chem* 276: 35778-35785
80. Gascard P, Lee G, Coulombel L, Auffray I, Lum M, Parra M, Conboy JG, Mohandas N, Chasis JA (1998) Characterization of multiple isoforms of protein 4.1R expressed during erythroid terminal differentiation. *Blood* 92: 4404-4414
81. Fabbri M, Fumagalli L, Bossi G, Bianchi E, Bender JR, Pardi R (1999) A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *EMBO J* 18: 4915-4925
82. An X, Zhang X, Debnath G, Baines AJ, Mohandas N (2006) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins. *Biochemistry* 45: 5725-5732
83. Mohandas N, Evans E (1994) Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 787-818
84. De Matteis MA, Morrow JS (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113: 2331-2343
85. Thomas GH (2001) Spectrin: the ghost in the machine. *Bioessays* 23: 152-160
86. Tse WT, Tang J, Jin O, Korsgren C, John KM, Kung AL, Gwynn B, Peters LL, Lux SE (2001) A new spectrin, beta IV, has a major truncated isoform that associates with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and the nuclear matrix. *J Biol Chem* 276: 23974-23985
87. Sikorski AF, Hanus-Lorenz B, Jezierski A, Dluzewski AR (2000) Interaction of membrane proteins with membrane lipid domain. *Acta Biochim Pol* 47: 565-578
88. Grzybek M, Chorzalska A, Bok E, Hryniewicz-Jankowska A, Czogala A, Diakowski W, Sikorski AF (2006) Spectrin-phospholipid interactions. Existence of multiple kinds of binding sites? *Chem Phys Lipids* 141: 133-141
89. Sikorski AF, Kuczek M (1985) Labelling of erythrocyte spectrin *in situ* with phenylisothiocyanate. *Biochim Biophys Acta* 820: 147-153
90. Sikorski AF, Kuczek M, Nyczka Z, Kubiak ZJ (1987) Hydrophobic labelling of spectrin in erythrocytes using arylisothiocyanates. *Biomem Biochim Acta* 46: 75-82
91. Sikorski AF, Jezierski A (1987) The effect of spectrin on the erythrocyte membrane fluidity. *Studia Biophys* 113: 193-201
92. Michalak K, Bobrowska M, Sikorski AF (1993) Interaction of bovine erythrocyte spectrin with aminophospholipid liposomes. *Gen Physiol Biophys* 12: 163-170
93. Sikorski AF, Michalak K, Bobrowska M (1987) Interaction of spectrin with phospholipids. Quenching of spectrin intrinsic fluorescence by phospholipid suspensions. *Biochim Biophys Acta* 904: 55-60
94. Diakowski W, Ozimek L, Bielska E, Bem S, Langner M, Sikorski AF (2006) Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochim Biophys Acta* 1758: 4-12
95. Diakowski W, Sikorski AF (1994) Brain spectrin interacts with membrane phospholipids. *Acta Biochim Polon* 41: 153-154
96. Diakowski W, Sikorski AF (1995) Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids. *Biochemistry* 34: 13252-13258
97. Diakowski W, Prychidny A, Swistak M, Nietubyc M, Bialkowska K, Szopa J, Sikorski AF (1999) Brain spectrin (fodrin) interacts with phospholipids as revealed by intrinsic fluorescence quenching and monolayer experiments. *Biochem J* 338: 83-90
98. Diakowski W, Sikorski AF (2002) Brain spectrin exerts much stronger effect on anionic phospholipid monolayers than erythroid spectrin. *Biochim Biophys Acta* 1564: 403-411
99. Diakowski W, Szopa J, Sikorski AF (2003) Occurrence of lipid receptors inferred from brain and erythrocyte spectrins binding NaOH-extracted and protease-treated neuronal and erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1611: 115-122

100. Bialkowska K, Zembron A, Sikorski AF (1994) Ankyrin inhibits binding of erythrocyte spectrin to phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 119: 21-26
101. Bialkowska K, Zembron A, Sikorski AF (1994) Ankyrin shares a binding site with phospholipid vesicles on erythrocyte spectrin. *Acta Biochim Polon* 41: 155-157
102. Bialkowska K, Leńniewski J, Nietubyć M, Sikorski AF (1999) Interaction of spectrin with phospholipids is inhibited by isolated erythrocyte ankyrin. A monolayer study. *Cell Mol Biol Lett* 4: 203-218
103. Sikorski AF, Bialkowska K (1996) Interactions of Spectrins with Membrane Intrinsic Domain. *Cell Mol Biol Lett* 1: 97-104
104. Lu PW, Soong CJ, Tao M (1985) Phosphorylation of ankyrin decreases its affinity for spectrin tetramer. *J Biol Chem* 260: 14958-14964
105. Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS (1991) Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin. *J Cell Biol* 115: 267-277
106. Baines AJ (2003) Comprehensive analysis of all triple helical repeats in beta-spectrins reveals patterns of selective evolutionary conservation. *Cell Mol Biol Lett* 8: 195-214
107. Hryniewicz-Jankowska A, Bok E, Dubielecka P, Chorzalska A, Diakowski W, Jezierski A, Lisowski M, Sikorski AF (2004) Mapping of an ankyrin-sensitive, phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine mono- and bi-layer binding site in erythroid beta-spectrin. *Biochem J* 382: 677-685
108. Bok E, Plazuk E, Hryniewicz-Jankowska A, Chorzalska A, Szmaj A, Dubielecka PM, Stebelska K, Diakowski W, Lisowski M, Langner M, Sikorski AF (2007) Lipid-binding role of betaII-spectrin ankyrin-binding domain. *Cell Biol Int* 31: 1482-1494
109. An X, Guo X, Gratzer W, Mohandas N (2005) Phospholipid binding by proteins of the spectrin family: a comparative study. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 794-800
110. Czogalla A, Jaszewski AR, Diakowski W, Bok E, Jezierski A, Sikorski AF (2007) Structural insight into an ankyrin-sensitive lipid-binding site of erythroid β -spectrin. *Mol Membr Biol* 24: 215-224
111. Czogalla A, Grzymajło K, Jezierski A, Sikorski AF (2008) Phospholipid-induced structural changes to an erythroid beta spectrin ankyrin-dependent lipid-binding site. *Biochim Biophys Acta [przyjęte do druku]*
112. Wang DS, Shaw G (1995) The association of the C-terminal region of beta I sigma II spectrin to brain membranes is mediated by a PH domain, does not require membrane proteins, and coincides with an inositol-1,4,5 triphosphate binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 608-615
113. Wang DS, Miller R, Shaw R, Shaw G (1996) The pleckstrin homology domain of human beta I sigma II spectrin is targeted to the plasma membrane in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 420-426
114. Hyvonen M, Macias MJ, Nilges M, Oschkinat H, Saraste M, Wilmarus M (1995) Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J* 14: 4676-4685
115. Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL 3rd, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A, VanRenterghem B, Czech MP, Ravichandran KS, Burakoff SJ, Wang DS, Chen CS, Cantley LC (1997) A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272: 22059-22066
116. Kavran JM, Klein DE, Lee A, Falasca M, Isakoff SJ, Skolnik EY, Lemmon MA (1998) Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 273: 30497-30508
117. An X, Debnath G, Guo X, Liu S, Lux SE, Baines A, Gratzer W, Mohandas N (2005) Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 44: 10681-10688
118. Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burridge K (1991) α -Actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans* 19: 1065-1069
119. Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K (2008) alpha-Actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci (w druku)*
120. Han X, Li G, Li Gu, Lin K (1997) Interactions between smooth muscle α -actinin and lipid bilayers. *Biochemistry* 36: 10364-10371
121. Goldmann WH, Teodoridis JM, Pal Sharma C, Alonso JL, Isenberg G (1999) Fragments from α -actinin insert into reconstituted lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 225-229
122. Greenwood JA, Theibert AB, Prestwich GD, Murphy-Ulrich JE (2000) Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase: regulation by PtdIns (3,4,5)-P₃ binding to α -actinin. *J Cell Biol* 150: 627-641
123. Corgan AM, Singleton C, Santoso CB, Greenwood JA (2004) Phosphoinositides differentially regulate α -actinin flexibility and function. *Biochem J* 378: 1067-1072
124. Fraley TS, Tran TC, Corgan AM, Nash CA, Hao J, Critchley DR, Greenwood JA (2003) Phosphoinositide binding inhibits α -actinin bundling activity. *J Biol Chem* 278: 24039-24045
125. Franzot G, Sjöblom B, Gautel M, Djinović-Carugo K (2005) The crystal structure of the actin binding domain from α -actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipids regulation of α -actinin. *J Mol Biol* 348: 151-165
126. Full SJ, Deinzer ML, Ho PS, Greenwood JA (2007) Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin CH2 domain structure: analysis by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Sci* 16: 2597-2604
127. Young P, Gautel M (2000) The interaction of titin and α -actinin is controlled by a phospholipids-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *EMBO J* 19: 6331-6340
128. Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150: 1209-1214
129. Ervasti JM, Campbell KP (1993) Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 5: 82-87
130. Mejean C, Lebart MC, Roustan C, Benyamin Y (1995) Inhibition of actin-dystrophin interaction by inositol phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 152-158
131. Rybakova IN, Amanu KJ, Ervasti JM (1996) A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 135: 661-672
132. DeWolf C, McCauley P, Sikorski AF, Winlove CP, Bailey AI, Kahana E, Pinder JC, Gratzer WB (1997) Interaction of dystrophin fragments with model membranes. *Biophys J* 72: 2599-2604
133. Helliwell TR, Ellis JM, Mountford RC, Appleton RE, Morris GE (1992) A truncated dystrophin lacking the C-terminal domains is localized to the muscle membrane. *Am J Hum Genet* 50: 508-514
134. Recan D, Chafey P, Leturcq F, Hugnot JP, Vincent N, Tome F, Collin H, Simon D, Czernichow P, Nicholson LV, et al (1992) Are cysteine-rich and COOH-terminal domains of dystrophin critical for sarcolemmal localization? *J Clin Invest* 89: 712-716
135. Lee CC, Pearlman JA, Chamberlain JS, Caskey CT (1991) Expression of recombinant dystrophin and its localization to the cell membrane. *Nature* 349: 334-336
136. Le Rumeur E, Fichou Y, Pottier S, Gaboriau F, Rondeau-Mouro C, Vincent M, Gallay J, Bondon A (2003) Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J Biol Chem* 278: 5993-6001
137. Le Rumeur E, Pottier S, Da Costa G, Metzinger L, Mouret L, Rocher C, Fourage M, Rondeau-Mouro C, Bondon A (2007) Binding of the dystrophin second repeat to membrane di-oleyl phospholipids is dependent upon lipid packing. *Biochim Biophys Acta* 1768: 648-654
138. Legardinier S, Hubert JF, Le Bihan O, Tascon C, Rocher C, Raguënès-Nicol C, Bondon A, Hardy S, Le Rumeur E (2008) Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta* 1784: 672-682
139. Ren G, Vajjala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL (2006) The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 37-120
140. Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1: 33-39

141. Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303: 495-499
142. Habermann B (2004) The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep* 5: 250-255
143. Dawson JC, Legg JA, Machesky LM (2006) Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol* 16: 493-498
144. Zimmerberg J, McLaughlin S (2004) Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Curr Biol* 14: R250-R252
145. Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155: 193-200
146. Rescher U, Gerke V (2004) Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117: 2631-2639
147. Bendorowicz-Pikuła J (2007) Aneksyny – białka kontrolujące organizację i prawidłowe funkcjonowanie błon biologicznych – od *Arabidopsis thaliana* do *Homo sapiens*. *Postepy Biochem* 53: 143-153
148. Prehoda KE, Scott JA, Mullins RD, Lim WA (2000) Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290: 801-806
149. Bompard G, Caron E (2004) Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 166: 957-962
150. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6181-6186
151. Goldmann WH, Isenberg G (2002) Actin-related protein (Arp2) inserts into artificial lipid membranes. *Cell Biol Int* 26: 1073-1078
152. Arbuza A, Wang L, Wang J, Hangyas-Mihalyne G, Murray D, Honig B, McLaughlin S (2000) Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry* 39: 10330-10339
153. Adams RJ, Pollard TD (1989) Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* 340: 565-568
154. Areas JA, Grobner G, Glaubitz C, Watts A (1998) Interaction of a type II myosin with biological membranes studied by 2H solid state NMR. *Biochemistry* 37: 5582-5588

The interactions of actin cell and membrane skeleton proteins with lipids

Ewa Bok¹, Anita Hryniewicz-Jankowska², Aleksander F. Sikorski^{2,✉}

¹University of Zielona Góra, Faculty of Biology Sciences, Department of Molecular Biology, 1 Szafrana St., 65-516 Zielona Góra, Poland

²University of Wrocław, Faculty of Biotechnology, Department of Cytobiochemistry, 63-77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

✉ e-mail: afsbc@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: the interactions of proteins with lipids, cytoskeleton, membrane skeleton, actin filaments, phosphoinositides, lipid-binding site

ABSTRACT

The results of many studies indicate that many cytoskeletal proteins interact with lipids, or are regulated by phosphoinositides. Proteins may associate with membranes through specific domains, amphipathic helices and undefined motifs that interact through electrostatic or hydrophobic interactions. The interaction between specific proteins and certain lipids affect stabilization of lipid microdomains, which may provide an anchor for cytoskeletal proteins. *In vitro*, proteins that sever or depolymerize actin filaments, such as gelsolin, villin, cofilin and profilin, are inactivated by PI(4,5)P₂. Conversely, proteins like e.g. vinculin, talin, α -actinin, ezrin, N-WASP, WAVE that promote actin polymerization and link actin filaments to each other, are activated by this lipid. The major components of red blood cell membrane skeleton: spectrin and protein 4.1, also their nonerythroid counterparts interact with lipids, and those interactions may be regulated by phosphoinositides.

Białka śledzące koniec plus mikrotubul oraz ich udział w organizacji wrzeciona mitotycznego

STRESZCZENIE

Białka śledzące koniec plus mikrotubul (+TIPs) stanowią zróżnicowaną grupę białek, której przedstawiciele zidentyfikowano u wszystkich badanych organizmów eukariotycznych. Cechują się one unikatową zdolnością do lokalizowania się na dynamicznie rosnącym końcu mikrotubul, co czyni je doskonałymi regulatorami tam zachodzących zjawisk oraz procesów, w których obserwuje się dużą dynamikę mikrotubul. Przykładem takiego procesu jest mitoz, w czasie której następuje wytworzenie wrzeciona podziałowego – maszyny komórkowej zbudowanej z mikrotubul. Białka grupy +TIP odgrywają znaczącą rolę w jego formowaniu. Do ich głównych funkcji należy kontrolowanie tempa wzrostu mikrotubul, dostarczanie innych białek do końca plus mikrotubuli oraz udział w oddziaływaniu mikrotubul z innymi elementami wrzeciona. W artykule opisano budowę głównych przedstawicieli tej grupy, zwracając szczególną uwagę na strukturę domen umożliwiających wiązanie końca plus mikrotubuli. Przedstawiono także możliwe mechanizmy śledzenia końca plus, wpływ +TIPs na dynamikę mikrotubul oraz lokalizację motorów molekularnych.

WPROWADZENIE

Wrzeciono podziałowe jest strukturą powstającą podczas podziału komórki i odpowiedzialną za prawidłowy rozdział materiału genetycznego do komórek potomnych. Mikrotubulom budującym wrzeciono podziałowe towarzyszy wiele białek regulujących jego powstawanie i działanie. Celem artykułu jest zapoznanie Czytelnika ze szczególną grupą białek związanych z mikrotubulami – białkami śledzącymi koniec plus mikrotubul (+TIPs). Termin „śledzenie końca plus mikrotubuli” należy rozumieć jako zdolność rozpoznawania i wiązania – samodzielnie lub za pośrednictwem innych białek – końca plus mikrotubuli oraz pozostawanie w jego rejonie podczas ich wydłużania bądź skracania. +TIPs nie są tylko biernie transportowane przez polimeryzującą mikrotubulę, ale mogą regulować szybkość wzrostu mikrotubuli oraz brać udział w jej oddziaływaniu z innymi strukturami komórkowymi.

POWSTAWANIE I BUDOWA WRZECIONA MITOTYCZNEGO

Główny budulec wrzeciona podziałowego stanowią mikrotubule. Są to cylindryczne polimery o średnicy ok. 25 nm, zbudowane z heterodimerów α, β -tubuliny, łączących się w długie liniowe protofilamenty, które w liczbie od 9 do 17, a najczęściej 13, budują ścianę cylindra. Mikrotubula powstaje jako płaski arkusz, składający się z protofilamentów, skierowanych w tym samym kierunku i oddziałujących ze sobą lateralnie. Arkusz ten zostaje następnie zwinięty, a boczne brzegi, łącząc się ze sobą, zamykają ścianę cylindra. Ze względu na przesunięcie protofilamentów wzdłuż dłuższej osi cylindra, w miejscu połączenia przeciwnych krawędzi tworzy się nieciągłość strukturalna, zwana szwem.

Mikrotubule są strukturami polarnymi, które na jednym końcu zwanym „końcem minus” mają wyeksponowane podjednostki tubuliny α , na drugim zaś – „końcu plus” tubuliny β . Końce te różnią się dynamiką wzrostu: zarówno proces wydłużania, jak i depolimeryzacji mikrotubul odbywa się głównie na końcu plus. Heterodimery tubuliny przyłączające się do mikrotubuli z otaczającego środowiska zawierają GTP, którego hydroliza następuje krótko po przyłączeniu do polimeru. Po hydrolizie GTP następuje zmiana konformacji protofilamentów oraz formowanie struktury dojrzałej mikrotubuli. Na końcu plus świeżo spolimeryzowanych mikrotubul obserwuje się strefę zawierającą tubulinę ze związanym GTP o strukturze luźniejszej niż pozostała część filamentu.

Formowanie wrzeciona rozpoczyna się od duplikacji centrosomu w fazie S cyklu. W pierwszym etapie podziału – profazie (Ryc. 1A) – centrosomy migrują wokół jądra, umieszczając się po jego przeciwnych stronach (Ryc. 1B). Po pęknięciu otoczki jądrowej wyrastające z centrosomów wiązki mikrotubul ulegają wydłużaniu i łączą się z kinetochorami (Ryc. 1C). Powstaje w ten sposób

Seweryn Bajer

Andrzej A. Kasprzak

Pracownia Białek Motorycznych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

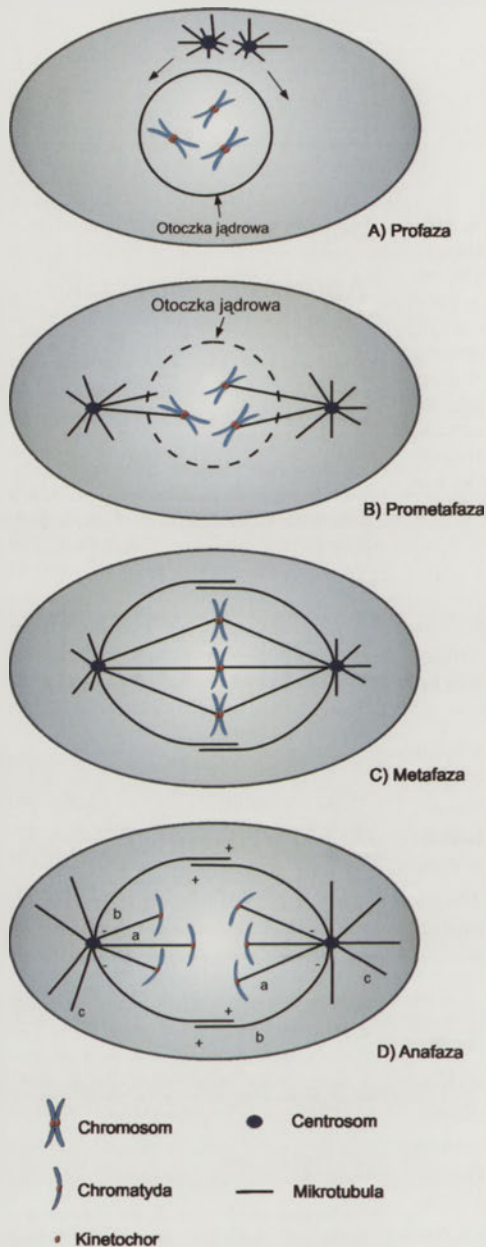
Pracownia Białek Motorycznych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 83; e-mail: a.kasprzak@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 20 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 6 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: +TIPs, EB, mikrotubula, wrzeciono mitotyczne

Wykaz skrótów: +TIPs – białka śledzące koniec plus mikrotubuli (ang. *plus-end tracking proteins*); CAP-Gly – bogate w reszty glicyny domeny białek związanych z cytoszkieletem (ang. *cytoskeleton-associated protein Gly-rich domains*); CH – domena homologii do kalponiny (ang. *calponin homology*); CLASP – rodzina białek wiążących białka CLIP (ang. *CLIP associating proteins*); CLIP – rodzina białek – łączników cytoplazmatycznych (ang. *cytoplasmic linker proteins*); EB – rodzina białek wiążących koniec plus mikrotubul (ang. *end binding*); XMAP215 – wiążące się z mikrotubulami białko o masie 215 kDa (ang. *microtubule associated protein 215 kDa*).

Podziękowanie: Autorzy dziękują Elżbiecie Kocik za cenne uwagi. Artykuł został przygotowany w ramach działalności Sieci Mechanizmów Ruchów Komórkowych *Mobilitas.pl*



Rycina 1. Organizacja wrzeciona podziałowego na różnych etapach mitozy. a – mikrotubula kinetochoralna, b – mikrotubula międzybiegunowa, c – mikrotubula astralna. Znakami $+$ i $-$ oznaczono odpowiednie końce mikrotubul.

dojrzałe wrzeciono o bipolarnej budowie, w którym każdy kinetochor połączony jest z dwoma, położonymi na biegunach wrzeciona centrosomami, a wszystkie chromosomy ustawione są w jednej płaszczyźnie, tworząc tzw. płytkę metafazalną (Ryc. 1C) [1]. Wrzeciono metafazalne utworzone jest z wiązek mikrotubul, które podzielić można na 3 główne populacje [2]: (a) mikrotubule kinetochoralne, łączące centrosomy ze zlokalizowanymi w części równikowej chromosomami, (b) mikrotubule międzybiegunowe, tworzące wiązki nakładające się końcami plus w części centralnej wrzeciona oraz (c) mikrotubule astralne, łączące centrosomy z korteksem cytoplazmy (Ryc. 1D). Wspólną cechą tych populacji mikrotubul jest zakotwiczenie końcem minus w centrosomach. Dwie pierwsze grupy mają główny wkład w wytworzeniu sił niezbędnych do rozdziału siostrzanych chromatyd i ich transportu do przeciwnych biegunów ko-

mórki. Funkcją mikrotubul astralnych jest natomiast sterowanie położeniem centrosomów w komórce, a więc i całego wrzeciona podczas podziału. W kolejnym etapie, anafazie, obserwuje się znaczne skrócenie mikrotubul kinetochoralnych transportujących siostrzane chromatydy w kierunku przeciwnych centrosomów oraz wydłużenie mikrotubul astralnych (Ryc. 1D) [2].

Jak widać z powyższego i, podkreślmy, bardzo pobieżnego i schematycznego opisu – podstawową rolę w procesie funkcjonowania wrzeciona podziałowego odgrywają dwa czynniki: dynamika polimeryzacji/depolimeryzacji mikrotubul oraz obecność białek odpowiedzialnych za przestrzenne rozłożenie elementów wrzeciona w komórce. Obie te właściwości zapewniają białka motoryczne, głównie kinezy i dyneiny, choć na różnych etapach proponuje się także udział miozyny. Ponieważ postuluje się także, że koniec plus mikrotubul stanowi centrum aktywności komórkowej [3], wpływ zjawisk na końcu mikrotubul nie ogranicza się do podziału komórki.

Rozważmy co się dzieje, jeśli w pobliżu tego miejsca zabraknie jakiegoś białka lub innego składnika maszynierii komórkowej. W wielu wypadkach zostanie on dostarczony przez białka motoryczne. Ale istnieje także inny system spełniający podobną funkcję: są to białka wiążące koniec plus mikrotubul (+TIPs). Białka te nie są motorami molekularnymi, tzn. nie poruszają się kosztem hydrolizy ATP, jak klasyczne motory. Energia potrzebna do ich ruchu pochodzi z opisanej powyżej hydrolizy GTP w podjednostce β tubuliny, występującej podczas polimeryzacji mikrotubul. Ta właściwość ogranicza działanie takich białek do procesów, w których dynamika mikrotubul jest znaczna, jak na przykład mitoz, ale jak zobaczymy później +TIPs potrafią same regulować dynamikę polimeryzacji mikrotubul.

Udział białek związanych z końcem plus mikrotubuli w mitozie został potwierdzony w szeregu badaniach przeprowadzanych *in vivo* na liniach komórkowych. Obserwowano wpływ tych białek na polimeryzację mikrotubul oraz ich oddziaływanie z chromosomami i centrosomami. W komórkach linii S2 z *Drosophila melanogaster* po obniżeniu syntezy białka EB1, przy użyciu interferującego RNA, obserwuje się szereg zmian w budowie i działaniu wrzeciona mitotycznego [4]. Pierwsze zaburzenia, w postaci silnego skrócenia mikrotubul astralnych, pojawiają się w czasie profazy. W czasie metafazy obserwuje się szereg defektów występujących z różną częstością: brak mikrotubul astralnych, odłączenie chromosomów od mikrotubul, brak połączenia mikrotubul kinetochoralnych z centrosomem oraz zmniejszenie odległości między biegunami wrzeciona. Podobnych obserwacji dokonano, badając komórki embrionalne z *Drosophila melanogaster* po mikroiniekcji przeciwciał przeciwko EB1. Obserwowano także zaburzenia rozdziału chromosomów w czasie anafazy [4]. Nieprawidłowości w przebiegu mitozy stwierdzono także w komórkach HeLa po zastosowaniu siRNA przeciwko CLIP170. W takich komórkach zaburzone jest wytwarzanie połączeń kinetochor-mikrotubula [5]. Obniżenie ekspresji genów białek CLASP1 i CLASP2 w tej linii komórkowej powoduje z kolei opóźnienie przebiegu mitozy, skrócenie wrzecion oraz formowanie się w niektórych komórkach wrzecion wielobiegunowych [6].

Tabela 1. Główni przedstawiciele białek +TIP u kręgowców, ich homologi w organizmach modelowych oraz domeny charakterystyczne.

Domena charakterystyczna	Homologi			Piśmiennictwo	
	Kręgowce	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Saccharomyces pombe</i>
CH	EB1, EB2, EB3	EB1	Bim1p	Mal3p	[7]
TOG	XMAP215	MspS	Stu2p	Alp14p, Dis1p	[8]
CAP-Gly	CLIP170	D-CLIP 190	Bik1p	Tip1p	[9]
Sekwencje bogate w reszty serynowe	APC	E-APC	Kar9	–	[10]
	CLASP1/2	–	Stu1p	–	[9]

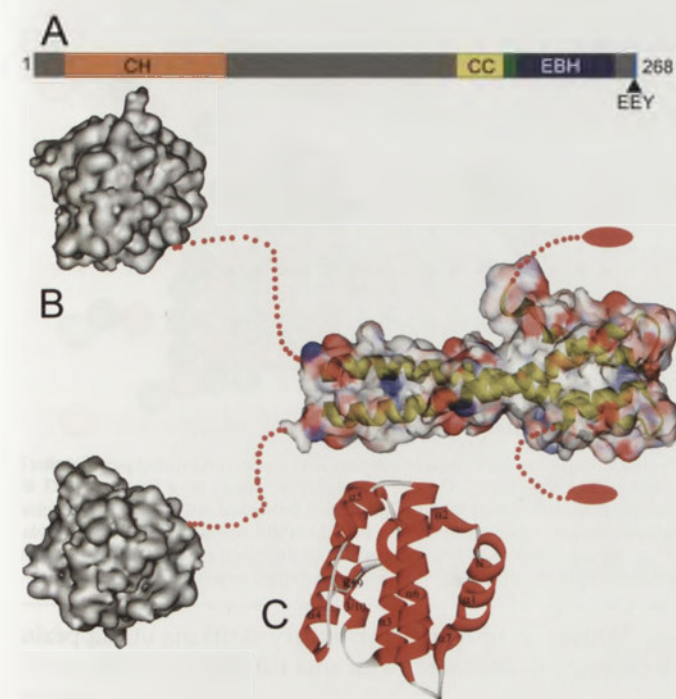
BUDOWA BIAŁEK ŚLEDZĄCYCH KONIEC PLUS MIKROTUBUL

Omawiana grupa białek jest wysoce niejednorodna i znajdujemy w niej przedstawicieli rodzin tak odległych, jak kinezyzny i rodzina EB. Do najczęściej wymienianych białek posiadających zdolność śledzenia końca plus należą: białka rodziny EB (ang. *End Binding*), XMAP215, CLIP, APC, dyneina oraz kinezyzna MCAK (Tab. 1) [7-10].

Białka rodziny EB są homodimerami, których monomery zbudowane są z dwóch domen, położonych odpowiednio na końcu aminowym i karboksylowym, o sekwencjach aminokwasowych zachowanych ewolucyjnie i połączonych łącznikami o strukturze nieuporządkowanej (Ryc. 2A). Koniec aminowy stanowią dwie domeny CH (homologi do kalponiny), które występują powszechnie wśród białek oddziałujących z aktyną. W tym przypadku domeny te odpowiedzialne są za zdolność wiązania

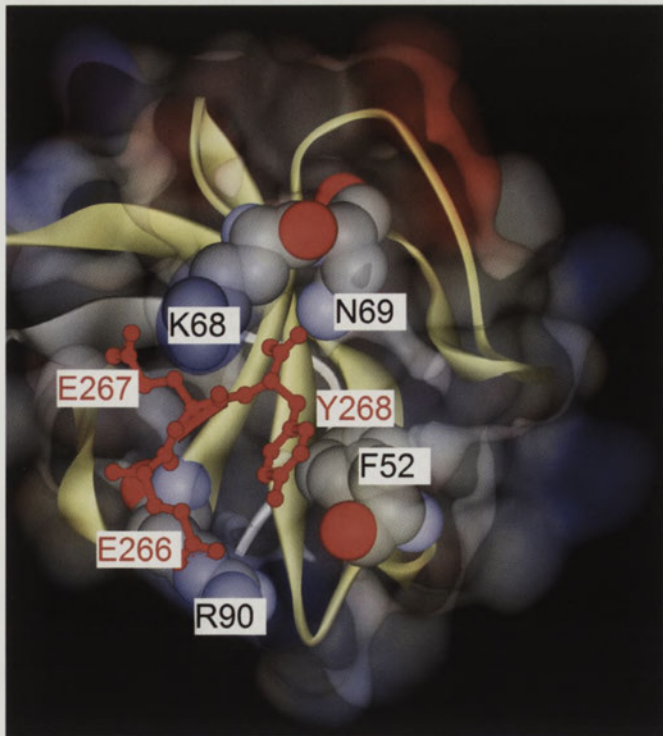
mikrotubul przez białka EB. Każda z domen CH ma budowę globularną i jest uformowana z sześciu [11] lub ośmiu [12] α -helis (Ryc. 2B). Centralne miejsce w strukturze zajmuje hydrofobowa helisa $\alpha 3$. Helisy $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 6$ ułożone są równoległe i połączone pętlami [12]. Reszty aminokwasowe helis $\alpha 4$ i $\alpha 6$ są częściowo eksponowane do roztworu, tworząc potencjalne miejsca oddziaływań z białkami. Mutacja Lys89 (Ryc. 2B), znajdującej się w bliskości hydrofobowej części domeny, powoduje utratę zdolności wiązania domeny CH z mikrotubulą. Wykazano także, że podwyższenie siły jonowej osłabia oddziaływanie z mikrotubulą. Fakty te wskazują na mieszany charakter oddziaływania białek EB z mikrotubulą: częściowo hydrofobowy, a w dużej mierze elektrostatyczny [11].

C-końcowa część EB1 zbudowana jest z superhelikalnego fragmentu warunkującego dimeryzację (Ryc. 2A) oraz domeny charakterystycznej dla białek rodziny EB (EBH), kluczowej dla oddziaływania z innymi białkami. W każdym z monomerów występują w tej części struktury dwie α -helisy, dłuższa i krótsza, ułożone antyrównoległe i połączone krótką pętlą [12]. W wyniku dimeryzacji tak zbudowanych podjednostek powstaje struktura określana jako „wiązka czterech helis” (ang. *four-helix bundle*). Łańcuchy boczne aminokwasów tworzących ten układ tworzą hydrofobowy rdzeń wiązki stabilizujący budowę dimeryczną białka i są sekwencjami zachowanymi w ewolucji [13]. Inne sekwencje aminokwasowe zachowane w ewolucji tworzą powierzchnię, składającą się z części hydrofobowej oraz polarnej, która jest odpowiedzialna za oddziaływania z innymi białkami, np. supresorem nowotworzenia APC. Ostatnie aminokwasy domeny C-końcowej stanowią fragment o nieuporządkowanej i elastycznej strukturze, zakończony sekwencją EEY (Glu-Glu-Tyr) (Ryc. 2B). Sekwencja ta bierze udział w oddziaływaniu z białkami zawierającymi domeny CAP-Gly, takimi jak p150(glued) [13]. Taka budowa domenowa białek EB czyni je doskonałymi pośrednikami (białkami adapterowymi) oddziaływania innych +TIPs z końcem plus mikrotubuli. Główny przedstawiciel tej rodziny – białko EB1 oraz jego homologi – posiada wiele partnerów białkowych oddziałujących za jego pośrednictwem z mikrotubulą (zob. także Ryc. 6).



Rycina 2. Budowa domenowa białka EB1. A) CH-domena homologii do kalponiny, CC – domena dimeryzacyjna (ang. *coiled-coil*), EBH – domena homologii do białek wiążących koniec plus, EEY, charakterystyczna sekwencja na końcu karboksylowym. B) Model struktury domenowej EB1 pełnej długości. Domeny CH związane są z domeną dimeryzacyjną elastycznymi łącznikami, na rysunku oznaczonymi kropkowanymi liniami. Czerwone elipsy odpowiadają sekwencji EEY. C) Struktura krystalograficzna domeny CH. Pokazano także pozycję Lys89.

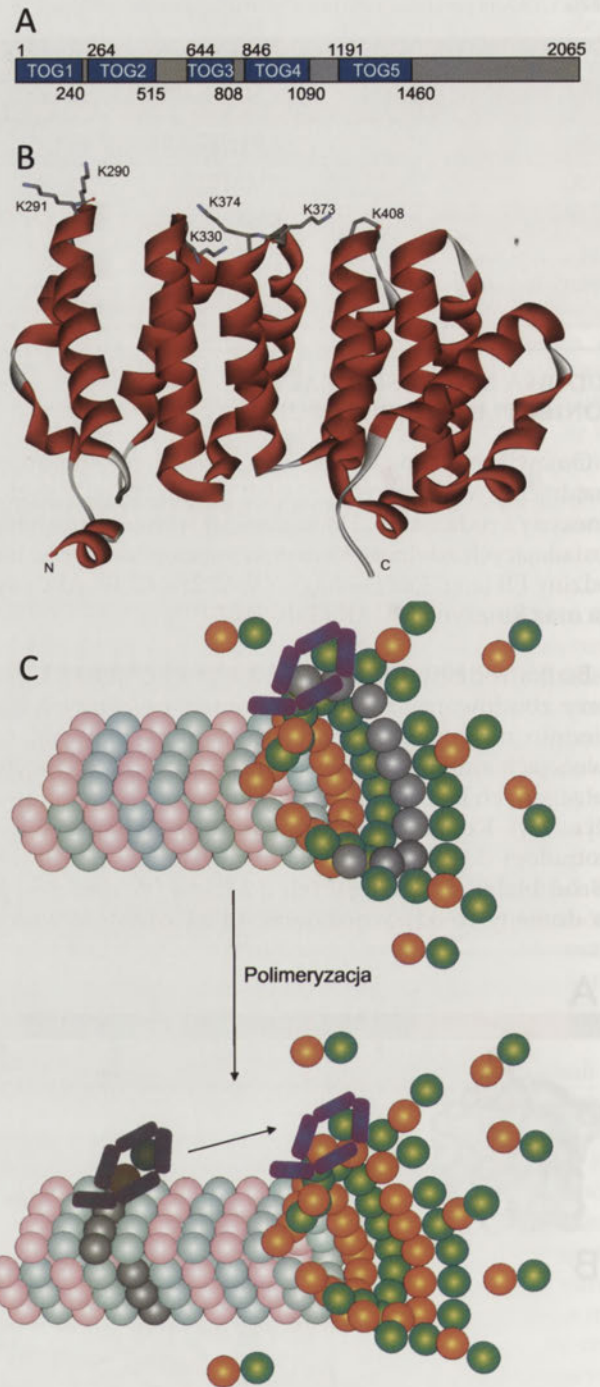
Inną dobrze określoną strukturą związaną ze zjawiskiem śledzenia końca plus mikrotubuli jest bogata w reszty glicyny domena CAP-Gly (ang. *cytoskeleton-associated protein Gly-rich domain*). Zawiera ona hydrofobowy fragment o zachowanej w ewolucji sekwencji GKNDG (Gly-Lys-Asn-Asp-Gly-), zawierający charakterystyczne



Rycina 3. Oddziaływania motywu EEY/F, występującego na końcu karboksylowym białek z rodziny EB, z białkiem z rodziny CAP-Gly. Ujemnie naładowane reszty kwasu glutaminowego tworzą wiązania elektrostatyczne i mostki solne z resztami Lys68 lub Arg90, a także wiązania wodorowe z Asn69. Występująca w motywie EEY reszta tyrozyny oddziałuje hydrofobowym wiązaniem z resztą Phe52. Wszystkie te reszty aminokwasowe zlokalizowane są w hydrofobowej szczeliny. Rycinę przygotowano na podstawie pliku PDB 2HL3, w którym podane są współrzędne atomów białka p150(glued) połączonego z peptydem obejmującym sześć ostatnich reszt aminokwasowych EB1 [44].

reszty glicyny, biorące udział w formowaniu pętli w globularnej części białka. W grupie +TIPs, domena ta została zidentyfikowana na końcu aminowym białek z rodziny CLIP oraz w zbliżonej do niej strukturalnie dużej podjednostce kompleksu dynaktyny – p150(glued). Warunkuje ona ich oddziaływanie z EB1 oraz tubuliną [14]. Oddziaływanie to polega na wiązaniu motywu EEY/F przez sekwencję GKNDG (Ryc. 3). Białka z grupy CLIP oraz p150(glued) zawierają dodatkowo sekwencję odpowiedzialną za dimeryzację przez tworzenie struktury superhelikalnej. W części C-terminalnej CLIP170 zlokalizowane są dwie domeny wiążące jon cynku oraz – podobnie jak w rodzinie EB – sekwencja EEY/F [15].

Spośród +TIPs na szczególne wyróżnienie zasługują białka z rodziny XMAP215. Oprócz białek EB jako jedyne posiadają one zdolność *samodzielnego* śledzenia końca plus mikrotubuli. Białka te zbudowane są ze zmiennej liczby, ułożonych liniowo, wiążących tubulinę domen TOG (Ryc. 4A). Domeny te zbudowane są z powtórzeń HEAT [16], z których każde utworzone jest przez dwie ułożone antyrównoległe helisy połączone pętlą (Ryc. 4B). Powtórzenia te ułożone są w taki sposób, że domena jako całość jest wydłużona, a reszty aminokwasowe pętli eksponowane są wzdłuż dłuższych boków. Reszty lizyny ułożone wzdłuż jednego z tych boków tworzą dodatnio naładowaną powierzchnię (Ryc. 4B), w której obecne są również aminokwasy nadające jej charakter hydrofobo-



Rycina 4. Budowa i mechanizm śledzenia końca plus mikrotubul przez białka z rodziny XMAP. A) Białko XMAP215 kręgowców składa się z 5 domen TOG. B) Struktura domeny TOG2 białka XMAP215 z *Drosophila melanogaster*. C) Mechanizm śledzenia końca plus przez białko XMAP215, stabilizujące ostatni przyłączony do protofilamentu heterodimer. Po uformowaniu się dojrzałej struktury mikrotubuli białko dzięki jednowymiarowej dyfuzji wraca na koniec plus.

wy. Mutacje w obrębie tej struktury skutkują utratą przez domenę TOG zdolności wiązania tubuliny [12,17].

Do trudnych do klasyfikacji +TIPs należy grupa niespokrewnionych ze sobą białek, których wspólną cechą jest występowanie sekwencji bogatych w aminokwasy zasadowe oraz serynę (Tab. 1). W skład tej grupy wchodzi m.in. supresor nowotworzenia APC, białka z rodziny CLASP oraz melanofilina [18]. Lokalizację na końcach plus mikrotubul zaobserwowano

MECHANIZM ŚLEDZENIA KOŃCA PLUS

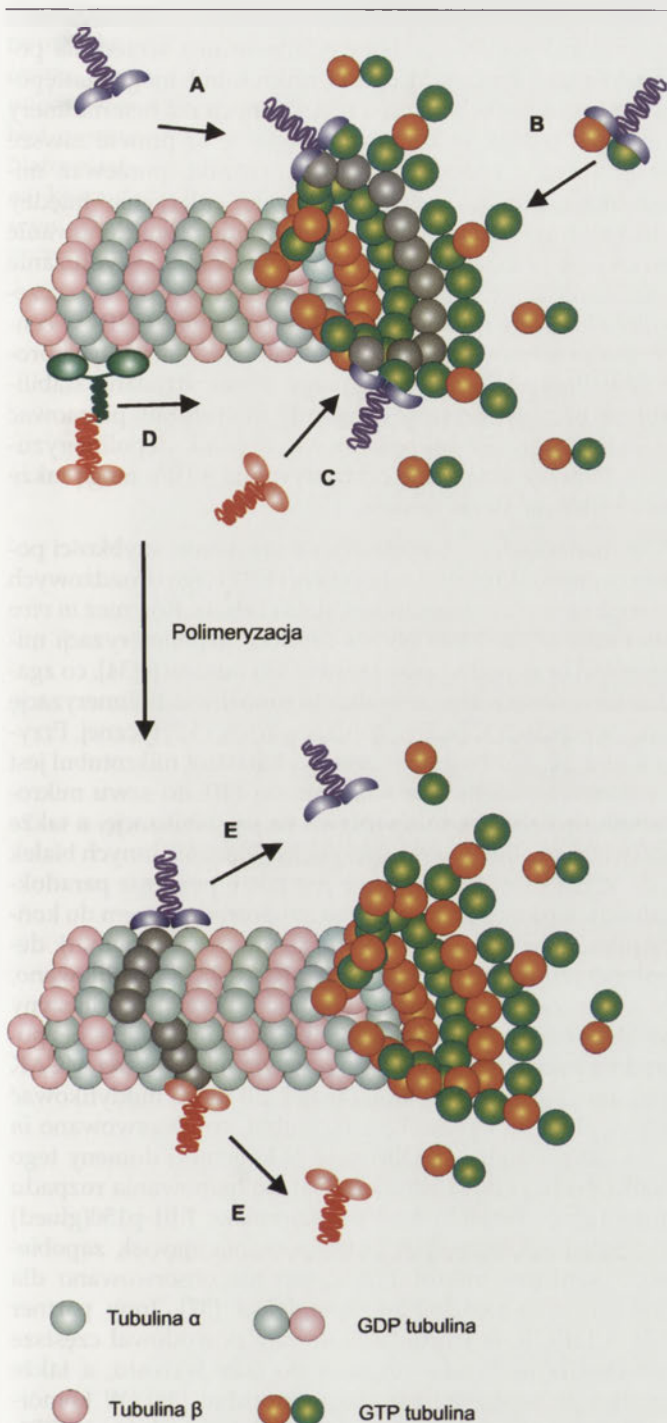
W dużej grupie białek +TIP tylko dwa ich rodzaje mogą śledzić koniec mikrotubuli samodzielnie: białka z grup EB oraz XMAP. Białka te wykorzystują do tego celu różne mechanizmy.

(a) Treadmilling¹. Ten mechanizm śledzenia występuje dla białek z rodziny EB. Polega on na cyklicznym przyłączaniu się i dysocjacji +TIP od mikrotubuli. Białka EB wiążą się do rosnącego końca, a następnie odłączają się, gdy związany heterodimer tubuliny staje się częścią dojrzałego mikrotubuli. Po dysocjacji z filamentu +TIP może ponownie związać się z końcem plus (Ryc. 5). Możliwe są dwa sposoby realizacji takiego śledzenia końca mikrotubuli. Pierwszy, to mechanizm specyficznego rozpoznawania konformacji tubuliny na końcu plus, która różni się od tej położonej wewnątrz filamentu, między innymi, z powodu braku hydrolyzy GTP dla podjednostek β w cząsteczkach położonych na końcu. Zgodnie z tym mechanizmem białko +TIP wiąże się do heterodimerów tubuliny, gdy stały się już one częścią końca mikrotubuli (Ryc. 5A). Drugim sposobem śledzenia końca plus mikrotubuli jest mechanizm kopolimeryzacji, polegający na wiązaniu wolnych heterodimerów tubuliny w roztworze, a następnie dołączaniu całych kompleksów do końca plus (Ryc. 5B). W obu przypadkach białko +TIP dysocjuje, gdy wskutek polimeryzacji przestaje ono być częścią końca mikrotubuli.

W przypadku białka Mal3, będącego drożdżowym homologiem EB1, za pomocą mikroskopii całkowitego wewnętrznego odbicia stwierdzono, że rozpoznaje ono specyficzne cechy końca plus mikrotubuli [24], chociaż mechanizm jego działania jest bardziej skomplikowany od tego opisanego powyżej. Inne wyniki, otrzymane dla ludzkiego (EB1) pokazują, że pojedyncza domena CH nie jest zdolna do rozpoznania rosnącego końca mikrotubuli w nieobecności innych +TIPs [12]. Tym wnioskom przeczy ostatnio opublikowana praca [25], w której przedstawiono dowody na brak zależności pomiędzy zdolnością tworzenia dimerycznej struktury przez białko EB i jego zdolnością do wiązania mikrotubul.

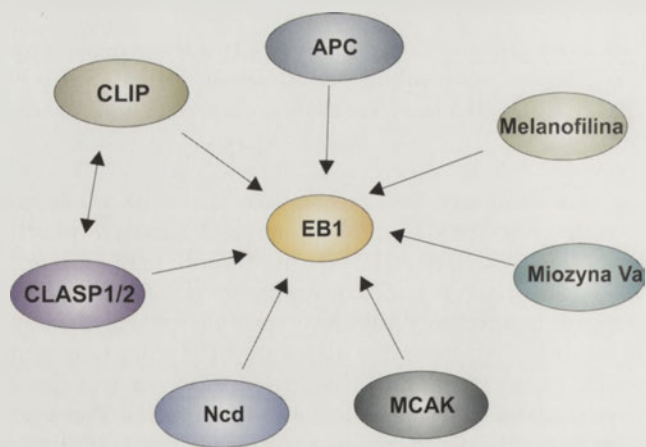
(b) Surfing. W tym sposobie śledzenia końca plus białko +TIP łączy się z podjednostkami tubuliny położonymi na końcu filamentu, promuje polimeryzację tubuliny i wędruje wraz z rosnącym końcem (Ryc. 4C). XMAP215 wykazuje taki mechanizm działania [26]. Białko to jest polimerazą tubuliny, która może się wiązać zarówno z rosnącym, jak i kurczącym się końcem mikrotubuli. Mechanizm przyspieszania polimeryzacji przez XMAP215 polega na stabilizacji połączeń pomiędzy nowo wiążącymi się do końca plus mikrotubuli heterodimerami tubuliny a resztą filamentu (Ryc. 4C). W czasie tego procesu XMAP215 stale śledzi koniec tworzącego się polimeru [26]. Podczas oddziaływania z rosnącym końcem, XMAP215 w ciągu kilku sekund dodaje ponad 300 heterodimerów tubuliny do końca plus, tj. 25 do każdego z protofilamentów, bez dysocjacji z mikrotubuli, tzn. wykazuje cechy procesywnego działania. Szczegółowy mechanizm przemieszczania się na koniec nowo utworzonego filamen-

¹co dosłownie znaczy bieganie w miejscu po niekończącej się taśmie; chodzenie w kieracie



Rycina 5. Mechanizmy śledzenia końca plus. Białka +TIP mogą lokalizować się na końcu plus, rozpoznając charakterystyczną strukturę rosnącego końca (A), kopolimeryzując z dimerami tubuliny (B), przyłączając się do miejsca wiązania tworzonego przez inne białko (C) lub być dostarczone przez kinezyiny (D). W wyniku zmiany struktury mikrotubuli w czasie wzrostu +TIPs oddysocjują od mikrotubuli (E).

także dla białek motorycznych związanych z mikrotubulami. Cechę tę wykazują zarówno motory poruszające się w kierunku końca plus, jak i minus mikrotubuli. Lokalizację na końcu plus stwierdzono dla kinezyin drożdżowych Tea2 [19] i Kip2 [20], kinezyin z rodziny 13 depolimeryzujących mikrotubule MCAK [21], a także przedstawicieli rodziny 14 kinezyin: drożdżowej Kar3 oraz Ncd z *Drosophila melanogaster* [22]. Śledzenie końca plus zostało także wykazane dla dyneiny cytoplazmatycznej oraz miozyny z rodziny V [23].



Rycina 6. Wybrane białka, których lokalizacja uzależniona jest od EB1 lub jego homologów. APC – Adenomatous polyposis coli, CLASP1/2 – białka wiążące białka CLIP 1 i 2, CLIP – rodzina białek – łączników cytoplazmatycznych, MCAK – związana z centrosomami kinezyna z rodziny 13 depolimeryzująca mikrotubule, Ncd – kinezyna z rodziny 14 (z ang. *non-claret disjunctional*).

tu nie jest do końca poznany. Prawdopodobnie chodzi tu o jednowymiarową dyfuzję +TIPu na powierzchni lub wzdłuż protofilamentu mikrotubuli, podobnie jak w przypadku kinezyn MCAK [27], KIF1A [28] i Ncd [29,30].

(c) Opisane powyżej sposoby wiązania końca plus dotyczą białek zdolnych do samodzielnego jego śledzenia. Duża część +TIPs nie posiada tej cechy, a mimo to wykazują one lokalizację na końcu plus, co prowadzi do wniosku, że zdolność śledzenia tego końca jest zależna od oddziaływań z innymi białkami. Budowa domenowa (Ryc. 2) białek z rodziny EB umożliwia im pełnienie funkcji transporterów dostarczających inne białka do końca plus. Przykładem takiej aktywności jest udział EB1 w lokalizacji CLIP170 u kręgowców. *In vitro* CLIP170, przy braku obecności innych czynników, dekoruje mikrotubule na całej długości. W obecności EB1 obserwuje się natomiast lokalizację charakterystyczną dla +TIPs [31,32]. Kluczowym elementem tego oddziaływania jest oddziaływanie domeny CAP-Gly z sekwencją EEE białka EB1, na co wskazuje utrata możliwości śledzenia końca plus przez CLIP170 po zamianie reszty tyrozynowej tego motywu na resztę alaninową. Co ciekawe, wiązanie CLIP170 do końca plus mikrotubuli zależne jest także od obecności reszty tyrozynowej w sekwencji EEE α -tubuliny, czego nie obserwuje się dla EB1. Obserwacje te wskazują na rozpoznawanie przez CLIP170 złożonego miejsca wiązania, zbudowanego z reszt aminokwasowych dwóch białek: zawierającej tyrozynę α -tubuliny oraz EB1 [31].

Także dla innych białek stwierdzono udział EB1 w procesie prowadzącym do ich lokalizacji na końcu plus (Ryc. 6). W badaniach na liniach komórkowych obserwowano zależność zdolności śledzenia końca plus przez kinezynę MCAK [33] oraz Ncd [22] od obecności EB1. Informacje te stawiają białka EB w centrum zainteresowania jako potencjalnie główny składnik kompleksów białkowych obecnych na końcu plus mikrotubuli.

REGULACJA DYNAMIKI POLIMERYZACJI MIKROTUBUL

Mikrotubule są strukturami podlegającymi nieustannym zmianom długości, płynnie przechodzącymi między fazami

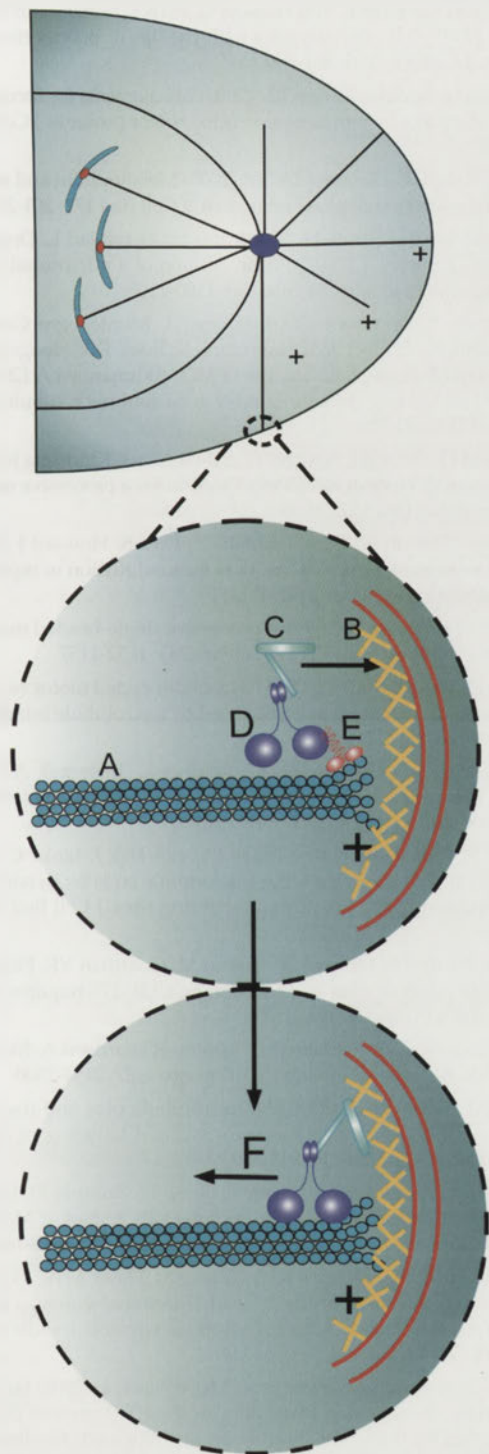
polimeryzacji i depolimeryzacji. Dynamiczna niestabilność mikrotubul stanowi podstawę formowania wrzeciona podziałowego. Zmiany długości mikrotubul mogą następować samoistnie bez udziału białek innych niż heterodimery tubuliny. Jednak w komórce procesy te są prawie zawsze kontrolowane przez dodatkowe czynniki, ponieważ mikrotubule muszą wytwarzać trwałe połączenia między strukturami komórkowymi. Formowanie i funkcjonowanie wrzeciona podziałowego nie stanowi wyjątku. Wydłużanie i skracanie mikrotubul odbywa się na ich końcach, a szczególnie intensywnie na końcu plus, co stawia +TIPs w centrum zainteresowania jako potencjalne regulatory tych procesów. Białka tej grupy mogą wywoływać działanie stabilizujące, hamując częstość katastrof ² mikrotubul, promować polimeryzację, ale także stanowić czynnik depolimeryzujący. Poprzez wzajemne oddziaływania +TIPs mogą także modyfikować swoje funkcje.

W badaniach *in vitro* obserwuje się wzrost szybkości powstawania mikrotubul w obecności EB1 i jego drożdżowych homologów, w szczególności Mal3 (Tab. 1). Również *in vivo* stwierdzono, że Mal3 obniża częstość depolimeryzacji mikrotubul oraz podwyższa częstość ich nukleacji [34], co zgadza się z obserwacją, iż białko to umożliwia polimeryzację przy stężeniach tubuliny poniżej wartości krytycznej. Przypuszcza się, że obniżanie częstości katastrof mikrotubul jest związane ze zdolnością wiązania się EB1 do szwu mikrotubuli, co bezpośrednio wpływa na jej stabilizację, a także na tworzenie lub blokowanie miejsc wiązania innych białek [35]. Z białkami EB związane jest także pozornie paradoksalne zjawisko rekrutowania za ich pośrednictwem do końca plus mikrotubul białek o działaniu przeciwnym, tj. depolimeryzującym, np. kinezyny MCAK [33]. Postulowano, że jest to związane z utrzymywaniem przez EB1 kinezyny MCAK w formie nieaktywnej [33], na co wskazuje bezpośrednio oddziaływanie EB1 z domeną katalityczną MCAK [36]. Inni partnerzy białkowi białek EB mogą modyfikować jego wpływ na dynamikę mikrotubul, co obserwowano *in vitro* dla p150(glued). Obecność N-końcowej domeny tego białka podwyższyła zdolność EB1 do hamowania rozpadu mikrotubul ponad 3 krotnie. Kompleks EB1-p150(glued) zwiększał także częstość występowania zjawisk zapobieżenia katastrof mikrotubul, czego nie obserwowano dla pojedynczych składników kompleksu [37]. Inny partner EB1, CLIP170, w warunkach *in vitro* powodował częstsze przechodzenie z fazy rozpadu do fazy wzrostu, a także promował tworzenie zarodki mikrotubul [38]. W komórkach ssaków funkcje te są prawdopodobnie zależne od EB1, ponieważ jak wspomniano wcześniej, CLIP170 nie posiada zdolności samodzielnego śledzenia końca plus.

Kolejnym białkiem +TIP wpływającym na wzrost mikrotubul jest XMAP215, który w badaniach *in vitro* przyspieszał polimeryzację 10-krotnie [39]. Pierwotną hipotezą tłumaczącą znaczne przyspieszenie polimeryzacji był „model matrycy”. Postulowała ona, że białko XMAP215, wskutek obecności 5 domen wiążących heterodimery tubuliny (Ryc. 5B), stanowi matrycę dla polimeryzacji tubuliny do oligomerów, które następnie łączą się z końcem plus polimeryzującej mikrotubuli [40]. Nowe obserwacje wydają się nie potwier-

²tym terminem określa się proces gwałtownej depolimeryzacji mikrotubuli, podczas której traci ona znaczną część swojej długości

dzać tego mechanizmu. Wykazano, że XMAP215 i tubulina tworzą kompleks o stechiometrii 1:1, co wyklucza przyłączanie wielu cząsteczek tubuliny w każdym cyklu [26]. Co więcej, w modelu matrycy efektywność XMAP215 powinna być proporcjonalna do ilości jego cykli asocjacji/dysocjacji. Natomiast XMAP215 okazał się być procesywną polimerazą, która dysocjuje rzadko. Jak już wspomnieliśmy, obecne wyniki faworyzują taki mechanizm działania tego białka, w



Rycina 7. Oddziaływanie końca plus mikrotubuli z korteksem cytoplazmy. Wytworzenie wiązania między końcem plus mikrotubuli (A) a korteksem cytoplazmy (B) odbywa się za pośrednictwem dynaktyny (C), lokalizacja dynaktyny na końcu plus jest zależna od dyneiny (D) oraz CLIP170 (E). Po przyłączeniu kompleksu dyneina-dynaktyna do korteksu możliwy jest ruch motoru w kierunku końca minus (F), powodujący przesuwanie mikrotubuli względem korteksu.

którym dochodzi do stabilizacji połączeń pomiędzy świeżo dodaną na końcu plus cząsteczką tubuliny i resztą polimeru, a następnie przemieszczenie się XMAP215 do nowo utworzonego końca [26].

FUNKCJE MOTORÓW MOLEKULARNYCH ŚLEDZĄCYCH KONIEC PLUS

Motory molekularne generujące ruch w stronę końca minus mikrotubuli, takie jak cytoplazmatyczna dyneina oraz kinezy z grupy 14, np. Ncd, mają istotny wkład w tworzenie prawidłowego wrzeciona podziałowego. W przypadku obu wymienionych białek obserwowano zmiany w ogniskowaniu wiązek mikrotubul na centrosomach [5]. Stwierdzono także udział dyneiny w stabilizowaniu wrzeciona na etapie metafazy przez przeciwdziałanie siłom wytwarzanym przez kinezynę Eg5 [5].

Przedstawiony w pierwszej części artykułu mechanizm formowania wrzeciona podziałowego opiera się na modelu „poszukiwania i chwytania” (ang. *search and capture*) kinetochorów przez mikrotubule wyrastające z centrosomów. Zakłada on przypadkowe pochwylenie chromosomów przez ulegające ciągłym procesom wydłużania i skracania mikrotubule. Postulowany jest również alternatywny mechanizm formowania wrzeciona, bazujący na obserwacji acentrosomalnej nukleacji mikrotubul w pobliżu chromosomów [41]. Mikrotubule te są związane z mikrotubulami astralnymi oraz transportowane wzdłuż nich, co doprowadza do skupienia ich końców minus w pobliżu centrosomów. Proces pochwylenia i transportu odbywa się za pośrednictwem obecnych na końcu plus mikrotubuli astralnej białek motorycznych poruszających się w kierunku minus. Zarówno dla dyneiny, jak i Ncd zaobserwowano zdolność utrzymywania się na końcu plus mikrotubul, zależną od partnerów białkowych. W przypadku Ncd stwierdzono zanik tej aktywności po zastosowaniu interferującego RNA przeciwko EB1 [22], jednak jak dotąd brak dowodów na bezpośrednie oddziaływanie tego motoru z EB1. Co ważniejsze, w tej samej pracy zaobserwowano, że po obniżeniu poziomu EB1 w komórce powstają zmiany w budowie wrzeciona identyczne z tymi, które pojawiają się po wyciszeniu ekspresji genu Ncd.

Wytwarzanie przez motory molekularne sił stabilizujących wrzeciono odbywa się w jego równikowej części, w miejscu nakładania się końcami plus mikrotubul polarnych (Ryc. 1D). W rejonie tym kinezyzna Eg5 wytwarza siłę rozsuwającą, równoważoną przez przeciwstawne działanie dyneiny [5] i Ncd [42]. Ta funkcja dyneiny zależna jest od CLIP170, na co wpływ mają prawdopodobnie dwa czynniki: a) dyneina nie ma zdolności wiązania dwóch mikrotubul, konieczne jest więc oddziaływanie z białkiem, które zwiąże drugą mikrotubulę; b) motor ten generuje ruch w stronę minus i nie jest w stanie samodzielnie przemieszczać się na koniec plus, gdzie zachodzi opisywany proces. Inną przypisywaną dyneinie funkcją w organizacji wrzeciona jest jej udział w oddziaływaniu mikrotubul astralnych z korteksem (częścią korową, korą) cytoplazmy (Ryc. 6). Wytworzenie takiego połączenia za pośrednictwem dynaktyny umożliwia temu motorowi molekularnemu transport mikrotubuli względem korteksu, a przez to wpływanie na pozycję centrosomu w komórce. Potwierdzeniem takiej funk-

cji dyneiny jest obserwowana u drożdży jej lokalizacja na korteksie cytoplazmy i jej brak w nieobecności dynaktyny [43]. Aby możliwe było wytworzenie połączenia mikrotubula-kora cytoplazmy, niezbędna jest obecność dyneiny na końcu plus mikrotubuli. Ta obecność, także w przypadku drożdży, zależy od CLIP170. Analizując udział tego motoru w opisywanych procesach, należy zwrócić uwagę, że tak w przypadku CLIP170 ssaków, jak i jego drożdżowego homologu stwierdzono, że śledzenie końca plus odbywa się za pośrednictwem innych białek: EB1 w przypadku ssaków [32] lub kinezyzny Kip2 w drożdżach [20].


Jak widać na przedstawionych przykładach białka +TIP uczestniczą w złożonych procesach angażujących wiele różnych białek i przez to trudnych do badania. Doświadczenia *in vitro* dostarczają wielu ciekawych informacji, jednak ograniczają się one zazwyczaj do badań pojedynczych białek, których zachowanie może być modyfikowane w obecności innych elementów tego skomplikowanego układu.

PIŚMIENNICTWO

- Varmark H (2004) Functional role of centrosomes in spindle assembly and organization. *J Cell Biochem* 91: 904-914
- Glotzer M (2009) The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 9-20
- Lansbergen G, Akhmanova A (2006) Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic* 7: 499-507
- Rogers SL, Rogers GC, Sharp DJ, Vale RD (2002) *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol* 158: 873-884
- Tanenbaum ME, Macůrek L, Galjart N, Medema RH (2008) Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J* 27: 3235-3245
- Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S (2003) "Search-and-capture" of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs). *J Biochem* 134: 321-326
- Morrison EE (2007) Action and interactions at microtubule ends. *Cell Mol Life Sci* 64: 307-317
- Kinoshita K, Habermann B, Hyman AA (2002) XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 12: 267-273
- Galjart N (2005) CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 487-498
- Aoki K, Taketo MM (2007) Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 120: 3327-3335
- Hayashi I, Ikura M (2003) Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem* 278: 36430-36434
- Slep KC, Vale RD (2007) Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell* 27: 976-991
- Honnappa S, John CM, Kostrewa D, Winkler FK, Steinmetz MO (2005) Structural insights into the EB1-APC interaction. *EMBO J* 24: 261-269
- Hayashi I, Wilde A, Mal TK, Ikura M (2005) Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex. *Mol Cell* 19: 449-460
- Mishima M, Maesaki R, Kasa M, Watanabe T, Fukata M, Kaibuchi K, Hakoshima T. (2007) Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10346-10351
- Andrade MA, Petosa C, O'Donoghue SI, Müller CW, Bork P (2001) Comparison of ARM and HEAT Protein Repeats. *J Mol Biol* 309: 1-18
- Al-Bassam J, Larsen NA, Hyman AA, Harrison SC (2007) Crystal structure of a TOG domain: conserved features of XMAP215/Dis1-family TOG domains and implications for tubulin binding. *Structure* 15: 355-362
- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 309-322
- Browning H, Hackney DD (2005) The EB1 homolog Mal3 stimulates the ATPase of the kinesin Tea2 by recruiting it to the microtubule. *J Biol Chem* 280: 12299-12304
- Carvalho P, Gupta ML Jr, Hoyt MA, Pellman D (2004) Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell* 6: 815-829
- Moore AT, Rankin KE, von Dassow G, Peris L, Wagenbach M, Ovechikina Y (2005). MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J Cell Biol* 169: 391-397
- Goshima G, Nédélec F, Vale RD (2005) Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol* 171: 229-240
- Wu XS, Tsan GL, Hammer JA 3rd (2005) Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1. *J Cell Biol* 171: 201-207
- Bieling P, Laan L, Schek H, Munteanu EL, Sandblad L, Dogterom M, Brunner D, Surrey T (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature* 450: 1100-1105
- Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Montenegro Gouveia SE, Munteanu L, Schober JM, Honnappa S, Buey RB, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A (2009) Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol* 184: 691-706
- Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA (2008) XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 132: 79-88
- Helenius J, Brouhard G, Kalaidzidis Y, Diez S, Howard J (2006) The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature* 441: 115-119
- Okada Y, Hirokawa N (1999) A processive single-headed motor: Kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283: 1152-1157
- Furuta K, Toyoshima Y (2008) Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling *in vitro*. *Curr Biol* 18: 152-157
- Fink G, Hajdo L, Skowronek KJ, Reuther C, Kasprzak AA, Diez S (2009) The mitotic kinesin-14, Ncd, drives directional microtubule-microtubule sliding. *Nat Cell Biol* (w druku)
- Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T (2008) CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol* 183: 1223-1233
- Dixit R, Barnett B, Lazarus JE, Tokito M, Goldman YE, Holzbaur EL (2009) Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 492-497
- Lee T, Langford KJ, Askham JM, Brüning-Richardson A, Morrison EE (2008) MCAK associates with EB1. *Oncogene* 27: 2494-2500
- Busch KE, Brunner D (2004) The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol* 14: 548-559
- Sandblad L, Busch KE, Tittmann P, Gross H, Brunner D, Hoenger A (2006) The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* 127: 1415-1424
- Ems-McClung SC, Hertzler KM, Zhang X, Miller MW, Walczak CE (2007) The interplay of the N- and C-terminal domains of MCAK control microtubule depolymerization activity and spindle assembly. *Mol Biol Cell* 18: 282-294
- Manna T, Honnappa S, Steinmetz MO, Wilson L (2008) Suppression of microtubule dynamic instability by the +TIP protein EB1 and its modulation by the CAP-Gly domain of p150glued. *Biochemistry* 47: 779-786
- Arnal I, Heichette C, Diamantopoulos GS, Chrétien D (2004) CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol* 14: 2086-2095

39. Gard DL, Kirschner MW (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol* 105: 2203-2215
40. Kerssemakers, JW, Munteanu, EL, Laan L, Noetzel TL, Janson ME, Dogterom M (2006). Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442: 709-712
41. Gruss OJ, Wittmann M, Yokoyama H, Pepperkok R, Kufer T, Silljé H, Karsenti E, Mattaj JW, Vernos I (2002) Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol* 4: 871-879
42. Sharp DJ, Yu KR, Sisson JC, Sullivan W, Scholey JM (1999) Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol* 1: 51-54
43. Moore JK, Li J, Cooper JA (2008) Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic* 9: 510-527
44. Honnappa S, Okhrimenko O, Jaussi R, Jawhari H, Jelesarov I, Winkler FK, Steinmetz MO (2006) Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol Cell* 23: 663-671

Plus end tracking proteins and their role in mitotic spindle organization

Seweryn Bajer, Andrzej A. Kasprzak 

Motor Proteins Laboratory, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: a.kasprzak@nencki.gov.pl

Key words: +TIPs, EB1, microtubule plus end, mitotic spindle

ABSTRACT

Plus end tracking proteins (+TIPs) form a diverse protein family, members of which were found in all eukaryotes. Their characteristic feature is the ability of localisation on dynamically growing plus ends of microtubules. +TIPs perform many important functions during mitosis: they control microtubule growth, the recruitment of other proteins to the microtubule plus end and promote the interaction of microtubules with other elements of the spindle. In the article we describe the structure of main +TIPs groups, focusing especially on domains responsible for plus end tracking. We also discuss several mechanisms for plus-end accumulation, the influence of these proteins on microtubule dynamics and their importance in the spindle organization.

Marta Migocka-Patrzałek

Maria Malicka-Błaszkwicz

Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel.: (071) 375 62 06, e-mail: migocka@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 5 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: aktyna jądrowa, ABPs, transkrypcja, izoformy aktyny, β -aktyna

Wykaz skrótów: ABPs (ang. *actin binding proteins*) – białka wiążące aktynę; Arps (ang. *actin related proteins*) – białka podobne do aktyny; Exp6 (ang. *exportin 6*) – eksportyna 6; NES (ang. *nuclear export sequence*) – sekwencja eksportu z jądra; NMI (ang. *nuclear myosin I*) – miozyna jądrowa I

STRESZCZENIE

Aktyna jest wielofunkcyjnym białkiem, obecnym we wszystkich komórkach eukariotycznych. Występuje w cytoplazmie i w jądrze. W odróżnieniu od aktyny cytoplazmatycznej, organizacja i funkcje aktyny jądrowej nie są dokładnie poznane. Monomery aktyny przemieszczają się pomiędzy cytoplazmą a jądrem, scalając oba te obszary subkomórkowe. W jądrze obserwujemy odmienną organizację aktyny – obecność monomerów, oligomerów i krótkich polimerów, co może być wynikiem ograniczonej przestrzeni wewnątrz jądra. Aktyna uczestniczy w organizacji struktury jądra, reorganizacji chromatyny, procesie transkrypcji oraz przekazywaniu sygnałów. Poziom, organizacja i funkcje aktyny jądrowej są kontrolowane, podobnie jak to ma miejsce w cytoplazmie przez ABPs, w tym również występujące jedynie w jądrze.

WPROWADZENIE

Aktyna to wielofunkcyjne białko, powszechnie występujące w komórkach eukariotów. Jest elementem cytoszkieletu – struktury odpowiedzialnej za utrzymanie i zmiany kształtu komórki, jej zdolność do ruchu i wiele innych podstawowych procesów życiowych. Aktyna uczestniczy w transporcie, cytokinezie oraz w indukowaniu i przekazywaniu sygnałów z otoczenia do wnętrza komórki. Wielofunkcyjność aktyny jest możliwa dzięki jej zdolności do polimeryzacji i oddziaływania z wieloma białkami regulatorowymi. Monomery aktyny (G-aktyna), w odpowiednich warunkach, łączą się, tworząc filamenty (F-aktyna). Formy te istnieją w dynamicznej równowadze, kontrolowanej przez zmiany zachodzące w środowisku komórki. Czynniki, takie jak jony metali (Ca^{2+} , Mg^{2+}) oraz rodzaj przyłączanego nukleotydu (ADP/ATP) wpływają na właściwości zarówno monomerów, jak i polimerów aktyny. Dynamika polimeryzacji aktyny i jej organizacja w cytoplazmie są ściśle kontrolowane przez szereg oddziałujących z aktyną białek, objętych nazwą ABPs (ang. *actin binding proteins*), zależą też od stanu fizjologicznego komórki oraz czynników zewnętrznych [1].

Aktyna występuje w kilku izoformach różniących się między sobą niewielką liczbą aminokwasów. Izoforny aktyny zostały sklasyfikowane na podstawie punktu izoelektrycznego oraz lokalizacji w tkankach i w komórce. U kręgowców aktyna występuje w postaci sześciu izoform: dwóch form w mięśniach poprzecznie prążkowanych (aktyny α z mięśni szkieletowych i aktyny α z mięśnia sercowego), aktyny α i γ z mięśni gładkich oraz dwóch izoaktyn cytoplazmatycznych – β i γ . W świetle opublikowanych badań, wydaje się słusznym stwierdzenie, że izoforny aktyny obok wspólnych właściwości i funkcji mają w komórce specjalne zadania, często związane z różnym subkomórkowym rozmieszczeniem [2-5]. Struktura i funkcja aktyny cytoplazmatycznej są dokładnie poznane, zainteresowanych tą tematyką odsyłamy do prac przeglądowych i literatury w nich zebranej [6-8].

Aktyna przez długi czas traktowana była wyłącznie, jako białko cytoplazmatyczne. Pierwsze doniesienie o obecności aktyny w jądrze komórkowym – to opublikowana w 1978 roku praca Clark'a i Merriam [9], w której opisano białko o właściwościach charakterystycznych dla aktyny z mięśni szkieletowych, w frakcji jądrowej oocytów żaby *Xenopus laevis*. Przez wiele lat uważano jednakże, iż wynikało to z zanieczyszczenia frakcji jądrowej cytoplazmą. W niniejszej pracy podjęto próbę zebrania najnowszych danych o organizacji i funkcji aktyny jądrowej oraz o obecnych w jądrze białkach wiążących aktynę.

TRANSPORT AKTYNY JĄDROWEJ

Błona jądrowa stanowi barierę pomiędzy cytoplazmą a wnętrzem jądra i jest nieprzepuszczalna dla większości substancji komórkowych. Ich przemieszczaniu służą pory jądrowe, tworzące kanały przenikające błonę jądrową. Wyróżnia-

my dwa główne typy transportu poprzez te kanały, bierną dyfuzję małych białek (do 60 kDa [10]) oraz transport aktywny zachodzący za pomocą obecnych w błonie jądrowej, specyficznych receptorów [11].

Aktyna, białko o masie około 43 kDa, mieści się w granicach wielkości pozwalającej na przenikanie do wnętrza jądra na drodze biernej dyfuzji, w czasie od około 30 minut do kilku godzin [12]. Możliwe jest też przenoszenie aktyny do jądra w kompleksie z innym białkiem, takim jak kofilina, która posiada sygnał lokalizacji jądrowej oraz domenę wiążącą aktynę [13].

W sekwencji łańcucha polipeptydowego aktyny występują dwa funkcjonalne, bogate w leucynę, fragmenty - sygnały exportu z jądra (NES, ang. *nuclear export sequence*). Wprowadzona do jądra na drodze mikroiniekcji, monomeryczna aktyna zostaje szybko eksportowana do cytoplazmy. Proces ten jest hamowany przez leptomycynę B, specyficzny inhibitor eksportu jądrowego białek zawierających sygnał NES, co w konsekwencji powoduje wzrost stężenia aktyny w jądrze. Częsteczki aktyny z mutacją w obrębie sekwencji sygnałowej NES akumulują się w jądrze, czemu towarzyszy obniżenie zdolności proliferacyjnych komórki [14]. Wykazano, że w „usuwaniu” aktyny z jądra bierze udział eksportyna 6 (Exp6), którą cechuje zdolność do tworzenia kompleksów z białkami posiadającymi sygnał NES. Ludzka eksportyna 6 wiąże przede wszystkim aktynę, jednak obecność aktyny w kompleksie z profiliną znacznie zwiększa szybkość eksportu aktyny [14,15].

Eksport aktyny z udziałem Exp6 nie funkcjonuje w dużych jądrach oocytów *Xenopus*. Białko Exp6 jest nieobecne w jądrze tych komórek – jego wprowadzenie powoduje eksport aktyny i destabilizację jądra. Dostarczenie drogą iniekcji do jądra *Xenopus* zarówno ludzkiej Exp6, jak i izoform α -, β - i γ -aktyny, a nawet aktyny z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, powoduje „usuwanie” wszystkich tych form aktyny z jądra, co świadczy o zdolności Exp6 do eksportu aktyny niezależnie od rodzaju izoformy [12,15].

Na podstawie aktualnych doniesień można przyjąć następujący, ogólny model transportu aktyny do jądra [16]. Kofilina, tworząc kompleksy z monomerami ADP-aktyny, transportuje je z cytoplazmy do wnętrza jądra. Dzięki wyższemu stężeniu ATP w jądrze (w porównaniu do cytoplazmy) następuje wymiana ADP na ATP w kompleksie aktyny z kofiliną i, w konsekwencji, osłabienie siły wiązania kompleksu. Rozdysocjowanie kompleksu następuje w wyniku fosforylacji kofiliny przez kinazę jądrową LIM. ATP-aktyna tworzy w jądrze krótkie polimery, niezbędne w procesach tam zachodzących. Wolne monomery aktyny, po spełnieniu swoich funkcji, mogą tworzyć kompleksy z profiliną, opuszczające jądro na drodze eksportu z udziałem białka Exp6.

ORGANIZACJA AKTYNY JĄDROWEJ

Ograniczona przestrzeń w jądrze wydaje się „wymuszać” organizację aktyny. Filamenty aktynowe, osiągające długość około 3–5 μm , są zbyt długie, aby zmieścić się w przestrzeni wewnątrzjądrowej [17,18]. Badania polimeryzacji aktyny

jądrowej *in vivo* w komórkach nowotworu szyjki macicy (HeLa), metodą FRAP (ang. *fluorescent recovery after photobleaching*) wykazały, że 20% całkowitej puli aktyny jądrowej prezentuje właściwości bardzo dynamicznej, spolimeryzowanej aktyny [19]. Poziom aktyny spolimeryzowanej w jądrze był nieco niższy niż w cytoplazmie. Aktyna występuje w jądrze w formie krótkich polimerów i oligomerów związanych ze strukturami jądrowymi, takimi jak błona jądrowa [19,20]. Porównanie poziomu aktyny filamentarnej (F), monomerycznej (G) i obliczenie stopnia spolimeryzowania aktyny wyrażonego stosunkiem F:G we frakcji cytoplazmatycznej, uzyskanej z homogenatów wątroby szczura i frakcji nukleoplazmatycznej wyizolowanej z oczyszczonych jąder wątroby szczura, wskazuje na niewielkie różnice tego parametru pomiędzy cytoplazmą a nukleoplazmą [21]. Uzyskane wyniki wskazały na około 5% poziom aktyny monomerycznej zarówno w cytoplazmie, jak i nukleoplazmie (w stosunku do aktyny całkowitej). Dane te uzyskano metodą pomiaru aktyny, jako inhibitora DNazy I z trzustki wołu, porównując poziom jednostek inhibitora w miligramie białka cytoplazmy i nukleoplazmy.

Organizacja aktyny jądrowej różni się w zależności od typu komórki i jej stanu fizjologicznego. Duże jądro oocytów *Xenopus* cechuje wysoki poziom aktyny, zorganizowanej w wyraźne, rozgałęzione filamenty, stabilizujące strukturę jądra [12]. Metodą powszechnie stosowaną w „obrazowaniu” filamentów aktyny jest znakowanie aktyny falloidyną skoniugowaną z różnymi znacznikami fluorescencyjnymi oraz obserwacje w mikroskopie elektronowym. Jednakże wizualizacja aktyny filamentarnej w jądrach komórek somatycznych takimi metodami nie powiodła się [22]. Może to wynikać z kilku powodów. W jądrze utrzymywany jest niski poziom aktyny, ściśle kontrolowany przez mechanizm eksportu [15], który zapobiega spontanicznemu tworzeniu się filamentów aktyny. Polimeryzację ogranicza także utrudniony dostęp do monomerów aktyny, związanych w kompleksach z ABPs. Dominują kompleksy aktyny z kofiliną [16]. ABPs mogą także zasłaniać miejsca wiązania falloidyny na filamentach aktyny [22,23]. Takim przykładem są filamenty „dekorowane” kofiliną, które nie wykazują powinowactwa do falloidyny [24]. Miejsca wiązania falloidyny mogą być niedostępne także ze względu na łączenie się monomerów aktyny w niekonwencjonalny sposób, zmieniający lokalnie strukturę filamentu [17]. Możliwe jest także, że aktyna w jądrze przybiera formę krótkich, niezwykle dynamicznych oligomerów, utrudniających jej wykrywanie za pomocą znakowanej fluorescencyjnie falloidyny [19,22].

W warunkach stresu, takiego jak szok cieplny [25], obecność dimetylosulfotlenku (DMSO) [26] czy obniżenie poziomu ATP [13,27], aktyna przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórki. Przemieszczenie aktyny do jądra w wyniku stresu, powoduje powstawanie parakrystalicznych skupisk (ang. *rod-like structures*) [28], które można zaobserwować omawianą wyżej metodą znakowania falloidyną. Skupiska te zidentyfikowano jako kompleksy aktyny z kofiliną (ang. *actin/cofilin rods*) [25]. Podobne agregaty tworzą się również w jądrach *Amoeba*, *Dictyostelium* i ludzkich komórek HeLa [26] w obecności DMSO i w mysich fibroblastach pod wpływem szoku cieplnego [25] oraz po dezorganizacji cytosz-

kieletu komórkowego w warunkach obniżonego poziomu ATP [13,27].

Dla poznania form w jakich znajduje się aktyna w jądrze, stworzono nowe przeciwciała, skierowane przeciwko „niekonwencjonalnym” formom aktyny, takim jak dimery aktyny, w których monomery połączone są ze sobą w odmienny od klasycznego sposób, czy wobec aktyny w kompleksie z innymi białkami np. profiliną [20,29].

Proces polimeryzacji aktyny w cytoplazmie zaczyna się od etapu tworzenia dimerów aktyny. Utworzony w pierwszej kolejności dimer LD [30] (ang. *lower dimer*), w którym podjednostki aktyny połączone są ze sobą poprzez reszty cystein 374, przekształca się następnie w dimer UD (ang. *upper dimer*), w którym monomery połączone są ze sobą poprzez reszty lizyny 191 jednej podjednostki z resztą cysteiny 374 drugiej podjednostki. W następnej fazie procesu polimeryzacji z dimerów UD utworzony zostaje filament aktynowy [31]. Dimery aktyny UD i LD migrują w elektroforezie w warunkach denaturujących z różną szybkością, tworząc „górną” i „dolną” prążek, stąd ich nazwa [30,31]. W niektórych przypadkach LD może być wbudowywany w rosnący filament aktynowy, zmieniając jego właściwości strukturalne. Zjawisko to ma znaczenie w regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego, np. w komórkach, których funkcja wymaga dużej ruchliwości [17]. Możliwe, że podobny mechanizm regulacji dynamiki filamentów aktynowych ma miejsce w jądrze komórki. Celem uzyskania dodatkowych informacji o właściwościach aktyny jądrowej, wyprodukowano monoklonalne przeciwciała skierowane wobec dimerów LD, które nazwano 1C7 [29]. Drugi typ uzyskanych przeciwciał monoklonalnych, nazwanych 2G2, jest skierowany przeciw kompleksowi aktyny z profiliną [32]. Reagują one z aktyną jądrową i cytoplazmatyczną [20,32]. Przeciwciała 1C7 rozpoznają także aktynę jądrową, ale obraz jej rozmieszczenia w jądrze jest odmienny od uzyskiwanego przy zastosowaniu przeciwciał 2G2. Może to świadczyć o odrębnych funkcjach tych dwóch form aktyny w jądrze [20,29]. Opisane przeciwciała, które rozpoznają „niekonwencjonalne” formy aktyny mogą dostarczyć nowych informacji o organizacji i funkcjach aktyny jądrowej.

Aktyna występuje w określonych obszarach jądra komórkowego. Jej rozmieszczenie odpowiada pełnionym funkcjom i zmienia się w zależności od aktywności transkrypcyjnej komórki. Wykorzystanie mikroskopu elektronowego do obserwacji rozmieszczenia aktyny w jądrach komórek HeLa, wskazuje na lokalizację aktyny głównie w obszarze zdekondensowanej chromatyny oraz w jąderkach [33]. Jąderko składa się z trzech morfologicznie różnych obszarów. Centra fibrylarne (FCs, ang. *fibrillar centers*), gdzie znajdują się rybosomalne RNA, polimeraza RNA i czynniki transkrypcyjne, otoczone są gęstym obszarem fibrylarnym (DFC, ang. *dense fibrillar component*). Geny ulegające transkrypcji znajdują się na granicy tych dwóch obszarów. Trzeci, wyróżniany morfologicznie w jąderku obszar ziarnisty (GC, ang. *granular component*) jest miejscem tworzenia się rybosomów. Aktyna znajduje się we wszystkich trzech wymienionych obszarach jąderka [33].

W limfocytach ludzkich, podobnie jak w komórkach HeLa, aktyna znajduje się głównie w obszarze zdekondensowanej chromatyny, na granicy z heterochromatyną oraz w centrach fibrylarnych jąderka [33]. Po stymulacji procesu transkrypcji, aktyna jest nadal widoczna w centrach fibrylarnych, obserwuje się akumulację aktyny i miozyny jądrowej I również w gęstym obszarze fibrylarnym i w obszarze ziarnistym jąderka. W jądrze, oprócz opisanych zmian, widzimy także przemieszczanie aktyny i miozyny jądrowej I z obszaru skondensowanej chromatyny do obszaru aktywnej transkrypcyjnie, zdekondensowanej chromatyny [34-36]. Zarówno aktyna, jak i miozyna jądrowa I są obecne w miejscach transkrypcji [34]. Mechanizm tego procesu przedstawiono schematycznie na rycinie 1. Więcej o roli miozyny I i innych miozyn w jądrze komórkowym – w artykule Sobczak i wsp. w tym numerze „Postępów biochemii”.

Niewiele uwagi poświęcono dotychczas występowaniu i identyfikacji izoform aktyny w jądrze. Na podstawie sekwencji aminokwasowej, zidentyfikowano w jądrze komórkowym jedynie β -aktynę. Stanowi ona podjednostkę kompleksu remodelującego chromatynę [37] i uczestniczy w transkrypcji, wchodząc w skład kompleksu polimerazy RNA I, II i III [38-40]. Specyficzne monoklonalne przeciwciała, skierowane przeciw β -cytoplazmatycznej i α -szkieletowej aktynie pozwoliły na identyfikację tych izoform w jądrach mysich mioblastów. Występują one w kompleksie z emeryną w otocze jądrowej [41]. Nasze własne badania metodą Western Blott, wykazały obecność cytoplazmatycznych izoform β i γ aktyny w nukleoplazmie, wyizolowanej z jąder komórek ludzkiego czerniaka A375 oraz mysich fibroblastów 3T3. Zidentyfikowano je również w mikroskopie fluorescencyjnym, wykorzystując odpowiednie przeciwciała [42].

BIAŁKA ODDZIAŁUJĄCE Z AKTYNĄ OBECNE W JĄDRZE

Stan spolimeryzowania aktyny jądrowej, podobnie jak ma to miejsce w cytoplazmie, jest kontrolowany przez oddziałujące z nią białka regulatorowe (ABPs), posiadające domeny wiążące aktynę (ABD, ang. *actin-binding domains*). Część z tych białek jest stale obecna w jądrze, inne przemieszczają się tam z cytoplazmy w odpowiedzi na zmiany w środowisku komórki [43,44].

Wiele z białek oddziałujących z aktyną filamentarną posiada domeny wiążące aktynę, złożone z dwóch regionów CH (ang. *calponin homology*). Domena CH występuje w białkach cytoszkieletowych i białkach biorących udział w przekazywaniu sygnałów w cytoplazmie. Białka posiadające takie domeny wykazano także w jądrze komórki, są to: spektryna [33,45], α -aktynina [33,46], dystrofina [47] i filamina A [33,48]. Białka wiążące F-aktynę, występujące w jądrze, prawdopodobnie spełniają inne funkcje niż w cytoplazmie. Białka te lub ich fragmenty, powstałe w wyniku degradacji proteolitycznej, krążą pomiędzy cytoplazmą a jądrem. Przykład stanowi C-końcowy fragment filaminy A, który może przemieszczać się z cytoplazmy do jądra wraz z receptorem androgenu, scalając oba te obszary subkomórkowe [49].

W jądrze występują także znane białka wiążące monomery aktyny, takie jak profilina [15,43] i tymozyna- β 4 [18,20,43], białka regulujące polimeryzację aktyny, takie jak CapG [50,51] i kofilina [16,52,53] oraz białka z rodziny żelsolin: superwillina, „flightless I” oraz żelsolina [54]. Rola niektórych ABPs w jądrze, takich jak N-WASP i Arp2/3 [55] oraz miozyna [36], wiąże się z procesem transkrypcji. Wykryto też obecność całego szeregu innych ABPs, takich jak białka c-Abl [56], tropomiozyna [33,57], DNaza I [58,59], miopodyna i plastyna [43].

Niektóre z ABPs zawierają sygnał lokalizacji jądrowej, inne są przenoszone do jądra w wyniku zmian w środowisku komórki [43]. Profilina i tymozyna- β 4 stanowią przykład białek na tyle małych, że mogą wnikać do jądra na zasadzie biernej dyfuzji. Natomiast białko CapG i kofilina są przenoszone do jądra w sposób kontrolowany, zależny od fosforylacji [60]. Białko CapG przemieszcza się do jądra w formie ufosforylowanej, a kofilina po defosforylacji [60].

Na szczególną uwagę zasługują ABPs, obecne jedynie w jądrze komórkowym, takie jak białka kompleksu remodelującego chromatynę [37], białka „aparatu” transkrypcyjnego [61] oraz hnRNP U (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*). Jest to jeden z kompleksów rybonukleoproteinowych, zaangażowanych w transport, dojrzewanie oraz zapewnienie stabilności pre-mRNA [62]. W jądrze aktyna wiąże się także z kompleksami laminy A [63], emeryny [64] i nespryny [65]. Wszystkie te jądrowe białka wiążące aktynę utrzymują ją w odpowiedniej konformacji i organizacji.

W jądrze komórkowym, oprócz aktyny oraz ABPs, znajdują się także białka podobne do aktyny (Arps, ang. *actin related proteins*), sklasyfikowane pod względem identyczności sekwencji i podobieństwa strukturalnego do aktyny. Arps mogą oddziaływać z aktyną i wpływać na jej konformację, np. wspomniany wcześniej Arp2/3 jest czynnikiem stymulującym proces polimeryzacji aktyny [66]. Arps mogą także pełnić w jądrze komórkowym podobne funkcje jak aktyna, np. uczestniczyć w regulacji właściwości chromatyny [66].

FUNKCJE AKTYNY JĄDROWEJ

Funkcje aktyny jądrowej, podobnie jak cytoplazmatycznej, wiążą się bezpośrednio z jej zdolnością do polimeryzacji, oddziaływania z ABPs oraz z innymi strukturami jądra.

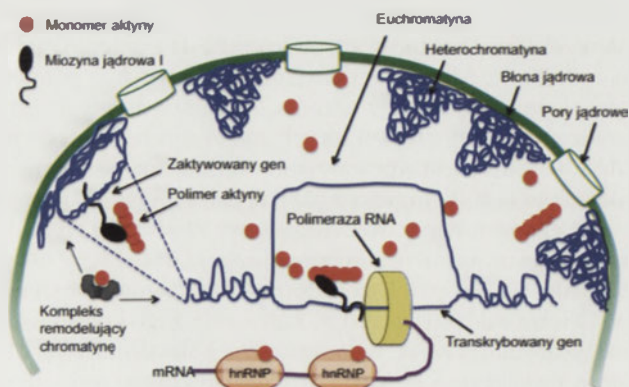
Aktyna uczestniczy w tworzeniu struktur podtrzymujących architekturę jądra. Aktyna, α II-spektryna i inne białka, tworzą z emeryną kompleks w wewnętrznej błonie jądrowej. Brak funkcjonalnego kompleksu objawia się zmianami w kształcie otoczki jądrowej, tak jak ma to miejsce w dystrofii mięśniowej Emery-Dreifuss (EDMD) [67]. Dystrofia ta jest spowodowana mutacją w genie emeryny, białka posiadającego zarówno domeny wiążące aktynę, jak i laminy [67]. W otoczce jądrowej mysich mioblastów emeryna tworzy kompleks z izoformami aktyny: β -cytoplazmatyczną i α -szkieletową. Podczas miogenezy wzrasta poziom kompleksu aktyny z emeryną, co wskazuje na równoległą regulację emeryny, aktyny i lamin podczas różnicowania się mioblastów w miotubule [41].

Aktyna monomeryczna łączy się z DNazą I w stosunku 1:1, tworząc kompleks, w którym aktyna traci zdolność do polimeryzacji, a DNaza I zdolność do degradacji DNA [58,68]. Obecność w jądrze DNazy I i aktyny sugeruje powstawanie naturalnego kompleksu DNaza-aktyna, chroniącego integralność komórkowego DNA [21].

Na uwagę zasługuje udział aktyny jądrowej w procesie transkrypcji. Aktyna uczestniczy we wczesnych etapach tego procesu i oddziałuje bezpośrednio z aparatem transkrypcyjnym [69]. Jako element kompleksów remodelujących chromatynę, wpływa także na regulację struktury chromatyny [70].

Aktyna wiąże się z polymerazą RNA I [40], polymerazą RNA II [38] oraz polymerazą RNA III [39]. Wykazano, że dla funkcjonowania polymeraz zasadnicze znaczenie ma obecna w jądrze β -aktyna. Stanowi ona integralną część tworzącego się kompleksu i jest konieczna dla prawidłowego przebiegu procesu transkrypcji. Monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko β -aktynie redukują aktywność wszystkich trzech polymeraz [38,40,69].

Proces transkrypcji rozpoczyna się w heterochromatynie, gdzie następuje aktywacja transkrybowanego miejsca. Po rozluźnieniu struktury chromatyny, zaktywowany fragment chromosomu jest przemieszczany z rejonu podbłonowego w rejon euchromatyny, gdzie rozpoczyna się transkrypcja. Przemieszczanie to jest możliwe dzięki oddziaływaniu aktyny z miozyną – białek odpowiedzialnych za powstawanie ruchu w komórce. Uważa się, że miozyna jądrowa I (NMI, ang. *nuclear myosin I*) porusza się wzdłuż krótkich, dynamicznych polimerów aktyny (Ryc. 1) [35,36]. Aktywność transkrypcyjna polymerazy RNA II jest kontrolowana przez polimeryzację aktyny [55]. Białko nakrywające końce filamentów aktyny, należące do rodziny żelsolin, CapG [51] oraz białka N-WASP i Arp2/3 [55] kontrolują polimeryzację aktyny.



Rycina 1. Udział aktyny i miozyny w procesie transkrypcji. Aktyna stanowi składnik kompleksów remodelujących chromatynę w strukturę odpowiednią dla procesu transkrypcji. Aktyna i miozyna jądrowa I (NMI) biorą udział w przemieszczaniu się obszarów chromatyny wewnątrz jądra. NMI kieruje się do miejsca aktywacji procesu transkrypcji, w rejon heterochromatyny. W oparciu o oddziaływanie aktyny z NMI aktywny transkrypcyjnie region chromosomu przemieszcza się do wnętrza jądra, gdzie formuje się aparat transkrypcyjny. NMI porusza się prawdopodobnie wzdłuż krótkich, dynamicznych polimerów aktyny. Aktyna i NMI oddziałują z polymerazą RNA. Aktyna, poprzez oddziaływanie z białkiem hnRNP, przylączyła się do rosnącego łańcucha mRNA (opracowano na podstawie [36,73,81]).

Zarówno aktyna, jak i miozyna jądrowa I biorą udział w transkrypcji poprzez oddziaływanie z polimerazą RNA I [40,71]. Wpływ aktyny na strukturę chromatyny jest też wynikiem jej oddziaływania z enzymami modyfikującymi histony [44].

Rearanżację chromatyny, poprzedzającą transkrypcję, kontrolują w komórce oddziaływania lamin, białek otoczki jądrowej i kompleksy remodelujące chromatynę. Kompleksy te, złożone z wielu białek, których aktywność zależy od obecności ATP, wpływają na oddziaływanie DNA z histonami [72]. Jednym z takich kompleksów jest SWI/SNF (ang. *switch malting type/sucrose non-fermenting*), zawierający w swojej budowie β -aktynę. Kompleks SWI/SNF uczestniczy w regulacji genów kodujących białka adhezyjne oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej [37,72].

Wpływ aktyny jądrowej na strukturę chromatyny jest też wynikiem jej oddziaływania z białkiem hrp65, które łączy się z acetylotransferazą histonu H3. Kompleks aktyny z pre-mRNP przesuwają się wzdłuż aktywnego genu i przekształcają chromatynę w strukturę odpowiednią do transkrypcji. Zniszczenie oddziaływania aktyny z białkiem hrp65 uwalnia acetylotransferazę, co wpływa na obniżenie poziomu acetylacji histonów i zatrzymanie procesu transkrypcji [73,74].

Aktyna krąży między cytoplazmą a jądrem komórki, obie pule są ze sobą połączone. Przypisuje się jej rolę cząsteczki sygnałowej, jednoczącej cytoplazmatyczny i jądrowy szlak przekazywania informacji. Zmiany w stopniu spolimeryzowania aktyny cytoplazmatycznej, spowodowane zaburzeniami równowagi w komórce, wpływają na poziom aktyny jądrowej. Poziom aktyny w jądrze jest ściśle kontrolowany, jego zmiany mogą być sygnałem dla genomu komórki. Taki mechanizm ma miejsce w przypadku szlaku sygnałowego w odpowiedzi na stymulację komórek surowicą *in vitro*. Aktyna jądrowa bierze udział w regulacji białka MAL (ang. *myocardin-related transcription factor-A*), które jest koaktywatorem czynnika aktywującego transkrypcję w odpowiedzi na stymulację komórek surowicą (SRF, ang. *serum response factor*). Białko MAL przemieszcza się swobodnie pomiędzy cytoplazmą a jądrem w komórkach niestymulowanych surowicą, czyli takich, w których nie zachodzi transkrypcja. MAL w jądrze jest utrzymywany na niskim poziomie, ponieważ tworzy kompleks z aktyną jądrową i w takiej postaci jest eksportowany do cytoplazmy. W wyniku stymulacji komórek surowicą, następuje polimeryzacja aktyny w cytoplazmie, a więc zwiększone zapotrzebowanie na monomery. Obniża się poziom aktyny jądrowej, czego konsekwencją jest akumulacja MAL w jądrze, co z kolei umożliwia aktywację transkrypcji genów [75]. Mechanizm ten wskazuje jak zwiększenie stopnia spolimeryzowania aktyny w cytoplazmie, prowadzące do obniżenia ilości aktyny w jądrze, staje się sygnałem aktywującym proces transkrypcji.

We wszystkich opisanych powyżej procesach aktyna pełni funkcję regulatora tworzenia i aktywności kompleksów białkowych. Pośredniczy w dynamicznych oddziaływaniach białko-białko. Działa jako allosteryczny regulator

wielocząsteczkowych kompleksów, jakim jest także aparat transkrypcyjny [69].

UWAGI KOŃCOWE

Podstawowe właściwości aktyny cytoplazmatycznej i jądrowej, takie jak zdolność do polimeryzacji i jej regulacja przez ABPs są wspólne dla aktyny w obu tych obszarach subkomórkowych. Monomery aktyny przemieszczają się pomiędzy cytoplazmą a jądrem, scalając oba te obszary [76]. Prace ostatnich lat wskazują jednak na odmienną organizację aktyny w jądrze, to jest na obecność jedynie monomerów, oligomerów i krótkich polimerów, co wynika z ograniczonej przestrzeni wewnątrz jądra [77]. Wymienione formy aktyny uczestniczą w procesach zachodzących w jądrze, takich jak organizacja struktury jądra, rearanżacja chromatyny, proces transkrypcji oraz przekazywanie sygnałów. Część z tych procesów wymaga powstania ruchu, czyli współdziałania aktyny z miozyną, podobnie jak ma to miejsce w cytoplazmie. Aktyna w jądrze może odgrywać rolę allosterycznego regulatora wielocząsteczkowych kompleksów białkowych.

Niewiele wiadomo o obecnych w jądrze izoformach aktyny i ich roli w stanach patologicznych komórki, szczególnie w patologii nowotworowej. Komórki nowotworowe, w odróżnieniu od normalnych, wykazują zmienioną morfologię jądra. Wiele typów nowotworów charakteryzuje się też odmienną liczbą jąder i chromosomów. Odpowiedź mechanizmów regulujących transkrypcję, zwłaszcza związanych z wrażliwością komórek na radio- czy chemioterapię, jest istotnym czynnikiem prognostycznym w leczeniu danego typu nowotworu [78]. Zmiany poziomu aktyny i jej izoform w jądrze mogą mieć znaczenie diagnostyczne. Zależność wzrostu poziomu β -aktyny od wzrostu współczynnika inwazyjności komórek nowotworowych, wskazuje na rolę tej izoformy w patologii nowotworowej [4,79,80]. Badania zmian ilościowych i jakościowych izoform aktyny w jądrze i cytoplazmie komórek nowotworowych w porównaniu z normalnymi, winny wnieść istotne informacje dla zrozumienia molekularnego mechanizmu takich procesów, jak wzrost nowotworu czy jego zdolności do tworzenia przerzutów. Wyniki tych badań mogą uczynić z izoform aktyny (szczególnie izoformy β) białko docelowe dla projektowania leków.

PIŚMIENNICTWO

1. Shterline P, Clayton J, Sparrow J (1999) Protein profile. Actin, Oxford University Press
2. Vandekerckhove J, Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the aminoacids sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Biol Chem* 126: 783-802
3. Nowak D, Malicka-Błaszkiwicz M (1999) Izoforny aktyny-zróźnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych. *Postepy Biochem* 45: 261-269
4. Nowak D, Skwarek-Maruszewska A, Zemanek-Zboch M, Malicka-Błaszkiwicz M (2005) Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Acta Biochim Polon* 52: 461-468
5. Khaitlina SY (2007) Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Cell Tissue Biol* 4: 293-304

6. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83: 433-473
7. Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C (2004) The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1890-1909
8. Chhabra ES, Higgs HN (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9: 1110-1121
9. Clark TG, Merriam RW (1978) Actin in *Xenopus oocytes*. *J Cell Biol* 47: 427-438
10. Pollard TD, Earnshaw WC (2004) *Cell Biology*. Saunders
11. Terry LJ, Shows EB, Wente SR (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318: 1412-1416
12. Bohnsack MT, Stüven T, Kuhn C, Cordes VC, Görlich D (2006) A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus oocytes*. *Nat Cell Biol* 8: 257-263
13. Pendleton A, Pope B, Weeds A, Koffer A (2003) Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem* 278: 14394-14400
14. Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E (1998) Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J* 17: 1635-1641
15. Stüven T, Hartmann E, Görlich D (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J* 22: 5928-5940
16. Chhabra D, dos Remedios CG (2005) Cofilin, actin and their complex observed *in vivo* using fluorescence resonance energy transfer. *Biophys J* 89: 1902-1908
17. Steinmetz MO, Goldie KN, Aebi U (1997) A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J Cell Biol* 138: 559-574
18. Blessing CA, Ugrinova GT, Goodson HV (2004) Actin and ARPs: action in the nucleus. *Trends Cell Biol* 14: 435-442
19. McDonald D, Carrero G, Andrin C, de Vries G, Hendzel MJ (2006) Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 172: 541-552
20. Jockusch BM, Schoenenberger CA, Stetefeld J, Aebi U (2006) Tracking down the different forms of nuclear actin. *Trends Cell Biol* 16: 391-396
21. Malicka-Blaszkiewicz M (1990) Rat liver DNase I-like activity and its interaction with actin. *Z Naturforsch [C]* 45: 1165-1170
22. Pederson T, Aebi U (2002) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* 140: 3-9
23. Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 410-415
24. McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* 138: 771-781
25. Nishida E, Iida K, Yonezawa N, Koyasu S, Yahara I, Sakai H (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5262-5266
26. Fukui Y, Katsumaru H (1979) Nuclear actin bundles in *Amoeba*, *Dictyostelium* and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide. *Exp Cell Res* 120: 451-455
27. Domazetovska A, Ilkovski B, Cooper ST, Ghoddusi M, Hardeman EC, Minamide LS, Gunning PW, Bamberg JR, North KN (2007) Mechanisms underlying intranuclear rod formation. *Brain* 130: 3275-3284
28. Iida K, Iida H, Yahara I (1986) Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 165: 207-215
29. Schoenenberger CA, Buchmeier S, Boerries M, Sütterlin R, Aebi U, Jockusch BM (2005) Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. *J Struct Biol* 152: 157-168
30. Mockrin SC, Korn ED (1981) Isolation and characterization of covalently cross-linked actin dimer. *J Biol Chem* 256: 8228-8233
31. Schoenenberger CA, Bischler N, Fahrenkrog B, Aebi U (2002) Actin's propensity for dynamic filament patterning. *FEBS Lett* 529: 27-33
32. Gonsior SM, Platz S, Buchmeier S, Scheer U, Jockusch BM, Hinssen H (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* 112: 797-809
33. Dingová H, Fukalová J, Maninová M, Philimonenko VV, Hozák P (2009) Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol* 131: 425-434
34. Kyselá K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janáček J, Kahle M, Hozák P (2005) Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol* 124: 347-358
35. Chuang CH, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle P, Belmont AS (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol* 16: 825-831
36. Hofmann WA, Johnson T, Klappczynski M, Fan JL, de Lanerolle P (2006) From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I. *Biochem Cell Biol* 84: 418-426
37. Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Crabtree GR (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95: 625-636
38. Hofmann WA, Stojilkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kyselá K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozák P, de Lanerolle P (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 6: 1094-1101
39. Hu P, Wu S, Hernandez N (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 18: 3010-3015
40. Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingová H, Kyselá K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozák P, Grummt I (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6: 1165-1172
41. Maraldi NM, Lattanzi G, Marmioli S, Squarzone S, Manzoli FA (2004) New roles for lamins, nuclear envelope proteins and actin in the nucleus. *Adv Enzyme Regul* 44: 155-172
42. Migocka M, Malicka-Blaszkiewicz M (2008) Actin isoforms in the nucleus of human melanoma A375 cells. *Acta Biochim Pol* 55: 29
43. Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert T, Vandekerckhove J, De Corte V (2005) Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. *Traffic* 6: 847-857
44. Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR (2002) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 71: 755-781
45. Bachs O, Lanini L, Serratos J, Coll MJ, Bastos R, Algué R, Rius E, Carafoli E (1990) Calmodulin-binding proteins in the nuclei of quiescent and proliferatively activated rat liver cells. *J Biol Chem* 265: 18595-18600
46. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S (1998) Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 140: 1383-1393
47. Fuentes-Mera L, Rodríguez-Muñoz R, González-Ramírez R, García-Sierra F, González E, Mornet D, Cisneros B (2006) Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associated with the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 312: 3023-3035
48. Meng X, Yuan Y, Maestas A, Shen Z (2004) Recovery from DNA damage-induced G2 arrest requires actin-binding protein filamin-A/actin-binding protein 280. *J Biol Chem* 279: 6098-6105
49. Uribe R, Jay D (2009) A review of actin binding proteins: new perspectives. *Mol Biol Rep* 36: 121-125
50. Onoda K, Yu FX, Yin HL (1993) gCap39 is a nuclear and cytoplasmic protein. *Cell Motil Cytoskel* 26: 227-238
51. Hubert T, Van Impe K, Vandekerckhove J, Gettemans J (2008) The F-actin filament capping protein CapG is a bona fide nucleolar protein. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 699-704

52. Nebl G, Meuer SC, Samstag Y (1996) Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem* 271: 26276-26280
53. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393: 805-809
54. Archer SK, Claudianos C, Campbell HD (2005) Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators. *Bioessays* 27: 388-396
55. Yoo Y, Wu X, Guan JL (2007) A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J Biol Chem* 282: 7616-1623
56. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7457-7462
57. Zeng XL, Jiao MD, Xing M, Wang XG, Hao S (1999) Tropomyosin is localized in the nuclear matrix and chromosome scaffold of *Physarum polycephalum*. *Cell Res* 9: 61-69
58. Lazarides E, Lindberg U (1974) Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4742-4746
59. Rauch F, Polzar B, Stephan H, Zanotti S, Paddenberg R, Mannherz HG (1997) Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol* 137: 909-923
60. Rando OJ, Zhao K, Crabtree GR (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* 10: 92-97
61. Franke WW (2004) Actin's many actions start at the genes. *Nat Cell Biol* 6: 1013-1014
62. Kukalev A, Nord Y, Palmberg K, Bergman T, Percipalle P (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 12: 238-244
63. Sasseville AM, Langelier Y (1998) *In vitro* interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. *FEBS Lett* 425: 485-489
64. Lattanzi G, Cenni V, Marmiroli S, Capanni C, Mattioli E, Merlini L, Squarzoni S, Maraldi NM (2003) Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 764-770
65. Zhang Q, Ragnauth C, Greener MJ, Shanahan CM, Roberts RG (2002) The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* 80: 473-481
66. Chen M, Shen X (2007) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 19: 326-330
67. Holaska JM, Kowalski AK, Wilson KL (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol* 2: 1354-1362
68. Malicka-Błaszkiwicz M, Roth JS (1983) Evidence for the presence of DNase-actin complex in L1210 leukemia cells. *FEBS Lett* 153: 235-239
69. Percipalle P, Visa N (2006) Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol* 172: 967-971
70. Fedorova E, Zink D (2008) Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2174-2184
71. Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I (2008) Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 22: 322-330
72. Farrants AK (2008) Chromatin remodelling and actin organisation. *FEBS Lett* 582: 2041-2050
73. Sjölander M, Björk P, Söderberg E, Sabri N, Farrants AK, Visa N (2005) The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes. *Genes Dev* 19: 1871-1884
74. Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16: 191-196
75. Vartiainen MK (2008) Nuclear actin dynamics – from form to function. *FEBS Lett* 582: 2033-2040
76. Schleicher M, Jockusch BM (2008) Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochem Cell Biol* 129: 695-704
77. Gieni RS, Hendzel MJ (2009) Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem Cell Biol* 87: 283-306
78. Zaidi SK, Young DW, Javed A, Pratap J, Montecino M, van Wijnen A, Lian JB, Stein JL, Stein GS (2007) Nuclear microenvironments in biological control and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 454-463
79. Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P, Leclerc N, Nabi IR (1998) Increased β -actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* 58: 1631-1635
80. Popow A, Nowak D, Malicka-Błaszkiwicz M (2006) Actin cytoskeleton and β -actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells. *J Physiol Pharmacol* 57: 111-123
81. Vieu E, Hernandez N (2006) Actin's latest act: polymerizing to facilitate transcription? *Nat Cell Biol* 8: 650-651

Nuclear actin

Marta Migocka-Patrzałek[✉], Maria Malicka-Błaszkiwicz

Department of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 63/77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: migocka@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: nuclear actin, ABPs, transcription, actin isoforms, β -actin

ABSTRACT

Actin is multifunctional protein occurring in all eukaryotic cells. It appears in cytoplasm and in nucleus. Organization and functions of nuclear actin are not well recognized to distinguish from cytoplasmic actin. Actin monomers are shuttling between cytoplasm and nucleus, integrating both of those compartments. Monomers, oligomers and short polymers are observed as the result of the limited space within the nucleus. Actin participates in nuclear structure organization, chromatin remodeling, transcription and signal transduction. Nuclear actin level, organization and functions are under control of ABPs (similarly as it takes place in cytoplasm), including some proteins appearing only in the nucleus.

Miozyny w jądrze komórkowym

STRESZCZENIE

Miozyny, zależne od aktywnych motory molekularne są obecne niemal we wszystkich komórkach eukariotycznych, gdzie zaangażowane są w szereg funkcji komórkowych, takich jak skurcz mięśni, migracja i adhezja komórkowa, transport wewnątrzkomórkowy, endocytoza czy sekrecja. W ciągu ostatniej dekady ukazało się wiele prac o obecności miozyn oraz aktywnych i oddziałujących z nią białek w jądrze komórkowym. Dotychczas stwierdzono tam obecność jądrowej izoformy miozyny IC (NMI), miozyny VI, miozyny XVIB i miozyny XVIII B. Zgromadzone dane wskazują na udział NMI i miozyny VI w procesie transkrypcji i, być może, w transporcie wewnątrzjądrowym. Lektura dotychczasowych doniesień, podsumowanie której przedstawiono w niniejszej pracy, niewątpliwie wskazuje, że pełne zrozumienie roli miozyn w jądrze i mechanizmów jej tam działania wymaga dalszych badań.

WPROWADZENIE

Miozyny tworzą ogromną nadrodzinę zależnych od aktywnych białek motorycznych, które wykorzystują energię uzyskaną z hydrolizy ATP do wytworzenia siły i ruchu. Miozyny utożsamiane są przede wszystkim z aparatem skurczu mięśnia, gdzie tworzą filamenty grube oddziałujące z zawierającymi aktywnymi filamentami cienkimi [1]. Na początku lat 70. Pollard i Korn pokazali, że w jednokomórkowym organizmie *Acanthamoeba castellanii* występuje odmienne od miozyn mięśniowych białko, nie tworzące filamentów, nazwane miozyną I [2]. Początkowo badacze zajmujący się skurczem mięśni nie dowierzali tym doniesieniom, dopiero zsekwencjonowanie genu miozyny I i wykazanie obecności w amebach miozyny podobnej strukturalnie i funkcjonalnie do miozyn mięśniowych, kodowanej przez osobny gen zmieniło ich poglądy [3]. Zapoczątkowało to nowy okres rozwoju wiedzy na temat miozyn. Obecnie znanych jest ponad 250 sekwencji ciężkich łańcuchów miozyn, które na podstawie różnic w sekwencji domeny motorycznej podzielono na ponad 30 klas/rodzin. Wszystkie dotychczas poznane miozyny zbudowane są według podobnego schematu, a mianowicie z N-końcowej globularnej domeny motorycznej, w której znajdują się miejsca wiązania i hydrolizy ATP oraz miejsce wiązania aktywności; helikalnej szyjki – złożonej z jednego lub więcej motywów IQ, które stanowią miejsce wiązania łańcuchów lekkich; oraz C-końcowej pałeczki – najbardziej zróżnicowanej domeny w cząsteczce miozyn. Łańcuchami lekkimi są z reguły specyficzne białka o masie cząsteczkowej 16–25 kDa lub cząsteczki kalmoduliny. Miozyny podobne strukturalnie i funkcjonalnie do miozyn mięśniowych tworzą rodzinę II i zwane są również miozynami konwencjonalnymi. Pozostałe rodziny miozyn, numerowane kolejno w miarę ich odkrywania, to miozyny niekonwencjonalne. Miozyny występują praktycznie we wszystkich organizmach eukariotycznych [4]. I chociaż do tej pory funkcje większości nowoodkrytych miozyn pozostają niewyjaśnione, to wiadomo, że zaangażowane są one niemal we wszystkich procesach, takich jak: migracja [5], adhezja komórkowa [6], transport organelli komórkowych i mRNA [7,8], endocytoza [9], sekrecja [10] czy podziały komórkowe [11]. Kolejnym przełomem w badaniach nad tą grupą białek motorycznych było odkrycie w 1997 r. jądrowej izoformy miozyny I [12]. Po ponad 10. latach wiemy, iż w jądrze poza miozyną I występują także miozyny VI, XVI i XVIII, wciąż jednak nie znamy mechanizmów funkcjonowania tych białek motorycznych w tej największej organelli komórkowej. Ponadto, poza miozynami w jądrze obecna jest aktywna i cały szereg białek z nią oddziałujących, o czym informuje praca Migockiej-Patrzałek i Malickiej-Błaszkiwicz w tym numerze „Postępów Biochemii”. Niniejsza praca ma za zadanie przybliżenie stanu wiedzy o roli miozyn w jądrze.

MIOZYNA I

Miozyna I to najwcześniej odkryta miozyna niekonwencjonalna [2]. Pierwotnie wyizolowano ją z *Acanthamoeba castellanii*, więc sądzono, że podobne białka występują tylko u pierwotniaków; szybko jednak zweryfikowano ten pogląd.

Magdalena Sobczak

Łukasz Majewski

Maria Jolanta Rędownicz[✉]

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

[✉]Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 24 56, faks: (022) 822 53 42, e-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 5 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: miozyny, transkrypcja, jądro komórkowe

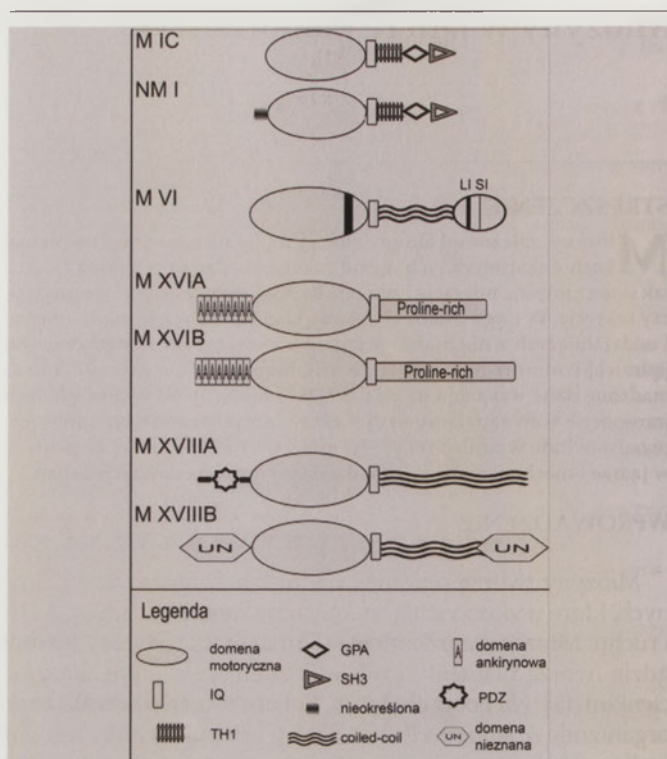
Podziękowanie: Praca powstała w ramach działania Sieci Naukowej: Mechanizmy Ruchów Komórkowych Mobilitas.pl

Dzisiaj znamy ponad 30 izoform miozyny I obecnych u zwierząt, pierwotniaków i grzybów, przy czym u człowieka znaleziono osiem z nich [13]. Miozyna ta została oznaczona numerem I, ponieważ w przeciwieństwie do miozyny mięśniowej składa się tylko z jednego łańcucha ciężkiego, nie tworzy więc filamentów, lecz funkcjonuje w formie monomerycznej.

Łańcuchy ciężkie miozyn I mają masę 110-140 kDa, a ich cechą charakterystyczną jest brak w domenie motorycznej N-końcowego fragmentu o długości ok. 80 reszt aminokwasowych (Ryc. 1). Szyjka obejmuje od jednego do sześciu motywów IQ, najczęściej wiążących kalmodulinę. W obrębie pałeczki miozyny I zawierają rejon bogaty w zasadowe reszty aminokwasowe, nazywany TH1 (ang. *tail homology 1*), który jest odpowiedzialny za oddziaływanie z fosfolipidami i wiązanie błon [14]. W ogonku można też odnaleźć ok. 100-aminokwasowy segment homologiczny do domeny plekstrynowej [15]. Na podstawie różnic w sekwencji aminokwasowej domeny motorycznej, ilości motywów IQ oraz długości i budowy ogonka, białka te dzieli się na cztery grupy. Miozyny I należące do podrodziny tzw. „ameboidalnej” zawierają w pałeczce również domenę bogatą w glicynę, prolinę i alaninę (domenę GPA), zwaną także domeną TH2 (ang. *tail homology 2*) i tworzącą drugie, niezależne od nukleotydu, miejsce wiązania aktyny, oraz domenę SH3, nazywaną niekiedy domeną TH3 (ang. *tail homology 3*), występującą w wielu białkach cytoszkieletu i prawdopodobnie uczestniczącą w oddziaływaniach białko-białko. Regulacja aktywności miozyny I zachodzi poprzez fosforylację reszt seryny lub treoniny mieszczących się w domenie motorycznej lub przez wiązanie jonów wapnia do łańcuchów lekkich [16].

Pomimo wielu prac, rola miozyn I w komórce nadal pozostaje słabo poznana, być może ze względu na trudności w identyfikacji specyficznych partnerów, z którymi białko to oddziałuje oraz w utworzeniu zwierząt transgenicznych z wyciszonym (ang. *knockout*) jej genem. Przyczyną tego najczęściej jest obecność kilku miozyn I w danym organizmie i/lub komórce. Po raz pierwszy przejmowanie funkcji jednej izoformy miozyny I przez inną zostało pokazane w komórkach nabłonka jelita myszy, gdzie przy braku miozyny Ia zostaje ona zastąpiona miozyną Id, której synteza wzrasta [17]. Miozyny I występują w bogatych w aktywną strukturach korykalnych, takich jak filopodia, lamellipodia, mikrodomeny błonowe oraz w krawędzi wiodącej komórki. Uważa się, że białka te pełnią istotną funkcję w transporcie organelli i błon, formowaniu pseudopodiów, chemotaksji, a także w utrzymywaniu struktury i dynamiki cytoszkieletu aktynowego i struktur podbłonowych [16]. U niższych eukariontów wykazano, że miozyny klasy I są zaangażowane w aktywację kompleksu Arp2/3 i tworzenie rozgałęzionej sieci aktynowej [18].

Unikalną izoformę miozyny I zidentyfikowano w jądrze komórkowym [12] i nazwano jądrową miozyną I (NMI, ang. *nuclear myosin I*). Różni się ona od cytoplazmatycznej miozyny Ic dodatkową złożoną z 16 reszt aminokwasowych wstawką na N-końcu białka (Ryc. 1; [19]). Wstawka ta jest niezbędna dla jądrowej lokalizacji NMI, to znaczy dla jej transportu lub akumulacji w jądrze, a usunięcie jej zmienia lokalizację białka na wyłącznie cytoplazmatyczną. Sekwen-



Rycina 1. Schemat budowy miozyn występujących w jądrze komórkowym. IQ, szyjka miozyny; TH1, domena pałeczki miozyny I wiążąca lipidy; GPA, dodatkowe miejsce wiązania aktyny w pałeczce miozyny; SH3, domena homologiczna do kinazy Src; coiled-coil, domeny umożliwiające tworzenie superhelisy; PDZ, domena PDZ; SI, mała wstawka; LI, duża wstawka.

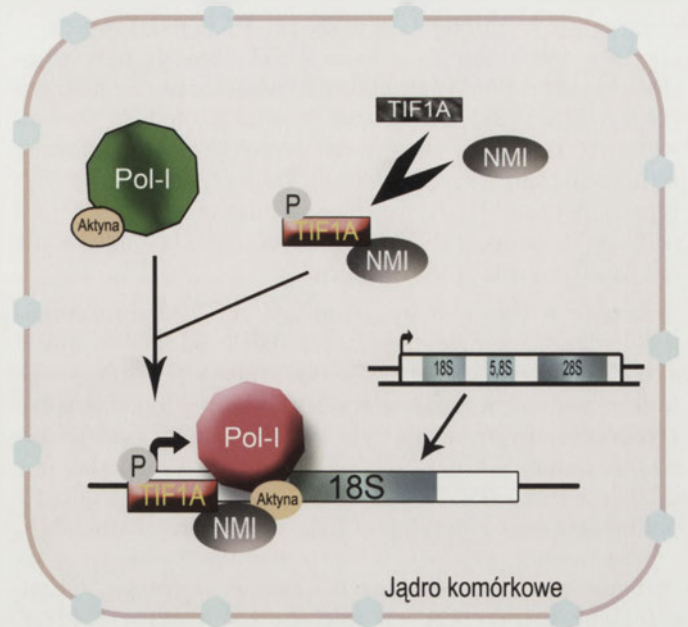
cja wstawki nie przypomina jednak żadnego ze znanych sygnałów lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*). Jądrowa i cytoplazmatyczna miozyna Ic są kodowane przez ten sam gen zlokalizowany na chromosomie 11. Analiza struktury tego genu wykazała obecność alternatywnego miejsca startu translacji zlokalizowanego w obrębie eksonu -1, który koduje 6 aminokwasów w zgodnej ramce odczytu z eksonem 1. Gen kodujący NMI jest sekwencją zachowaną w ewolucji: niemal identyczne sekwencje kodujące wstawkę odnaleziono w genomie ssaków (człowieka, psa, krowy, myszy i szczura), a podobne (35-60% identyczności) także u innych kręgowców (kury, ropuchy *Xenopus tropicalis* i ryb: *Danio rerio*, *Fugu rubripes* i *Tetraodon nigroviridis*) [20]. Również u roślin stwierdzono w jądrze obecność białka oddziałującego z przeciwciałem skierowanym przeciwko NMI [21]. U myszy NMI występuje powszechnie we wszystkich badanych tkankach, z wyjątkiem komórek na końcowych etapach spermatogenezy, a najwyższy poziom jej syntezy zaobserwowano w płucach [20].

Wydaje się, że główną rolą NMI jest uczestnictwo w transkrypcji. Już pierwsze badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały, że w mysich fibroblastach białko to jest zlokalizowane w nukleoplazmie, a także w jąderku w obrębie struktur (gęsty składnik włóknisty – ang. *dense fibrillar component*) związanych z transkrypcją rDNA [12]. Stymulacja transkrypcji w limfocytach za pomocą fitohemaglutyniny prowadzi do zmiany rozmieszczenia NMI oraz aktyny z obszaru chromatyny skondensowanej w kierunku aktywnej transkrypcyjnie chromatyny luźnej [22]. Za pomocą mikroskopii konfokalnej pokazano także kolokali-

zając NMI z polimerazą RNA typu II (RNAPII). Kolokalizacja ta jest zależna od tego czy w komórce aktualnie zachodzi proces transkrypcji, ponieważ zanika po inkubacji komórek z substancjami hamującymi transkrypcję, takimi jak α -amanityna lub aktynomycyna D [19]. Zastosowanie przeciwciała skierowanego przeciwko NMI wykazało, że wraz z białkiem tym ko-immunoprecypitacji z frakcji jądrowej komórek HeLa ulega duża podjednostka RNAPII, co wskazuje, że występują one w tym samym kompleksie białkowym. Wniosek taki potwierdza również obecność NMI w preparacie zawierającym RNAPII, oczyszczoną z frakcji jądrowej [23]. Co więcej, przeciwciało przeciwko NMI hamuje transkrypcję z udziałem RNAPII w teście *in vitro*, zarówno wykorzystującym ekstrakt jądrowy [19], jak też z oczyszczonymi podstawowymi elementami „maszyny” transkrypcyjnej, czyli z matrycą DNA zawierającą promotor, czynnikami transkrypcyjnymi TBP, TFIIB i TFIIF oraz trifosforanami nukleotydów [23]. Natomiast dodanie oczyszczonej NMI stymuluje transkrypcję w tym samym teście, co wskazuje bezpośrednio na jej udział w tym procesie. Również *in vivo* przeciwciało anti-NMI, wprowadzone do komórek za pomocą mikroiniekcji, zmniejsza ilość nowo powstających transkryptów w jądrze. Szczegółowa analiza wykazała, że NMI nie jest niezbędna do utworzenia kompleksu preinicjacyjnego, lecz do inicjacji transkrypcji, a dokładnie – do utworzenia pierwszego wiązania fosfodiesterowego, ponieważ w obecności przeciwciała zaburzone jest powstawanie RNA o długości 2 nukleotydów oraz dłuższych [23].

Inne badania wykazały, że NMI pełni istotną funkcję również w transkrypcji zależnej od polimerazy RNA typu I (RNAPI). Jak już wspomniano, NMI jest obecna w jąderku i ulega redystrybucji po stymulacji transkrypcji [22]. W niezwykle interesującej pracy Philimonenko i wsp. pokazali, że zahamowanie funkcji NMI za pomocą przeciwciała wprowadzonego do jąder komórek HeLa, prowadzi do zaburzenia syntezy pre-rRNA [24]. Podobne wyniki osiągnięto obniżając poziom syntezy NMI za pomocą interferującego RNA (RNAi), natomiast nadprodukcja NMI w komórce powoduje zależny od dawki wzrost poziomu pre-RNA. Również *in vitro* dodanie rekombinowanej NMI ponad 7-krotnie aktywowało transkrypcję zależną od RNAPI, natomiast przeciwciało anti-NMI hamowało ten proces.

Dalsze doświadczenia dowiodły jednak, że NMI nie oddziałuje z RNAPI bezpośrednio, lecz poprzez czynnik inicjujący transkrypcję TIF-1A [24]. Jak wykazano wcześniej, większość RNAPI obecnej w komórce jest transkrypcyjnie nieaktywna [25], ponieważ do kompleksu inicjującego transkrypcję może zostać włączona tylko frakcja związana z TIF-1A. Ich oddziaływanie jest niezbędne, aby polimeraza mogła się związać z promotorem rDNA. Co więcej, ko-immunoprecypitacja pokazała, że kompleks RNAPI z TIF1A powstaje tylko, gdy w komórce zachodzi transkrypcja, a jego ilość zmniejsza się po inkubacji z aktynomycyną D [24]. Oddziaływanie TIF1A z NMI obserwowano niezależnie od stanu aktywności transkrypcyjnej komórki, jednakże tworzenie tego wiązania jest możliwe tylko, jeżeli TIF1A jest ufosforylowany na Ser 649, kluczowej dla regulacji tworzenia kompleksu inicjacyjnego. Wydaje się więc, że w transkrypcji zależnej od RNAPI istotne jest oddziaływanie polimerazy zarówno z NMI, jak też z TIF-1A (Ryc. 2).



Rycina 2. Schemat udziału jądrowej miozyny I (NMI) i aktyny w tworzeniu kompleksu inicjującego transkrypcję przy udziale polimerazy I (Pol-I). TIF-1A, czynnik transkrypcyjny; P, miejsce fosforylacji; 18S, 5,8S i 28S, podjednostki rybosomalnego RNA.

Jaką dokładnie rolę odgrywa NMI w procesie transkrypcji? Uważa się, że białko to, z uwagi na swoje oddziaływanie z TIF-1A, może być zaangażowane na etapie inicjacji transkrypcji. Potwierdzają to wyniki doświadczeń immunoprecypitacji chromatyny pokazujące, że zarówno NMI, jak i TIF-1A oddziałują z promotorem, ale nie z rejonem kodującym rDNA [24]. Przyłączanie polimerazy do kompleksu NMI z TIF-1A może być ułatwione dzięki oddziaływaniu NMI z aktyną, która wiąże się bezpośrednio z RNAPI [26]. W kolejnych pracach pokazano jednak nieco odmienne rezultaty: NMI znajdowano zarówno na obszarze promotora, jak też w rejonie kodującym [27] oraz międzygenowym rDNA [28]. Różnice te prawdopodobnie wynikają z zastosowania przez autorów prac różnych przeciwciał przeciwko NMI, co sugeruje, że białko to przyjmuje odmienną konformację zależnie od rejonu DNA, z którym oddziałuje [28]. Zjawisko to może być związane również z przekształceniem struktury innego składnika kompleksu transkrypcyjnego, przypuszczalnie RNAPI, której zmiana konformacji jest niezbędna przy przejściu z fazy inicjacji transkrypcji do elongacji. Także wyniki uzyskane w teście transkrypcji *in vitro* wskazują, że NMI odgrywa istotną rolę na etapie późniejszym niż inicjacja, ponieważ w obecności przeciwciała anti-NMI zmniejsza się ilość powstającego pre-mRNA o pełnej długości, natomiast ilość transkryptów o długości 3 nukleotydów pozostaje niezmienną [27]. Percipalle i wsp. sugerują, że NMI pełni istotną funkcję w przebudowie chromatyny, ponieważ wraz z WSTF (ang. *Williams syndrome transcription factor*) oraz ATPazą SNF2h wchodzi w skład kompleksu modyfikującego chromatynę WICH [27]. Zmiany struktury chromatyny stanowią jeden z mechanizmów regulujących dostęp aparatu transkrypcyjnego do promotorów genów, a także są niezbędne na etapie elongacji transkrypcji [29]. Wykazano, że NMI, WSTF i SNF2h oddziałują zarówno z RNAPI, jak też z rejonem promotorowym i kodującym

rDNA. Ponadto, obniżenie syntezy NMI oraz WSTF za pomocą RNAi zmniejsza syntezę pre-RNA *in vitro*, a przeciwciała skierowane przeciwko WSTF obniżają transkrypcję zależną od RNAPI na chromatynie, lecz nie na matrycy nagiego DNA [27]. Ten ostatni rezultat jest jednak kontrowersyjny, ponieważ we wcześniejszych pracach pokazano, że przeciwciała anty-NMI hamuje transkrypcję na obu tych typach matrycy [24], co sugeruje, że funkcja NMI polegająca na współdziałaniu z WICH w przebudowie chromatyny nie jest jej jedyną rolą w transkrypcji.

Kolejnym istotnym pytaniem jest czy NMI funkcjonuje w jądrze samodzielnie, czy też dzięki oddziaływaniu z aktyną. W cytoplazmie wszystkie miozyny pełnią swoją funkcję poprzez współdziałanie z aktyną, trudno więc sobie wyobrazić, aby w jądrze było inaczej. Tezę tę potwierdza fakt, że aktyna jest niezbędna w transkrypcji zachodzącej z udziałem wszystkich trzech polimeraz RNA, oddziałuje z polimerazą oraz z nowo powstającymi cząsteczkami RNA, a przeciwciała przeciwko aktynie hamują transkrypcję na chromosomach politenicznych *Chironomus tentans*. Długo jednak brakowało bezpośrednich dowodów na współdziałanie aktyny z miozyną w jądrze, natomiast pokazano pewne różnice w ich funkcjonowaniu. Aktyna bowiem wiąże się z RNAPI bezpośrednio, natomiast NMI, jak już wspomniano, poprzez TIF-1A. Pojawiły się więc sugestie, że oba białka pełnią w transkrypcji niezależnie rolę strukturalną [26]. Istnieje również alternatywna możliwość, że oddziaływanie NMI z aktyną może ułatwiać wiązanie TIF-1A z polimerazą i dzięki temu być istotne w procesie łączenia różnych części maszynery transkrypcyjnej w jeden duży, składający się z wielu podjednostek kompleks białkowy (Ryc. 2). Aktomiozyna w jądrze może też być odpowiedzialna za wytworzenie siły i pełnić funkcję motoru molekularnego „napędzającego” transkrypcję i uczestniczącego w przesuwaniu takich dużych kompleksów białkowych względem również wielkiej cząsteczki DNA. Aktywność motoryczną posiada również sama polimeraza RNA, lecz prawdopodobnie nie jest ona jedynym motorem molekularnym zaangażowanym w transkrypcję. Potwierdzają to wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Ye i współautorów, którzy pokazali, że w transkrypcji RNAPI niezbędne są filamenty aktynowe, a środki hamujące polimeryzację aktyny, takie jak cytochalazyna D i latrunkulina B, zmniejszają syntezę pre-rRNA *in vitro* w stopniu zależnym od dawki [28]. Na proces transkrypcji wpływ mają także białka regulujące stan równowagi pomiędzy F-aktyną (spolimeryzowaną) i G-aktyną (monomeryczną) oraz mutacje aktyny indukujące lub hamujące polimeryzację [28]. Aktyna w jądrze nie występuje w postaci długich, stabilnych filamentów podobnych do tych obserwowanych w cytoplazmie, lecz tworzy krótsze i bardziej dynamiczne struktury [30]. Wiadomo, że miozyny oddziałują właśnie z filamentami aktynowymi, a nie z aktyną globularną. Wykazano również, że w obecności ATP zmniejsza się wiązanie aktyny oraz NMI z TIF-1A i RNAPI, a więc oddziaływanie miozyny z aparatem transkrypcyjnym jest zależne od wiązania i hydrolizy nukleotydu [28]. Ponadto, mutacje NMI, zaburzające jej zdolność do wiązania się z aktyną lub do hydrolizy ATP, powodują osłabienie jej oddziaływania z RNAPI oraz z rDNA (ale nie z TIF-1A). Prowadzi to do zmniejszenia ilości polimerazy związanej z rejonem kodującym pre-RNA, lecz nie z obszarem promo-

tora rDNA. Wydaje się więc, że zależna od aktywy aktywność motoryczna NMI jest niezbędna dla jej oddziaływania z RNAPI i rDNA oraz w elongacji transkrypcji [28].

Znaczenie oddziaływania pomiędzy NMI i aktyną oraz aktywności motorycznej miozyny dla translokacji udokumentowano jeszcze w dwóch innych publikacjach, w których badano transport fragmentów chromosomów wewnątrz jądra. Praca Hu i wsp. pokazuje, że po stymulacji jądrowego receptora estrogenowego (ER α) za pomocą 17 β -estradiolu dochodzi do szybkiego przemieszczania się rejonów regulatorowych znajdujących się na dwóch różnych chromosomach i oddziaływania tych obszarów w obrębie tzw. granul interchromatynowych (ang. *interchromatin granules*), zawierających czynniki niezbędne w elongacji transkrypcji oraz obróbce postranskrypcyjnej pre-mRNA [31]. Prowadzi to do zwiększonej ekspresji genów regulowanych przez receptor estrogenowy. Oddziaływanie pomiędzy chromosomami nie jest obserwowane po mikroiniekcji do jądra ludzkich komórek raka piersi (MCF7) przeciwciała lub siRNA skierowanego przeciwko NMI, a także przeciwko aktynie. Efekt przeciwciała oraz wyciszenia ekspresji genu NMI był znoszony dzięki nadprodukcji w komórce NMI dzikiego typu, natomiast nie wówczas, gdy komórki transfekowano zmutowanymi formami NMI, które nie wiążą się z aktyną lub ATP. NMI pełni więc istotną funkcję w przebudowie określonych rejonów jądra, co stanowi nowy sposób regulacji transkrypcji przynajmniej niektórych genów docelowych receptorów jądrowych [31].

Również praca Chuanga i wsp. sugeruje, że NMI może uczestniczyć w transporcie pewnych fragmentów chromosomów po stymulacji transkrypcji [32]. Pokazali oni, że w komórkach jajnika chomika chińskiego CHO DG44 nieaktywne rejony chromosomów, zlokalizowane najczęściej na obszarach peryferyjnych blisko błony jądrowej, po aktywacji są przemieszczane w kierunku centrum jądra. Ruch ten odbywa się na znacznych odległościach 1–5 μ m, z prędkością 0,1–0,9 μ m/min, prostopadle do błony jądrowej oraz jest zależny od oddziaływania pomiędzy aktyną i NMI. Mutacja miozyny zaburzająca jej zdolność do przesuwania filamentów aktynowych w teście *in vitro* prowadzi do znacznego opóźnienia transportu, czego nie obserwowano po indukcji syntezy zmutowanej formy NMI zachowującej jednak aktywność motoryczną. Z kolei nadprodukcja aktyny z mutacją uniemożliwiającej jej polimeryzację powoduje całkowite zahamowanie translokacji, a wprowadzenie aktyny z mutacją stabilizującą filamenty przyspiesza transport. Prawdopodobnie więc mechanizm tego ruchu bezpośrednio wymaga zaangażowania F-aktyny i miozyny [32].

Wydaje się również, że NMI może uczestniczyć w niezależnym od transkrypcji transporcie wewnątrz jądra oraz w eksporcie jądrowym. Zarówno NMI, jak i aktyna ulegają precypitacji z białkiem S6, będącym składnikiem małej podjednostki rybosomu oraz wspólnie z nim występują w rejonach peryferyjnych jądra i w porach jądrowych, a zahamowanie funkcji miozyny za pomocą przeciwciała powoduje akumulację białka S6 w rejonie jąderka [33]. NMI pełniłaby tu funkcję transportową, analogiczną do roli wielu miozyn w cytoplazmie. Pewne dane wskazują więc, że rola NMI w jądrze nie ogranicza się jedynie do jej funkcji w transkrypcji.

Sugeruje to również obecność NMI zarówno na aktywnych, niemetylowanych genach rDNA, jak też na genach metyloowanych, w których transkrypcja została epigenetycznie wyciszona [28]. Rola NMI w jądrze wydaje się więc być złożona i z pewnością konieczne są dalsze prace dotyczące wyjaśnienia mechanizmu jej tam działania.

MIOZYNA VI

Jedną z najbardziej interesujących miozynie niekonwencjonalnych jest miozyna VI. Uczestniczy ona w wielu ważnych procesach biologicznych, takich jak np.: migracja, transport wewnątrzkomórkowy, podział komórkowy. Po raz pierwszy została opisana u *Drosophila* [34]; obecnie uważa się, że powszechnie występuje u wyższych eukariontów [35]. Wykazano, że mutacje w genie miozyny VI prowadzą do zaburzeń słuchu, destabilizacji architektury aparatu Golgiego, a także mogą prowadzić do kardiomiopatii przerostowej [35]. Natomiast podwyższenie poziomu ekspresji genu tego białka obserwowano w złośliwych formach nowotworów jajnika [36] i prostaty [37].

Jej łańcuch ciężki o m. cz. ok. 140 kDa (Ryc. 1) zawiera unikalną wstawkę (53 reszty aminokwasowe). Do łańcucha ciężkiego miozyny VI mogą przyłączać się dwie cząsteczki kalmoduliny (łańcuchy lekkie): jedna cząsteczka do klasycznego motywu IQ w szyjce, druga – do wstawki. W następstwie przyłączenia się kalmoduliny do wstawki zachodzą zmiany w strukturze białka, warunkujące unikalny ruch miozyny VI w kierunku końca „-” filamentu aktynowego. W C-końcowym rejonie domeny helikalnej pałeczki znajduje się natomiast fragment, który wykazuje wysokie prawdopodobieństwo tworzenia superhelisy. Dlatego przypuszcza się, że cząsteczki miozyny VI mogą występować w postaci dimerów, aczkolwiek ta kwestia wciąż pozostaje niewyjaśniona [38]. Znajdująca się w pałeczce domena globularna odpowiedzialna jest za oddziaływanie z białkami, będącymi właściwymi partnerami miozyny VI. W jej obrębie wyróżniono dwie wstawki [39], które w wyniku alternatywnego splicingu warunkują istnienie 4 izoform białka. Ich występowanie wydaje się być tkankowo specyficzne, a długość poszczególnych wstawek zróżnicowana gatunkowo. Dotychczas zidentyfikowano kilka białek wiążących się z domeną globularną miozyny VI. Są to na przykład: Dab2 (ang. *disabled 2*) – odpowiedzialne za występowanie miozyny VI na pęcherzykach opłaszczonych klatryną [40], GIPC – warunkujące jej obecność na pęcherzykach nieopłaszczonych (ang. *uncoated vesicles*) [41] oraz w tzw. regionie ciała środkowego (ang. *midbody region*) podczas cytokinezy [11], optineuryna – oddziałująca z miozyną VI w obrębie aparatu Golgiego [42] czy Sap97 – zlokalizowane na pęcherzykach synaptycznych [43]. Za ich pośrednictwem miozyna VI zaangażowana jest w procesy endocytozy, wydzielania białek, warunkuje utrzymywanie odpowiedniej struktury aparatu Golgiego i jego funkcjonowanie, bierze udział w podziale komórkowym [10].

Miozyna VI to motor procesywny, poruszający się – jak już wcześniej wspomniano – w kierunku końca „-” filamentu aktynowego, najprawdopodobniej dzięki wspomnianej wyżej wstawce [44]. Wykazano, że jej krok roboczy jest zaskakująco długi (ok. 30–36 nm dla formy dimerycznej)

i zależy od wielkości przyłączonego ładunku [45]. Można przypuszczać zatem, że miozyna VI jest kluczowym elementem dynamicznych procesów organizacji architektury komórkowej i transportu wewnątrzkomórkowego. W badaniach prowadzonych na różnych liniach komórkowych wielokrotnie pokazywano, że miozyna VI występuje na pęcherzykach, w aparacie Golgiego i w pofałdowaniach błony krawędzi wiodącej poruszającej się komórki.

W ostatnim czasie ukazały się dwa doniesienia opisujące obecność miozyny VI w jądrze komórkowym [46,47]. Wykazano, że po wywołaniu uszkodzeń DNA w komórce, które aktywują zależny od czynnika transkrypcyjnego p53 szlak prożyciowy, następuje dramatyczna zmiana lokalizacji miozyny VI, a mianowicie jej przemieszczenie z cytoplazmy do jądra komórkowego i przestrzeni okołojądrowej [46]. Autorzy zaobserwowali również, że białko p53 przyłącza się do rejonów promotorowych genu miozyny VI i aktywuje jego ekspresję [46]. W kolejnej pracy pokazano natomiast, że miozyna VI oddziałuje z kompleksem polimerazy RNAPII i kolokalizuje z nowo powstałymi transkryptami [47]. Po zablokowaniu miozyny VI przy użyciu swoistych przeciwciał dochodzi do zahamowania transkrypcji w teście transkrypcji *in vitro*, a w warunkach *in vivo* – spada wydajność ekspresji niektórych genów, np. LDLR (ang. *low-density lipoprotein receptor*). Przypuszcza się, że to białko motoryczne może modulować zależną od polimerazy RNA typu II transkrypcję genów [47]. Również w naszych badaniach wykazaliśmy, że miozyna VI występuje w jądrze komórkowym, gdzie, po stymulacji komórek chlorkiem potasu lub inkubacji z inhibitorem eksportu jądrowego – leptomycyną B, nasila się jej kolokalizacja z czynnikiem transkrypcyjnym Sp1 w jądrze komórkowym. Ponadto, przeprowadzona przez nas analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej miozyny VI ujawniła obecność w obrębie pałeczki siedmiu przypuszczalnych sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*) i jeden prawdopodobny motyw eksportu jądrowego (NES, ang. *nuclear export signal*).

Oczywistą wydaje się konieczność prowadzenia dalszych badań, które pozwolą wyjaśnić rolę miozyny VI w jądrze. Wciąż bowiem otwarte pozostają pytania – jakie może pełnić tam funkcje, jakie występują tam izoformy, czy i jak aktywnie uczestniczy w procesie transkrypcji genów, czy współdziała z aktyną?

MIOZYNA XVI

Klasę XVI nadrodziny miozynie zidentyfikowano tylko u ssaków. Białka te występują w postaci dwóch izoform: MyoXVIa i MyoXVIb. Masa cząsteczkowa łańcuchów ciężkich tych miozynie wynosi, odpowiednio, ok. 150 kDa i 210 kDa. Budowa strukturalna prezentuje typową dla nadrodziny miozynie organizację domenową (Ryc. 1). Charakterystyczną cechą tej klasy jest obecność na N końcu (jeszcze przed domeną motoryczną) domeny ankirynowej, która sugeruje możliwość oddziaływania z podjednostkami katalitycznymi 1 α i 1 γ fosfatazy białkowej 1 [48]. Fosfataza ta bierze udział w ważnych procesach komórkowych, m. in.: transkrypcji, dojrzewaniu i transporcie RNA [49]. W C-końcowej domenie miozynie, pałeczce, nie zidentyfikowano rejonu α -helikalnego, co sugeruje występowanie tych białek w postaci mo-

nomerycznej [50]. Analiza sekwencji ujawniła obecność w pałeczce miozyny XVIIb motywów bogatych w reszty prolinowe, umożliwiających oddziaływanie z profiliną, białkiem uczestniczącym w regulacji organizacji cytoszkieletu aktynowego [51].

Po raz pierwszy białka tej klasy odkryto w komórkach nerwowych i wykazano, że ich synteza zachodzi przede wszystkim podczas rozwoju tkanki nerwowej [48].

Dominującą izoformę, MyoXVIIb, zlokalizowano w jądrach komórek podczas interfazy [50]. Wykazano, że za jądrową lokalizację odpowiedzialny jest C-końcowy rejon pałeczki, obejmujący reszty aminokwasowe 1616-1912 [50]. Krótsza izoforma, XVIa, nie posiada tego fragmentu, a jej występowanie ogranicza się tylko do cytoplazmy. Uzasadnionym wydaje się przypuszczenie, że białka te są zaangażowane w różne procesy. Pokazano, że miozyna XVIIb w jądrze znajduje się pomiędzy miejscami okupowanymi przez euchromatynę (pulę aktywnej transkrypcyjnie chromatyny), w których obserwuje się obecność profiliny oraz spolimerizowanej aktyny; może to wskazywać na jej uczestnictwo w regulacji procesu polimeryzacji aktyny jądrowej [50]. Co więcej, w rejonach lokalizacji tej izoformy występują białka będące markerami fazy S cyklu komórkowego; PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) i cyklina A. Wykazano także, że nadprodukcja miozyny XVIIb powoduje opóźnienie przebiegu fazy S cyklu komórkowego, podczas której odbywa się replikacja genomowego DNA, poprzedzająca podział komórkowy. Ma to swoje następstwa w postaci wydłużenia się cyklu proliferacji komórek [50]. Jednakże w przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano udziału miozyny XVIIb w procesie mitozy [50]. Do określenia precyzyjnej funkcji jaką miozyny tej klasy pełnią w komórce, konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań, aczkolwiek obecne dane doświadczalne mogą sugerować jej zaangażowanie w procesie replikacji i naprawy DNA. Poza tym przypuszcza się, że miozyna XVIIb należy do grupy kluczowych czynników regulujących (ang. *key regulator*) podczas embrionalnego rozwoju układu nerwowego [50].

MIOZYNA XVIII

Do rodziny XVIII należą MysPDZ (miozyna XVIIIa) i miozyna XVIIIb oraz homologiczne białka występujące u *Drosophila* [52]. Łańcuch ciężki miozyn XVIII przedstawia typową dla miozyn podstawową organizację strukturalną (Ryc. 1). Zbudowany jest z domeny: motorycznej, jednej domeny IQ, do której przyłącza się cząsteczka kalmoduliny, oraz długiej pałeczki podzielonej na część helikalną i C-końcową część globularną. W części helikalnej można wyróżnić region superhelisy, umożliwiający tworzenie dimerów. Po raz pierwszy miozyna tej klasy została zidentyfikowana w komórkach hematopoetycznych zrębu szpiku kostnego uzyskanych z myszy szczepu C57BL/6 [53].

Miozyna XVIIIa zawiera, oprócz opisanych wyżej domeny, N-końcową domenę PDZ; uważa się, że domena ta bierze udział w wiązaniu kanałów jonowych i receptorów błonowych oraz jest odpowiedzialna za wiązanie tych receptorów z enzymami efektorowymi [53]. W budowie łańcucha ciężkiego miozyny XVIIIa zidentyfikowano również

rejon KE bogaty w reszty lizyny i kwasu glutaminowego, który wskazuje na możliwość jądrowej lokalizacji białka. Ze względu na brak doniesień nie wiadomo czy miozyna XVIIIa faktycznie występuje w jądrze komórkowym i jaką może pełnić tam funkcję.

Kolejnym białkiem klasy XVIII jest miozyna XVIIIb. Jej sekwencja aminokwasowa wykazuje w ~ 40% homologię do miozyny XVIIIa [54]. Łańcuch ciężki miozyny XVIIIb ma masę około 250 kDa, nie zidentyfikowano w nim domeny PDZ i KE charakterystycznych dla miozyny XVIIIa. Natomiast na N- i C-końcu znaleziono unikalne sekwencje, które nie wykazują – oprócz motywu lokalizacji jądrowej (NLS) – homologii do żadnego znanego białka. Motyw lokalizacji jądrowej znajduje się między 2377-2338 resztą aminokwasową łańcucha ciężkiego [57]. Poza tym, w pałeczce wyróżniono domenę FERM homologiczną do taliny, która determinuje lokalizowanie się białek w błonie plazmatycznej [52].

Wykazano obecność tego białka w mięśniach szkieletowych, w sercu, jądrach oraz szpiku kostnym [55]. Wykazano, że miozyna XVIIIb pełni ważną funkcję w rozwoju raka płuc; uważa się, że w tym procesie może ona odgrywać rolę czynnika supresorowego. W przeprowadzonych badaniach pokazano, że nadprodukcja miozyny XVIIIb hamuje podziały i wzrost komórek nowotworowych [55]. Wszystkie badane linie wykazywały obniżoną ekspresję genu miozyny XVIIIb, spowodowaną głównie czynnikami epigenetycznymi: metylacją promotora i acetylacją histonów [56]. Jednakże, znaczenie tych obserwacji dla procesu kancerogenezy pozostaje niejasne.

Interesujące wydają się wyniki badań poświęconych lokalizacji komórkowej miozyny XVIIIb w komórkach mięsnych i mięśniach szkieletowych. W mioblastach występuje ona w cytoplazmie, natomiast podczas różnicowania mioblastów w miotuby pewna pula białka koncentruje się w jądrach komórkowych [57]. W dojrzałych mięśniach szkieletowych białko to również występuje w jądrach komórkowych. Wiadomym jest, że każdy proces różnicowania wiąże się nie tylko z reorganizacją cytoszkieletu, ale także z aktywacją specyficznych genów. Dlatego przypuszcza się, że miozyna XVIIIb, podobnie jak wcześniej opisane miozyny klas I i VI, może być zaangażowana w proces regulacji transkrypcji genów; wyjaśnienie tej kwestii wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań.

PODSUMOWANIE

Od ponad dekady pojawiają się doniesienia o obecności aktyny i białek motorycznych należących do nadrodziny miozyn w jądrze komórkowym, a także o ich zaangażowaniu w procesy transkrypcji i transportu wewnątrzjądrowego. Wykazano obecność w jądrach miozyny IC (jej jądrowej izoformy, NMI), VI, XVIIb i XVIIIb. O ile dość dużo wiadomo o roli miozyny I w jądrze, to wciąż niewiele jest publikacji poświęconych innym izoformom miozyn tam występujących. Należy zwrócić uwagę, że uzyskane dane pochodzą w dużej mierze z badań na liniach komórek nowotworowych, gdzie po pierwsze procesy transkrypcji są wzmożone, a po drugie w komórkach tych zaobserwowano podwyższone

poziomy syntezy niektórych miozyn, np. VI w komórkach raka jajnika czy prostaty [36,37].

Lektura dotychczasowych doniesień jednoznacznie prowadzi do wniosku, iż pełne zrozumienie roli i mechanizmu działania miozyn w jądrze komórkowym wymaga z pewnością dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

- Huxley AF, Niedergerke R (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971-973
- Pollard TD, Korn ED (1973) *Acanthamoeba myosin*. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem* 248: 4682-4690
- Korn ED (2004) The discovery of unconventional myosins: serendipity or luck? *J Biol Chem* 279: 8517-8525
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3681 - 3686.
- Buss F, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2002) Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* 3: 851-858
- Tuxworth RI, Weber I, Wessels D, Addicks GC, Soll DR, Gerisch G, Titus MA (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol* 11: 318-329
- Langford GM (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3: 859-65
- Johnston D St (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 363-75
- Hasson T (2003) Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116: 3453-3461
- Buss F, Kendrick-Jones J (2008) How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun* 369: 165-175
- Arden SD, Puri C, Au JS, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 18: 4750-61
- Nowak G, Pestic-Dragovich L, Hozák P, Philimonenko A, Simerly C, Schatten G, de Lanerolle P (1997) Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *J Biol Chem* 272: 17176-17181
- Gillespie PG, Albanesi JP, Bahler M, Bement WM, Berg JS, Burgess DR, Burnside B, Cheney RE, Corey DP, Coudrier E, de Lanerolle P, Hammer JA, Hasson T, Holt JR, Hudspeth AJ, Ikebe M, Kendrick-Jones J, Korn ED, Li R, Mercer JA, Milligan RA, Mooseker MS, Ostap EM, Petit C, Pollard TD, Sellers JR, Soldati T, Titus MA (2001) Myosin-I nomenclature. *J Cell Biol* 155: 703-704
- Sellers JR (1999) Myosin, 2nd edition. Protein Profile, Oxford University Press, Oxford
- Hwang KJ, Mahmoodian F, Ferretti JA, Korn ED, Gruschus JM (2007) Intramolecular interaction in the tail of *Acanthamoeba myosin* IC between the SH3 domain and a putative pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 784-789
- Barylko B, Jung G, Albanesi JP (2005) Structure, function, and regulation of myosin 1C. *Acta Biochim Polon* 52: 373-380
- Benesh AE, McConnell RE, Mao S, Tyska MJ (2007) Myosin-1d Is a Major Component of the Enterocyte Brush Border cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 18 (suppl), abstract 1685
- Lechler T, Shevchenko A, Li R (2000) Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization. *J Cell Biol* 148: 363-373
- Pestic-Dragovich L, Stojilkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozák P, de Lanerolle P (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science* 290: 337-341
- Kahle M, Pridalová J, Spacek M, Dzijak R, Hozák P (2007) Nuclear myosin is ubiquitously expressed and evolutionary conserved in vertebrates. *Histochem Cell Biol* 127: 139-148
- Cruz JR de la, Torre C, Moreno Díaz de la Espina S (2008) Nuclear actin in plants. *Cell Biol Int* 32: 584-587
- Kyselá K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janáček J, Kahle M, Hozák P (2005) Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol* 124: 347-358
- Hofmann WA, Vargas GM, Ramchandran R, Stojilkovic L, Goodrich JA, de Lanerolle P (2006) Nuclear myosin I is necessary for the formation of the first phosphodiester bond during transcription initiation by RNA polymerase II. *J Cell Biochem* 99: 1001-1009
- Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingová H, Kyselá K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozák P, Grummt I (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6: 1165-1172
- Grummt I (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17: 1691-1702
- Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16: 191-196
- Percipalle P, Fomproix N, Cavellán E, Voit R, Reimer G, Krüger T, Thyberg J, Scheer U, Grummt I, Farrants AK (2006) The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin I and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep* 7: 525-530
- Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I (2008) Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 22: 322-330
- Farrants AK. (2008) Chromatin remodelling and actin organisation. *FEBS Lett* 582: 2041-2050
- McDonald D, Carrero G, Andrin C, de Vries G, Hendzel MJ (2006) Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 172: 541-552
- Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD (2008) Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19199-19204
- Chuang CH, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle P, Belmont AS. (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol* 16: 825-831
- Cisterna B, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M (2006) Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transit to the nuclear pores. *FASEB J* 20: 1901-1903
- Kellerman KA, Miller KG (1992) An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 119: 823-834
- Redowicz MJ (2007) Unconventional myosins in muscle. *Eur J Cell Biol* 86: 549-558
- Yoshida H, Cheng W, Hung J, Montell D, Geisbrecht E, Rosen D, Liu J, Naora H (2004) Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8144-8149
- Dunn TA, Chen S, Faith DA, Hicks JL, Platz EA, Chen Y, Ewing ChM, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J (2006) A novel role of Myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol* 169: 1843-1854
- Rock RS, Ramamurthy B, Dunn AR, Beccafico S, Rami BR, Morris C, Spink BJ, Franzini -Armstrong C, Spudich JA, Sweeney HL (2005) A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI. *Mol Cell* 17: 603-609
- Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5: 798-813
- Inoue A, Sato O, Homma K, Ikebe M (2002) DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 300-307
- Aschenbrenner L, Naccache SN, Hasson T (2004) Uncoated Endocytic Vesicles Require the Unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol Biol Cell* 15: 2253-2263
- Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the

- Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169: 285-295
43. Wu H, Nash JE, Zamorano P, Garner CC (2002) Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor Myosin VI. Implications for ampa receptor trafficking. *J Biol Chem* 277: 30928-30934
 44. Iwaki M, Tanaka H, Iwane AH, Katayama E, Ikebe M, Yanagida T (2006) Cargo-binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively. *Biophys J* 90: 3643-3652
 45. Altman D, Sweeney HL, Spudich JA (2004) The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* 116: 737-749
 46. Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 23: 749-755
 47. Jung EJ, Liu G, Zhou W, Chen X (2006) Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway. *Mol Cell Biol* 26: 2175-2186
 48. Patel KG, Liu Ch, Cameron PL, Cameron RS (2001) Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1 α and 1 γ . *J Neurosci* 21: 7954
 49. Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84: 1-39
 50. Cameron RS, Liu C, Mixon AS, Pihkala JP, Rahn RJ, Cameron PL (2007) Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 19-48
 51. Yarmola EG, Bubba MR (2006) Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem Sci* 4: 197-205
 52. Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780
 53. Furusawa T, Ikawa S, Yanai N, Obinata M (2000) Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 67-75
 54. Berg JS, Derfler BH, Pennisi CM, Corey DP, Cheney RE (2000) Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci* 113: 3439-3451
 55. Nishioka M, Kohno T, Tani M, Yanaihara N, Tomizawa Y, Otsuka A, Sasaki S, Kobayashi K, Niki T, Maeshima A, Sekido Y, Minna JD, Sone S, Yokota J (2002) MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12269-12274
 56. Yanaihara N, Nishioka M, Kohno T, Otsuka A, Okamoto A, Ochiai K, Tanaka T, Yokota J (2004) Reduced expression of MYO18B, a candidate tumor-suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int J Cancer* 112: 150-154
 57. Salamon M, Millino C, Raffaello A, Mongillo M, Sandri C, Bean C, Negrisolio E, Pallavicini A, Valle G, Zaccolo M, Schiaffino S, Lanfranchi G (2003) Human MYO18B, a novel unconventional myosin heavy chain expressed in striated muscles moves into the myonuclei upon differentiation. *J Mol Biol* 326: 137-149

Myosins in nucleus

Magdalena Sobczak, Łukasz Majewski, Maria Jolanta Rędownicz[✉]

Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

Key words: myosins, transcription, cell nucleus

ABSTRACT

Myosins, actin-dependent molecular motors are expressed in almost all eukaryotic cells where are engaged in a panoply of cellular processes such as muscle contraction, cell migration and adhesion, intracellular trafficking, cytokinesis, endocytosis and secretion. In recent years a number of reports has been published revealing nuclear localization of myosins as well as actin and actin-binding proteins. Namely, nuclear form of myosin IC (NMI), myosin VI, myosin XVIB and myosin XVIIIIB were found in nucleus. NMI and myosin VI seem to be involved in gene transcription and possibly intranuclear transport. In this paper, current knowledge on the role of myosin motors in nucleus has been presented.

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek od autorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępów Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępów Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składowi obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się, przysyłanie prac na dyskietce lub płycie CD. Tekst winien być zapisany jako *.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: *.tif, *.cdr, *.psd lub *.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem

telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

Kolejno numerowane strony obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of Kv AP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
4. Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment, W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
5. Darżynkiewicz E, Jankowska-Anyska M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t. IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

Ilustracje: ryciny winny być zapisane jako: *.tif, *.cdr, *.psd, lub *.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerń i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

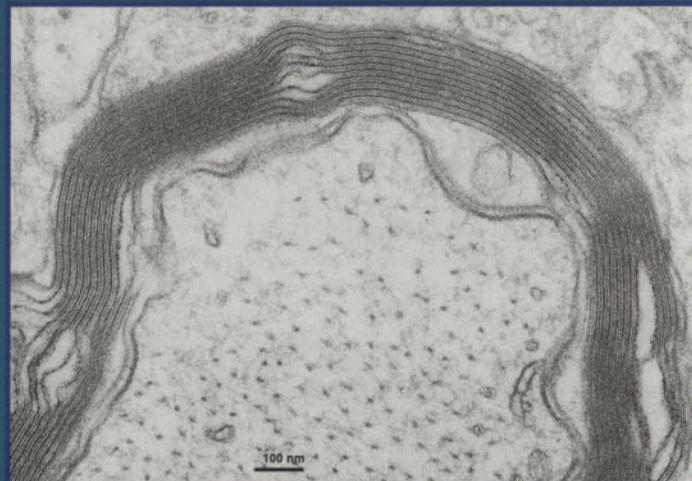
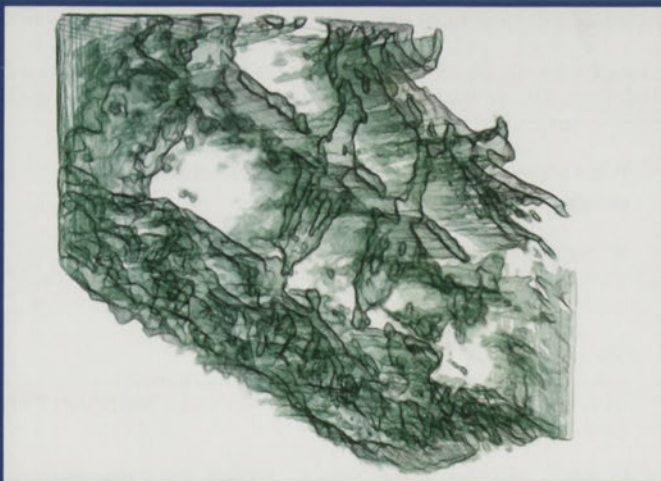
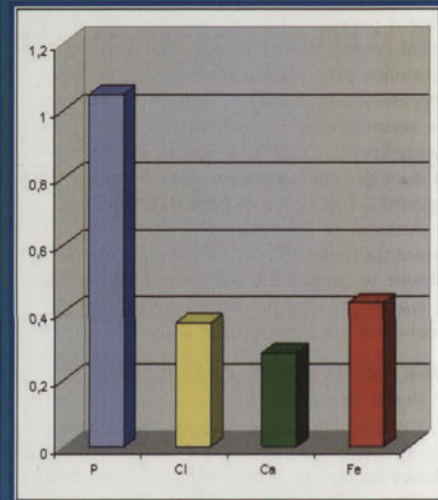
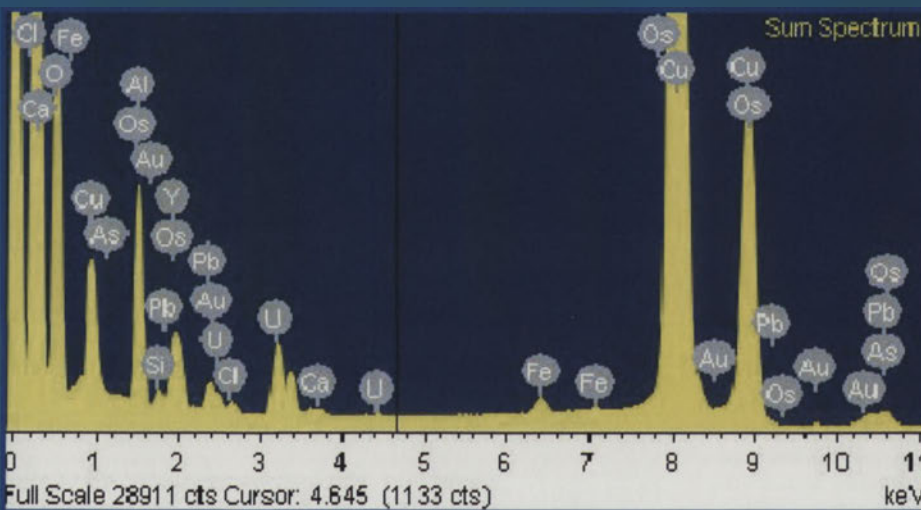
Sławomir Pikuła
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Opłata za druk: Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Opłata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm

Kilkuletnie starania o pozyskanie środków finansowych z funduszy strukturalnych UE w okresie 2004-2006 zakończyły się wielkim sukcesem Centrum Zaawansowanych Technologii „Biotechnologii, Informatyki Stosowanej i Medycyny - Kampus Ochota”. W ramach projektu Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego, koordynowanego przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, a wykonywanego wspólnie z Akademią Medyczną i Uniwersytetem Warszawskim, zrealizowane zostały inwestycje aparaturowe o wartości ponad 15 milionów złotych. Jest to największy tego typu projekt w ramach SPO WKP 1.4 w Polsce.

W ramach tego projektu do Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nenckiego zakupiono wysokorozdzielczy (0,2 nm) elektronowy mikroskop transmisyjny JEM 1400 (JEOL Co., Japonia 2008). Ten elektronowy mikroskop cyfrowy jest sterowany z platformy Windows XP i jest wyposażony w mikroanalizator rentgenowski (EDS INCA Energy TEM, Oxford Instruments) oraz system do tomografii i kamerę CCD MORADA (SiS-Olympus). Przy pomocy tego zestawu aparaturowego wykonać można pełnozakresową mikroanalizę rentgenowską, zarówno jakościową, jak i ilościową, umożliwiającą obrazowanie rozkładu pierwiastków w preparacie biologicznym oraz odwzorowanie tomograficzne 3D. Jest to unikalny w Polsce mikroskop elektronowy dający takie możliwości badawcze i jeden z pierwszych na świecie.



UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH
PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ

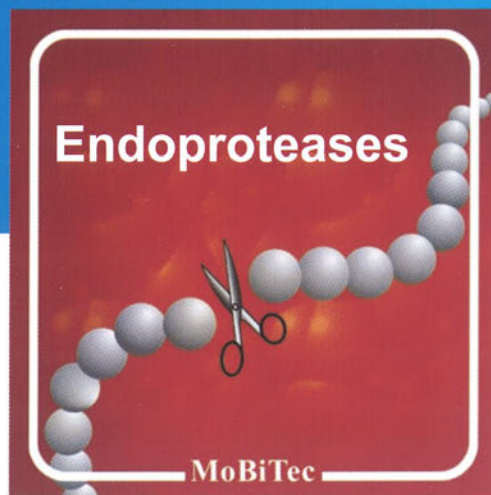
<http://rcin.org.pl>



Projekt współfinansowany przez
UNIĘ EUROPEJSKĄ
ze środków
Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego

bim
CZT
KAMPUS - OCHOTA

Ideal for Removal of Fusion Tags



MobiTEV Protease:

Improved TEV Protease at an Affordable Price

HRV3C Protease:

Highly Active Protease for the 'PreScission' Site

IgA Protease:

Especially Useful for Cleavage of Fusion Protein in Inclusion Bodies

Factor Xa Protease:

The Endoprotease that Creates Authentic Recombinant Proteins

Kex2 Protease:

Protease for Alternative Cleavage Sites

Pro39 Protease:

Very Specific and Tuneable Protease

Więcej informacji:

www.mobitec.com

abo Grażyna Boreysza

ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk

Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk

tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80

e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl

Jak mogę otrzymać lepsze rezultaty badań
z zastosowaniem metody immunoblottingu?

SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit

pomoże otrzymać wyniki, których poszukujesz.

That's what's in it for you.
Merck Chemicals

Cechy i korzyści:

- Wzmacnia sygnał, minimalizuje tło w metodach immunoblottingu, dot blottingu i ELISA.
- Może być używany z membranami nitrocelulozowymi lub PVDF.
- Współdziała z chemiluminescencyjnym lub kolorymetrycznym systemem detekcji.
- Może być używany z przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z HRP, AP, etc.
- Wystarcza na 20 miniblotów lub 1600 cm² membrany.
- Gotowy do użycia; nie trzeba rozcieńczać; nie ma dodatkowych etapów i manipulacji.
- Nie są potrzebne dodatkowe odczynniki.

Zapraszamy do sklepu internetowego
<https://mecommmerck.pl>