

HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA

*Zakład Biochemii Mięśni*

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN*

*Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*e-mail:hannas@nencki.gov.pl*

## GENERACJA RUCHU PRZEZ POLIMERYZACJĘ AKTYNY

### WPROWADZENIE

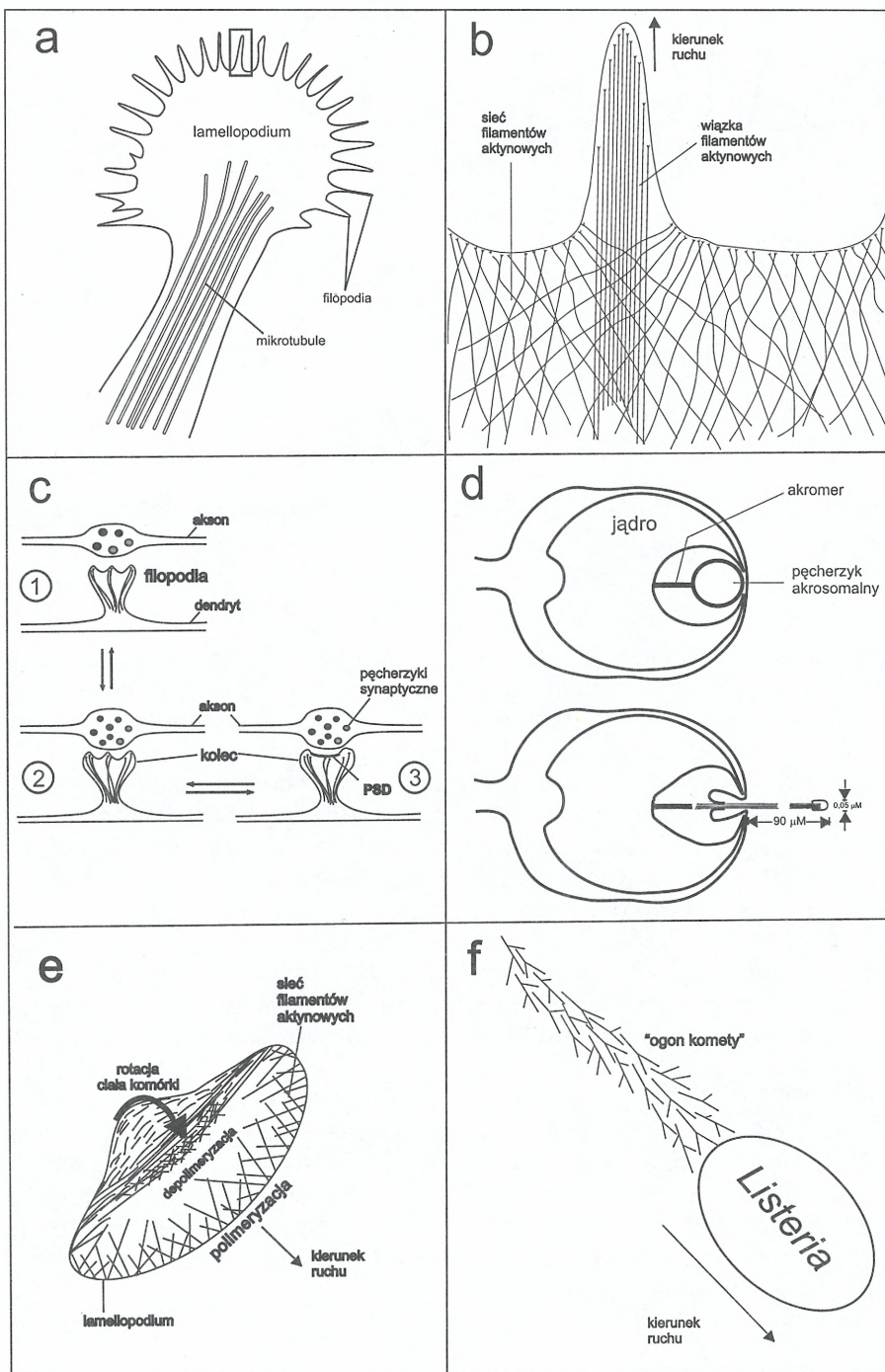
Udział w generowaniu różnego rodzaju ruchów jest główną funkcją aktyny, białka obecnego w wysokich stężeniach we wszystkich typach komórek eukariotycznych. Funkcję tę aktyna spełnia w dwojaki sposób. Jeden z nich wymaga jej występowania w formie filamentów (polimerów) i sprowadza się do współdziałania z miozyną w przesuwaniu jej własnych filamentów wzdłuż filamentów miozynowych. Ten ślizgowy mechanizm, w którym motorem przekształcającym energię chemiczną w mechaniczną (ruch lub siłę) jest miozyna, a źródłem energii — enzymatyczna hydroliza adenozyntrofosforanu (ATP) przez miozynę (patrz art. B. PŁISZKI w tym numerze KOSMOSU), jest podstawą skurczu mięśni oraz, jak się przypuszcza, zjawisk kurczliwości biorących udział w ruchu komórek mięśniowych. Jest wysoce prawdopodobne, że podobny mechanizm przekształcania energii chemicznej w ruch występuje też w procesach wewnątrzkomórkowego transportu,

w których filamety aktyny stanowią rodzaj szyn dla miozynowych motorów przenoszących różnego rodzaju „ładunki” (patrz art. J. M. REDOWICZ w tym numerze KOSMOSU). Podstawą całkowicie odmiennego sposobu generacji ruchu, którego motorem jest sama aktyna, jest kierunkowa polimeryzacja/depolimeryzacja tego białka. Źródłem energii w tym przypadku jest towarzysząca polimeryzacji hydroliza ATP specyficznie wiązanej przez aktynę monomeryczną. Ten rodzaj ruchu występuje wyłącznie w komórkach mięśniowych, gdzie aktyna jest obecna nie tylko w formie filamentów, jak to ma miejsce w dojrzałych komórkach mięśniowych, lecz znaczna jej część znajduje się w formie monomerycznej, stanowiącej materiał do tworzenia w określonych miejscach komórki nowych filamentów i/lub wydłużania już istniejących w odpowiedzi na bodźce wewnętrz- lub zewnątrzkomórkowe.

### PRZYKŁADY RUCHÓW, KTÓRYCH MOTOREM JEST POLIMERYZACJA AKTYNY

Najbardziej typowym przykładem jest wysuwanie pseudopodiów, lamellipodiów i filopodiów przez komórki mające zdolność pełzania po stałym podłożu. Częstymi obiektami badań mechanizmów powstawania i ruchu lamellipodium oraz promieniście z niego wychodzących filopodiów są fibroblasty i stożek wzrostu neuronu (Ryc. 1a,b). Naprzemienne wysuwanie i wycofywanie tych wysoce dynamicznych struktur umożliwia eksplorację zewnątrzkomórkowego otoczenia, a następnie przemieszczenie frontu komórki w wybranym kierunku (patrz: JAY 2000). Wysuwanie filopodiów jest prawd-

podobnie efektem nacisku na błonę komórkową prostopadle do niej ustawionych filamentów aktynowych przyrastających na ich końcach zwróconych ku błonie. W miarę inkorporacji kolejnych monomerów powstaje wiązka kilkudziesięciu jednakowo zorientowanych filamentów szczelnie wypełniająca filopodium. Lamellipodium zawiera luźniejszą sieć filamentów aktynowych, skierowanych ich szybciej przyrastającymi końcami również ku błonie komórkowej, aczkolwiek nie prostopadle — jak w filopodiach — lecz na ogół pod mniejszymi kątami. Z najnowszych badań wynika, że także w tym



Ryc. 1. Przykłady struktur generujących ruch przez polimeryzację aktyny.

(a) stożek wzrostu neuronu; (b) schemat organizacji filamentów aktynowych w lamellipodium i filopodium — powiększenie fragmentu zaznaczonego kwadratem na Ryc. 1a; (c) schematyczne przedstawienie hipotetycznego mechanizmu rozwoju kolców dendrytycznych (wg MATUSA 2000): stymulacja receptorów NMDA (*N*-metylo-*D*-asparaginyanu) w błonie dendrytu inicjuje gromadzenie się aktyny, jej polimeryzację i wytwarzanie ruchliwych filopodiów (1) w miejscach przyszłych synaps; nagromadzenie się w tych miejscach receptorów AMPA (propionianu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolu) i tworzenie kontaktów synaptycznych zmniejsza ruchliwość filopodiów (2); pod wpływem aktywacji receptorów AMPA następuje obniżenie dynamiki filamentów aktynowych i przekształcenie filopodiów w kolce dendrytyczne, z receptorami zgromadzonymi w zagęszczeniu postsynaptycznym (ang. postsynaptic density PSD) i filamentami aktynowymi stabilizującymi strukturę kolca; sugeruje się, że odwracalność tych procesów jest podstawą plastyczności kolców; (d) tworzenie akrosomalnego wyrostka przez plemnik strzykwy (wg INOUE i TILNEYA 1982); liniami zaznaczono wypełniające wyrostek filanty aktynowe; (e) keratynocyt jako przykład komórek wytwarzających lamellipodium bez filopodiów; wg Smalla i współpracowników (ANDERSON i współaut. 1996), w tym przypadku ciało komórki przesuwa się za lamellipodium przez rotację wywołaną aktywnością skurczową wynikającą ze współdziałania filamentów aktynowych z miozynowymi w tylnej części komórki; (f) ruch bakterii *Listeria*; na rysunku zaznaczono dendrytyczną organizację filamentów aktynowych w pozostającym za bakterią „ogonie komety” tworzoną przez polimeryzującą aktynę (patrz: KWIATKOWSKA 2001).

przypadku motorem ruchu jest raczej nacisk rosnących filamentów na błonę komórkową niż dyskutowane wcześniej efekty hydrostatyczne lub osmotyczne (patrz: THERIOT 2000, BORISY i SVITKINA 2000).

Na osobną wzmiankę zasługują filopodia uważane obecnie za prekursorsy kolców dendrytycznych uczestniczących w tworzeniu międzyneuronalnych połączeń synaptycznych w mózgu. W dawniejszych badaniach zjawisk ruchowych w mózgu więcej uwagi poświęcano aksonalnym stożkom wzrostu, traktując aksony jako głównego aktywnego partnera w tworzeniu sieci neuronalnej. Na równie lub być może bardziej aktywną rolę dendrytów wskazują ostatnie obserwacje neuronów w hodowlach komórkowych, które ujawniły przewagę ruchliwych filopodiów na powierzchni dendrytów we wczesnej fazie rozwoju neuronu i stopniowe obniżanie ich aktywności ruchowej w miarę ich przekształcania w morfologicznie dojrzałe kolce (Ryc. 1c). Podobne zmiany obserwowano w mózgu w okresie rozwoju postnatalnego. W dojrzałej synapsie kolce dendrytyczny zawiera centralną wiązkę i sieć peryferyjnych filamentów aktynowych, które prawdopodobnie reprezentują cytoskielet stabilizujący strukturę kolca. Ale i w mózgu dojrzałych osobników obserwowane są zmiany w dynamice kolców dendrytycznych: zmniejszenie ich ruchliwości po wyeliminowaniu bodźców pobudzających, a zwiększenie w trakcie uczenia się przez zwierzęta nowych zachowań. Zdolność aktyny do tworzenia zarówno stabilnych, jak i wysoce dynamicznych struktur i szybkiego przechodzenia z jednego stanu w drugi skłania do przypuszczeń, że białko to odgrywa istotną rolę w mechanizmach uczenia się i pamięci, pełniąc rolę pośrednika w zamianie sygnałów elektrycznych w trwałą zapis pamięciowy i w aktywacji śladów pamięciowych w odpowiedzi na zmiany w przewodnictwie synaptycznym (patrz: MATUS 2000).

Podobnie jak filopodia, lecz znacznie szybciej tworzony jest wyrostek akrosomalny plemników strzykwy *Thyone* (Ryc. 1d). Zetknięcie się plemnika z żelem otaczającym komórki jajowe inicjuje gwałtowną, kierunkową polimeryzację monomerów aktyny zgromadzonych w rejonie periakrosomalnym. W ciągu zaledwie 10 sekund powstaje wypełniony przez wiązkę filamentów wyrostek o długości dochodzącej do 90  $\mu\text{m}$ . Jest to najszybszy z ruchów generowanych przez polimeryzację aktyny. Jego szczególną cechą jest również to, iż jest aktem jednorazowym: wyrostek akrosomalny rośnie nieprzerwanie do chwili zetknięcia się z błoną komórki jajowej, na czym kończy się jego zadanie umo-

żliwienia fuzji obu komórek (patrz literatura: OLBRIS i HERZFELD 1999).

Popularnym obiektem badań mechanizmów ruchu zależnych od polimeryzacji aktyny są epidermalne keratynocyty ryb i płazów, których charakterystyczną cechą jest ruch niezależny od bodźców chemotaktycznych. Mogą one poruszać się z szybkością do 25  $\mu\text{m}/\text{min}$ , podczas gdy na przykład fibroblasty migrują z szybkością ok. 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Komórki te wytwarzają wachlarzowate, większe od reszty komórki lamellipodium bez filopodiów (Ryc. 1e), wykonujące wyłącznie ruch postępowy, skorelowany z przyrostem diagonalnie w nim rozmieszczonych (w stosunku do frontu komórki) filamentów aktynowych (patrz: SMALL i współaut. 1996).

Przebojem lat 90. było rozpoznanie mechanizmu poruszania się chorobotwórczych bakterii *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, bakterii z rodziny *Rickettsia* czy wirusa *Vaccinia* w zainfekowanych przez nie komórkach, wykorzystującego indukowaną przez te patogeny miejscową polimeryzację aktyny komórek gospodarza (Ryc. 1f). Rosnące filamente, zgrupowane na jednym biegunie bakterii w wiązkę przypominającą ogon komety, przepychają bakterię (lub wirusa) przez cytoplazmę z szybkością dziesiątych części  $\mu\text{m}/\text{sek}$ , a więc porównywalną z szybkością ruchu keratynocytów (patrz: KWIATKOWSKA 2001). Ostatnie badania wskazują na funkcjonowanie podobnego mechanizmu transportowego w niektórych typach endocytozy. W bazofilnych leukocytach, za odrywającymi się od powierzchni błony plazmatycznej i wędrującymi w cytozolu pinosomami (pęcherzykami z pobranym płynem) zidentyfikowano filamente aktynowe ułożone w charakterystyczny ogon komety (MERRIFIELD i współaut. 1999).

Wykazanie związku wyżej wymienionych zjawisk ruchowych z kierunkową polimeryzacją aktyny było zadaniem stosunkowo łatwym. Po wstrzyknięciu do komórki monomerycznej aktyny znakowanej fluorescencyjnymi znacznikami można w mikroskopie fluorescencyjnym obserwować jej gromadzenie się w strefie frontowej lamellipodium czy filopodiów migrujących komórek. W połączeniu z mikroskopią elektronową, pokazującą stałą obecność filamentów aktynowych w tych strukturach, świadczy to o przyroście filamentów na ich końcach zwróconych ku błonie, w kierunku ruchu. Z kolei wprowadzenie do komórki związków z grupy cytochalazyn, specyficznie hamujących polimeryzację aktyny przez blokowanie szybko przyrastającego końca filamentu, wstrzymuje wysuwanie lamellipodiów i filopodiów. Obser-

wacje te nie przesądzają jednak o tym, że polimeryzacja aktyny jest siłą napędową ruchu. Dowodem, aczkolwiek tylko pośrednim, jest wykluczenie alternatywnego mechanizmu opartego na współdziałaniu filamentów aktynowych z miozyną jako motorem ruchu. Ten mechanizm, wymagający udziału konwencjonalnej miozyny tworzącej bipolarne filamenty, jest niewątpliwie zaangażowany w przemieszczanie ciała komórki za wysuwaniem lamellipodium czy posuwającą się nibynóżką ameby. Natomiast w rejonie frontu komórki nie znaleziono izoform konwencjonalnej miozyny, a doświadczenia na mutantach *Dictyostelium* wykazały, że pozbawienie komórek amebowego stadium rozwoju tego śluzowca konwencjonalnych izoform miozyny nie zaburza ich zdolności wysuwania nibynóżek (patrz: GRĘBECKI 1993). Ponadto, zgodnie z polarnością filamentów aktynowych i ich orientacją w strefie frontowej, współdziałanie z filamentami miozynowymi powodowałoby ich ruch ku wnętrzu komórki, czyli w kierunku przeciwnym do aktualnego kierunku działania siły.

Wątpliwości odnośnie motorycznej roli polimeryzacji aktyny nasiliły się jednak kiedy wykazano, że wsteczny przepływ filamentów aktynowych rzeczywiście zachodzi w lamellipodiach migrujących komórek. Pierwszą wskazówką, że zjawisko takie może mieć miejsce były obserwacje na fibroblastach, do których wprowadzano fluorescencyjnie znakowaną aktynę, a po jej inkorporacji do aktynowego cytoszkieletu nasświetlano laserową wiązką wąski pasek powierzchni filopodium lub lamellipodium, powodując zniszczenie fluorescencji na tym obszarze (ang. fluorescence photobleaching). Po tym zabiegu obserwowano stopniowe przesuwanie się tak zaznaczonego obszaru ku wnętrzu komórki i jednocześnie napływ na jego miejsce fluoryzującej aktyny poczynając od strefy frontowej. Wyniki te zostały zinterpretowane jako „przepływ monomerów” przez filamenty rosnące od strony błony, a depolimeryzujące na przeciwnych końcach (ang. treadmilling) (WANG 1985). Kilka lat później THERIOT i MITCHISON (1991) wykazali, że zaznaczony przy użyciu analogicznej techniki fragment cytoszkieletu w lamellipodium keratynocyty jest nieruchomy w stosunku do podłoża, a zatem wsteczny przepływ jest zjawiskiem pozornym, wynikającym z przesuwania materiału cytoplazmatycznego ku frontowi komórki ponad stacjonarnymi filamentami. Nie usunęło to jednak niepewności co do mechanizmu ruchu lamellipodium, gdyż na przykład w stożku wzrostu neuronu obserwowano wsteczny ruch filamentów aktynowych również po zahamowaniu polimeryzacji przez cytochalazynę (FORSHER i SMITH 1988). Wraz z wykry-

ciem we frontowych strefach ruchliwych komórek jednogłówkowych izoform miozyny, których struktura i właściwości sugerują możliwość przesuwania przez nie filamentów aktynowych wzdłuż błony (patrz art. J. M. RĘDOWICZ w tym numerze KOSMOSU), umacniał się pogląd, że polimeryzacja aktyny w strefie frontowej może być zjawiskiem wtórnym, prowadzącym do wypełniania wolnej przestrzeni powstającej na skutek działania innego rodzaju sił powodujących ruch przedniej krawędzi komórki do przodu i wsteczny ruch podbłonowego cytoszkieletu (patrz: GRĘBECKI 1993).

Bezpośredniego dowodu na możliwość generacji ruchu przez polimeryzację aktyny dostarczyły dopiero niedawne doświadczenia polegające na odtworzeniu ruchu bakterii *Listeria monocytogenes* poza komórką, w układzie zawierającym prócz aktyny F (filamentarnej) tylko trzy białka: kompleks Arp2/3, ADF i białko „zakrywające”, z których żadne nie ma właściwości motorycznych. Kompleks białek Arp2/3, uaktywniony przez wiązanie się z transmembranowym białkiem *Listerii* ActA, wraz z nim inicjuje polimeryzację aktyny przy błonie komórki bakteryjnej; ADF (ang. actin depolymerizing factor) przyspiesza uwalnianie monomerów z „ostrych” (wolno rosnących) końców polimeru; białko zakrywające, blokując szybko rosnące końce filamentów aktynowych obecnych w roztworze, utrzymywało wysoki poziom monomerów aktyny uwalnianych z ostrego końca filamentów i powodowało, że wchodziły one ponownie w cykl polimeryzacji tylko tam, gdzie było to potrzebne dla generacji siły, czyli przy błonie komórki bakteryjnej (LOISEL i współaut. 1999).

Równie spektakularne było wywołanie ruchu, umieszczonych w takim samym środowisku, genetycznie zmienionych bakterii *Escherichia coli* z wymuszoną ekspresją IcsA — białka bakterii *Shigella*. Funkcją IcsA jest rekrutacja obecnych w zainfekowanej komórce białek z rodziny WASP/Scar, współdziałających z kompleksem Arp2/3 w inicjowaniu polimeryzacji aktyny gospodarza przy błonie komórki bakteryjnej. Inaczej mówiąc, IcsA połączone z którymś z białek z rodziny WASP/Scar spełnia u *Shigella* funkcję, którą u bakterii *Listeria* pełni ActA. W przypadku doświadczeń *in vitro* z *Escherichia coli*, dla uzyskania ruchu bakterii pokrywano ich powierzchnię białkiem N-WASP (LOISEL i współaut. 1999).

Te doświadczenia niewątpliwie przyczyniły się do zwrócenia uwagi na podobieństwo mechanizmów przemieszczania się bakterii *Listeria* i *Shigella* i ruchu lamellipodiów pełzających komórek. Przemawia za nim wykrycie w lamel-

lipodiach tych samych lub podobnie działających białek regulujących, które — jak wykazały wspomniane wyżej doświadczenia *in vitro* — są niezbędne dla wykorzystywania energii polimeryzacji aktyny do wprawiania w ruch komórek bakterii, oraz podobna organizacja aktyny w popychającym bakterie „ogonie komety” i w lamellipodiach migrujących komórek (patrz: BORISY i SVITKINA 2000, HIGGS i POLLARD 2001). Będzie o tym jeszcze mowa w dalszej części tego artykułu.

Odniesienie do mechanizmu tworzenia komórkowych wypustek typu pseudopodiów czy filopodiów mają doświadczenia, w których wywołując polimeryzację monomerycznej aktyny

„zamkniętej” w liposomach (przez szybkie wprowadzenie do wnętrza liposomu polimeryzującej soli metodą elektroporacji) obserwowano tworzenie podobnych do filopodiów wypustek rosnących z szybkością (0.3–0.7  $\mu\text{m}/\text{sek}$ ) porównywalną z szybkościami tworzenia takich struktur przez komórki (MIYATA i współaut. 1999).

Aczkolwiek organizacja i stan dynamiczny aktyny w komórce są regulowane przez szereg wiązanych przez nią białek, podstawą generacji ruchu przez polimeryzację aktyny są strukturalne właściwości samego polimeru. Inne białka jedynie przejściowo potęgują te lub inne właściwości aktyny w określonym rejonie komórki.

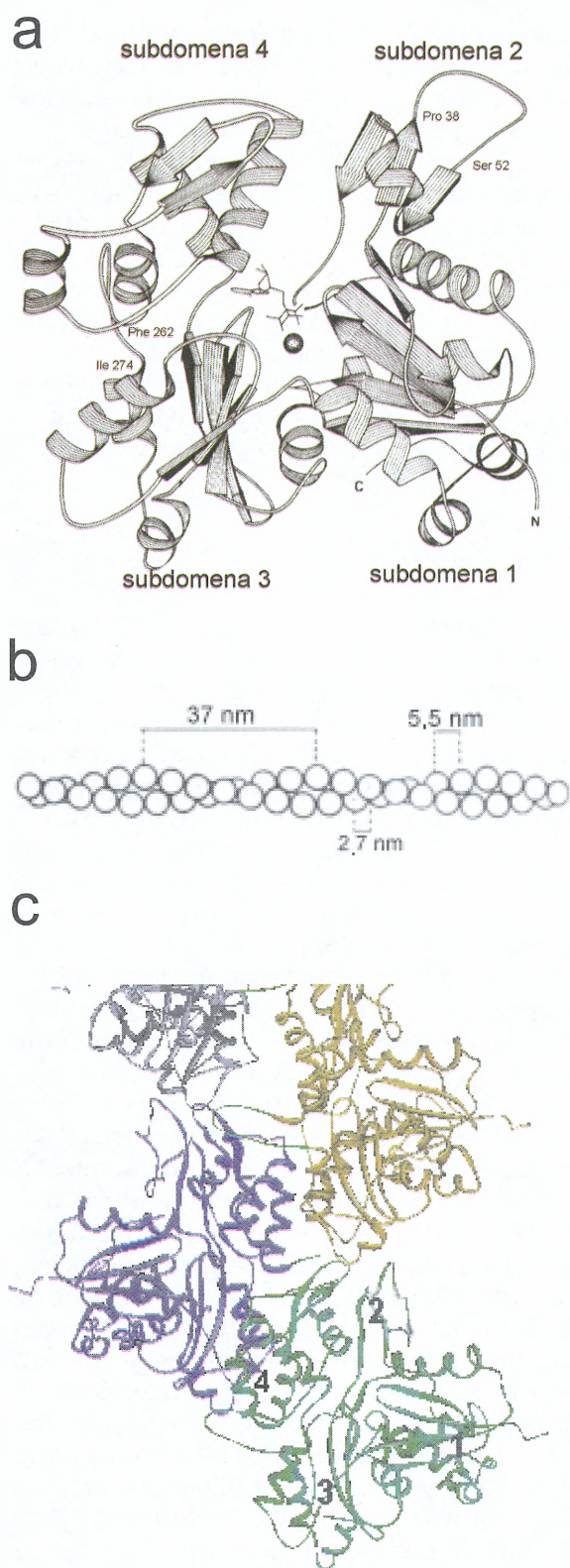
### STRUKTURA MONOMERU I POLIMERU AKTYNY

Aktyna jest białkiem wysoce konserwatywnym. Aminokwasowa sekwencja izoform kręgowców wykazuje specyficzną tkankową i minimalne lub brak różnic międzygatunkowych. Izofornie cytoplazmatyczne  $\beta$  i  $\gamma$  z mięśniowych komórek ssaków różnią się od izoformy  $\alpha$  z mięśni szkieletowych jedynie 24. (izoforma  $\gamma$ ) i 25. (izoforma  $\beta$ ) zastąpieniami reszt aminokwasowych, w większości konserwatywnymi, na ogólną liczbę 374 (izoformy  $\beta$  i  $\gamma$ ) lub 375 reszt aminokwasowych (izoforma  $\alpha$ ). W sekwencji aktyny z gatunku tak odległego jak *Physarum polycephalum* znaleziono 35 zastąpień w stosunku do izoformy  $\alpha$  z mięśni szkieletowych na tę samą liczbę (375) reszt aminokwasowych, a 17 w stosunku do mięśniowej izoformy  $\gamma$  ssaków (VANDEKERCHOVE i WEBER 1978).

Podobieństwo sekwencji aminokwasowych sugeruje brak zasadniczych różnic w trójwymiarowej strukturze monomeru, co zostało potwierdzone określeniem krystalicznej struktury izoformy  $\alpha$  z mięśni szkieletowych (KABSCH i współaut. 1990, McLAUGHLIN i współaut. 1993) i cytoplazmatycznej izoformy  $\beta$  z mięśniowych komórek ssaków (SCHUTT i współaut. 1993). Rentgenostrukturalna analiza wykazała ułożenie polipeptydowego łańcucha aktyny w dwie domeny przedzielone głęboką szczeliną i obecność w każdej domenie dwóch luźno ze sobą połączonych subdomen o zwartej strukturze (Ryc. 2a). W międzydomenowej szczelinie wiązany jest nukleotyd, którym w fizjologicznych warunkach jest ATP lub ADP, oraz jon dwuwartościowego metalu reagujący bezpośrednio z resztami aminokwasowymi białka i z resztami fosforanowymi nukleotydu. Z badań biochemicznych wiadomo, że oba te ligandy są w równowadze dysocjacji z wolnym nukleotydem i, odpowiednio, wolnym kationem w roz-

tworze. Wysokie stężenie jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i niskie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  sprawia, że kationem wiązonym przez aktynę *in vivo* jest  $\text{Mg}^{2+}$ , ale rutynowe procedury izolacji i oczyszczania aktyny prowadzą do zastąpienia go przez jon  $\text{Ca}^{2+}$ . Ponieważ rodzaj wiązanego kationu ma znaczący wpływ na konformację i właściwości aktyny (będzie o tym mowa w następnych rozdziałach), należy pamiętać, że atomową strukturę monomeru określono dla aktyny zawierającej  $\text{Ca}^{2+}$  w międzydomenowej szczelinie.

Trzy zaproponowane dotąd modele struktury filamentu aktynowego na poziomie atomowym powstały przez znajdowanie metodą „prób i błędów” takiego ułożenia monomerów w polimerze i takiej ich konformacji, przy których uzyskuje się najlepszą zgodność modelu z obrazami niskokątowego rozpraszania promieni X na wiązkach jednakowo zorientowanych filamentów. Te trzy modele różnią się jeszcze w szczegółach, których nie można ustalić eksperymentalnie ze względu na niską rozdzielczość (8 Å) obrazów dyfrakcyjnych filamentu, wiadomo natomiast, że konformacja monomeru ulega pewnym zmianom w trakcie polimeryzacji. W pierwszym modelu atomowej struktury filamentu HOLMES i współaut. (1990) wprowadzili drobną korektę orientacji subdomeny 2 monomeru, poprawiającą zgodność z obrazami dyfrakcyjnymi. W dwóch późniejszych modelach, z których jeden przedstawiony jest na Ryc. 2c, uzyskano dalszą poprawę wprowadzając znacznie większą rotację subdomeny 2 (LORENZ i współaut. 1993) lub subdomen 2 i 4 (TIRION i współaut. 1995), prowadzącą do zbliżenia tych subdomen i zwięzienia międzydomenowej szczeliny. Tego rodzaju korekty znajdują uzasadnienie w strukturalnej giętkości monomeru, pozwalającej na rotację obu domen i ich subdomen wzglę-



Ryc. 2. Atomowa struktura monomeru aktyny i orientacja monomerów w polimerze.

Struktura monomerycznej aktyny  $\alpha$  z mięśni szkieletowych królika wykryzalizowanej w kompleksie z DNazą I (KABSCH i współaut. 1990). Zaznaczono pozycje reszt aminokwasowych ograniczających powierzchniowe pętle, których udział w międzymonomerycznych kontaktach jest dyskutowany w tekście. Kulka pokazuje miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  w międzysubdomenowej szczelinie. (b) Schematyczne przedstawienie

dem siebie (TIRION i BEN-AVRAHAM 1993, PAGE i współaut. 1998). Eksperymentalnego potwierdzenia tej możliwości dostarczyła rentgenostrukturalna analiza kryształów niemięśniowej aktyny  $\beta$ : zmieniając warunki krystalizacji uzyskano zmianę orientacji subdomeny 2 prowadzącą do szerszego otwarcia międzysubdomenowej szczeliny w stosunku do wcześniej określonej struktury tej samej izoformy oraz mięśniowej izoformy  $\alpha$  (CHIK i współprac. 1996).

Z punktu widzenia mechanizmu generacji ruchu przez polimeryzację aktyny istotne jest potwierdzenie przez atomowe modele sugerowanego już w 1968 r., ale później kwestionowanego, ułożenia monomerów w polimerze w podwójną helisę, w której każda monomeryczna podjednostka tworzy wiązania z czterema sąsiednimi (Ryc. 2b). Taka stabilizacja struktury przez międzymonomeryczne wiązania zarówno wzdłuż, jak i w poprzek filamentu nadaje filamentowi odpowiednią sztywność, niezbędną dla wywoływania odkształceń błony komórkowej czy popychania komórki bakteryjnej przez nacisk rosnącego filamentu. Alternatywny, już nieaktualny jednoniciowy model podkreślał inny aspekt struktury filamentu — jego dynamiczną giętkość, eksperymentalnie udokumentowaną i też niezbędną dla motorycznej funkcji aktyny. Autorzy tego modelu sugerowali, że podstawą giętkości jest znaczna swoboda rotacji monomerów w polimerze (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 1986). Znajomość atomowej struktury monomeru i jego orientacji w polimerze pozwala obecnie tłumaczyć tę cechę filamentu wspomnianą wyżej rotacyjną ruchliwością subdomen monomeru oraz konformacyjną zmiennością powierzchniowych pętli zaangażowanych w tworzenie międzymonomerycznych wiązań, w szczególności tzw. pętli wiążącej DNazę I (reszty 38–52) na szczycie subdomeny-2 i C-końcowego segmentu w subdomenie-1 (ORLOVA i EGELMAN 1993, LORENZ i współaut. 1993). Do tych właściwości aktyny, odgrywających kluczową rolę w mechanizmie polimeryzacji tego białka, wrócimy nieco dalej.

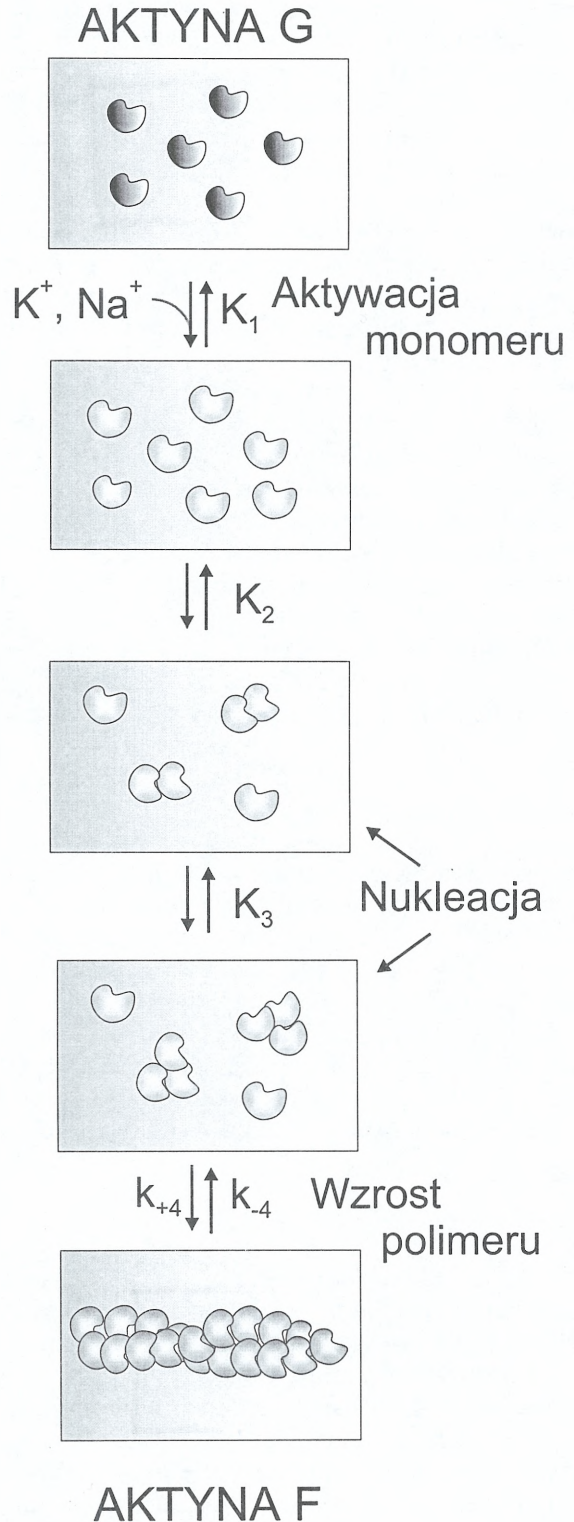
struktury polimeru aktyny pokazujące ułożenie monomerycznych podjednostek w podwójną helisę. (c) Atomowy model struktury polimeru wg LORENZA i współaut. (1993). Współrzędne atomowe wzięto z <http://indy.mpimf.-heidelberg.mpg.de/~michael/ftp.html>. Różnymi kolorami zaznaczono kilka kolejnych monomerycznych podjednostek. W jednej z podjednostek, numerami 1–4, zaznaczono subdomeny monomeru. Identyczna orientacja wszystkich podjednostek względem długiej osi polimeru jest podstawą jego strukturalnej polarności: subdomeny 1 i 3 podjednostek wyznaczają szybkorosnący koniec polimeru zwany „kolczystym”, a subdomeny 2 i 4 — koniec „ostry”, wolnorosnący.

## MECHANIZM POLIMERYZACJI AKTYNY

W nieobecności innych białek wpływających na jej stan, aktyna występuje w formie monomerycznej w roztworach o niskiej sile jonowej, a pod wpływem soli nieorganicznych w ich fizjologicznych stężeniach ulega transformacji w polimer. Jest to proces wysoce kooperatywny, zachodzący w kilku etapach, z których każdy jest reakcją odwracalną (Ryc. 3). Pierwszy etap, zwany aktywacją monomeru, to właśnie zmiana konformacji cząsteczki pod wpływem wiązania kationu dodanej soli w kilku miejscach o umiarkowanym powinowactwie (innych niż miejsce silnego wiązania dwuwartościowego kationu w międzydomenowej szczelinie). Jest to etap wyróżniony na podstawie badań biochemicznych, wskazujących na wyprzedzające polimeryzację zmiany konformacji monomeru w kierunku konformacji podjednostek polimeru.

Drugi etap (nukleacja) to tworzenie zarodki polimeryzacji. Jest to energetycznie niekorzystne, najwolniejsze stadium, którego szybkość determinuje ogólną szybkość całego procesu. Z kinetyki polimeryzacji wynika, że zarodki są trimerami — najmniejszymi oligomerami z zaczątkiem struktury helikalnej. Ich wzrost przez przyłączanie kolejnych monomerów (trzeci etap) jest już reakcją szybką — w tym właśnie przejawia się kooperatywny charakter polimeryzacji. Stała równowagi reakcji wzrostu polimeru,  $K_4 = k_{-4}/k_{+4}$ , określa stężenie monomerów współistniejących z polimerami w stanie stacjonarnym. Ten parametr, zwany stężeniem krytycznym aktyny, jest termodynamiczną stałą równowagi tylko w przypadku polimeryzacji aktyny zawierającej ADP w miejscu wiązania nukleotydu. Polimeryzacji aktyny ze związanym ATP towarzyszy bowiem jego hydroliza i uwolnienie ortofosforanu do środowiska z zachowaniem związanego ADP. Ponieważ zaś szybkości asocjacji i dysocjacji monomerów są różne dla aktyny-ATP i aktyny-ADP, polimeryzacja aktyny-ATP jest w istocie procesem nieodwracalnym: do polimeru preferencyjnie przyłączane są monomery-ATP, a po hydrolizie ATP oddysocjują podjednostki zawierające już związany ADP, których powinowactwo do końców polimeru jest niskie (aby wejść ponownie w szybką reakcję polimeryzacji muszą wymienić związany ADP na obecny w środowisku ATP). Dlatego w odniesieniu do polimeryzacji aktyny-ATP dla określenia stanu, w którym szybkości inkorporacji monomerów i ich dysocjacji są zrównoważone, zamiast nieadekwatnego w tym przypad-

ku terminu stan równowagi termodynamicznej, używamy terminu stan stacjonarny.

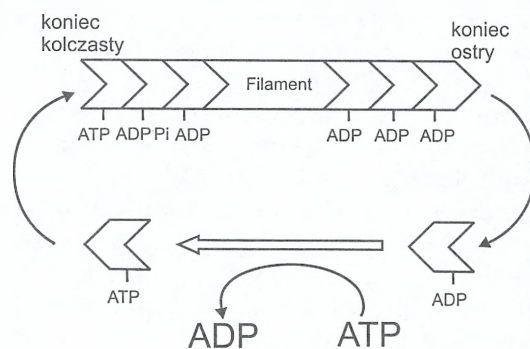


Ryc. 3. Wieloetapowy przebieg polimeryzacji aktyny. Objaśnienia w tekście.

Towarzyszająca polimeryzacji hydroliza związanego z aktywną ATP jest opóźniona w stosunku do inkorporacji monomeru i zachodzi w dwóch kolejnych reakcjach: po hydrolizie wiązania fosforanowego zachodzi jeszcze wolniejsza reakcja uwolnienia ortofosforanu. Wynikiem tego jest gromadzenie się na przyrastających końcach filamentu podjednostek zawierających jeszcze ATP (F-ATP), za którymi znajduje się strefa podjednostek zawierających ADP i ortofosforan (F-ADP-P), a za nią dopiero znajdują się wcześniej przyłączone podjednostki z samym ADP (F-ADP). Ponieważ powinowactwo monomerów zawierających ATP lub ADP-P do końców filamentu jest wyższe niż powinowactwo monomerów zawierających ADP, w trakcie szybkiej polimeryzacji — gdy stężenie monomerów jest wysokie i filamenty przyrastają na obu końcach (choć z różną szybkością) — świeżo przyłączone monomery tworzą stabilizującą filament „czapkę” wolniej dysocjujących podjednostek F-ATP i F-ADP-P na obu końcach filamentu. W stanie stacjonarnym (stężenie monomerów niższe od krytycznego, powolna inkorporacja monomerów do polimeru) można się jej spodziewać tylko na bardziej dynamicznym końcu kolczastym, ponieważ polimeryzacja na końcu ostrym jest zbyt powolna by opóźnienie hydrolizy ATP i uwalniania ortofosforanu odgrywało tu istotną rolę (patrz: CARLIER 1989, 1991).

Ten pozornie skomplikowany mechanizm wzrostu filamentu, w gruncie rzeczy sprowadza się do prostych, bimolekularnych reakcji między monomerami i końcami filamentu, zależnych od stężenia monomerów i stałych szybkości ich asocjacji i dysocjacji, które są określone przez rodzaj związanego nukleotydu. Strukturalna polarność filamentu i „kierunkowa” hydroliza związanego ATP wzdłuż filamentu kreuja różnicę stałych szybkości i stężeń krytycznych dla inkorporacji monomerów na dwóch końcach filamentu. Przy fizjologicznych stęże-

niach soli, stężenie krytyczne monomerów zawierających ADP jest podobne dla obu końców i wysokie (ok.  $2 \mu\text{M}$ ; pamiętamy, że jest to stężenie poniżej którego aktywna nie polimeryzuje). Monomery zawierające ATP cechuje nie tylko wyższa stała szybkości asocjacji z końcami polimeru, ale także niskie stężenie krytyczne (ok.  $0,1 \mu\text{M}$  dla końca kolczastego i  $0,6 \mu\text{M}$  dla ostrego) (POLLARD i współprac. 2000). Te różnice sprawiają, że w obecności ATP stan stacjonarny osiągany jest gdy stężenie monomerów-ATP spada poniżej stężenia krytycznego dla ich asocjacji z wolno przyrastającym końcem ostrym. Możemy się wówczas spodziewać ciągłego uwalniania monomerów-ADP z końca ostrego, kompensowanego przyrostem filamentu na końcu kolczastym przez inkorporację monomerów-ATP (Ryc. 4). Efektem jest wspomniany już



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie wymiany podjednostek polimeru aktywny w stanie stacjonarnym według mechanizmu określanego jako „treadmilling”. Objasnienia w tekście.

„przepływ monomerów” wzdłuż filamentu (treadmilling), udokumentowany przez badanie inkorporacji znakowanej aktywny monomerycznej do filamentów w doświadczeniach *in vitro* (WEGNER 1976) i zauważony *in vivo* przez Wang (WANG 1985).

#### STRUKTURALNE PODŁOŻE DYNAMIKI FILAMENTÓW AKTYNOWYCH

Jak już zaznaczono w poprzednim rozdziale, warunkiem asocjacji monomerów w helikalny polimer jest zmiana ich konformacji. Nasza wiedza o naturze tej zmiany, a raczej zmian, prawdopodobnie jest jeszcze dalece niekompletna, ale obecnie istnieją już dowody (biochemiczne) wskazujące, że właśnie na tym etapie zachodzi wspomniane przy omawianiu struktury filamentu zwięźnienie międzydomenowej szczeliny (przejście z konformacji „otwartej” w „zamkniętą”) przez rotację subdomeny-2. Jak wynika z atomowych modeli filamentu, ta zmiana orien-

tacji subdomeny-2 ustawia ją w pozycji dogodnej dla tworzenia przez jej powierzchniową pętlę (pętlę wiążącą DNazę I) międzymonomerycznych wiązań wzdłuż filamentu. Inną eksperymentalnie udokumentowaną zmianą poprzedzającą polimeryzację jest zmiana konformacji C-końcowego segmentu (lub jego otoczenia) usytuowanego w subdomenie-1 aktywny. Metody użyte do jej wykrycia (zmiana natężenia fluorescencji znaczników sprzężonych z przedostatnią resztą aminokwasową, Cys-374) nie dostarczają informacji o naturze tej zmiany. Można



tylko przypuszczać, że jest to zmiana sprzyjająca sugerowanemu przez modele filamentu i badania biochemiczne tworzeniu kontaktu C-końcowych reszt z pętlą wiążącą DNazę sąsiedniego monomeru wzdłuż filamentu. (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2001).

Znany od dawna wpływ rodzaju wiążanego przez aktywny kationu i nukleotydu na kinetykę polimeryzacji i stężenie krytyczne aktywny sugerował istotny dla polimeryzacji wpływ również tych ligandów na konformację monomeru. Wymiana związanego  $\text{Ca}^{2+}$  na  $\text{Mg}^{2+}$  obniża stężenie krytyczne i przyspiesza polimeryzację przez zwiększenie szybkości etapu nukleacji. O wpływie rodzaju związanego nukleotydu, ATP lub ADP, była już mowa w poprzednim rozdziale. Badania kinetyki polimeryzacji pokazały również, że wpływ kationu zależy od rodzaju związanego nukleotydu: kinetyczne różnice obserwowano porównując aktywny-Ca-ATP i aktywny-Mg-ATP, natomiast aktywny-Ca-ADP i aktywny-Mg-ADP wykazują to samo wysokie stężenie krytyczne i obniżoną w stosunku do aktywny-Mg-ATP szybkość polimeryzacji, w czym przypominają bardziej aktywny-Ca-ATP. Inaczej mówiąc, zastąpienie związanego ATP przez ADP w aktywny monomerycznej niweluje funkcjonalne różnice zależne od rodzaju związanego kationu,  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Mg}^{2+}$  (patrz: ESTES i współaut. 1992).

Informacje dotyczące strukturalnego podłoża tych efektów opierają się na razie głównie na badaniach biochemicznych. Sugerują one, że transformacji monomerycznej aktywny-Ca-ATP w aktywny-Mg-ATP towarzyszy zwężenie międzydomenowej szczeliny i zmiana konformacji C-końcowego segmentu. Oba te konformacyjne przejścia są niwelowane przez zastąpienie związanego ATP przez ADP (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2001).

Współzależność strukturalnych i funkcjonalnych efektów kationu i nukleotydu znajduje wytłumaczenie w tym, że ligandy te wiązane są jako kompleks. Z drugiej strony, każdy z nich reaguje z innymi, choć blisko siebie położonymi resztami aminokwasowymi, co stwarza możliwość transmisji ich konformacyjnych efektów innymi drogami, do różnych rejonów cząsteczki. Przykładem allosterycznego efektu zależnego tylko od nukleotydu jest zmiana konformacji pętli 38–52 towarzysząca zastępowaniu związanego ATP przez ADP. Sugerowane na podstawie wyników biochemicznych usztywnienie tej pętli w aktywny-ADP, niekorzystne dla tworzenia międzycząsteczkowych wiązań, przypuszczalnie przyczynia się do obniżonej zdolności tej formy aktywny do polimeryzacji (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2001). W odróżnieniu od wcześniej ogłoszonych krystalicznych struktur

aktywny-ATP, wykazujących nieuporządkowanie lub mobilność pętli 38–52, w zaproponowanej w tym roku atomowej strukturze aktywny-ADP (wykryształizowanej po raz pierwszy bez użycia innych białek dla utrzymania aktywny w formie monomerycznej), pętla ta tworzy strukturę  $\alpha$ -helikalną (OTTERBEIN i współaut. 2001).

Aczkolwiek *in vivo* aktywna nie wiąże jonu wapnia, już z tego krótkiego przeglądu widać, że systematyczne badania porównawcze aktywny-Ca i aktywny-Mg walenie przyczyniły się do poznania konformacyjnej zmienności aktywny monomerycznej i jej roli w mechanizmie polimeryzacji tego białka. Ujawniły one ścisłą korelację między zależnym od rodzaju wiążanego kationu i nukleotydu przechodzeniem „otwartej” konformacji monomeru w „zamkniętą” (i odwrotnie) i zmianami zdolności aktywny do polimeryzacji. W zestawieniu z faktem, że polimeryzację aktywny-Ca-ATP poprzedza jej przejście z konformacji otwartej w zamkniętą pod wpływem polimeryzującej soli, stabilizacja zamkniętej konformacji monomeru przez MgATP w nieobecności soli przemawia za zaliczeniem tego efektu do kategorii zmian będących podstawą aktywacji monomeru (STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2001).

Pytanie, jakie zmiany konformacyjne determinują szybkość następnego etapu polimeryzacji — nukleacji, pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi. Sugerowano, że do tej kategorii należy stymulowana przez MgATP zmiana konformacji C-końcowego segmentu, która — jak wykazano — różni się od zmiany w tym rejonie stymulowanej przez dodanie soli (CARLIER i współaut. 1986). Z teoretycznych rozważań wynika, że konformacja decydująca o szybkości nukleacji powinna wpływać na międzynomeryczne kontakty w poprzek filamentu, stabilizujące helikalną strukturę filamentu. Tymczasem te właśnie kontakty są najslabiej zdefiniowane. Przy konstrukcji atomowych modeli filamentu HOLMES i współaut. (1990) i LORENZ i współaut. (1993) przyjęli założenie, że do hydrofobowej kieszeni tworzonej przez pętlę 38–52 i C-końcowy segment monomerów sąsiadujących ze sobą wzdłuż długiej osi filamentu wnika hydrofobowa pętla 262–274 z subdomeny-4 ich sąsiada z drugiego helikalnego łańcucha monomerów. Ten hipotetyczny kontakt znalazł potwierdzenie w badaniach aktywny drożdżowej z punktowymi mutacjami pozwalającymi na wprowadzenie fluorescencyjnego znacznika do pętli 262–274 (wyniki i przegląd literatury: KIM i REISLER 2000). Być może wyżej wspomniana, zależna od MgATP zmiana konformacji C-końcowego segmentu utrwała ten trójstronny kontakt. Wydaje się jednak, że większe znaczenie miałaby stymulacja przez MgATP koniecznej dla

utworzenia takiego kontaktu zmiany orientacji pętli 262–274, ponieważ w krystalicznej strukturze aktywno-Ca-ATP pętla ta jest zasocjowana z rdzeniem subdomeny-4. Na razie na taki allosteryczny efekt MgATP nie ma eksperymentalnych dowodów.

Z przytoczonych obserwacji wynika, że międzymonomeryczne kontakty w polimerze głównie stabilizują konformację przyjętą przez monomery na etapie aktywacji, ale nie można wykluczyć, że struktura polimeru wymusza pewne dalsze korekty. Niewątpliwie efektem jakiejś zmiany czy zmian zachodzących w wyniku polimeryzacji jest hydroliza związanego ATP. Z kolei uwolnienie ortofosforanu z intermediatu F-ADP-P destabilizuje filament przez przybliżenie konformacji jego podjednostek do konformacji monomerycznej aktywno-ADP. Wskazuje na to porównanie struktury filamentów kontrolnych, złożonych głównie z podjednostek F-ADP, z filamentami potraktowanymi fluorkiem berylu, który wiążąc się trwale w miejscu uwolnionego ortofosforanu odtwarza strukturę charakterystyczną dla F-ATP. Zarówno badania metodami biochemicznymi, jak i trójwymiarowe rekonstrukcje filamentów na podstawie ich obrazów w mikroskopie elektronowym sugerują, że przejście w stan F-ADP destabilizuje filament przez osłabienie międzymonomerycznych kontaktów z udziałem pętli 38–52 wskutek zmiany orientacji subdomeny-2 (przejścia z konformacji zamkniętej w otwartą) oraz reorganizacji samej pętli (BELMONT i współaut. 1999 oraz literatura w STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2001). Na razie nie wiadomo, czy w podjednostkach F-ADP pętla 38–52 przyjmuje konformację  $\alpha$ -helikalną, jak w kryształach monomeru-ADP; autorzy atomowych modeli filamentu sugerują inną jej przebudowę po inkorporacji monomeru do filamentu, ale są to wciąż tylko spekulacje.

Na zakończenie tej części warto jeszcze przytoczyć niedawne badania aktywno z drożdży i jej

mutantów. Okazało się, że naturalna izoforma tej aktywno tworzy filamenty znacznie bardziej dynamiczne (szybciej wymieniające swoje podjednostki z pulą monomerów w wyniku polimeryzacji/depolimeryzacji) od filamentów mięśniowej izoformy  $\alpha$ . Analiza trójwymiarowych rekonstrukcji filamentów z ich obrazów w mikroskopie elektronowym wykazała, że ta właściwość koreluje z bardziej otwartą strukturą podjednostek polimeru i osłabieniem międzymonomerycznych kontaktów z udziałem subdomeny-2 (kontaktów wzdłuż filamentu) w stosunku do filamentów aktywno mięśniowej. Punktowa mutacja Val-159→Asn, reszty usytuowanej w międzydomenowej szczelinie i uczestniczącej w wiązaniu fosforanu  $\gamma$  ATP, zmieniała obie cechy filamentu: ograniczała wymianę podjednostek i zmieniała strukturę na podobną do struktury polimeru aktywno mięśniowej (BELMONT i współaut. 1999).

Te same współzależności między międzymonomerycznymi kontaktami z udziałem pętli 38–52, stopniem otwarcia międzydomenowej szczeliny i dynamiką filamentu wykryto badając wpływ proteolitycznego przecięcia pętli 38–52 w jej N-końcowym segmencie, tworzącym powierzchnię kontaktową dla sąsiedniego monomeru, na strukturę i dynamikę filamentu. Taka modyfikacja, osłabiająca — jak można przypuszczać — międzymonomeryczne wiązania z udziałem omawianej pętli, prowadziła do szerszego otwarcia międzydomenowej szczeliny i zwiększenia szybkości wymiany podjednostek polimeru o 1–2 rzędy wielkości (KHAILINA i STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 2002).

Jak widać, subdomena-2 pełni rolę konformacyjnego przełącznika determinującego funkcjonalny stan aktywno. Ostatnie badania sugerują też możliwość regulacji dynamiki filamentów aktywno przez allosteryczne efekty wiążących aktywno białek na konformację jej powierzchniowej pętli 38–52.

#### REGULACJA POLIMERYZACJI/DEPOLIMERYZACJI AKTYNY *IN VIVO*

Polimeryzacja, która w warunkach jonowych *in vivo* i przy wysokich stężeniach monomerycznej aktywno występujących w komórkach niemięśniowych przebiega spontanicznie z dużą szybkością, jest ze względu na towarzyszącą jej hydrolizę ATP procesem rozpraszającym energię. Dla wykorzystania tej energii do wykonania pracy potrzebny jest cały system białek regulujących, których właściwości i rozmieszczenie w komórce powodują, że polimeryzacja zachodzi tylko w określonym czasie i miejscu.

Dwa komplementarne mechanizmy utrzymują pulę monomerów w stężeniach dochodzących aż do 100  $\mu$ M (o trzy rzędy wielkości wyższego od stężenia krytycznego), które w określonych warunkach mogą być wykorzystane do szybkiej polimeryzacji. Jeden, to wiązanie monomerów przez małe białko profilinę (125–139 reszt aminokwasowych), która specyficznie wiąże monomery aktywno-ATP i zapobiega ich nukleacji. Ale kompleks aktywno z profiliną, podobnie jak wolne monomery, może przyłączać

się do szybko rosnącego (kolczastego) końca filamentu jeżeli nie jest on zablokowany. Profilina oddysocjowuje z filamentu po hydrolizie ATP w wiązanych przez nią monomerze, by połączyć się z kolejnym monomerem. Gdyby więc kolczasty koniec wszystkich filamentów był łatwo dostępny, doszłoby szybko do włączenia całej puli monomerów do filamentów. Zapobiega temu drugi mechanizm — blokowanie kolczastych końców filamentu przez białka z rodziny żelsoliny lub wszechobecne heterodimeryczne białko „zakrywające” (zwane również CapZ, Cap 32/34 lub aginactin). Tylko końce czasowo odblokowane lub jeszcze niezablokowane końce nowopowstałych filamentów rosną przyłączając kompleks profiliny z aktyną (patrz: BARKALOW i HARTWIG, 1995, CARLIER i współaut. 1997, POLLARD i współaut. 2000, PANTALONI i współaut. 2001).

Inną właściwością profiliny jest zwiększanie przez nią szybkości wymiany wiązanej przez aktynę ADP na ATP. Istniejące przez pewien czas wątpliwości, czy ta aktywność profiliny ma funkcjonalne znaczenie w warunkach fizjologicznych, zostały rozstrzygnięte na korzyść poglądu, że wobec powolnej spontanicznej wymiany ADP na ATP w monomerach aktywny, profilina odgrywa ważną rolę w regeneracji monomerów-ATP z monomerów-ADP uwalnianych z ostrych końców filamentu (SELDEN i współaut. 1999).

Profilina jest obecna we wszystkich dotąd badanych komórkach eukariotycznych. Pewien kłopot w ustaleniu jej roli sprawiał fakt, że jej stężenie w komórce (ok. 50  $\mu\text{M}$ ) jest znacznie niższe od stężeń monomerycznej aktywny. Problem został rozwiązany przez znalezienie w większości badanych komórek tymozyny  $\beta 4$  (występującej w stężeniach aż do 600  $\mu\text{M}$ ), peptydu zbudowanego z 43 reszt aminokwasowych, który wiąże monomeryczną aktynę (około 50-krotnie silniej aktynę-ATP niż aktynę-ADP), zapobiega jej nukleacji, a związany przez nią monomer nie łączy się ani z ostrym, ani z kolczastym końcem filamentu. Jest to więc typowe białko sekwestrujące. Profilina konkuruje z nim o aktynę-ATP i sekwestruje ją sama gdy kolczaste końce filamentu są zablokowane. W warunkach, kiedy stają się one dostępne, profilina spełnia rolę przenośnika aktywny z puli monomerów na filamente. Ponieważ ani tymozyna, ani profilina, nie przenoszą aktywny na ostry koniec filamentu, te końce nie muszą być zablokowane, choć — jak obecnie wiadomo, mogą być blokowane przez kompleks Arp2/3 (patrz: CARLIER i współaut. 1997, POLLARD i współaut. 2000, PANTALONI i współaut. 2001).

Blokowanie kolczastych końców filamentu w komórce ma znaczenie nie tylko dla utrzymania

puli monomerów, ale — choć w pierwszym momencie to stwierdzenie może wydać się paradoksalne — również przyczynia się do zwiększenia efektywności treadmillingu. Okazało się bowiem, że określona w doświadczeniach *in vitro* szybkość przyrostu kolczastego końca filamentu jest aż o trzy rzędy wielkości za niska dla wytłumaczenia szybkiego ruchu lamellipodiów czy filopodiów wielu typów komórek (patrz: FULTON 1985, CARLIER 1998). Ponadto, analiza kinetyki wymiany podjednostek filamentu z pulą monomerów ujawniła możliwość przypadkowych fluktuacji długości filamentu przez polimeryzację/depolimeryzację na obu końcach (model dyfuzyjnej wymiany podjednostek). Oba mechanizmy nie wykluczają się wzajemnie: przewaga jednego lub drugiego zależy od warunków jonowych. Okazało się na przykład, że wysokie stężenia kationów jednowartościowych, charakterystyczne dla warunków jonowych *in vivo*, silnie hamują treadmilling (zmniejszają różnicę między stężeniami krytycznymi dla obu końców filamentu) (patrz: FULTON 1985, CARLIER 1989). Te niezgodności, z jednej strony, przyczyniły się do sugerowania w latach 80. alternatywnych mechanizmów generowania ruchu lamellipodiów czy filopodiów, ponieważ naprzemienne wydłużanie i skracanie końca kolczastego nie może być podstawą zamiany energii hydrolizy ATP w pracę. Z drugiej zaś strony, ponieważ efektywny treadmilling w lamellipodiach różnego typu komórek był faktem udokumentowanym eksperymentalnie (patrz: CARLIER 1998), stały się bodźcem do poszukiwania czynników zwiększających efektywność tego procesu w stosunku do sytuacji *in vitro*.

W świetle badań aktywny z drożdży opisanych w poprzednim rozdziale, dziś możemy przypuszczać, że niezgodność szybkości przyrostu kolczastych końców filamentu w warunkach *in vivo* i *in vitro* może nie być aż tak dramatyczna jak to wynikało z porównań, w których punktem odniesienia były właściwości aktywny mięśniowej. Izoforma z drożdży jest bardziej dynamiczna i można się spodziewać, że inne niemięśniowe izoformy dzielą z nią tę cechę (BELMONT i współaut. 1999). Nie zbadano jednak, który z mechanizmów wymiany podjednostek ma w tym przypadku przewagę.

Efektywny treadmilling wymaga szybkiego uwalniania podjednostek z ostrego końca filamentu, gdyż ta reakcja determinuje ogólną szybkość całego procesu (CARLIER i PANTALONI 1997). Badania ostatnich kilku lat dostarczyły dowodów, że stymulowanie treadmillingu jest biologiczną funkcją wspomnianych już w tym artykule białek należących do rodziny ADF/kofilina. Te wszechobecne białka wiążą się prefe-

rencyjnie z aktywną, zarówno monomeryczną, jak i podjednostkami filamentu wówczas, gdy związanym z aktywną nukleotydem jest ADP i — w przypadku filamentu — zwiększają szybkość uwalniania podjednostek F-ADP z ostrego końca filamentu w stacjonarnym stanie polimeryzacji. ADF przyspiesza tę reakcję 25-krotnie, a jego rolę w przyspieszaniu w ten sposób treadmillingu udokumentowały, między innymi, wspomniane już też poszukiwania czynników niezbędnych do odtworzenia ruchu bakterii *Listeria* poza komórką. Uzupełnieniem działania ADF/kofiliny jest akcja profiliny, która w obecności wysokich stężeń ATP konkuruje z tymi białkami o aktywną, zapobiegając w ten sposób ponownej asocjacji aktywny-ADP w kompleksie z ADF (kofiliną) z końcem ostrym filamentu. Kompleks aktywny-ADP z ADF przekształcony w kompleks aktywny-ATP z profiliną może ponownie wchodzić w reakcję z końcami kolczastymi (patrz: CARLIER 1998, CARLIER i współaut. 1999, BORISY i SVITKINA 2000, SOUTHWICK 2000, PANTALONI i współaut. 2001).

W tym miejscu możemy już nawiązać ponownie do roli białek zakrywających w zwiększaniu dynamiki filamentów. Przedstawiono ostatnio przekonywującą hipotezę, że zablokowanie końców kolczastych w dużej liczbie filamentów umożliwia asocjację monomerów tylko z tymi końcami kolczastymi, które nie są zablokowane, co powoduje szybszy wzrost tych mniej licznych filamentów. Wydaje się, że takie współdziałanie białek zakrywających z białkami z rodziny ADF/kofiliny w promocji mechanizmu generującego ruch jest istotne choćby ze względu na ograniczoną szybkość dyfuzji monomerów w gęstej sieci filamentów, co mogłoby stwarzać niedobór monomerów w rejonach szybkiego przyrostu wszystkich filamentów. Jeszcze jedną z rozważanych funkcji białek zakrywających mógłby być ich udział w wyznaczeniu miejsc, w których motoryczna funkcja polimeryzacji jest aktualnie potrzebna. Miejscowe zablokowanie końców kolczastych wszystkich filamentów zablokuje ruch; ich odkrycie będzie go inicjować (CARLIER i PANTALONI 1997, CARLIER 1998; BORISY i SVITKINA 2000, SOUTHWICK 2000).

Odkrywanie zablokowanych końców dla zainicjowania ruchu jest odrębnym, szerokim zagadnieniem dotyczącym regulacji oddziaływań aktywny z związanymi przez nią białkami; jego omówienie wykracza poza ramy tego artykułu. Ze względu na brak miejsca, również drugi mechanizm inicjowania polimeryzacji dla zapoczątkowania ruchu — wytwarzanie nowych, niezablokowanych końców kolczastych przez fragmentację już istniejących filamentów — mo-

że być tu tylko zasygnalizowany. Co ciekawe, aktywność cięcia filamentów aktywnych jest właściwością niektórych białek zakrywających (tych należących do rodziny żelsoliny) oraz białek należących do rodziny ADF/kofiliny. Przewodnikami w dotarciu do oryginalnych prac na ten temat mogą być artykuły BARKALOWA i HARTWIGA (1995), MOON i DRUBINA (1995), CARLIER i współaut. (1999), SOUTHWICKA (2000), POLLARDA i współaut. (2000). Trzeci mechanizm inicjowania ruchów wykorzystujących polimeryzację jako siłę motoryczną to nukleacja filamentów *de novo*. Jak już powiedziano w rozdziale o mechanizmie polimeryzacji, spontaniczna nukleacja jest najwolniejszą reakcją procesu polimeryzacji, ale komórki korzystają z pomocy białek przyspieszających ją przez utrwalanie zarodki polimeryzacji. Ten aspekt polimeryzacji *in vivo* skupia na sobie najwięcej uwagi od czasu odkrycia podobnych do aktywny białek Arp (ang. actin related proteins), wykazania w latach 90. ich powszechnej obecności w komórkach eukariotycznych oraz udokumentowania, że tworzony przez Arp2 i Arp3 kompleks siedmiu peptydów zwany kompleksem Arp2/3 stymuluje nukleację aktywny, pozostając związany z ostrym końcem rosnącego filamentu. Kompleks Arp2/3 może też łączyć się z „wewnętrzny” podjednostkami już istniejących filamentów i inicjować odrastanie od nich, pod kątem 70°, odgałęzień skierowanych (w komórce) ich kolczastymi końcami ku wiodącej krawędzi komórki. Dokładniejszy opis tych aktywności znajdzie czytelnik w artykule KWIATKOWSKIEJ w poprzednim numerze KOSMOSU (2001). Tu przypomnijmy, że kompleks Arp2/3 okazał się niezbędny do zrekonstruowania *in vitro* ruchu komórek *Listerii* (LOISEL i współaut. 1999). W tym kontekście, wykazanie obecności kompleksu Arp2/3 i zależnej od niego dendrytycznej organizacji filamentów aktywnych zarówno w popychającym komórkę *Listerii* ogonie komety (CAMERON i współaut. 2001), jak i w lamellipodiach migrujących komórek (fibroblastów, makrofagów, keratynocytów) (patrz: MACHESKY i GOULD 1999, HIGGS i POLLARD 2001), jest silnym dowodem na to, że w obu przypadkach motorem ruchu jest polimeryzacja aktywny. Przy tej konkluzji należy jednak pamiętać, że kompleks Arp2/3, choć jest niezbędny, nie wystarcza do zapoczątkowania ruchu bakterii, a więc przypuszczalnie i lamellipodiów. Można przypuszczać, że w obu przypadkach konieczne jest jego współdziałanie z innymi, wymienionymi w tym rozdziale mechanizmami regulacji stanu dynamicznego aktywny (CONDEELIS 2001).

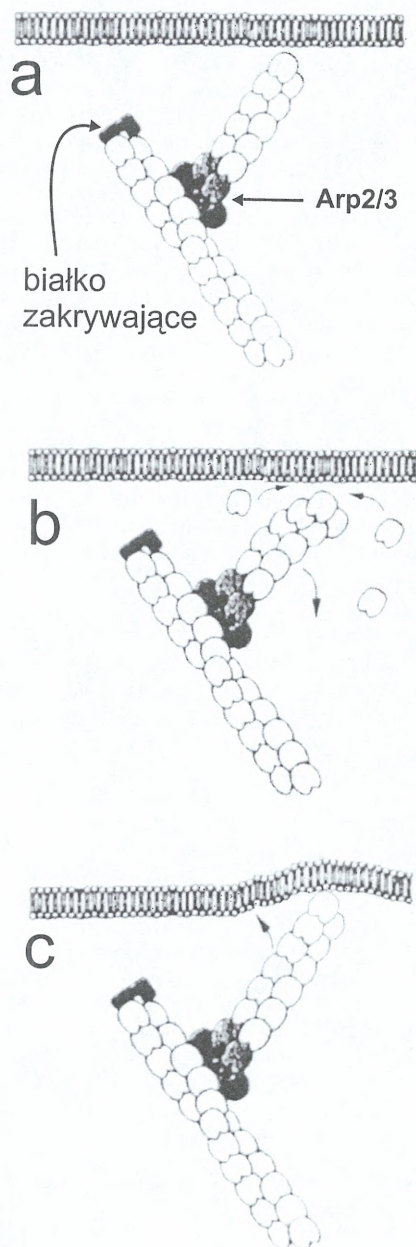
## FIZYCZNY MODEL GENERACJI RUCHU PRZEZ POLIMERYZACJĘ AKTYNY

Modele sugerujące sposób przełożenia polimeryzacji na ruch wiodącej krawędzi komórki pojawiły się w ślad za ideą wykorzystywania polimeryzacji jako siły motorycznej. PESKIN i współautorzy (1993) przedstawili teoretyczne obliczenia wskazujące, że przyrastający koniec polimeru aktyny może wywierać siłę wystarczającą do przekształcenia swobodnych ruchów dyfuzyjnych znajdującego się przed nim obiektu (błony komórkowej, komórki bakteryjnej) w ruch kierunkowy. Model ten zakładał, że filament jest sztywny, ustawiony prostopadle do danego obiektu, a odkształcenie czy przesunięcie obiektu wskutek ruchów Browna otwiera przestrzeń między nim a końcem filamentu wystarczającą do przyłączenia dodatkowego monomeru do końca filamentu. Wówczas odkształcenie to staje się nieodwracalne, gdyż sztywność filamentu przeciwdziała powrotowi do poprzedniej sytuacji przy dalszych przypadkowych ruchach termicznych obiektu.

Ten model Brownowskiej zapadki został zmodyfikowany i rozbudowany przez MOGILNERA i OSTERA (1996). Nowy model, uwzględniający obserwowane w lamellipodiach ukośne ustawienie filamentów względem błony (przeszkody dla inkorporacji nowych podjednostek) oraz eksperymentalnie udowodnioną giętkość filamentów aktynowych, jest obecnie uznawany i propagowany przez innych autorów (BORISY i SVITKINA 2000, THERIOT 2000, POLLARD i współaut. 2000). W tym modelu, nazwanym modelem „elastycznej zapadki Brownowskiej”, termicznymi fluktuacjom ulega zarówno „przeszkoda”, jak i filament, przy czym termiczne ruchy zginające filament odgrywają większą rolę. Filament zachowuje się jak elastyczna sprężyna: zgięcie ukośnie ustawionego w stosunku do błony filamentu otwiera przestrzeń umożliwiającą przyłączenie jednego lub kilku monomerów. Powrót wydłużonego filamentu do poprzedniej orientacji powoduje deformację błony (Ryc. 5) lub przesunięcie komórki bakteryjnej. Warunkiem wytworzenia nacisku na błonę jest, oczywiście, unieruchomienie przeciwnego końca filamentu. Z obliczeń autorów modelu wynika również, że długość naciskającego filamentu musi być ograniczona — w przeciwnym razie nie miałby on wystarczającej elastyczności dla pokonania oporu błony. Oba te warunki są spełnione przez usieciowanie filamentów przez kompleks Arp2/3, jak również przez wytwarzanie przez komórkę kontaktów ogniskowych z

podłożem, które przejściowo unieruchamiają całą sieć filamentów lub jej znaczne fragmenty.

W tym miejscu wypadałoby wrócić do zaszygalizowanej w pierwszej części tego artykułu pozornej sprzeczności między wstecznym ruchem filamentów aktynowych w lamellipodiach i filopodiach a motoryczną funkcją polimeryzacji aktyny i skomentować ją z dzisiejszego punktu widzenia. W wyniku licznych badań nad



Ryc. 5. Model generacji ruchu przez polimeryzację aktyny na zasadzie termicznej zapadki. Objasnienia w tekście.

zachowaniem się lamellipodium i filopodiów stożka wzrostu neuronu sformułowano „hipotezę sprzęgła”, którą w dużym skrócie można przedstawić następująco. Lamellipodia wytwarzają liczne kontakty z podłożem. Filopodia wykonują ruch postępowy wówczas, gdy wypełniające je filamenty przyrastające na ich końcach kolczastych, a ostrymi końcami wnikające w sieć filamentów lamellipodialnych (Ryc. 1b), zostają unieruchomione w stosunku do podłoża przez ogniskowe kontakty z podłożem (sprzęgło

włączone). Gdy sprzęgło jest wyłączone, miozynowe motory współdziałające z błoną komórkową przesuwają filamenty wstecz, do wnętrza komórki. Zainteresowanym dalszymi szczegółami polecam artykuły przeglądowe JAYA (2000) oraz SUTERA i FORSCHERA (2000).

Dziękuję mgr Barbarze Wawro za nieocenioną pomoc w przygotowaniu ilustracji do tego artykułu.

## GENERATION OF MOTION BY ACTIN POLYMERIZATION

### SUMMARY

Spatially controlled polymerization of actin provides the driving force for the formation and dynamics of cellular protrusions like lamellipodia and filopodia or the acrosomal process of sperm cells. *Listeria monocytogenes* and other bacterial pathogens use polymerization of actin recruited from the infected cells to propel themselves through the cytoplasm of these cells. The reconstitution of this microbial motility *in vitro* with purified proteins has recently established definitively that no other protein motor is required for the generation of motion by actin polymerization.

Although a large variety of actin binding proteins modulate the functional properties of actin, its motor function is based on the polymerization properties of actin alone. A unidirectional arrangement of the polymer subunits with respect to the filament long axis results in the structural polarity of the actin filament. During polymerization, the monomers are added preferentially to one end of the polymer, called barbed end. Incorporation of the monomers is followed by hydrolysis of their bound ATP and a slow dissociation of phosphate, while ADP remains bound.

Therefore, the polymers grow with caps at their ends composed of subunits carrying ATP or ADP-P, which stabilizes the polymer because the affinities of ATP-actin and ADP-P-actin for the polymer ends are higher than that of ADP-actin. This difference is related to the nucleotide-dependent differences in structure of both monomeric actin and of the polymer subunits. Under steady state conditions, the stabilizing cap is present only at the fast-growing barbed end. This results in a constant release of ADP-subunits from the opposite (pointed) end and their reassociation (after exchanging their bound ADP for ATP) with the barbed end. This phenomenon, called treadmilling, is the basis for the motor function of actin. The fast-growing filament ends, that are directed toward the cell membrane, are thought to push on the membrane and thus produce cell protrusions or propel a bacterium. The physical basis for the generation of motion by treadmilling is best explained by the elastic Brownian ratchet model. The roles of various actin-binding proteins in regulation of the treadmilling are briefly reviewed.

### LITERATURA

- ANDERSON K. I., WANG Y.-I., SMALL J. V., 1996. *Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body*. J. Cell Biol. 134, 1209–1218.
- BARKALOW K., HARTWIG J.H., 1995. *Setting the pace of cell movement*. Current Biol. 5, 1000–1002.
- BELMONT L. D., ORLOVA A., DRUBIN D. G., EGELMAN E. H., 1999. *A change in actin conformation associated with filament instability after P<sub>i</sub> release*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 29–34.
- BORISY G. G., SVITKINA T. M., 2000. *Actin machinery: pushing the envelope*. Current Opin. Cell Biol. 12, 104–112.
- CAMERON L. A., SVITKINA T. M., VIGNJEVIC D., THERIOT J. A., BORISY G. G., 2001. *Dendritic organization of actin comet tails*. Current Biol. 11, 130–135.
- CARLIER M.-F., 1989. *Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules*. Int. Rev. Cytol. 115, 139–170.
- CARLIER M.-F., 1991. *Actin: protein structure and filament dynamics*. J. Biol. Chem. 266, 1–4.
- CARLIER M.-F., 1998. *Control of actin dynamics*. Current Opin. Cell Biol. 10, 45–51.
- CARLIER M.-F., PANTALONI D., KORN E. D., 1986. *Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin*. J. Biol. Chem. 261, 10778–10784.
- CARLIER M.-F., PANTALONI D., 1997. *Control of actin dynamics in cell motility*. J. Mol. Biol. 269, 459–467.
- CARLIER M.-F., RESSAD F., PANTALONI D., 1999. *Control of actin dynamics in cell motility*. J. Biol. Chem. 274, 33827–33830.
- CHIK J. K., LINDBERG U., SCHUTT C. E., 1996. *The structure of an open state of  $\beta$ -actin at 2.65 Å resolution*. J. Mol. Biol. 263, 607–623.
- CONDEELIS J., 2001. *How is actin polymerization nucleated in vivo?* Trends Cell. Biol. 11, 288–293.
- ESTES J. E., SELDEN L. A., KINOSIAN K. J., GERSHMAN L. C., 1992. *Tightly-bound divalent cation of actin*. J. Muscle Res. Cell Motil. 13, 272–284.
- FORSHER P., SMITH S. J., 1988. *Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone*. J. Cell Biol. 107, 1505–1516.
- FULTON A. B., 1985. *Treadmilling, diffusional exchange and cytoplasmic structures*. J. Muscle Res. Cell Motil. 6, 263–273.
- GRĘBECKI A., 1993. *Ruchy lateralne podbłonowej sieci aktynowej w komórkach ruchliwych*. Post. Biol. Kom. 20 (Supl. 2) 97–111.
- HIGGS H. N., POLLARD T. D., 2001. *Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins*. Annu. Rev. Biochem. 70, 649–676.
- HOLMES K. C., POPP D., GEBHARD W., KABSCH W., 1990. *Atomic model of the actin filament*. Nature 347, 44–49.
- INOUE S., TILNEY L. G., 1982. *Acrosomal reaction of *Thyone sperm I*. Changes in the sperm head visualized by high resolution video microscopy*. J. Cell. Biol. 93, 812–819.

- JAY D. G., 2000. *The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone*. J. Neurobiol. 44, 114–125.
- KABSCH W., MANNHERZ H. J., SUCK D., PAI E. F., HOLMES K. C., 1990. *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature 347, 37–44.
- KHATILINA S. YU., STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., 2002. *Role of the DNase-I-binding loop in dynamic properties of actin filament*. Biophys. J. 82, w druku.
- KIM E., REISLER E., 2000. *Intermolecular dynamics and function in actin filaments*. Biophys. Chem. 86, 191–201.
- KWIATKOWSKA K., 2001. *Udział kompleksu białek Arp2/3 w nukleacji aktyny w komórce. Mechanizm ruchu bakterii Listeria monocytogenes*. Kosmos 50, 213–221.
- LOISEL T. P., BOUJEMAA R., PANTALONI D., CARLIER M.-F., 1999. *Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins*. Nature 401, 613–616.
- LORENZ M., POPP D., HOLMES K. C., 1993. *Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm*. J. Mol. Biol. 234, 826–836.
- MACHESKY L. M., GOULD K. L., 1999. *The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer*. Current Opin. Cell Biol. 11, 117–121.
- MATUS A., 2000. *Actin-based plasticity in dendritic spines*. Science 290, 754–758.
- MCLAUGHLIN P. J., GOOCH J. T., MANNHERZ H.-G., WEEDS A. G., 1993. *Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing*. Nature 364, 685–692.
- MERRIFIELD C. J., MOSS S. E., BALLESTREM C., IMHOF B. A., GIESE G., WUNDERLICH I., ALMERS W., 1999. *Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells*. Nature Cell Biol. 1, 72–74.
- MIYATA H., NISHIYAMA S., AKASHI K.-I., KINISITA K., 1999. *Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2048–2053.
- MOGILNER A., OSTER G., 1996. *Cell motility driven by actin polymerization*. Biophys. J. 71, 3030–3045.
- MOON A., DRUBIN D. G., 1995. *The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics*. Mol. Biol. Cell. 6, 1423–1431.
- OLBRIS D. J., HERZFELD J., 1999. *An analysis of actin delivery in the acrosomal process of Thyone*. Biophys. J. 77, 3407–3423.
- ORLOVA A., EGELMAN E. H., 1993. *A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament*. J. Mol. Biol. 232, 334–341.
- OTTERBEIN L. R., GRACEFFA P., DOMINGUEZ R., 2001. *The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state*. Science 293, 708–711.
- PAGE R., LINDBERG U., SCHUTT C.E., 1998. *Domain motions in actin*. J. Mol. Biol. 280, 463–473.
- PANTALONI D., LE CLAINCHE C., CARLIER M.-F., 2001. *Mechanism of actin-based motility*. Science 292, 1502–1506.
- PESKIN C. S., ODELL G. M., OSTER G.F., 1993. *Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet*. Biophys. J. 65, 316–324.
- POLLARD T. D., BLANCHON L., MULLINS R. D., 2000. *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in non-muscle cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 545–576.
- SCHUTT C. E., MYSLIK J. C., ROZYCKI M. D., GOONESEKERE C. W., LINDBERG U., 1993. *The structure of crystalline profilin-actin*. Nature 365, 810–816.
- SELDEN L. A., KINOSIAN H. J., ESTES J. E., GERSHMAN L.C., 1999. *Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics*. Biochemistry 38, 2769–2778.
- SMALL J. V., ANDERSON K., ROTTNER K., 1996. *Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling*. Biosci. Rep. 16, 351–368.
- SOUTHWICK F. S., 2000. *Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6936–6938.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., 1986. *Struktura filamentu aktynowego i jej implikacje biologiczne*. Post. Biol. Kom. 13, 97–124.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., 2001. *Divalent cations, nucleotides and actin structure*. [W:] *Results and Problems in Cell Differentiation*, tom 32: *Molecular Interactions of Actin*. Dos REMEDIOS C.G. (red.), Springer Verlag, Heidelberg, 23–41.
- SUTER D. M., FORSHER P., 2000. *Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance*. J. Neurobiol. 44, 97–113.
- THERIOT J. A., 2000. *The polymerization motor*. Traffic 1, 19–28.
- THERIOT J. A., MITCHISON T. J., 1991. *Actin microfilament dynamics in locomoting cells*. Nature 352, 126–131.
- TIRION M. M., BEN-AVRAHAM D., 1993. *Normal mode analysis of G-actin*. J. Mol. Biol. 230, 186–195.
- TIRION M. M., BEN-AVRAHAM D., LORENZ M., HOLMES K. C., 1995. *Normal modes as refinement parameters for the F-actin model*. Biophys. J. 68, 5–12.
- VANDEKERCKHOVE J., WEBER K., 1978. *The amino acid sequence of Physarum actin*. Nature 276, 720–721.
- WANG Y.-L., 1985. *Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling*. J. Cell. Biol. 101, 597–602.
- WEGNER A., 1976. *Head to tail polymerization of actin*. J. Mol. Biol. 153, 681–693.