

KATARZYNA KWIATKOWSKA

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: kkwiat@nencki.gov.pl

## UDZIAŁ KOMPLEKSU BIAŁEK Arp2/3 W NUKLEACJI AKTYNY W KOMÓRCIE. MECHANIZM RUCHU BAKTERII *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Filamenty aktynowe komórek niemięśniowych tworzą dynamiczną strukturę nazywaną cytoszkieletem aktynowym. Przebudowa cytoszkieletu aktynowego leży u podstaw takich procesów, jak polaryzacja i lokomocja komórki, cytokineza, fago- i egzocytoza. Kluczowe znaczenie dla tych zjawisk ma precyzyjnie kontrolowana, czasowo i przestrzennie, polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych, która zachodzi przy błonie komórki w odpowiedzi na pobudzenie określonych receptorów błonowych. Wyróżnia się trzy zasadnicze mechanizmy zapoczątkowywania polimeryzacji aktyny w komórce, z których każdy regulują określone białka wiążące aktynę (YIN i STOSSEL 1999). Pierwszy z nich polega na fragmentacji istniejących filamentów aktynowych i zwielokrotnieniu w ten sposób liczby szybko rosnących końców mikrofilamentów (tzw. koniec kolczasty, ang. barbed end). Drugi sposób zapoczątkowania polimeryzacji aktyny polega na odsłonięciu końców kolczastych mikrofilamentów bez ich

fragmentacji. Żelolina i białka jej pokrewne, takie jak CapG, są głównymi białkami fragmentującymi mikrofilamenty i/lub kontrolującymi dostępność ich końców kolczastych. Aktywność tych białek regulują poziomy  $Ca^{2+}$  i PIP<sub>2</sub> (bisfosforanu fosfatydyloinozytolu) w komórce (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1997). Nukleacja *de novo* jest najwolniejszym etapem formowania mikrofilamentu, choć, paradoksalnie, to właśnie ta trzecia droga może być głównym mechanizmem kontroli polimeryzacji aktyny w komórce. Gwałtowna nukleacja aktyny, indukowana przez niektóre bakterie chorobotwórcze jest też motorem ruchu tych bakterii w zainfekowanej komórce. Badania nad mechanizmem nukleacji aktyny, w tym nukleacji wywołanej przez bakterie *Listeria* i *Shigella*, doprowadziły do wniosku, że kluczową rolę w przyspieszaniu tego procesu odgrywa kompleks białek Arp2/3. Regulacja nukleacji aktyny w komórce stanowi temat niniejszej pracy.

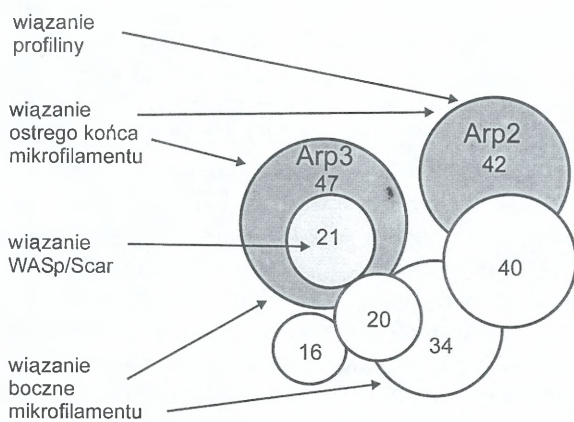
## UDZIAŁ KOMPLEKSU BIAŁEK Arp2/3 W NUKLEACJI AKTYNY

Nukleacja polega na tworzeniu zarodki mikrofilamentów, złożonych z trzech monomerów aktynowych. Ze względu na niestabilność dimerów i trimerów tego białka, spontaniczna nukleacja aktyny *in vitro* jest procesem powolnym. Niskie stężenie tworzących się *de novo* zarodki polimeryzacji aktyny ogranicza możliwości asocjacji jej kolejnych monomerów i spowalnia w ten sposób tempo przyrostu mikrofilamentów. Powolna nukleacja aktyny odpowiada za wyraźne opóźnienie tempa polimeryzacji aktyny obserwowane w początkowym etapie tego procesu. W komórce samorzutną nukleację aktyny hamują dodatkowo białka, które wiążą mono-

mery aktyny. Białka takie, np. tymozyna, utrzymują monomery aktyny w stężeniu, które 1000-krotnie przewyższa stężenie wymagane do polimeryzacji aktyny. Profilina, jedno z białek wiążących monomery aktynowe, może jednak funkcjonować również jako swoista „pompa”, ułatwiająca asocjację monomerów aktyny z szybko rosnącym końcem mikrofilamentu. Zarodki filamentów, które przyrastają od końca kolczastego, powstają przy udziale kompleksu białek Arp2/3.

Białka Arp (ang. actin-related proteins) występują powszechnie w komórkach eukariotycznych, a ich wspólną właściwością jest zbliżo-

ny skład aminokwasowy, w 30-60% identyczny ze składem aminokwasowym konwencjonalnych izoform aktyny. Wyróżnia się trzy rodziny białek Arp (KELLEHER i współaut. 1995). Białka z rodziny Arp1, najbardziej podobne pod względem budowy do aktyny, współuczestniczą z dyneiną w wewnątrzkomórkowym ruchu pęcherzyków i znajdują się poza obszarem zainteresowań tej pracy. Białka z rodziny Arp2 i Arp3, o kluczowym znaczeniu dla nukleacji aktyny, zidentyfikowano jako podjednostki kompleksu złożonego z siedmiu białek. Geny kodujące Arp2 i Arp3 odkryto po raz pierwszy na początku lat 90. w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Siedmioskładnikowy kompleks białek Arp2/3, przedstawiony schematycznie na Ryc. 1, wyizolowano dotąd



Ryc. 1. Schemat budowy kompleksu białek Arp2/3.

Wielkość kół oznaczających siedem podjednostek kompleksu jest proporcjonalna do ich mas cząsteczkowych. Liczby odpowiadają masom cząsteczkowym podjednostek w kDa. (Wg HIGGSA i POLLARDA 1999).

z tak różnorodnych komórek eukariotycznych jak *Acanthamoeba castellanii*, *S. cerevisiae* i ludzkie płytki krwi (MACHESKY i współaut. 1994, WELCH i współaut. 1997, WINTER i współaut. 1997). Poza białkami Arp2 i Arp3, pięć podjed-

nostek kompleksu tworzą nie znane wcześniej białka. Ustalono, że Arp2 odpowiada za interakcję kompleksu z profiliną, a podjednostka p21 wiąże białka Scar1 i WASp (Ryc. 1).

*In vitro* kompleks białek Arp2/3 wiąże się z dużym powinowactwem z wolno rosnącym końcem mikrofilamentu (koniec ostry, ang. pointed end) i ułatwia nukleację aktyny, jednakże z niską efektywnością. Przypuszczalnie kompleks ten wiąże się z formującymi się samorzutnie dimerami aktyny i umożliwia wzrost filamentu od strony końca kolczastego. Taki mechanizm funkcjonowania wyjaśnia, dlaczego wyizolowany kompleks białek Arp2/3 nie powoduje zmniejszenia opóźnienia obserwowanego na pierwszym etapie polimeryzacji aktyny. Kompleks białek Arp2/3 wiąże się też z boku mikrofilamentu i, dzięki wymienionym wcześniej właściwościom, może indukować tworzenie jego rozgałęzień (KELLEHER i współaut. 1995, MULLINS i współaut. 1998).

Najwyższe stężenia kompleksu białek Arp2/3 w komórce występuje w miejscach wzbogaconych w aktynę. Obecność kompleksu stwierdzono w czole migrujących komórek, w obrębie otoczki aktynowej bakterii *Listeria monocytogenes* oraz w aktynowych strukturach komórek drożdży. Mutacje genów białek Arp2 i Arp3 w *S. cerevisiae* i *S. pombe* silnie upośledzają funkcje życiowe lub prowadzą do śmierci tych komórek (KELLEHER i współaut. 1995, WELCH i współaut. 1997, WINTER i współaut. 1997). Stężenie kompleksu białek Arp2/3 w *A. castellanii* wynosi około 2 M i jest 100-krotnie niższe od stężenia aktyny, co potwierdza, wynikająca z badań *in vitro*, sugestię o regulującej, a nie strukturalnej, roli kompleksu białek Arp2/3 (KELLEHER i współaut. 1995).

Wyniki badań kilku niezależnych grup opublikowane w ciągu dwóch ostatnich lat wskazują, że zdolność kompleksu białek Arp2/3 do nukleacji aktyny w komórce stymulowana jest dzięki jego interakcji z białkami WASp/Scar.

#### BIAŁKA WASp/Scar REGULUJĄ FUNKCJONOWANIE KOMPLEKSU BIAŁEK Arp2/3

Rodzina białek WASp/Scar ssaków obejmuje sześć białek: WASp, N-WASp i cztery izoformy Scar, z których Scar1 określa się też nazwą WAVE (MIKI i współaut. 1998a). Ekspresja WASp jest ograniczona do komórek hemopoetycznych, a mutacja tego białka prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu płytek krwi i limfocytów nazywanych zespołem Wiskott-Aldricha (ang. Wiskott-Aldrich Syndrome, WAS). N-WASp jest występującym powszechniej w ko-

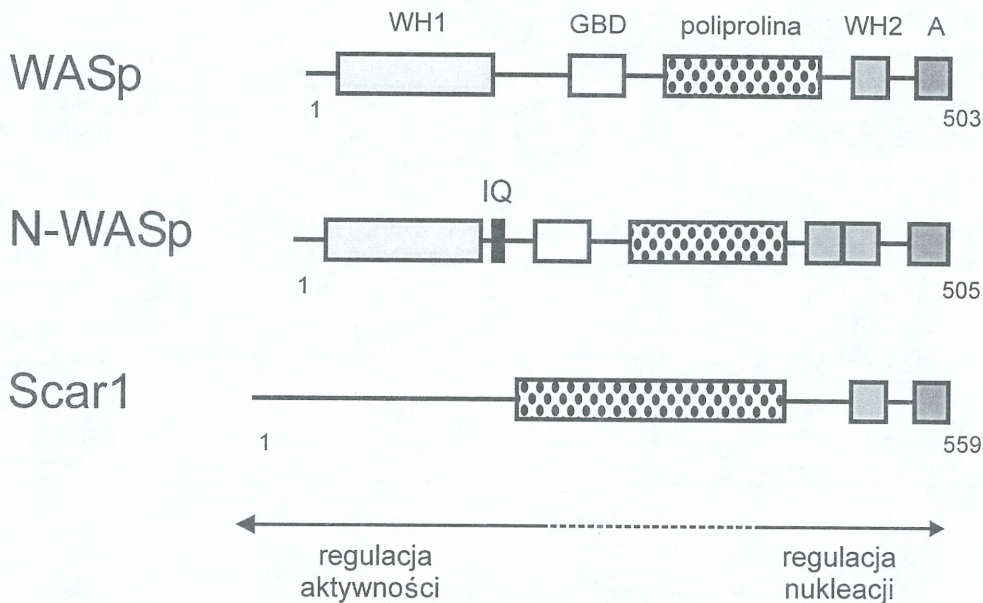
mórkach kręgowców homologiem WASp. Najbogatszym źródłem N-WASp jest tkanka nerwowa. Białko Scar odkryto u śluzowca *Dictyostelium discoideum*, a w drożdżach zidentyfikowano homolog białek WASp/Scar nazwany Bee1p (LI 1997, BEAR i współaut. 1998). Dane te wskazują na powszechność występowania białek omawianej rodziny w komórkach eukariotycznych, analogiczną do obserwowanej w przypadku kompleksu Arp2/3.



Białka z rodziny WASp/Scar wiążą się bezpośrednio z kompleksem Arp2/3 i kontrolują jego funkcjonowanie w komórce. Zwiększają one zdolność kompleksu białek Arp2/3 do nukleacji aktyny, jak ustalono w badaniach nad N-WASp (ROHATGI i współaut. 1999), WASp (YARRAR i współaut. 1999), Scar1 (Matchesky i współaut. 1999) oraz Bee1p (WINTER i współaut. 1999). Region odpowiedzialny za te właściwości obejmuje 65–120 aminokwasów końca C białek WASp/Scar (Ryc. 2). Z kompleksem białek

puszczać, że białka z rodziny WASp/Scar regulują organizację cytoszkieletu aktynowego działając poprzez kompleks Arp2/3.

Budowa N-terminalnej części białek WASp i N-WASp szczególnie predysponuje je do pełnienia wspomnianej funkcji regulatora dynamiki aktyny w komórce (Ryc. 2). Uwagę zwraca tu obecność motywu GBD (ang. GTPase-binding domain), z którym wiążą się białka Rac i Cdc42, monomeryczne GTPazy z rodziny Rho. Kolejna domena - WH1 - swoją organizacją przestrzen-



Ryc. 2. Schemat budowy ssaczych białek z rodziny WASp/Scar.

Domene WH1 określa się też jako „domene EVH1” lub „domene homologiczną do plekstryny”, a domene WH2 jako „domene homologiczną do werproliny”. Sekwencja aminokwasowa oddzielająca motywy „A” i WH2 wykazuje pewne podobieństwo do kofiliny, białka wiążącego monomery aktynowe, ale jej funkcja w białkach rodziny WASp/Scar nie jest jasna. WH1 i WH2, domeny homologiczne WASp; GBD, domena wiążąca GTPazy; poliprolina, fragment zawierający powtarzające się sekwencje 5 lub więcej reszt prolinowych; A, sekwencja bogata w aminokwasy kwaśne; IQ, domena wiążąca kalmodulinę. Numery odpowiadają numeracji aminokwasów.

Arp2/3 oddziałuje końcowy odcinek białek (A na Ryc. 2), składający się z kilkunastu aminokwasów kwaśnych. Dalej wyróżnia się jedną lub dwie domeny WH2 (ang. WASp homology 2 domain), które wiążą monomery aktynowe. Fragment białek WASp/Scar obejmujący motywy WH2 i A, dodany do mieszaniny monomerów aktyny i kompleksu Arp2/3, znacznie przyspiesza nukleację aktyny. Zmniejsza w ten sposób opóźnienie właściwe dla pierwszego etapu powstawania mikrofilamentów i zwiększa ich ilość (MATCHESKY i INSALL 1998, MATCHESKY i współaut. 1999, ROHATGI i współaut. 1999). Nadekspresja C-końcowego fragmentu białek Scar1 i WASp w fibroblastach i makrofagach hamuje formowanie lamellipodiów, bogatych w aktynę wypustek błony komórkowej, oraz zaburza kortykalne rozmieszczenie kompleksu białek Arp2/3 (MATCHESKY i INSALL 1998). Dane te pozwalają przy-

na przypomina domene plekstrynową, wiążącą PIP<sub>2</sub>. Poza PIP<sub>2</sub>, domena WH1 może też oddziaływać z sekwencjami poliprolinowymi niezidentyfikowanych dotąd białek (PREHODA i współaut. 1999). GTPazy Rho oraz PIP<sub>2</sub> są istotnymi elementami kontroli organizacji cytoszkieletu aktynowego. *In vitro*, Cdc42 i PIP<sub>2</sub> w istotny sposób zwiększają zdolność N-WASp do interakcji z kompleksem Arp2/3, a co za tym idzie, stymulują jego zdolność nukleacji aktyny (ROHATGI i współaut. 1999).

Lista ligandów oddziałujących z białkami WASp i N-WASp jest długa. Poza GTPazami i PIP<sub>2</sub>, obejmuje ona, między innymi, kinazy tyrozynowe Src, białka adaptorowe Grb2 i Nck oraz profilinę (HIGGS i POLLARD 1999). Białka te wiążą się z bogatymi w prolinę sekwencjami WASp i N-WASp (domena poliprolinowa na Ryc. 2). Odmienne budowa końca N białek

Scar, a zwłaszcza brak domen GBD i WH1 (Ryc. 2), sugeruje istnienie ligandów specyficznych dla tych białek. Pośrednio, funkcjonowanie Scar1 kontrolowane jest przez GTPazę Rac (Miki i współaut. 1998a), domena poliprolinowa Scar1 wiąże profilinę.

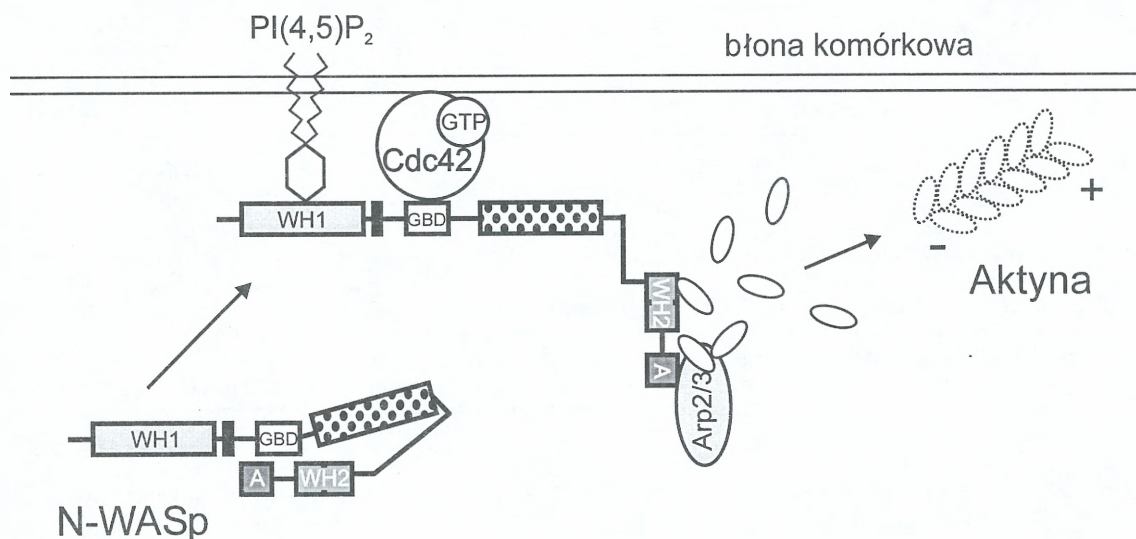
Rola większości z poznanych oddziaływań WASp/Scar nie jest sprecyzowana. Otwierają one jednak szerokie spektrum potencjalnych mechanizmów, na drodze których regulowana być może zarówno aktywność, jak i komórkowa lokalizacja białek WASp/Scar. Na przykład, dzięki interakcji z Grb2 i Nck, białka WASp i N-WASp wiążą się z receptorami czynników

wzrostu. Receptory te inicjują przebudowę cytoszkieletu aktynowego, w którą zaangażowane są GTPazy z rodziny Rho oraz PIP<sub>2</sub>. Scar może być włączony w szlaki sygnałowe generowane przez inną grupę receptorów błonowych, tzw. receptory serpentynowe i współdziałające z nimi GTPazy trimeryczne (MATCHESKY i INSALL 1999). W świetle zebranych dotąd danych, białka WASp/Scar wraz z kompleksem białek Arp2/3 wydają się odgrywać kluczową rolę w szlakach sygnałowych prowadzących do nukleacji i stymulacji polimeryzacji aktyny w komórce.

#### NUKLEACJA AKTYNY PRZEZ BIAŁKA WASp/Scar I KOMPLEKS Arp2/3 — PROPONOWANY MECHANIZM

Na podstawie szczegółowych badań dotyczących roli PIP<sub>2</sub> oraz Cdc42 w funkcjonowaniu N-WASp, ROHATGI i współaut. (1999) zaproponowali mechanizm nukleacji aktyny przedstawiony na Ryc. 3. Według tej propozycji, N-

polimeryzacji aktyny *in vitro* w obecności kompleksu Arp2/3 jest o 2–3 rzędy wielkości mniejsza niż aktywność fragmentu N-WASp obejmującego sekwencje WH2 i A. Nie wyklucza się też, że w komórkach spoczynkowych aktywność N-



Ryc. 3. Proponowany model mechanizmu nukleacji aktyny przez białka N-WASp i kompleks Arp2/3.

Aktywowana GTPaza Cdc42 oraz PIP<sub>2</sub> zmieniają konformację białka N-WASp, które z kolei przy współudziale kompleksu białek Arp2/3 stymuluje nukleację aktyny. Szczegółowy opis mechanizmu działania tych białek zamieszczono w tekście. Oznaczenia domen białka N-WASp są takie jak na Ryc. 2. Figura „Arp2/3” przedstawia umownie kompleks zawierający Arp2 i Arp3 oraz pięć pozostałych podjednostek. „-” i „+” oznaczają odpowiednio koniec ostry i koniec kolczasty mikrofilamentu. PI(4,5)P<sub>2</sub> jest skrótem od fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforanu. (Wg ROHATGI i współaut. 1999, zmodyfikowany).

WASp może przyjmować dwie konformacje; w konformacji „zamkniętej” sekwencje WH2 i A białka są zamaskowane i nieaktywne, przypuszczalnie na skutek oddziaływań wewnątrz cząsteczki N-WASp (cząsteczka N-WASp w lewym rogu Ryc. 3). Zgodnie z tym założeniem, zdolność białka N-WASp do stymulacji nukleacji i

WASp hamowana jest dodatkowo przez inne, nieznanne jeszcze czynniki. W badaniach modelowych bowiem, prowadzonych na ekstraktach z jaj żaby *Xenopus laevis* (w odróżnieniu od wspomnianych obserwacji prowadzonych na białkach wyizolowanych), N-WASp jest całkowicie niezdolny do stymulacji polimeryzacji aktyny.



W czasie aktywacji określonych receptorów błonowych komórki uruchamiane zostają szlaki sygnałowe, które prowadzą między innymi do aktywacji Cdc42, tj. wymiany związanego z tą GTPazą GDP na GTP; lokalnie może też być syntetyzowany PIP<sub>2</sub>. Związanie Cdc42 i PIP<sub>2</sub> z odpowiednimi domenami N-WASp wywołuje zmiany konformacyjne tego białka, stabilizując jego formę „otwartą”. W efekcie tych zmian odsłonięte zostają sekwencje WH2 i A (Ryc. 3, część środkowa). Następnie sekwencja A wiąże kompleks Arp2/3, a domena WH2 monomery aktyny sprawiając, że białka te znajdują się w swoim bezpośrednim sąsiedztwie. Współdziałanie sekwencji WH2 i A ułatwia zatem nukleację zarodków polimeryzacji aktyny. Kompleks Arp2/3 pozostaje związany z ostrym, wolno rosnącym końcem mikrofilamentu, umożliwiając tym samym jego wzrost od końca kolczaste go (prawa strona Ryc. 3).

Proponowany model integruje szereg elementów wiedzy o mechanizmach nukleacji aktyny w komórce. Uwzględnia między innymi ustaloną już rolę sekwencji WH2 i A w tym procesie (MACHESKY i INSALL 1998, ROHATGI i

współaut. 1999). Podkreśla rolę PIP<sub>2</sub> oraz Cdc42 w nukleacji aktyny poprzez N-WASp i kompleks białek Arp2/3, stwierdzoną na podstawie badań prowadzonych na wyizolowanych białkach oraz z zastosowaniem cytoplazmatycznych ekstraktów jaj *X. laevis* (MA i współaut. 1998a, b; ROHATGI i współaut. 1999). Nadekspresja N-WASp w fibroblastopodobnych komórkach COS-7 stymuluje polimeryzację aktyny i formowanie filopodiów indukowane przez Cdc42 (MIKI i współaut. 1998b). Z drugiej strony, omawiany model jest uproszczony i nie uwzględnia roli innych czynników, na przykład profiliny, w regulowaniu aktywności N-WASp (SUETSUGU i współaut. 1998). Odpowiedzi wymaga też pytanie, czy mechanizmy regulacji aktywności białek Scar, a zwłaszcza WASp, białka bardzo zbliżonego w budowie do N-WASp, mogą być podobne. Wiadomo dotąd, że ekspresja WASp w komórkach nabłonkowych wywołuje wokół jądra zależną od Cdc42 polimeryzację aktyny, a jednak WASp, w odróżnieniu od N-WASp, nie uczestniczy w indukowanym przez Cdc42 tworzeniu filopodiów (SYMONS i współaut. 1996, MIKI i współaut. 1998b).

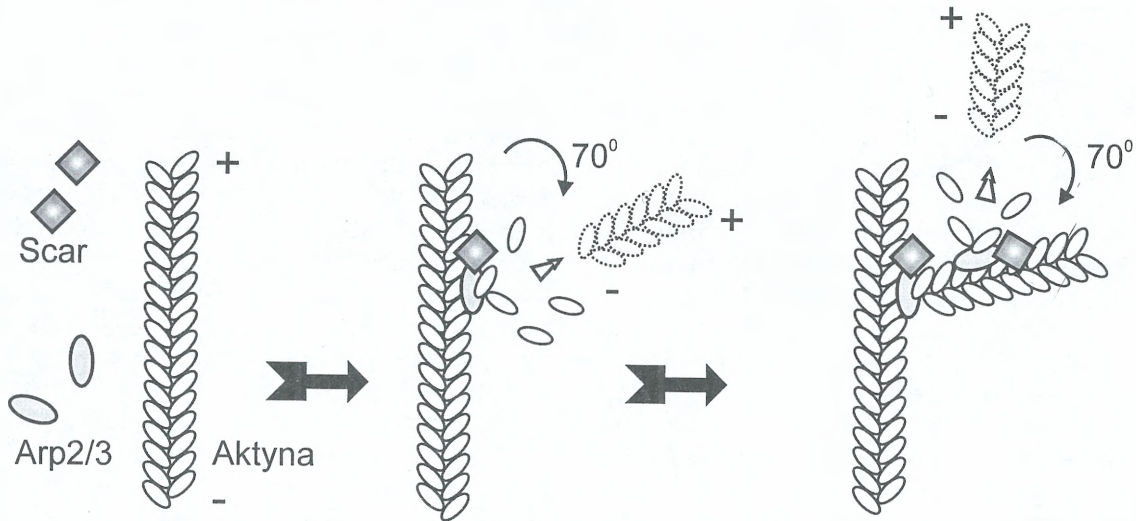
#### „DENDRYTYCZNY” MODEL NUKLEACJI AKTYNY

Omówiony przykład aktywacji N-WASp przez Cdc42 i PIP<sub>2</sub> jest jednym z możliwych sposobów kontrolowania nukleacji aktyny w komórce. W oparciu o badania interakcji Scar1 i kompleksu Arp2/3 zaproponowano też inny mechanizm formowania zarodki polimeryzacji aktyny, nazwany modelem „dendrytycznym” (MULLINS i współaut. 1998, MACHESKY i współaut. 1999). U jego podstaw znalazły się obserwacje, że stymulujący wpływ Scar1 na zależną od kompleksu Arp2/3 nukleację aktyny, może być dodatkowo wzmocniony. Efekt taki osiąga się po wstępnej inkubacji Scar1 i kompleksu białek Arp2/3 ze spolimeryzowanymi wcześniej mikrofilamentami. W takich warunkach całkowicie eliminowane jest opóźnienie, typowe dla pierwszego etapu polimeryzacji aktyny, gwałtownie powstają nowe filamenty. Sugeruje się więc, że Scar1 i kompleks białek Arp2/3 sprzyjają nukleacji aktyny, ale po wcześniejszym związaniu z istniejącymi już mikrofilamentami (Ryc. 4). Związane z mikrofilamentem Scar1 i kompleks Arp2/3 zapoczątkowują formowanie zarodki polimeryzacji aktyny u jego boku (Ryc. 4.) Białka te pozostają związane z ostrym końcem nowego filamentu, tym samym umożliwiają jego polimeryzację z końca kolczastego. Nowe, „odpączkujące” w ten sposób mikro-

filamenty tworzą kolejne odgałęzienia filamentów macierzystych, prowadząc do powstania sieci aktynowej (Ryc. 4). Zaletą dendrytycznego modelu nukleacji aktyny jest fakt, że uwzględnia on wszystkie właściwości kompleksu Arp2/3 — jego zdolność do nukleacji aktyny, wysokie powinowactwo do końca ostrego i przyłączanie do boku mikrofilamentu. Ponadto, obserwacje mikroskopowe potwierdziły, że w obecności kompleksu białek Arp2/3 filamenty aktynowe tworzą Y- lub T-kształtne rozgałęzienia zachowujące stały, 70° kąt odchylenia od filamentu macierzystego (Ryc. 4). Kompleks Arp2/3 zlokalizowany był w węzłach takich rozgałęzień (MULLINS i współaut. 1998). Podobną organizację filamentów aktynowych i lokalizację kompleksu Arp2/3 wykryto pod błoną komórkową w czole migrujących fibroblastów i keratynocytów (SVITKINA i BORISY 1999).

Model dendrytyczny nie wyklucza omówionego wcześniej mechanizmu nukleacji aktyny kontrolowanego przez PIP<sub>2</sub> i Cdc42. Te ligandy, i szereg innych białek oddziałujących z WASp/Scar, związanych jest z błoną komórkową bądź oddziałuje z receptorami błonowymi. Odkrycie zatem rodziny białek WASp/Scar i ustalenie ich roli w nukleacji aktyny wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla zrozumienia me-





Ryc. 4. Dendrytyczny model nukleacji aktyny.

Scar i kompleks białek Arp2/3 wiążą się z boku już istniejącego filamentu aktynowego, umożliwiając nukleację nowego mikrofilamentu. Kompleks Arp2/3 i Scar pozostają związane z końcem ostrym („-“) powstającego filamentu; filament ulega polimeryzacji z końca kolczastego („+“), tworząc odgałęzienie odchyłone od mikrofilamentu macierzystego pod kątem  $70^{\circ}$ . Rysunek nie uwzględnia udziału profiliny i białek z rodziny Ena/VASP, które mogą przyspieszać asocjacje monomerów aktyny do końca kolczastego nowego filamentu. Ponadto, białka takie jak żelolina (która zastania koniec kolczasty mikrofilamentu) oraz kofilina (katalizuje jego depolimeryzację i skracanie od końca ostrego) współdecydują o dynamice powstającej sieci aktynowej (MACHESKY i INSALL 1999).

chanizmów kontrolujących podbłonową polimeryzację aktyny. Polimeryzacja taka stanowi mechanizm napędowy szeregu procesów ko-

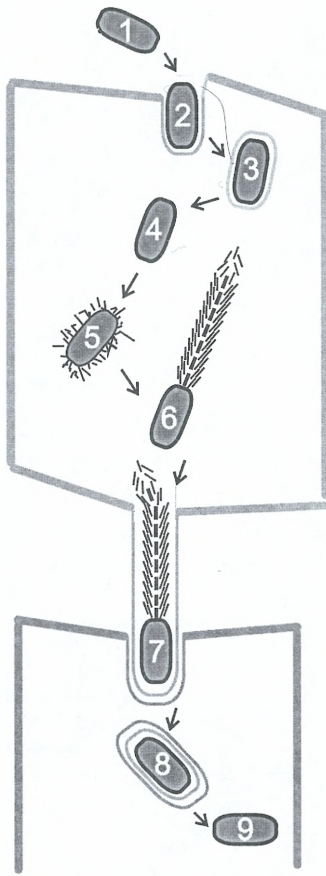
mórkowych, między innymi przesuwania się czoła migrującej komórki.

#### NUKELACJA AKTYNY INDUKOWANA PRZEZ BAKTERIĘ *Listeria monocytogenes*

Grupa chorobotwórczych bakterii, obejmująca Gram-dodatnią *Listeria* oraz Gram-ujemne *Shigella* i *Rickettsia*, rozwinęła mechanizm rozprzestrzeniania się w zainfekowanym organizmie, który opiera się na gwałtownej nukleacji i polimeryzacji aktyny gospodarza. Ryc. 5 przedstawia schematycznie etapy infekcji komórki przez *L. monocytogenes*. Bakterie te pobierane są do komórek na drodze fagocytozy. Następnie, dzięki wydzielanym przez siebie enzymom, degradowują otaczającą je błonę fagosomu i uwalniają się do cytozolu. Tu nie tylko rozmnażają się, ale też indukują lokalną polimeryzację aktyny. Filamenty aktynowe najpierw otaczają całą bakterię, po czym ulegają przegrupowaniu, formując „ogon” ciągnący się za jednym z biegunów bakterii. Biegun ten jest miejscem nukleacji i polimeryzacji aktyny, która odpycha bakterię, wprowadzając ją w ruch z prędkością 6–60  $\mu\text{m}$  na minutę. W momencie kontaktu z błoną komórkową ruch bakterii odkształca błonę — powstaje długa wypustka z bakterią na jej szczycie. Wypustki takie są często internalizowane przez sąsiednie komórki, co prowadzi do rozprzestrzeniania bakterii w tkankach gospodarza. *L. monocytogenes* atakuje ko-

mórki wątroby, a *Shigella flexnerii* nabłonek jelita, co prowadzi odpowiednio do listeriozy i biegunki. Zainteresowanie tymi bakteriami podyktowane jest nie tylko ich patogennością. Obserwacje ultrastrukturalne wykazały, że filamente aktynowe tworzące ich „ogony” są krótkie (0,2  $\mu\text{m}$ ), skierowane końcem kolczastym do powierzchni bakterii — tu zatem dochodzi do ich nukleacji i wydłużania. Następnie mikrofilamenty te wiązane są ze sobą wzajemnie, dzięki takim białkom jak  $\alpha$ -aktynina i fimbryna, i formują stacjonarny „ogon”, względem którego przemieszcza się bakteria. Wraz z odsuwaniem się bakterii, mikrofilamenty ulegają stopniowej depolimeryzacji. Morfologia i dynamika tych struktur przypomina więc organizację aktyny pod błoną komórki, np. w czole migrującej komórki, sprawiając, że stały się one wygodnym modelem badawczym dla tych zjawisk.

Jedynym białkiem *L. monocytogenes* niezbędnym do jej ruchu jest ActA. Jest to białko powierzchniowe, zakotwiczone w błonie bakterii końcem C, a jego część środkową zajmują sekwencje bogate w prolinę (Ryc. 6). ActA występuje głównie na jednym biegunie *L. monocytogenes* — i to przy tym biegunie polimeryzowana



Ryc. 5. Etapy infekcji komórek przez *Listeria monocytogenes*.

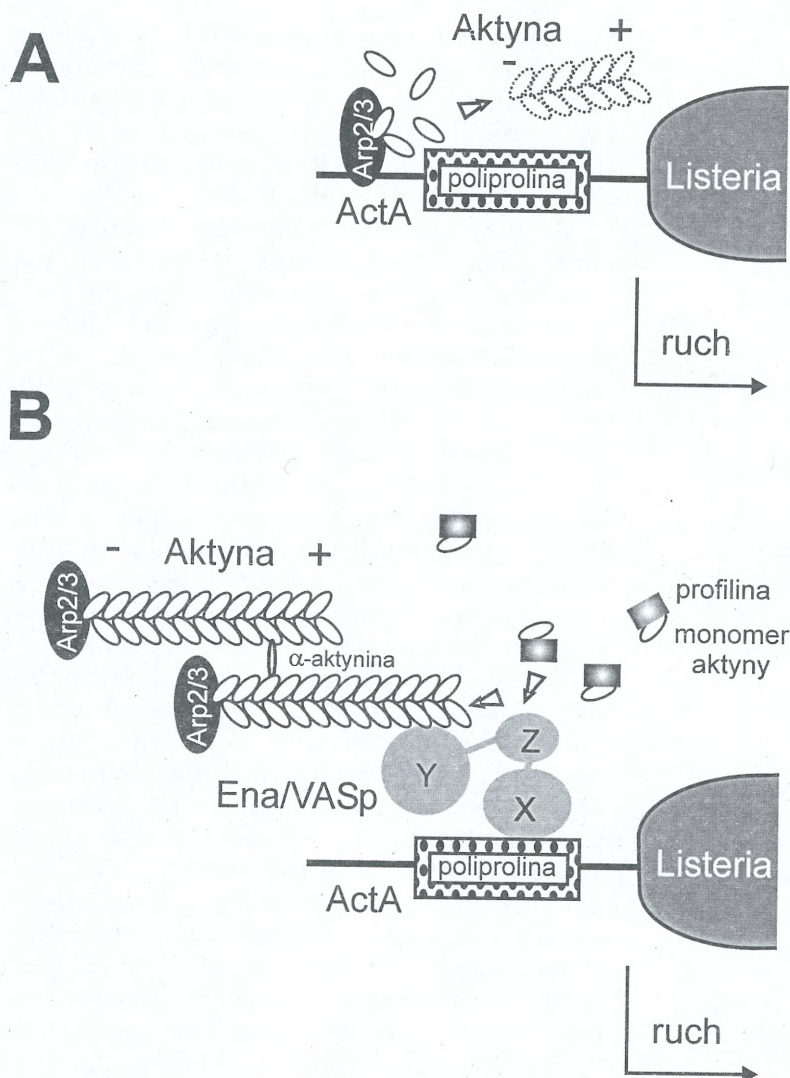
Bakteria (1) zostaje pobrana przez komórkę na drodze fagocytozy (2), zamknięta w fagosomie (3), z którego się uwalnia (4), po czym indukuje polimeryzację aktyny wokół swej powierzchni (5). Następnie, filamenty aktynowe polimeryzowane są już tylko na jednym biegunie bakterii tworząc „ogon” (6). Bakteria porusza się w cytoplazmie, napotyka na błonę komórkową i wywołuje formowanie wypustki (7), która jest internalizowana przez sąsiednią komórkę. Tu bakteria ponownie uwalnia się do cytoplazmy (8, 9), rozpoczynając nowy cykl rozwoju.

jest aktyna. Kluczowym dla wyjaśnienia mechanizmu tego zjawiska stało się odkrycie Welcha i współautorów, że to kompleks białek Arp2/3 inicjuje zależną od ActA polimeryzację aktyny wokół bakterii (Ryc. 6A). *In vitro* wyizolowany kompleks białek Arp2/3 i białko ActA (lub jego N-końcowy fragment) dodane łącznie do monomerów aktyny eliminują efekt opóźnienia pierwszego etapu polimeryzacji aktyny, 50-krotnie zwiększając jej szybkość. A zatem, ActA potęguje zdolność kompleksu Arp2/3 do nukleacji aktyny; białka te funkcjonują więc razem jako wyjątkowo efektywny katalizator polimeryzacji aktyny. Obserwacje te sugerowały, że w komór-

ce gospodarza białko ActA, poprzez swój koniec N, rekrutuje i wiąże endogenny kompleks Arp2/3. W ten sposób stymulowana jest nukleacja i polimeryzacja aktyny, która staje się motorem ruchu bakterii w cytozolu komórki (WELCH i współaut. 1997, 1998).

Autorzy omówionej hipotezy zakładali, że istnieją dodatkowe czynniki, które stymulują ruch bakterii w komórce. Mikrofilamenty polimeryzowane w obecności kompleksu białkowego Arp2/3 wokół *L. monocytogenes* rzadko bowiem formowały spolaryzowane „ogony” i nie wystarczały do przemieszczania się bakterii. Tę istotną dla ruchu *L. monocytogenes* rolę odgrywać mogą białka z kolejnej rodziny — Ena/VASp (LAURENT i współaut. 1999). Białka Ena/VASp są odległymi krewnymi omówionych wcześniej białek z rodziny WASp/Scar. Dzielią z nimi wspólną, N-końcową domenę WH1 (nazywaną też EVH1). Badania z użyciem syntetycznych peptydów wykazały, że domena ta (oprócz PIP<sub>2</sub>) wiąże z dużym powinowactwem sekwencję aminokwasową obejmującą 4 proliny i fenyloalaninę (PREHODA i współaut. 1999). Sekwencja taka występuje w białku ActA *L. monocytogenes* i odpowiada za jego interakcję z VASp (ang. vasodilator-stimulated protein) (Ryc. 6B). Koniec C białka VASp oddziałuje z filamentami aktynowymi, a motyw poliprolinowy wiąże profilinę. Taka wielofunkcyjność umożliwia aktywny udział Ena/VASp w formowaniu mikrofilamentów. Sądzi się, że funkcjonalne znaczenie ma interakcja Ena/VASp z profiliną, która z kolei wiąże monomery aktyny. Dzięki takim interakcjom białka Ena/VASp przyciągają monomery aktyny w okolice końca kolczastego mikrofilamentu i, łącznie z profiliną, mogą stymulować polimeryzację filamentów przy powierzchni *L. monocytogenes* (Ryc. 6B). Z drugiej strony, istotne jest też, że asocjacja białek Ena/VASp z powierzchnią *L. monocytogenes* warunkowana jest ich interakcją z ActA. Z uwagi na fakt, że występowanie ActA ograniczone jest do jednego bieguna bakterii, białka Ena/VASp współdecydują o biegunowej polimeryzacji aktyny. Tak zorientowana polimeryzacja aktyny może powodować ruch bakterii. W ślad za poruszającą się bakterią formuje się stacjonarny „ogon” aktynowy. Białka Ena/VASp łączą powstające filamenty aktynowe z bakterią, podczas gdy kompleks Arp2/3, silnie związany z końcem ostrym mikrofilamentów, pozostaje za nią w tyle (Ryc. 6B). Obserwacje mikroskopowe potwierdzają, że białka Ena/VASp skupiają się w strefie łączącej „ogon” aktynowy z powierzchnią *L. monocytogenes*, natomiast kompleks Arp2/3 rozmieszczony jest wzdłuż całej tej struktury (WELCH i współaut.





Ryc. 6. Modelowe mechanizmy polimeryzacji aktyny przy powierzchni *Listeria monocytogenes*.

(A) Kompleks białek Arp2/3 wiąże się do końca N białka ActA, zlokalizowanego biegunowo na powierzchni *L. monocytogenes*, i stymuluje nukleację aktyny. (B) Białka z rodziny Ena/VASp przyspieszają wydłużanie mikrofilamentów. Białka te wiążą z poliprolinową sekwencją ActA poprzez domenę EVH1 („X”). Ich własna sekwencja bogata w prolinę („Z”) może oddziaływać z profiliną i ułatwiać dodawanie monomerów aktyny do kolczastego końca mikrofilamentu. Filament pozostaje związany z domeną EVH2 („Y”) omawianych białek. Bardziej szczegółowy opis mechanizmu współdziałania tych Ena/VASp i kompleksu Arp2/3 zamieszczono w tekście.

1997, LAURENT i współaut. 1999). *L. monocytogenes* wykorzystuje więc współdziałanie białek Ena/VASp i kompleksu Arp2/3 w celu stymulacji polimeryzacji aktyny. Mechanizm taki wydaje się też funkcjonować w warunkach fizjo-

logicznych w komórce, wzbogacając repertuar sposobów, w jaki kontrolowana jest przebudowa cytoszkieletu aktynowego (MACHESKY i INSALL 1999).

#### PARTICIPATION OF Arp2/3 COMPLEX IN ACTIN NUCLEATION THE MECHANISM OF MOTILITY OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

##### Summary

Nucleation of actin is the first and the slowest step in polymerization of microfilaments. A critical role in acceleration of actin nucleation is played by Arp2/3 complex which creates microfilaments growing from their barbed ends. This activity of Arp2/3 complex is upregulated by WASp/Scar family proteins. These proteins, in turn, interact with a variety of cell signalling molecules including PIP<sub>2</sub> and Rho-family GTPases. Therefore, the WASp/Scar protein can

provide a link between cell surface receptors and actin polymerization. On the other hand, a pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* also activates the host Arp2/3 complex. This leads to directional polymerization of actin filaments at the bacterium surface which propels *L. monocytogenes* within the cytoplasm of the infected cell and allows its cell-to-cell spreading.

##### LITERATURA

BEAR J. E., RAWLS J. F., SAXE C. L., 1998. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *J. Cell Biol.* 142, 1325–1335.

HIGGS H. N., POLLARD T. D., 1999. Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar protein. *J. Biol. Chem.* 274, 32532–32531.

KELLEHER J. K., ATKINSON S. J., POLLARD T. D., 1995. Sequences, structural models, and cellular localization of the



- actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* 131, 385–397.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1997. Rola wapnia w organizacji cytoszkieletu podbłonowego. *Kosmos* 46, 579–585.
- LAURENT V., LOISEL T., HARBECK B., WAHMAN A., GROBE L., JOCKUSCH B. M., WEHLAND J., GERTLER F. B., CALIER M.-F., 1999. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 144, 1245–1258.
- LI R., 1997. *Bee1*, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich Syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136, 649–658.
- MA L., CANTLEY L. C., JANMEY P. A., KIRSCHNER M. W., 1998a. Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 140, 1125–1136.
- MA L., ROHATGI R., KIRSCHNER M. W., 1998b. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15362–15367.
- MACHESKY L. M., INSALL R. H., 1998. *Scar1* and the related Wiscott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347–1356.
- MACHESKY L. M., INSALL R. H., 1999. Signaling to actin dynamics. *J. Cell Biol.* 146, 267–272.
- MACHESKY L. M., ATKINSON S. J., AMPE C., VANDEKERCKHOVE J., POLLARD T. D., 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127, 107–115.
- MACHESKY L. M., MULLINS R. D., HIGGS H. N., KAISER D. A., BLANCHON L., MAY R. C., HALL M. E., POLLARD T. D., 1999. *Scar*, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3739–3744.
- MIKI H., SUTSUGU S., TAKENAWA T., 1998a. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by *Rac*. *EMBO J.* 17, 6932–6941.
- MIKI H., SASAKI T., TAKAI Y., TAKENAWA T., 1998b. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391, 93–96.
- MULLINS R. D., HEUSER J. A., POLLARD T. D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching network of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6181–6186.
- PREHODA K. E., LEE D. J., LIM W. A., 1999. Structure of the Enabled/VASP homology domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell* 97, 471–480.
- ROHATGI R., MA L., MIKI H., LOPEZ M., KIRCHHAUSEN T., TAKENAWA T., KIRSCHNER M. W., 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221–231.
- SUETSUGU S., MIKI H., TAKENAWA T., 1998. The essential role of profilin in the assembly of actin microspike formation. *EMBO J.* 17, 6516–6526.
- SVITKINA T. M., BORISY G. G., 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.
- SYMONS M., DERRY J. M. J., KARLAK B., JIANG S., LEMAHIEU V., MCCORMICK F., FRANCKE U., ABO A., 1996. Wiscott-Aldrich Syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42h, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723–734.
- WELCH M., D., IWAMATSU A., MITCHISON T. J., 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265–269.
- WELCH M. D., ROSENBLATT J., SKOBLE J., PORTNOY D. A., MITCHISON T. J., 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105–108.
- WINTER D., PODTELEJNIKOV A. V., MANN M., LI R., 1997. The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr. Biol.* 7, 519–529.
- WINTER D., LECHLER T., LI R., 1999. Activation of the yeast Arp2/3 complex by *Bee1p*, a WASP-family protein. *Curr. Biol.* 9, 501–504.
- YARAR D., TO W., ABO A., WELCH M. D., 1999. The Wiscott-Aldrich Syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 9, 555–558.
- YIN H. L., STULL, J. T., 1999. Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *J. Biol. Chem.* 274, 32529–32530.