

HANNA FABCZAK

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: hannaFab@nencki.gov.pl

RODZINA BIAŁEK Rho A CYTOSZKIELET

WSTĘP

Białka Rho, należące do nadrodziny małych białek G, regulują wiele procesów kluczowych dla życia komórki eukariotycznej. Jedną z najważniejszych funkcji przez nie pełnionych jest uruchamianie szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do przebudowy cytoszkieletu aktynowego w wyniku aktywacji receptora na błonie cytoplazmatycznej. Cytoszkielet aktynowy, zbudowany z mikrofilamentów aktynowych połączonych z wieloma białkami wiążącymi aktynę, często tworzy złożone układy wiązek lub sieci filamentów. Aktyna w takiej postaci bierze między innymi udział w organizacji struktur komórkowych, takich jak pierścień kurczliwy

formowany podczas cytokinezy, korykalna sieć aktynowa, włókna naprężeniowe, znane również pod nazwą pęczków kurczliwych (ang. stress fibers) oraz wypustek powierzchniowych, włącznie z lamelipodiami, pofałdowaniami błon (ang. membrane ruffles) lub filopodiami (Ryc. 1). Cytoszkielet aktynowy stanowi dynamiczny układ, który w związku z pełnionymi funkcjami (migracja, zmiana kształtu i podział komórki, egzo- i endocytoza) ulega ciągłym przeobrażeniom, a białka Rho pełnią nadrzędną rolę w kontroli tych zjawisk komórkowych (KOROHODA 1997, VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997, SCHMIDT i HALL 1998).

REGULACJA AKTYWNOŚCI MAŁYCH BIAŁEK G

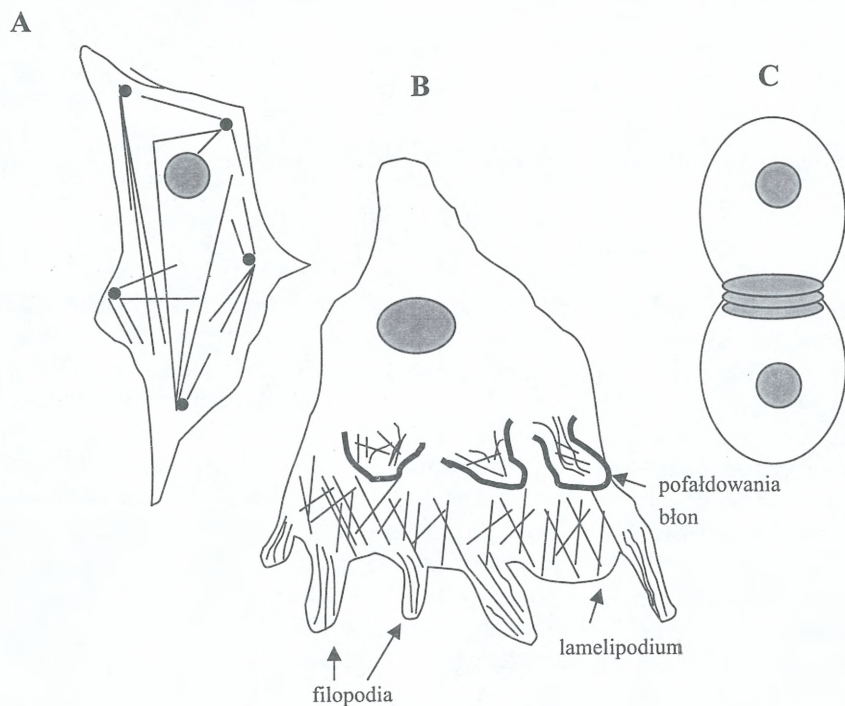
Białka Rho należą do wielkiej nadrodziny małych białek G, nazywanych również małymi GTP-azami, małymi białkami wiążącymi GTP lub białkami Ras. Ich masa cząsteczkowa waha się między 20 a 40 kDa. Występują one we wszystkich komórkach eukariotycznych, od mikroorganizmów (TANAKA i TAKAI 1998, CHUNG i współaut. 2000, RĘDOWICZ i KORN 2000), poprzez rośliny (VALSTER i współaut. 2000), aż do kręgowców (MATOZAKI i współaut. 2000, TAKAI i współaut. 2001). Ze względu na homologię sekwencji aminokwasowych oraz podobieństwo pełnionych funkcji, nadrodzina tych białek dzieli się na przynajmniej 5 rodzin: białka Ras, Rho, Rab, Sar/Arf oraz Ran. Białka należące do rodziny Ras, aktywowane w wyniku stymulacji receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych przez kinazy MEK i MAP, mogą regulować procesy transkrypcyjne w jądrze komórkowym. Białka z dwóch rodzin, Rab i Sar/Arf, biorą udział w kontroli wewnątrzkomórkowego transportu pęcherzyków błonowych, związanego z

procesami endo- i egzocytozy. Białka Ran są natomiast odpowiedzialne za transport między jądrem a cytoplazmą podczas faz G1, S i G2 cyklu komórkowego oraz organizację mikrotubul podczas fazy M. Rodzina białek Rho, w których wyróżnia się białka rho, rac i cdc42 (w niniejszym artykule przyjęto zasadę podawania nazw przedstawicieli rodziny Rho małymi literami, dla odróżnienia od nazwy całej rodziny), zaangażowana jest również w regulację procesów transkrypcji, ale przede wszystkim kontroluje przekształcenia cytoszkieletu aktynowego komórki związane z procesami ruchu komórki, zmiany jej kształtu, cytokinezy oraz egzo- i endocytozy (TAKAI i współaut. 2001, Tabela 1).

Wszystkie białka G, nie wyłączając białek należących do rodziny białek Rho, występują w formie nieaktywnej, gdy z cząsteczką białka połączony jest GDP, a aktywnej po wymianie GDP na GTP. Przejście ze stanu nieaktywnego w stan aktywny wymaga udziału dodatkowych

białek aktywujących lub regulujących. Do pierwszej grupy takich białek należą białka GEF (ang. guanine nucleotide exchange factors), które umożliwiają wymianę GDP na GTP. Każde białko należące do tej stosunkowo dużej grupy (ponad 30 przedstawicieli) posiada dwie charakterystyczne domeny. Pierwszą z nich stanowi domena DH (ang. 1-Db1 homology), która jest odpowiedzialna za wymianę nukleotydów, a drugą — domena PH (ang. pleckstrin homolo-

czania się białek Rho między błoną cytoplazmatyczną a cytoplazmą. Nieaktywne białka Rho występują w cytoplazmie w postaci kompleksu z białkami GDI, które hamują wymianę GDP na GTP. Po aktywacji następuje dysocjacja GDI i białka Rho ulegają przemieszczeniu do błony cytoplazmatycznej (KJØLLER i HALL 1999). W procesie tym biorą udział białka z rodziny ERM (ang. ezrin/radixin/moesin), które ułatwiają dysocjację GDI od białka G i umożliwiają



Ryc. 1. Schematyczny obraz struktur komórkowych wchodzących w skład cytoszkieletu aktynowego.

A. Włókna naprężeniowe, pęczki filamentów aktynowych biegnące wzdłuż linii naprężenia cytoplazmy. B. Lamelipodium, szeroka wypustka na przedzie poruszającej się komórki, w której filamente aktynowe tworzą sieć krzyżujących się struktur, pofałdowania błonowe powstałe w wyniku uniesienia i zawinięcia do tyłu lamelipodium, oraz filopodia, cienkie palczaste wypustki, w których filamente aktynowe ułożone są równoległe do siebie. C. Pierścień kurczliwy, obecny podczas cytokinezy.

gy), dzięki której białka te mogą wiązać się z fosfolipidami, np. błony cytoplazmatycznej lub błon wewnątrzkomórkowych. Domeny te są odpowiedzialne za właściwą lokalizację białek w komórce (HART i współaut. 1991, YAKU i współaut. 1994, ZHENG i współaut. 1996). Drugą grupę stanowią białka regulatorowe GDI (ang. guanine nucleotide dissociation inhibitors), których kluczową rolą jest kontrola przemiesz-

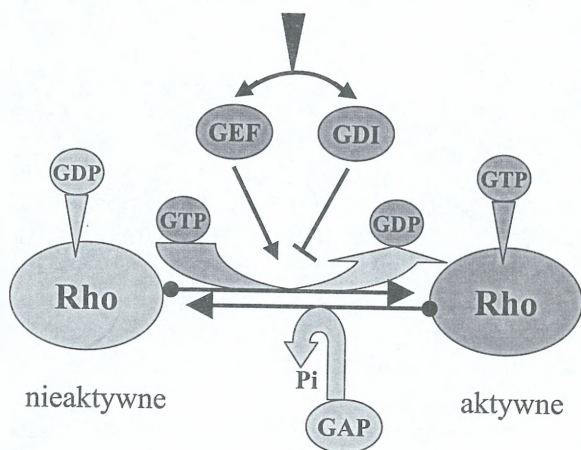
tym samym wymianę GDP na GTP (TAKAHASHI i współaut. 1998). Ze względu na niską wewnętrzną aktywność GTPazową małych białek G, ich przejście ze stanu aktywnego w nieaktywny wymaga dodatkowego białka regulatorowego, GAP (ang. guanine nucleotide activating protein), które aktywuje hydrolizę GTP do GDP (KJØLLER i HALL 1999) (Ryc. 2).

BIAŁKA Rho A CYTOSZKIELET AKTYNOWY

Po raz pierwszy wykazano, że białka Rho zaangażowane są w procesy związane z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego zachodzące w komórkach drożdży podczas pączkowania (ADAMS i współaut. 1990). Dopiero jednak badania Ridley i Halla na początku lat 90. pozwoliły poznać szlaki aktywacji poszczególnych białek — rho, rac oraz cdc42 — w komórkach ssaczych i udowodniły, że każda z tych grup ma swój indywidualny udział w przebudowie cytoszkieletu aktynowego (RIDLEY i HALL 1992, RIDLEY i współaut. 1992). Stwierdzili oni, że mikro-

iniekcja konstytutywnie aktywnej, zmutowanej (Gly14Val) postaci białka rho lub podanie surowicy powoduje zmianę morfologii fibroblastów hodowanych w środowisku bez surowicy. Zmiany te zachodzą w trakcie przebudowy cytoszkieletu aktynowego, podczas której tworzą się nowe włókna naprężeniowe (Ryc. 3). Jednocześnie rozproszona do tej pory w cytoplazmie winkulina, jedno z białek biorących udział w tworzeniu ognisk kontaktowych (ang. focal adhesion), stanowiących punkty przyczepu komórek do podłoża, a równocześnie punkty zaczepienia włó-

kien naprężeniowych w błonie, przemieszcza się do błony. Podobny efekt obserwowano po podaniu do hodowli fibroblastów kwasu lizofosfatydowego (LPA), występującego w surowicy i stymulującego poprzez receptory zlokalizowane w błonie komórkowej szlak przekazywania sygnałów, w którym białko rho pełni kluczową rolę. Nie obserwowano tych zmian, a nawet stwierdzono zanik istniejących już włókien naprężeniowych w komórkach, w których białko rho inaktywowano przez ADP-rybozylację pod wpły-



Ryc. 2. Schemat procesu aktywacji białek Rho (dokładny opis w tekście).

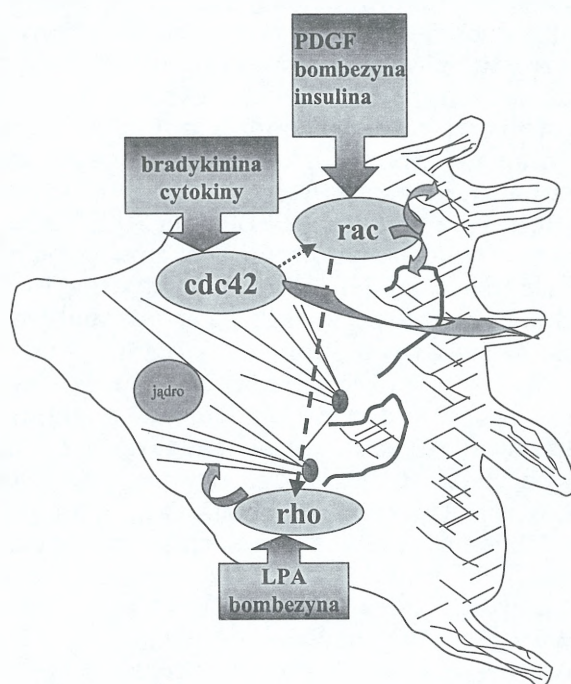
Po sygnale aktywującym (czarna grot strzałki) GEF umożliwia wymianę GDP na GTP. Białka GDI tworzą kompleks z Rho-GDP i hamują wymianę GDP na GTP. GAP aktywują hydrolazę GTP do GDP (wg. TAKAI i współaut. 2001, zmieniony).

wem transferazy C3 z *Clostridium botulinum* (RIDLEY i HALL 1992). (Transferaza C3 specyficznie ADP-rybozyluje białko rhoA i dlatego jest niezwykle użytecznym narzędziem w rozgraniczaniu funkcji pełnionych przez poszczególne białka z rodziny Rho).

Kolejną grupą białek z rodziny Rho są białka rac. Występują one w komórkach ssaczy w postaci dwóch izomerów, rac1 i 2, homologicznych wobec siebie w 92%. W podobnym cyklu doświadczeń, jakie przeprowadzono w przypadku białek rho, konstytutywnie aktywna postać białka rac1 powodowała reorganizację cytoszkieletu aktywnego polegającą na polimeryzacji aktywny *de novo* na peryferiach komórki i tworzeniu nowych lamelipodiów i pofałdowań błon (Ryc. 3) oraz aktywacji pinocytozy (RIDLEY i współaut. 1992). Stymulacja receptorów błonowych komórki przez hormony PDGF, insulinę lub bombezynę wywoływała taki sam efekt, jak konstytutywnie aktywna forma białka rac (RIDLEY i współaut. 1992, NOBES i współaut. 1995). Zahamowanie reorganizacji cytoszkieletu akty-

nowego następowało natomiast po wprowadzeniu do komórki konstytutywnie nieaktywnej formy białka rac, w którym 17 aminokwas, serynę, zamieniono na asparaginę (takie białko wykazuje 10-krotnie niższe powinowactwo do GTP, niż do GDP).

Długotrwała obserwacja komórek po wprowadzeniu aktywnego białka rac lub po stymulacji hormonalnej wykazała, że oprócz charakterystycznych dla aktywnego białka rac przeobrażeń cytoszkieletu na peryferiach komórki pojawiają się włókna naprężeniowe i organizują się nowe ogniska kontaktowe, specyficzne dla przekształceń cytoszkieletu aktywnego w obecności aktywnych białek rho. W komórkach, do których wprowadzono konstytutywnie aktywną formę białka rac równocześnie z transferazą C3 z *Clostridium botulinum*, nie obserwowano wprawdzie zahamowania tworzenia nowych lamelipodiów i pofałdowań błon, ale nie pojawiały się już włókna naprężeniowe i nowe miejsca adhezji (RIDLEY i współaut. 1992). Te ostatnie



Ryc. 3. Schemat reorganizacji cytoszkieletu aktywnego w fibroblastach po aktywacji białek Rho (wg. MATOZAKI i współaut. 2000, zmieniony).

doświadczenia dowodzą, że białka rho, odpowiedzialne za tworzenie włókien naprężeniowych w komórce, mogą być stymulowane nie tylko bezpośrednio przez receptor, ale również przez aktywne białka rac.

Aktywacja białka cdc42, kolejnego przedstawiciela rodziny Rho, wywołuje w drożdżach polaryzację komórek i jest również odpowiedzialna za inicjację procesu pączkowania (ADAMS i współaut. 1990). W fibroblastach sty-

mulacja białka cdc42 przez bradykininę powoduje formowanie filopodiów (Ryc. 3), a później — lamelipodiów. Tworzenie się nowych filopodiów hamowało wprowadzenie do komórek dominująco negatywnej postaci białka cdc42, natomiast podanie negatywnej formy rac powodowało jedynie zablokowanie tworzenia lamelipodiów i pofałdowań błony (NOBES i HALL 1995, KOZMA i współaut. 1995). W tym przypadku aktywacja białka cdc42 może pociągać za sobą stymulację podległego mu białka rac. Wydaje się zatem bardzo prawdopodobne, że białko cdc42 pełni funkcję nadrzędną w rodzinie białek

Rho i może bezpośrednio aktywować białka rac, pośrednio zaś, poprzez białko rac, regulować aktywność białek rho. Na rycinie 3 przedstawiono schematycznie drogi aktywacji białek Rho oraz miejsce działania poszczególnych przedstawicieli tej rodziny. Przedstawione przykłady działania aktywnych form białek Rho uzupełnia Tabela I, w której przedstawiono szczegółowo izomery wchodzące w skład poszczególnych grup, lokalizację genu kodującego dane białko w chromosomach, miejsce ekspresji w organizmie oraz funkcję, jaką pełnią one w komórkach.

AKTYWACJA BIAŁEK Rho

Przełom w zrozumieniu funkcjonowania szlaków przekazywania sygnałów z udziałem białek Rho stanowiło poznanie mechanizmu aktywacji tych białek. Białka Rho mogą być stymulowane przez wiele czynników, do których należą substancje aktywujące receptory o aktywności kinaz tyrozynowych (np. czynniki wzrostu, insulina), agonści receptorów o 7 domenach transbłonowych, związanych z heterotrimerycznymi białkami G (np. LPA, bombezyna, bradykinina, trombina), integryny oraz substancje depolimeryzujące mikrotubule (HALL 1998, SCHWARTZ i SHATTIL 2000). Interesujące było rozszyfrowanie sposobu, w jaki bradykinina, LPA i bombezyna aktywują białka rho. Wymienione czynniki są agonistami receptorów błonowych, które aktywują inną rodzinę GTPaz, tzw. duże, heterotrimeryczne białka G. Od niedawna dopiero wiadomo, że szlaki przekazywania sygnałów z udziałem dużych i małych białek G mogą oddziaływać między sobą (SELBIE i HILL 1998). W wyniku aktywacji heterotrimeryczne białka G dysocjują na podjednostki, $G\alpha$, wiążącą GTP i $G\beta\gamma$. Do tej pory poznano 4 rodziny białek G: $G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$ i $G_{12/13}$. Wiele z nich może być aktywowane przez LPA. Wstrzykując do fibroblastów różne podjednostki α białek G stwierdzono, że dwie z nich, $G\alpha_{12}$ i $G\alpha_{13}$, powodują tworzenie włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych (BUHL i współaut. 1995). Późniejsze badania pozwoliły stwierdzić, że $G\alpha_{12}$ jest aktywowana przez trombinę, zaś $G\alpha_{13}$ przez LPA (KJØLLER i HALL 1998).

Mechanizm aktywacji G_{13} przez LPA jest lepiej poznany i polega na współdziałaniu podjednostki $G\alpha_{13}$ z czynnikiem GEF białka rho (115pRhoGEF), co powoduje jego aktywację i włączenie szlaku przekazywania sygnałów prowadzącego do przeobrażeń cytoszkieletu z udziałem tych białek (HART i współaut. 1998) (Ryc. 4).

Istnieje wiele dowodów na to, że ważnym ogniwem w regulacji białek rac jest kinaza 3-fosfatydyloinozytolu. Produkt tej kinazy, fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan, może bezpośrednio oddziaływać z domenami PH czynników GEF (Tiam1, Sos, Vav), prowadząc do zmiany lokalizacji i /lub aktywacji GEF białka rac (REIF i współaut. 1996, BAR-SAGI i HALL 2000) (Ryc. 4). Podawanie do hodowli fibroblastów inhibitora tej kinazy, wortmaniny, powodowało zahamowanie tworzenia indukowanych przez PDGF, EGF i insulinę pofałdowań błony, ale mikroiniekcja aktywnej formy białka rac cofała ten efekt (KOTANI i współaut. 1994, WENNSTROM i współaut. 1994, NOBES i współaut. 1995).

Najmniej znany jest mechanizm aktywacji cdc42. Czynnikiem chemotaktyczny fMLP powoduje w granulocytach obojętnochłonnych wzrost aktywności tego białka, a proces ten jest wrażliwy na działanie toksyny krztuśca. Może to wskazywać na udział heterotrimerycznego białka G, z grupy G_i , w aktywacji cdc42. Ponadto cytokiny TNF- α i Il-1 stymulują cdc42 i regulują reorganizację cytoszkieletu aktynowego (KJØLLER i HALL 1999).

KASKADY SYGNALIZACYJNE Z UDZIAŁEM BIAŁEK Rho

BIAŁKA rho

Do niedawna niewiele było wiadomo o molekularnym mechanizmie działania białek Rho.

W ciągu ostatnich kilku lat poznano szereg białek, które wiążą się z aktywną formą białek rho (rho-GTP) i mogą pełnić funkcję białek efektorowych. Szczególnie interesującym białkiem jest kinaza ROK α /ROCK, występująca również

pod nazwą kinazy p160Rho (RĘDOWICZ1999). Aktywność tej serynowo/treoninowej kinazy wzrasta w niewielkim stopniu po związaniu z rho-GTP. LEUNG i współaut. (1996) jako pierwsi wykazali, że nadekspresja białka kinazy aktywowanej rho lub jej N-końcowego odcinka (sta-

Ważną rolą kinazy rho jest regulacja stopnia fosforylacji miozyny. Substratem tej kinazy jest wiążąca miozynę podjednostka MBS (ang. myosin-binding subunit) fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny (KIMURA i współaut. 1996). Fosforylacja MBS prowadzi do zmniejszenia aktyw-

Tabela I. Rodzina białek G, białka Rho, lokalizacja i działanie na cytoszkielet komórki ssaczkiej (wg ASPENSTRÖM1999)

Małe białka G	Lokalizacja w chromosomie	Występowanie w organizmie	Działanie na cytoszkielet
rac1	7p21-22	występują powszechnie	lamelipodia, pofałdowania błon
rac2	22q12	komórki krwiotwórcze	aktywacja oksydazy NADPH
rac3	17qter/17q23-q25	serce, nerki, trzustka	?
rhoG	11p15.4-15.5	występują powszechnie	pofałdowania błon
cdc42	1p36.1?	występują powszechnie	filopodia
TC10	?	mięśnie szkieletowe, serce, wątroba	filopodia
rnd1 (rho6)	12q12-q13	mózg i wątroba, jądra	zanik włókien naprężeniowych, zniesienie adhezji
rnd2 (rho7)	17q21	mózg, wątroba, ?	
rhoE (rnd3)	?	występują powszechnie	zanik włókien naprężeniowych, wypustki błonowe
rhoA	3p21	występują powszechnie	włókna naprężeniowe ogniska kontaktowe
rhoB	2p12-2pter	występują powszechnie	włókna naprężeniowe
rhoC	1p13-p21	występują powszechnie	włókna naprężeniowe
rhoH (TTF)	4q13	komórki krwiotwórcze	?
rhoD (HP1)	?	występują powszechnie	filopodia? zanik włókien naprężeniowych

nowiącego domenę katalityczną, ale pozbawionego miejsca wiązania białka rho) powoduje utworzenie włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych w komórce, co później potwierdzili AMANO i współaut. (1997). Okazało się zatem, że do reorganizacji cytoszkieletu wymagana jest aktywność kinazy, nie zaś domena wiążąca białko rho. Ponadto, ekspresja mutantu z nieaktywną katalityczną domeną kinazy lub tylko C-końca (domeny wiążącej rho) tego białka powoduje zanik włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych. ISHIZAKI i współaut. (1997) zaobserwowali, że dominujący negatywny mutant kinazy zależnej od rho powodował również zahamowanie tworzenia włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych w nowotworowych komórkach nabłonkowych, ale równocześnie obserwowano wzrost stopnia polimeryzacji aktyny. Te ostatnie wyniki sugerują, że drogi prowadzące do polimeryzacji aktyny i tworzenia włókien naprężeniowych oraz ognisk kontaktowych mogą być regulowane niezależnie przez odmienne efekторы.

ności fosfatazy lekkiego łańcucha miozyny, a w konsekwencji do wyższego stopnia ufosforylowania cząsteczki miozyny (wyższego poziomu jej aktywności). Ponadto, kinaza zależna od rho może bezpośrednio fosforylować lekki łańcuch miozyny w tym samym miejscu, co specyficzna kinaza lekkiego łańcucha miozyny (AMANO i współaut. 1996, art. BRZESKIEJ, w tym numerze KOSMOSU). Miozyna w postaci ufosforylowanej łączy się z mikrofilamentami, tworząc aktomiozynowy układ kurczliwy komórek (TAN i współaut. 1992, CHRZANOWSKA i BURRIDGE 1996). Stymulowany przez rho skurcz fibroblastów można zahamować przez zastosowanie farmakologicznego inhibitora kinazy lekkiego łańcucha miozyny (KT5926), lub endogennego czynnika białkowego, kaldesmonu, blokującego oddziaływanie miozyna-aktyna (CHRZANOWSKA i BURRIDGE 1996, SASTRY i BURRIDGE 2000). Białko rho i kinaza zależna od niego regulują skurcz w komórkach mięśni gładkich, a zredukowanie aktywności kinazy białka rho przez Y-27632

hamuje skurcz mięśni gładkich indukowany przez agonistów (UEHATA i współaut. 1997).

Drugim ważnym punktem działania białek rho jest synteza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu, PI(4,5)P₂. Wprawdzie nie jest znany mechanizm tego procesu, ale przypuszcza się, że kinaza fosforylująca w pozycji 5 pierścienia inozytoloowego fosfatydyloinozytolo-4-fosforan, jest aktywowana przez bezpośrednie wiązanie z aktywną formą rho (CHONG i współaut. 1994, HARTWIG i współaut. 1995, TOLIAS i współaut. 1995, REN i współaut. 1996). Stymulacja syntezy PI(4,5)P₂ może wpływać na reorganizację aktyny poprzez białka wiążące aktynę (np. żelazina, profilina, kofilina, α-aktynina, winkulina, spektryna oraz CapZ). Białka te posiadają domeny bogate w lizynę i argininę oraz domeny PH, które łączą się z fosfatydyloinozytolami (SCHMIDT i HALL 1998). Wstrzyknięcie przeciwciał przeciw PI(4,5)P₂ do fibroblastów hamuje wytwarzanie indukowanych przez LPA włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych (GILMORE i BURRIDGE 1996).

Kolejnym fizjologicznie aktywnym efektem białek rho jest białko p140mDia (pokrewne białko u *Drosophila diaphanous* bierze udział w procesie cytokinezy i ustalaniu polarności komórek). W komórkach ssaczy białko to może reagować z profiliną, białkiem wiążącym monomery aktynowe (WATANABE i współaut. 1997). Ponadto, NARUMIYA i współaut. (1997) oraz WATANABE i współaut. (1997) stwierdzili, że w spolaryzowanych i niespolaryzowanych fibroblastach oraz komórkach fagocytujących białko p140mDia kolokalizuje się z profiliną, a nadekspresja p140mDia w komórkach nabłonkowych wzmagają organizację mikrofilamentów. W oparciu o te obserwacje zaproponowano mechanizm działania p140mDia, w którym aktywowane białko rho powoduje przemieszczenie kompleksu p140mDia/profilina w specyficzne miejsce pod błoną. Proces ten wiąże się z lokalnym wzrostem poziomu profiliny, a to z kolei prowadzi do polimeryzacji mikrofilamentów. W ten sposób tłumaczy się funkcję białka p140mDia w procesie cytokinezy w komórkach ssaczy. (VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997).

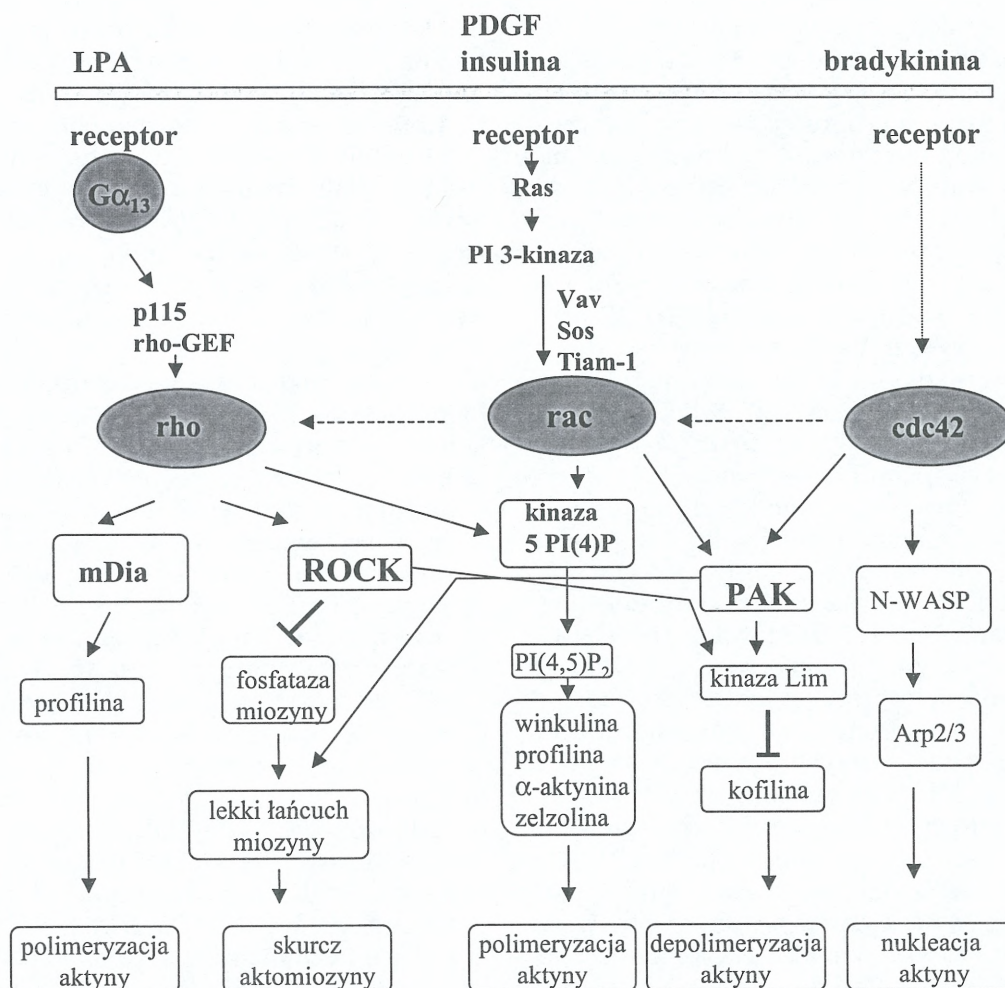
BIAŁKA rac i cdc42

Najważniejszym efektem dla białek rac i cdc42 jest kinaza PAK, dla której substratem jest miozyna (patrz art. BRZESKIEJ, w tym numerze KOSMOSU). Nadekspresja białka p65PAK może powodować formowanie lamelipodiów w fibroblastach (SELLS i CHERNOFF 1997). Kinaza PAK nie tylko bezpośrednio regu-

luje reorganizację cytoszkieletu aktynowego, ale również działa poprzez białka efektorowe. Jednym z nich jest kinaza LIM, białko należące do rodziny białek CRP (ang. cystein rich protein), posiadające wiążącą jony cynku domenę LIM. Większość białek z tej grupy pełni wprawdzie funkcje czynników transkrypcyjnych, ale zlokalizowano je również jako białka związane z cytoszkieletem aktynowym. Po fosforylacji przez kinazę PAK, aktywna kinaza LIM, będąca również substratem dla kinazy ROCK (AMANO i współaut. 2000), fosforyluje i inaktywuje kofilinę (białko wiążące się z filamentami aktynowymi i depolimeryzujące je), przez co zapobiega depolimeryzacji aktyny (SCHMITZ i współaut. 2000). Wszystkie białka należące do rodziny kinaz PAK posiadają wspólny motyw, obejmujący 18 aminokwasów. Motyw ten, nazwany CRIB (ang. cdc42/rac interactive binding) bierze udział w oddziaływaniach z rac i cdc42. Analiza komputerowa pozwoliła ustalić, że domenę CRIB posiada ponad 25 różnych białek, między innymi białko p34, nazwane POR1 (ang. partner of rac). Oddziałuje ono specyficznie z aktywną postacią białka rac i bierze udział w formowaniu pofałdowań błonowych. Mutant pozbawiony genu kodującego POR1 nie tworzy pofałdowań błon (JONESON 1996, VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997).

Kolejnym białkiem aktywowanym przez rac i cdc42, które bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, jest białko IQGAP (BRILL i współaut. 1996, KURODA i współaut. 1996). Wiąże się ono zarówno z rac i cdc42, oraz dzięki domenie homologicznej do domeny wiążącej aktynę kalponiny, może wiązać się z F-aktyną. Po związaniu z cdc42, białko IQGAP hamuje jego aktywność GTPazową i w związku z tym pozostaje ono przez dłuższy czas w formie aktywnej. Uszkodzenie genu kodującego odpowiednik białka IQGAP w drożdżach wiąże się z zaburzeniem procesu cytokinezy, natomiast nadekspresja IQGAP powoduje przedwczesne kształtowanie bruzdy podziałowej. IQGAP zlokalizowano w pierścieniu kurczliwym podczas podziału komórki (WOLF i współaut. 1999).

Ponadto, rac, analogicznie do rho, aktywuje 5-kinazę fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu, która odgrywa ważną rolę w polimeryzacji aktyny. Produktem tej kinazy jest PI(4,5)P₂ i, jak wykazano w płytkach krwi z uprzepuszczalną błoną, rac i PI(4,5)P₂ powodują uwalnianie białek blokujących z szybko rosnących końców filamentów aktynowych, co stanowi wstępny krok wymagany do polimeryzacji aktyny w odpowiedzi na działanie trombiny (HARTWIG i współaut. 1995). Nie stwierdzono do tej pory, aby białko cdc42 brało udział w aktywacji 5-ki-



Ryc. 4. Schemat działania białek Rho po aktywacji receptorów z uwzględnieniem najważniejszych szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do aktywacji tych białek oraz kaskad enzymów efektorowych stymulowanych przez białka Rho (wg. SCHMIDTA i HALLA 1998, KJØLLERA i HALLA 1999, SCHMITZA i współaut. 2000, zmieniony).

nazy fosfatydyloinozytolo-4-fosforanowej. Dlatego obserwowana polimeryzacja aktyny po aktywacji cdc42 przebiega prawdopodobnie z udziałem innych szlaków przekazywania sygnałów (MACKAY i HALL 1998). Jednym z efektorów specyficznie aktywowanych przez cdc42, ale nie przez rac, jest białko WASP (ang. Wiskott-Aldrich syndrome protein) (BURBELLO i współaut. 1995). (Rolę białka WASP i kompleksu Arp2/3 w procesie polimeryzacji aktyny obszernie omawia art. KWIATKOWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Nadekspresja WASP pro-

wadzi do tworzenia filopodiów (MIKI i współaut. 1993, MACKAY i HALL 1998), a w komórkach nabłonkowych nerki szczura i limfocytach T może indukować powstawanie skupisk aktyny. Procesy te można zablokować wprowadzając do komórki dominujący negatywny mutant białka cdc42 (SYMONS i współaut. 1996). Na Ryc. 4 przedstawiono schematycznie szlaki przekazywania sygnałów uruchamiane w wyniku aktywacji białek rho, rac i cdc42 w komórkach ssaków.

ENDOCYTOZA I TRANSPORT WEWNĄTRZKOMÓRKOWY

Fagocytoza jest procesem pobierania przez komórki cząstek o średnicy powyżej 0,5 μm . Na drodze fagocytozy komórki mogą pobierać pokarm, a komórki układu immunologicznego w ten sposób pochłaniają i unieszkodliwiają np. bakterie. Fagocytoza zostaje zapoczątkowana

przez przyłączenie cząstek do receptorów powierzchniowych. Związanie cząsteczki z receptorami powierzchniowymi indukuje uruchomienie w komórce szlaków przekazywania sygnałów, które prowadzą do miejscowej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w najbliższym

sąsiedztwie błony cytoplazmatycznej i wchłonięcie cząstki (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1999). Po jej internalizacji następuje szereg procesów odłączania i fuzji błon, które powodują dojrzewanie fagosomu i dostarczają hydrolaz, proteaz, i enzymów antybakteryjnych rozkładających cząstkę lub niszczących patogen. Z wielu badań wynika, że w procesie przekazywania sygnału fagocytarnego uczestniczą również białka Rho (VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997). W przypadku komórek nabłonkowych wykazano, że podczas wchłaniania bakterii *Shigella* do komórki zaangażowane są trzy izoformy białek rho: rho A, B oraz C. W zaproponowanym modelu (ADAM i współaut. 1996), inwazja bakteryjna wywołuje w komórce podbłonową nukleację aktyny i aktywowaną przez białko rho, jej polimeryzację. Proces ten jest kontynuowany podczas zamykania fagosomu i w trakcie jego wchłaniania. Komórki traktowane transferazą C3, która inaktywuje białka rho, nie wykazują zdolności do fagocytozy. Badania prowadzone na innych komórkach nie wykluczają udziału białek rac i cdc42 na tych etapach fagocytozy. W makrofagach aktywność cdc42 i rac jest wymagana również podczas internalizacji mikroorganizmów z udziałem receptorów Fc (CARON i HALL 1998, COX i współaut. 1997). Wykazano także, że nadekspresja dominujących negatywnych mutantów rac1 i cdc42 hamuje fagocytozę zależną od receptorów Fc w leukocytach (COX i współaut. 1997). Ponadto, w późniejszej fazie procesu fagocytozy, z udziałem receptorów Fc, następuje aktywacja wytwarzającej nadtlenki oksydazy NADPH, której rac jest allosterycznym regulatorem (ABO i współaut. 1991).

Polimeryzacja cząsteczek aktyny i akumulacja mikrofilamentów jest zjawiskiem przejściowym i występuje tylko w trakcie tworzenia kubka fagocytarnego i we wczesnej fazie tworzenia się fagosomu (GREENBERG i współaut. 1991). Podczas dojrzewania fagosomu oraz fuzji z endosomami i lizosomami ma miejsce proces odwrotny, depolimeryzacja aktyny. Oprócz mikrofilamentów, wokół wczesnych fagosomów zidentyfikowano kilkadziesiąt białek wiążących aktynę, które decydują o stopniu polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny, zaś ruch mikrofilamentów w pseudopodiach formujących kubek fagocytarny przypisuje się miozynie I i VII (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1999, MA 1999). Rola białek Rho podczas przeobrażeń cytoszkieletu aktynowego w procesie fagocytozy polega na aktywacji enzymów efektorowych, podobnie jak ma to miejsce w przypadku migracji czy zmiany kształtu komórki. Wśród enzymów efektorowych stymulowanych przez białka Rho po za-

działaniu sygnału fagocytarnego znajdują się, między innymi, kinaza rho i 5-kinaza fosfatydyloinozytolowa. Produkt tej ostatniej kinazy, PI(4,5)P₂ oddziałując z różnymi białkami wiążącymi aktynę i posiadającymi domeny wiążące fosfoinozytole, może w efektywny sposób regulować poziom polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny (SCHMIDT i HALL 1998).

Endocytoza fazy płynnej, zależna i niezależna od klatryny, podobnie jak w przypadku fagocytozy rozpoczyna się aktywacją receptorów błonowych i przeobrażaniem cytoszkieletu podbłonowego (KŁOPOCKA 2000). W komórkach ssaków konstytutywnie aktywne mutanty rac i rho redukują endocytozę receptorów transferyny, a dominujący aktywny mutant rhoA blokuje internalizację receptorów muskarynowych. Przypuszcza się, że w proces ten zaangażowane są fosfolipaza D (PLD) i 5-kinaza fosfatydyloinozytolowa, które kontrolują organizację wgłębień opłaszczonych klatryną (LAMAZE i współaut. 1996). Ekspresja dominującego aktywnego mutantu rho A w oocytach *Xenopus* powoduje zwiększenie endocytozy nie związanej z opłaszczaniem pęcherzyków klatrynowych, a wprowadzenie transferazy C3 lub ADP-rybozylowanej formy rho A hamuje ten efekt. Białka z rodziny Rho zostały zlokalizowane na powierzchni wczesnych endosomów (VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997). Natomiast w fibroblastach (RIDLEY i współaut. 1992), ale nie w zarodkowych komórkach nerki chomika (LI i współaut. 1997), po wprowadzeniu aktywnej formy białka rac obserwowano wzmoczoną pinocytozę, podczas której zlokalizowano na powierzchni pęcherzyków pinocytotycznych kinazę PAK1. W późniejszych badaniach wykazano, że RasH aktywuje proces pinocytozy, który nie jest blokowany przez dominujący negatywny mutant rac1, ale dominujący aktywny mutant Rab5. Rola białek rac w procesie endocytozy jest niejasna, a opisywane rozbieżności mogą sugerować występowanie odmiennych dróg przekazywania sygnałów w różnych rodzajach komórek (VAN AELST i D'SOUZA-SCHOREY 1997).

Poza regulacją endocytozy, małe białka G z rodziny Rho kontrolują proces transportu pęcherzyków sekrecyjnych (egzocytozy). W komórkach tucznych białka rac i rho stymulują egzocytozę pęcherzyków wydzielniczych, podczas gdy transferaza C3 i dominujące negatywne mutanty tych białek hamują wydzielanie indukowane przez GTPγS (NORMAN i współaut. 1996). Podobnie jak w procesach endocytozy, podczas egzocytozy wymagana jest także redystrybucja i polimeryzacja mikrofilamentów. Ten ostatni proces można zahamować cytochalazyną D, ale interesujący jest fakt, że dominujące

aktywne mutanty rac i rho aktywują egzocytozę nawet w obecności cytochalazyny D. Wydaje się więc, że w tych komórkach szlaki przekazywania sygnałów kontrolujące transport pęcherzykowy i przebudowę cytoszkieletu aktywnego przebiegają równolegle. Przypuszczenia te potwierdzają obserwacje, w których wykazano, że GDI białek rho hamuje egzocytozę stymulowaną przez GTP γ S (MARIOT i współaut. 1996). W komórkach drożdży *S. cerevisiae* w pęcherzykach aparatu Golgiego zlokalizowano homolog rhoA, rho1 (MCCAFFERY i współaut. 1991), z drugiej strony cdc42 występuje w drożdżach w miejscach sekrecji pęcherzyków przy nowo formowanym pączku (ZIMAN i współaut. 1993). W komórkach ssaków białko cdc42 jest obecne w

aparacie Golgiego i sugeruje się, że aktywacja tego białka i tworzenie filopodiów przy krawędzi komórki może być związana z transportem do błony cytoplazmatycznej (ERIKSON i współaut. 1996). Wprawdzie wiadomo, że wiele procesów związanych z transportem pęcherzykowym koordynowanych jest przez wzajemnie oddziaływanie pomiędzy cytoszkieletem a błoną komórkową, jednak funkcja tych interakcji w przebiegu procesu egzocytozy nie jest znana. Najprawdopodobniej wpływ białek Rho na metabolizm fosfolipidów, ze szczególnym uwzględnieniem fosfatydyloinozytoli, może być tym kluczowym ogniwem w regulacji przemiany cytoszkieletu aktywnego podczas procesów sekrecji.

PODSUMOWANIE

Przedstawiciele rodziny małych białek G, białka Rho, funkcjonują jako regulatory molekularne, które kontrolują szeroki zakres procesów kluczowych dla życia komórki eukariotycznej. Podobnie jak inne GTPazy, występują one w stanie aktywnym po związaniu GTP, a w stanie nieaktywnym, gdy GTP ulegnie hydrolizie do GDP. Wymiana i hydroliza nukleotydów wymaga udziału dodatkowych białek regulatorowych, takich jak GEF, GAP i GDI. Jedną z najważniejszych funkcji białek należących do rodziny białek Rho (rho, rac i cdc42) po aktywacji

receptora przez ligand jest uruchamianie mechanizmów prowadzących do reorganizacji i przekształcenia cytoszkieletu aktywnego. Po przez stymulację wielu kinaz i białek efektorowych, białka Rho mogą włączać szlaki przekazywania sygnałów, które kontrolują stopień polimeryzacji i depolimeryzacji aktywny oraz regulują poziom fosforylacji miozyny. W ten sposób umożliwiają one komórkom prawidłowy przebieg tak ważnych dla jej życia procesów, jak ruch, zmiana kształtu, endocytoza, egzocytoza i podział komórki.

FAMILY OF Rho PROTEINS AND CYTOSKELETON

Summary

The GTP-ases of the Ras superfamily act as molecular switches to control a wide range of essential biochemical pathways in eukaryotes from microorganisms to human. This family is structurally classified into at least five families: the Ras, Rho, Rab, Sar/Arf, and Ran. The Ras family regulates gene expression, Rab and Arf/Sarf families regulate vesicle trafficking, Ran family regulates nucleocytoplasmic transport and microtubule organization, and Rho family regulates cytoskeleton reorganization and gene expression. The review aims to summarize current views of Rho GTPases (rho, rac, cdc42) in signal transduction path-

ways that link plasma membrane receptors to the organization of the actin cytoskeleton. Like the all other GTPases, they exist in an inactive (GDP-bound) and an active (GTP-bound) conformation. In their active GTP-bound state, Rho GTPases interact with specific downstream effectors to promote characteristic morphological changes. In addition there is growing evidence for cross-talk within the Rho GTPase family. These signaling networks are thought to provide the cooperative and coordinated interactions that are crucial for regulating complex biological process such as actin cytoskeleton reorganization.

LITERATURA

- ABO A., PICK E., HALL A., TOTTI N., TEAHAN C. G., SEGAL A. W., 1991. *The small GTP-binding protein, p21rac1, is involved in the activation of the phagocyte NADPH oxidase*. Nature 353, 668-670.
- ADAM T., GRIRY M., BOQUET P., SANSONETTI P., 1996. *Rho-dependent membrane folding causes Shigella entry into epithelial cells*. EMBO J. 15, 3315-3321.
- ADAMS A. E., JOHNSON D. I., LONGENECKER R. M., SLOAT B. F., PRINGLE J. R., 1990. *CDC42 i CDC43 two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 111, 131-142.
- AMANO M., ITO M., KIMURA K., FUKATA Y., CHIHARA K., NAKANO T., MATSUURA Y., KAIBUCHI K., 1996. *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J. Biol. Chem. 271, 20246-20249.
- AMANO M., CHIHARA K., KIMURA K., FUKATA Y., NAKAMURA N., MATSUURA Y., KAIBUCHI K., 1997. *Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase*. Science 275, 1308-1311.
- AMANO M., FUKATA Y., KAIBUCHI K., 2000. *Regulation and functions of Rho-associated kinase*. Exp. Cell Res. 261, 44-51.

- ASPENSTRÖM P., 1999. *The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton*. *Exp. Cell Res.* 246, 20–25.
- BAR-SAGI D., HALL A., 2000. *Ras and Rho GTPases: a family reunion*. *Cell* 103, 227–238.
- BRILL S., LI S., LYMAN C. W., CHURCH D. M., WASMUTH J. J., WEISBACH L., BERNARDS A., SNIJDERS A. J., 1996. *The Ras GTPase activating protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases*. *Mol. Cell Biol.* 16, 4869–4878.
- BUHL A. M., JOHNSON N. L., DHANASEKARAN N., JOHNSON G. L., 1995. *G alpha12 and G alpha13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly*. *J. Biol. Chem.* 270, 24631–24634.
- BURBELO P. D., DRECHSEL D., HALL A., 1995. *A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases*. *J. Biol. Chem.* 270, 29071–29074.
- CARON E., HALL A., 1998. *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. *Science* 282, 1717–1721.
- CHONG L. D., TRANOR K. A., BOKOCH G. M., SCHWARTZ M. A., 1994. *The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells*. *Cell* 79, 507–513.
- CHRZANOWSKA W. M., BURRIDGE K., 1996. *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.
- CHUNG C. Y., LEES., BRISCOE C., ELLSWORTH C., FIRTEL R. A., 2000. *Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 5225–5230.
- COX D., CHANG P., ZHANG Q., REDDY P. G., BOKOCH G. M., GREENBERG S., 1997. *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. *J. Exp. Med.* 186, 1487–1494.
- ERICKSON J. W., ZHANG C. J., KAHN R. A., CERIONE R. A., 1996. *Mammalian Cdc42 is a brefeldin A sensitive compound of the Golgi apparatus*. *J. Biol. Chem.* 271, 26850–26854.
- GILMORE A. P., BURRIDGE K., 1996. *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-bisphosphate*. *Nature* 381, 531–535.
- GREENBERG S., KHOURY J., DIVIRGILIO F., KAPLAN E. M., SILVERSTEIN S. C., 1991. *Ca²⁺-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. *J. Cell Biol.* 113, 757–767.
- HALL A., 1998. *Rho-GTPases and the actin cytoskeleton*. *Science* 279, 509–514.
- HART M. J., EVA A., EVANS T., AARONSON S. A., CERIONE R. A., 1991. *Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product*. *Nature* 354, 311–314.
- HART M. W., JIANG X., KOZASA T., ROSCOE W., SINGER W. D., GILMAN A. G., STERNWEIS P. C., BOLLAG G., 1998. *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115RhoGEF by G13*. *Science* 280, 2112–2115.
- HARTWIG J. H., BOKOCH G. M., CARPENTER C. L., JANMEY P. A., TAYLOR L. A., TOKER A., STOSSEL T. P., 1995. *Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human plates*. *Cell* 82, 643–653.
- ISHIZAKI T., NAITO M., FUJISAWA K., MAEKAWA M., WATANABE N., SAITO Y., NARUMIYA S., 1997. *p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions*. *FEBS Lett.* 404, 118–124.
- JONESON T., MCDONOUGH M., BAR-SAGI D., VAN AELEST L., 1996. *RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase*. *Science* 274, 1374–1376.
- KIMURA K., ITO M., AMANO M., CHIHARA K., FUKATA Y., NAKAFUKA M., YAMAMORI B., FENG J., NAKANO T., OKAWA K., IWAMATSU A., KAIBUCHI K., 1996. *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *Science* 273, 245–248.
- KJØLLER L., HALL A., 1999. *Signaling to Rho GTPases*. *Exp. Cell Res.* 253, 166–179.
- KŁOPOCKA W., 2000. *Endocytoza u pierwotniaków i w komórkach tkankowych*. *Kosmos* 49, 589–602.
- KOROHODA W., 1997. *Cytoszkielecik*. [W:] *Biofizyka dla Biologów*. BYSZEWSKA M., LEYKO W. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 349–375.
- KOTANI K., YONEZAWA K., HARA K., UEDA H., KITAMURA Y., SAKAUE H., ANDO A., CHAVANIEU A., CALAS B., GRIGORESCU F., 1994. *Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin or IGF-1-induced membrane ruffling*. *EMBO J.* 13, 2313–2321.
- KOZMA R., AHMED S., BEST A., LIM L., 1995. *The ras related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. *Mol. Cell Biol.* 15, 1942–1952.
- KURODA S., FUKATA M., KOBAYASHI K., NAKAFUKU M., NOMURA N., IWAMATSU A., KAIBUCHI K., 1996. *Identification of IQGAP as a putative target of the small GTPases, Cdc42 and Rac1*. *J. Biol. Chem.* 271, 23363–23367.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1999. *Przekazywanie sygnału fagocytarnego: od agregacji receptorów do przebudowy cytoszkieletu*. *Post. Biol. Kom.* 26, 59–81.
- LAMAZE C., CHUANG L. J., TERLECKY L. J., BOKOCH G. M., SCHMIDT S. L., 1996. *Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac*. *Nature* 382, 177–179.
- LEUNG T., CHEN X. Q., MANSER E., LIM L., 1996. *The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is member of kinase family and is involved in reorganization of the cytoskeleton*. *Mol. Cell Biol.* 16, 5313–5317.
- LI G., D'SOUZA-SCHOREY C., BARBEIRI M. A., COOPER J. A., STAHL P. D., 1997. *Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction*. *J. Biol. Chem.* 272, 10337–10340.
- MA T., 1999. *A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis*. *Curr. Biol.* 9, 1297–1303.
- MACKAY D. J. G., HALL A., 1998. *Rho GTPase*. *J. Biol. Chem.* 273, 20685–20688.
- MARIOT P., O'SULLIVAN A. J., BROWN A. M., TATHAM P. E., 1996. *Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor protein Rho-GDI inhibits exocytosis in mast cells*. *EMBO J.* 15, 6476–6482.
- MATOZAKI T., NAKANISHI H., TAKAI Y., 2000. *Small G-protein networks: Their crosstalk and signaling cascades*. *Cell Signal.* 12, 515–524.
- MCCAFFERY M., JOHNSON J. S., GOUD B., MYERS A. M., ROSSIER J., POPOFF M. R., MADAULE P., BOGUET P., 1991. *The small GTP-binding protein Rho1p is localized on the Golgi apparatus and post Golgi vesicles in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 115, 309–319.
- MIKI T., SMITH C. L., LONG A., EVA A., FLEMING T. P., 1993. *Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding protein*. *Nature* 362, 462–465.
- NARUMIYA S., ISHIZAKI T., WATANABE N., 1997. *Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton*. *FEBS Lett.* 410, 68–72.
- NOBES C. D., HALL A., 1995. *Rho, rac, and cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell* 81, 53–62.
- NOBES C. D., HAWKINS P., STEPHENS L., HALL A., 1995. *Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors*. *J. Cell Sci.* 108, 225–233.
- NORMAN J. C., PRICE L. S., RIDLEY A. J., KOFFER A., 1996. *The small GTP-binding proteins, Rac and Rho regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways*. *Mol. Biol. Cell* 7, 1429–1442.

- REIF K., NOBES C. D., THOMAS G., HALL A., CANTRELL D. A., 1996. *Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways*. *Curr. Biol.* 6, 1445–1455.
- REN X. D., BOKOCH G. M., TRAYNOR K. A., JENKINS G. H., ANDERSON R. A., SCHWARTZ M. A., 1996. *Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells*. *Mol. Biol. Cell* 7, 162–167.
- REDOWICZ M. J., 1999. *Rho-associated kinase: involvement in cytoskeleton regulation*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 122–124.
- REDOWICZ M. J., KORN E. D., 2000. *Detection of Rho-family proteins in Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool.* 39, 75–79.
- RIDLEY A. J., 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.
- RIDLEY A. J., PATERSON H. F., JOHNSTON C. L., DIEKMANN D., HALL A., 1992. *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. *Cell* 70, 401–410.
- SASTRY S. K., BURRIDGE K., 2000. *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeleton dynamics*. *Exp. Cell Res.* 261, 25–36.
- SCHMIDT A., HALL M. N., 1998. *Signaling to the actin cytoskeleton*. *Ann. Rev. Cell Dev.* 14, 305–338.
- SCHMITZ A. A. P., GOVEK E.-E., BÖTTNER B., VAN AELST L., 2000. *Rho GTPases: signaling, migration, invasion*. *Exp. Cell Res.* 26, 1–12.
- SCHWARTZ M., SHATTIL S., 2000. *Signaling network linking integrins and Rho family GTP-ases*. *Trends Biochem. Sci.* 25, 388–391.
- SELBIE L. A., HILL S. J., 1998. *G protein-coupled-receptor cross-talk: The fine-tuning of multiple receptor-signaling pathways*. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 87–93.
- SELLS M. A., CHERNOFF J., 1997. *Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family*. *Trends Cell Biol.* 7, 162–167.
- SYMONS M., DERRY J. M., KARLAK B., JIANG S., LEMAHIEU V., MCCORMICK F., FRANCKE U., ABO A., 1996. *Wiscott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization*. *Cell* 84, 723–734.
- TAKAHASHI K., SASAKI T., MAMMOTO A., HOTTA I., TAKAISHI K., IMAMURA H., NAKANO K., KODAMA A., TAKAI Y., 1998. *Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein DB1*. *Oncogene* 16, 3279–3284.
- TAKAI Y., SASAKI T., MATOZAKI T., 2001. *Small GTP-binding proteins*. *Physiol. Rev.* 81, 153–208.
- TAN J. L., RAVID S., SPUDICH J. A., 1992. *Control of non muscle myosins by phosphorylation*. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 721–759.
- TANAKA K., TAKAI Y., 1998. *Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 112–116.
- TOLIAS K. F., CANTLEY L. C., CARPENTER C. L., 1995. *Rho family GTP-ases bind to phosphoinositide kinases*. *J. Biol. Chem.* 270, 17656–17659.
- UEHATA M., ISHIZAKI T., SATOH H., ONO T., KAWAHARA T., MORISHITA T., TAMAKAWA H., YAMAGAMI K., INUI J., MAEKAWA M., NARUMIYA S., 1997. *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. *Nature* 389, 990–994.
- VALSTER A. H., HEPLER P. K., CHERNOFF J., 2000. *Plant GTPases: the Rhos in bloom*. *Trends Cell Biol.* 10, 141–146.
- VAN AELST L., D'SOUZA-SCHOREY C., 1997. *Rho GTP-ases and signaling network*. *Genes and Develop.* 11, 2295–2322.
- WATANABE N., MADAULE P., REID T., ISHIZAKI T., WATANABE G., KAKIZUKA A., SAITO Y., NAKAO K., JOCKUSCH B., NARUMIYA S., 1997. *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is target protein for Rho small GTP-ase and is a ligand for profilin*. *EMBO J.* 16, 3044–3056.
- WENNSTROM S., HAWKINS P., COOKE F., HARA K., YONEZAWA K., KASUGA M., JACKSON T., CLAESSE W. L., STEPHENS L., 1994. *Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling*. *Curr. Biol.* 4, 385–393.
- WOLF W. A., CHEW T.-L., CHISHOLM R. L., 1999. *Regulation of cytokinesis*. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 108–120.
- YAKU H., SASAKI T., TAKAI Y., 1994. *The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties compared with those of Smg GDS*. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 198, 811–817.
- ZHENG Y., ZANGRILLI D., CERIONE R. A., EVA A., 1996. *The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic db1 through specific intracellular targeting*. *J. Biol. Chem.* 271, 19017–19020.
- ZIMAN M., PREUSS D., MULHOLLAND J., O'BRIEN J., BOTSTEIN D., JOHNSON D. I., 1993. *Subcellular localization of cdc42p, a Saccharomyces cerevisiae GTP-binding protein involved in control of cell polarity*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1307–1316.