

ALEKSANDRA STĘPIEŃ, ALINA GRZANKA, MACIEJ OSTROWSKI

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Kartłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
e-mail: a_stepien@cm.umk.pl*

BIAŁKA KOMPLEKSU ADF/KOFILINA: REGULACJA DYNAMIKI FILAMENTÓW AKTYNOWYCH

WSTĘP

Dynamiczne współdziałanie pomiędzy trzema komponentami cytoszkieletu: filamentami pośrednimi, mikrofilamentami oraz mikrotubulami, reguluje strukturalną organizację cytoplazmy komórek eukariotycznych, a co się z tym wiąże, tak istotne procesy jak ukierunkowany ruch komórek, ich wzrost, podział oraz różnicowanie. Pomimo wyraźnej funkcjonalnej zależności pomiędzy wymienionymi elementami cytoszkieletu, każdy z nich może być rozpatrywany jako odrębny i niezależny system, odpowiedzialny za pełnienie określonej funkcji w komórce.

Mikrofilamenty, zbudowane z filamentów aktynowych, zlokalizowane są w części peryferycznej komórki. Pozostają one pod kontrolą licznych białek, regulujących stan organizacji aktyny poprzez wiązanie się z G- lub z F-aktyną. Przeprowadzone w ostatnich latach badania, wskazują na coraz bardziej znaczącą rolę białek należących do kompleksu ADF/kofilina w powyższym procesie.

Kompleks ADF/kofilina należy do grupy struktur supramolekularnych. Wchodzące w jego skład: czynnik depolimeryzujący aktynę (ADF) oraz kofilina (ang. cofilamentous protein), stanowią niskocząsteczkowe białka (15–19 kDa), ulegające ekspresji w większości komórek eukariotycznych (patrz DOS REMEDIOS i współaut. 2003). Organizmy jednokomórkowe, np. drożdże, posiadają zazwyczaj jedną postać kompleksu ADF/kofilina, podczas gdy w organizmach wielokomórkowych zanotowano kilka izoform (patrz BAM-

BURG 1999). W komórkach ssaków występuje jedna izoforma ADF oraz dwie kofiliny (kofilina-1, kofilina-2). Kofilinę-1 zlokalizowano w większości komórek mięśniowych, natomiast kofilina-2 jest obecna w mięśniach. ADF ulega ekspresji głównie w neuronach oraz pewnych typach komórek nabłonkowych (VARTAINEN i współaut. 2002). Ze względu na podobny sposób regulacji dynamiki filamentów aktynowych, zwykle wspólną lokalizację oraz fakt, że ich aktywność kontrolowana jest poprzez odwracalną fosforylację, traktowane są jako jednostka – ADF/kofilina (AC) (patrz BAMBURG 1999). Pomimo szeregu podobieństw, białka należące do kompleksu ADF/kofilina cechują znaczne różnice. Są one niezbędne dla regulacji organizacji cytoszkieletu różnego typu komórek (VARTAINEN i współaut. 2002).

W komórkach znajdujących się w spoczynku, kofilina, najprawdopodobniej ze względu na swoją wielkość, rozproszona jest równomiernie zarówno w cytoplazmie, jak i w samym jądrze, z pominięciem jąderka (MATSUZAKI i współaut. 1988, OHTA i współaut. 1989). W aktywnie poruszających się komórkach oraz podczas podziałów, wykazano brak tego białka w jądrze. Kofilina skoncentrowana jest w rejonie, gdzie odbywa się ciągle proces dynamicznej reorganizacji cytoszkieletu komórki, a więc w części peryferycznej (CHHABRA i współaut. 2002). W komórkach ekspozowanych m. in. na okresowe działanie szoku cieplnego, następuje akumu-

lacja kofiliny w jądrze i formowanie tzw. pałeczek aktyny – skróconych i pogrubionych mikrofilamentów, stabilizowanych przez kofilinę (ang. actin/cofilin rods) (MATSUZAKI i współaut. 1988, MINAMIDE i współaut. 2000, NISHIDA i współaut. 1987).

Kofilina pełni wiele różnorodnych funkcji. Odpowiada m.in. za transport aktyny do jądra (IDA i współaut. 1992). Jest jednym z głównych czynników, niezbędnych do formowania dynamicznych struktur, jakimi są filopodia, lamellipodia (ARAI i ATOMI 2003) oraz stożki wzrostu aksonów komórek nerwowych (ENDO i współaut. 2003). Obecność aktywnej formy AC w obszarze lamellipodium, przy krawędzi wiodącej komórki, jest niezbędna dla utrzymania jej polarności podczas migracji (DAWE i współaut. 2003). Kofilina wpływa ponadto na aktywację komórek

T, między innymi poprzez udział w formowaniu synaps IS (ang. immunological synapse). Inhibicja wiązania kofiliny z F-aktyną w tych komórkach hamuje tworzenie IS, proliferację oraz produkcję cytokin typu T_H1 i T_H2 (EIBERT i współaut. 2004). Fosforylacja kofiliny przez kinazy z rodziny LIM (LIMK1), decyduje o indukowanej przez SDF-1 (ang. stromal cell-derived factor 1) chemotaksji komórek Jurkata (NISHITA i współaut. 2002). W ostatnich latach została dobrze udokumentowana funkcja kofiliny w procesie apoptozy (SONG i współaut. 2002, TAKAHASHI i współaut. 2002, TOMIYOSHI i współaut. 2004), a znacząca rola ADF i kofiliny w prawidłowej organizacji aktyny, w procesach morfogenezy, cytokinezy i ruchliwości komórek ssaków, pozostaje bezdyskusyjna (HOTULAINEN i współaut. 2005).

UDZIAŁ KOFILINY W REGULACJI STRUKTURALNEJ ORGANIZACJI AKTYNY

MODEL UWZGLĘDNIAJĄCY ZACHODZĄCĄ NIEPRZERWANIE REORGANIZACJĘ CYTOSZKIELETU W OBSZARZE WIODĄCYM KOMÓRKI (ANG. STEADY-STATE PROTRUSION)

W komórkach znajdujących się w ciągłym ruchu, np. keratynocytach, funkcja kofiliny sprowadza się do utrzymywania stałej puli monomerów G-aktyny poprzez łączenie się z ADP-aktyną i jej depolimeryzację na końcu (-) (ang. pointed end). Celem tych działań jest podtrzymanie zachodzącej nieprzerwanie polimeryzacji na końcu (+) filamentu (ang. barbed end), gdzie ilość cząsteczek G-aktyny jest ograniczona (patrz DESMARAIS i współaut. 2005; POLLARD i współaut. 2000, 2001).

MODEL STYMULOWANEJ AKTYWACJI MECHANIZMU WZROSTU FILAMENTÓW

AKTYNOWYCH W OBSZARZE WIODĄCYM KOMÓRKI (ANG. STIMULATED PROTRUSION)

W komórkach znajdujących się w spoczynku, po zadziałaniu bodźca stymulującego ruch, stwierdza się natychmiastowe udostępnianie wolnych końców (+) filamentów. Jednym ze sposobów inicjacji tego procesu, jest aktywacja kofiliny w obszarze wiodącym komórki. Białko ściąga filamenty aktynowe, by ostatecznie możliwa stała się polimeryzacja na końcach (+), z wykorzystaniem obecnych w dużej ilości monomerów aktyny. Proces ten pozostaje w ścisłym związku z zachodzącą na końcu (-) depolimeryzacją ADP-aktyny (DESMARAIS i współaut. 2004, 2005; GHOSH i współaut. 2004).

ODDZIAŁYWANIA KOMPLEKSU ADF/KOFILINA Z AKTYNĄ ORAZ SPOSOBY ICH REGULACJI

Zdolność kompleksu ADF/kofilina do wiązania G- i F-aktyny, zwiększania puli jej monomerów dysocjujących z końca (-) filamentu oraz udostępnianie wolnych końców (+), podlegają regulacji i pozostają pod kontrolą wielu czynników. Należą do nich m.in.: pH, rodzaj nukleotydu związanego z aktyną, obecność innych białek, fosforylacja czy modyfikacje z udziałem falloidyny.

Pierwotnie twierdzono, że kofilina wiąże się z dwiema sąsiadującymi podjednostkami

wzdłuż filamentu aktyny, pomiędzy subdomenami 1 i 2 (SD1 i SD2) jednego monomeru oraz subdomenami 1 i 3 (SD1 i SD3) drugiego. Spowodowana tym zmiana skreślenia spirali powoduje osłabienie wiązań w obrębie filamentu (MCGOUGH i współaut. 1997). Model zaproponowany przez RENOULTA i współaut. (1999) kładzie nacisk na istotną rolę SD1 aktyny w wiązaniu cząsteczki kofiliny. Zgodnie z nim, część N-końcowa kofiliny asocjuje z niżej położonym regionem subdome-

ny 1 jednej podjednostki aktywnej (miejsce I), obejmującym jej regiony N- i C-terminalne. Koniec karboksylowy kofiliny wiąże się natomiast z położonym wyżej regionem SD1 sąsiadującego monomeru (miejsce II). Tworzą go reszty aminokwasów (112-125), formujące spiralę w górnym obszarze subdomeny 1. Kolejny model, zaproponowany przez BLONDINA i współaut. (2001) potwierdza i rozszerza wcześniejsze hipotezy. Badacze wskazują, że miejsce II obejmuje obszar górnej części subdomeny 1 i dolnej subdomeny 2 tej samej podjednostki aktywnej. Model ten zakłada wstawienie cząsteczki kofiliny (z wyjątkiem tych eksponowanych na końcu (+) filamentu) pomiędzy subdomeny 1 i 2 dwóch sąsiadujących monomerów aktywnej. Na podstawie przeprowadzonych badań, określono ponadto zakres oddziaływań cząsteczki kofiliny z miejscem I, które jest prawdopodobnie obszarem wiązania G-aktyny. Miejsce II jest przypuszczalnie dostępne dla kofiliny jedynie w obrębie filamentu. Wskazują na to wyniki badań ukazujące ruch pomiędzy subdomenami 1 i 2 po przyłączeniu kofiliny do miejsca I. Autorzy sugerują, że następstwem tego procesu jest zmiana konformacyjna w obrębie subdomeny 2, umożliwiająca wiązanie kofiliny w miejscu II poprzez region karboksylowy cząsteczki (ONO i współaut. 2001). Ruch subdomeny 2 względem reszty cząsteczki może

być także wytłumaczeniem zdolności kompleksu ADF/kofilina do hamowania procesu wymiany nukleotydu w obrębie filamentu aktywnej (NISHIDA 1985). Interesujące wyniki eksperymentów otrzymali w swojej pracy GALKIN i współaut. (2001). Według nich, zmiana skrętu F-aktyny przez białka kompleksu ADF/kofilina zachodzi raczej poprzez stabilizację wcześniej istniejącej konformacji niż wprowadzanie nowych zmian strukturalnych. Potwierdzeniem tych rezultatów jest zidentyfikowanie segmentów F-aktyny pozbawionej białek towarzyszących (ang. pure actin), w których skręt spirali był identyczny z występującym w aktywnej związanej z kompleksem ADF/kofilina. Zaobserwowano jednocześnie, że w warunkach sprzyjających depolimeryzacji (pH alkaliczne), zachodzi zmiana nachylenia podjednostek aktywnej w stosunku do ich normalnej orientacji, w wyniku czego zostaje zniszczone połączenie pomiędzy monomerami. W tych warunkach odnotowano także obecność drugiej cząsteczki ADF związanej z monomerem aktywnej. W jednej z kolejnych publikacji, ta sama grupa badawcza (GALKIN i współaut. 2003) zasugerowała oddzielenie funkcji AC jako czynnika wpływającego na zmianę skrętu aktywnej, od jego zdolności do niszczenia połączenia pomiędzy SD1-SD2. Może ono bowiem następować bez udziału kompleksu ADF/kofilina.

RODZAJ NUKLEOTYDU ZWIĄZANEGO Z AKTYNĄ

Organizacja oraz dezorganizacja filamentów aktynowych w komórce są procesami wykorzystującymi ATP. Nukleotyd ten związany jest z monomerem aktywnej, a podczas polimeryzacji, lub w krótkim czasie po jej zejściu, ulega hydrolizie do ADP i P_i. AC wykazuje wyższe powinowactwo do ADP-aktyny, niż do formy związanej z ATP (MACIVER i WEEDS 1994, CARLIER i współaut. 1997, BLANCHOIN i POLLARD 1998). W warunkach obniżonego poziomu ATP w komórce, zachodzi defosforylacja kompleksu ADF/kofilina, a następnie

proteoliza i przyspieszenie depolimeryzacji końca (-) F-aktyny. Ostatecznie powstają dimery ADF/kofilina:ADP-aktyna oraz fragmenty (pałeczki) F-aktyny związanej z AC. Stwierdza się, że w warunkach niedoboru ATP bądź przy niedotlenieniu prowadzącym do spadku tempa fosforylacji oksydacyjnej *in vivo*, dochodzi do destrukcji filamentów aktynowych przy udziale kompleksu ADF/kofilina (ASHWORTH i współaut. 2003, OSTROWSKI i współaut. 2005).

WPLYW PH NA REGULACJĘ DYNAMIKI MIKROFILAMENTÓW

Zdolność większości białek zaliczanych do kompleksu ADF/kofilina do odwracalnej i kontrolowanej polimeryzacji i depolimeryzacji filamentów aktynowych pozostaje w ścisłej zależności od pH środowiska. Do wyjąt-

ków należą: aktoforyna wyizolowana z *Acanthamoeba castellanii* (MACIVER i współaut. 1998) oraz depaktyna z oocytów rozgwiazdy (MABUCHI 1983). Białka AC mają tendencję do wiązania się z F-aktyną w stosunku 1:1

przy pH ok. 6,5, natomiast z G-aktyną przy pH ok. 8,0 (MCGOUGH i współaut. 1997, RENOULT i współaut. 1999, BONET i współaut. 2000, BLONDIN i współaut. 2001). Godnym uwagi jest fakt, iż aktoforyna wiąże się z filamentami aktynowymi mięśni szkieletowych królika zarówno przy pH 6,5, jak i pH 8,0 (MACIVER i współaut. 1998). Depaktyna pozostaje niewrażliwa na pH środowiska (MABUCHI 1983). GALKIN i współaut. (2001) wykazali ponadto, że w warunkach sprzyjających depolimeryzacji, do pojedynczego monomeru aktyny przyłączają się dwie cząsteczki ADF. Trudności w wyjaśnieniu powyższych zależności wynikają z faktu, iż sama aktyna wykazuje znaczną wrażliwość na zmiany pH środowiska (ZIMMERLE i FRIEDEN 1988). BLONDIN i współaut. (2002) wykryli zmianę w strukturze subdomeny 1 (SD1) aktyny, powstającą wskutek zmiany pH. Stwierdzili także, że konformacja cząsteczki kofiliny pozostała nie zmieniona podczas zależnych od pH interakcji ADF/kofilina:aktyna, a proces wiązania AC do G-aktyny poprzez miejsce I został uznany za niewrażliwy na zmiany pH. Interesujące wyniki badań otrzymali BONET i współaut.

(2000). Wskazują one, że filamety aktynowe formowane w pH 6,5, charakteryzują się wyższym współczynnikiem dyfuzji, niż w pH 8,0. Autorzy uważają, że funkcją kofiliny w pH 6,5 jest cięcie filamentów na coraz mniejsze fragmenty do momentu, gdy uniemożliwiony będzie dalszy podział ze względu na ich stosunkową nieelastyczność. Sugerują ponadto, że być może ta forma aktyny związanej z kofiliną jest transportowana do jądra. Autorzy innej publikacji (PFANNSTIEL i współaut. 2001) opisują zdolność kofiliny do tworzenia dimerów pod wpływem czynników sieciujących i alkalicznego pH (8,0). Według nich, oligomeryzacja kofiliny powoduje zmianę jej aktywności z depolimeryzacyjnej, w kierunku wiązania i stabilizacji F-aktyny. Dowodzą, że powstawanie dimerów i oligomerów jest wzmacniane przez PIP_2 (fosfatydyloinozyl-4,5-bisfosforan) oraz zachodzi niezależnie od aktyny. Podobne struktury, zostały zaobserwowane w komórkach poddanych działaniu stresu oksydacyjnego (MINAMIDE i współaut. 2000), co może wskazywać na dotychczas niewyjaśnioną funkcję kofiliny *in vivo*.

INNE BIAŁKA REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ AC

Profilina jest białkiem, które rywalizuje z AC o możliwość wiązania z G-aktyną oraz intensyfikuje wymianę ADP związanego z aktyną na ATP. W konsekwencji dochodzi do dysocjacji końca (-) F-aktyny, a powstała w ten sposób pula monomerów aktyny związanych z profiliną, może być wykorzystana do elongacji rosnącego końca (+) filamentu (BLANCHOIN i POLLARD 1998).

Gelsolina wykazuje strukturalne podobieństwo do kompleksu ADF/kofilina. Wykazano, że AC konkuruje z jej segmentem 2 i 3 o wiązanie z F-aktyną (VAN TROYS i współaut. 1997). Powyższe stwierdzenie jest zgodne z modelem zaproponowanym przez RENOULTA i współaut. (1999), którzy wskazują ponadto na udział domeny 1 gelsoliny w wiązaniu aktyny i jej rywalizację z kofiliną. Oba białka powodują zmniejszanie długości filamentów aktynowych, a ich wiązanie z aktyną jest hamowane przez PIP_2 (SUN i współaut. 1994). Zdolność do „czapczkowania” końców rosnących filamentów białek z rodziny ADF/kofilina jest niewielka, podczas gdy gelsolina wiąże je bardzo silnie, hamując dalsze ich wydłużanie (ONO i współaut. 2004). Intensywność redukcji długości filamentów

przez kompleks ADF/kofilina jest mniejsza, gdy równocześnie zachodzi ich cięcie przez gelsolinę (RESSAD i współaut. 1999).

Kolejnym białkiem zaangażowanym w regulację funkcji AC jest tropomiozyna, rywalizująca z kompleksem ADF/kofilina o wiązanie z F-aktyną (NISHIDA i współaut. 1984, YONEZAWA i współaut. 1988). Przyłączenie tropomiozyny do filamentów aktynowych zapobiega ich proteolizie (DESMARAIS i współaut. 2002) oraz depolimeryzacji (BERNSTEIN i BAMBURG 1982) przez AC. W komórkach znajdujących się w ruchu, kofilina zlokalizowana jest w obszarze wiodącym (ARAI i ATOMI 2003), a tropomiozyna głównie w obrębie sieci filamentów znajdujących się głębiej w komórce oraz włókien naprężeniowych (DESMARAIS i współaut. 2002). Nie zawsze funkcje tropomiozyny i kofiliny są antagonistyczne. Świadczy o tym izoforma wyizolowana z niemięśniowych komórek kręgowców (Tms), która występuje w obszarze lamellipodium wspólnie z kofiliną, nie ograniczając aktywności tego białka (BRYCE i współaut. 2003).

AIP1 (ang. actin-interacting protein 1) to interesująca grupa białek odgrywająca znaczącą rolę w degradacji filamentów aktynowych

(proteoliza, depolimeryzacja) w obecności kompleksu ADF/kofilina. Proces ten przebiega gwałtownie już przy bardzo niskim stężeniu AIP1. Zdolność do „czapczkowania” jest słaba i umożliwia dalsze wydłużanie filamentów, co sugeruje, że nie jest to główna funkcja AIP1 *in vivo*. Jedną z nich jest prawdopodobnie interakcja z krótkimi fragmentami F-aktyny, „udekorowanymi” cząsteczkami kompleksu AC i ich dalsza destabilizacja do krótszych fragmentów (ONO i współaut. 2004).

Kompleks Arp 2/3 (ang. actin related proteins 2/3) zlokalizowany został w miejscach połączeń pomiędzy filamentami aktynowymi (ang. Y-junctions), w strefie wiodącej komórki (SVITKINA i BORISY 1999). Autorzy powyższej publikacji zasugerowali, że aktywność białek kompleksu związana jest z nukleacją filamentów aktynowych, a następnie włączeniem ich w sieć, w strefie wiodącej komórki, jako odgałęzienia wcześniej istniejących

filamentów. DESMARAIS i współaut. (2004) dowiedli natomiast istnienia wyraźnej zależności pomiędzy kofiliną a kompleksem Arp 2/3 w procesie regulacji dynamiki mikrofilamentów. Stwierdzono, że kofilina przemieszcza się do obszaru wiodącego komórki szybciej niż Arp 2/3, tnie filanty aktynowe uwalniając końce (+) i tym samym inicjuje proces polimeryzacji. Pojawiający się zaraz potem kompleks Arp 2/3 tworzy rozgałęzioną sieć spolimeryzowanych filamentów aktynowych.

Falloidyna i jej pochodne są specyficznie wiązane przez filanty aktynowe. Kofilina, powodując zmiany strukturalne w obrębie filamentu, zapobiega przyłączeniu się cząsteczki falloidyny do aktyny (MCGOUGH i współaut. 1997). PENDLETON i współaut. (2003) uważają, że aktyna znajdująca się w jądrze nie jest rozpoznawana przez falloidynę. Według nich, wskazuje to na istnienie w obrębie jądra kompleksu aktyna-kofilina.

FOSFORYLACJA/DEFOSFORYLACJA

W komórkach znajdujących się w spoczynku, ufosforylowana (nieaktywna) kofilina rozproszona jest w cytoplazmie. W efekcie stymulacji, jej koncentracja znacznie wzrasta przy krawędzi wiodącej komórki, gdzie ulega aktywacji (ARAI i ATOMI 2003). Fosforylacja białek AC zachodzi przy udziale kinaz LIM1 i 2 (LIMK1 i LIMK2) (MIZUNO i współaut. 1994, OKANO i współaut. 1995, AMANO i współaut. 2002, NISHITA i współaut. 2002, ENDO i współaut. 2003) oraz TESK1 i TESK2 (ang. testicular protein kinase) (TOSHIMA i współaut. 2001a, b). Powyższe kinazy regulowane są przez białka z rodziny GTP-az Rho: Rho, Rac, Cdc42, które poprzez szereg szlaków sygnałowych wpływają na regulację organizacji cytoszkieletu (OHASHI i współaut. 2000). Jednym z ważniejszych szlaków sygnałowych aktywujących kofilinę, jest Rho-ROCK-LIMK-kofilina. Przyłączenie związanej z GTP cząsteczki Rho do ROCK (ang. Rho ki-

nase) aktywuje kinazę, która następnie przeprowadza fosforylację LIMK1/2 (patrz BESSON i współaut. 2004, PRITCHARD i współaut. 2004). Inaktywacja kofiliny przez LIMK, poprzez fosforylację seryny 3 cząsteczki (NEBL i współaut. 1996, KUHN i współaut. 2000), powoduje zahamowanie jej funkcji, a co się z tym wiąże zwiększenie ilości filamentów aktynowych, stabilizację włókien naprężeniowych oraz wzrost adhezji komórek (patrz BESSON i współaut. 2004, PRITCHARD i współaut. 2004). Reaktywacja w pełni funkcjonalnego kompleksu AC zachodzi m.in. dzięki aktywności fosfataz Slingshot (SSH) (NIWA i współaut. 2002) oraz zidentyfikowanej niedawno Chronophin (CIN) (patrz WIGGAN i współaut. 2005). Slingshot-1L (SSH1L) ulega aktywacji w lamellipodiach poprzez wiązanie z filamentami aktyny. Białka 14-3-3 hamują jej funkcjonowanie (NAGATA-OHASHI i współaut. 2004).

TRANSPORT AKTYNY DO JĄDRA ORAZ UDZIAŁ KOMPLEKSU ADF/KOFILINA W PROCESACH ZWIĄZANYCH Z APOPTOZĄ

Jak już wcześniej wspomniano, jedną z licznych funkcji kofiliny jest transport aktyny do jądra, m.in. w odpowiedzi na szok termiczny (IDA i współaut. 1992, NISHIDA i współaut. 1987) oraz obniżony poziom ATP

(PENDLETON i współaut. 2003), które są procesami kierującymi komórkę na drogę apoptozy. W tych warunkach dochodzi do akumulacji aktyny w jądrze i formowania pałeczek aktyny związanych z kofiliną (ang. actin/co-

filin rods) (NISHIDA i współaut. 1987, WADA i współaut. 1998). Realizacja tego procesu możliwa jest dzięki posiadaniu przez kofilinę sekwencji sygnałowej kierującej ją do jądra (NLS). Nie stwierdzono występowania podobnej sekwencji w cząsteczce aktyny (MATSUZAKI i współaut. 1988). NLS to układ aminokwasów zasadowych: Lys-Lys-Arg-Lys-Lys (KKRKK) wykazujący duże podobieństwo do heptapeptydu Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val (PKKKRKK) odpowiedzialnego za transport dużego białkowego antygeny T do jądra (MATSUZAKI i współaut. 1988). Stwierdzono, że podczas stresu termicznego kofilina ulega defosforylacji (OHTA i współaut. 1989, SAMSTAG i współaut. 1994), powoduje intensywną dysocjację mikrofilamentów, a powstałe monomery i oligomery aktyny są transportowane do jądra w kompleksie z kofiliną. Funkcja formowanych na terenie jądra pałeczek aktyny stabilizowanych przez kofilinę, nie została dotychczas poznana i jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Udział w programowanej śmierci komórki przypisuje się także kofilinie pozostającej na terenie cytoplazmy. Wykazano, że ekspresja tego biał-

ka (S3A-koofilina) częściowo hamuje formowanie charakterystycznych dla apoptozy uwypukleń błony komórkowej (ang. blebbing) oraz kondensację chromatyny indukowane przez ROCK II (SONG i współaut. 2002). We wspomnianych procesach związanych z apoptozą, znaczącą rolę pełnią kinazy LIMK1 (TOMIYOSHI i współaut. 2004) oraz LIMK2 (TAKAHASHI i współaut. 2002). LIMK1 jest prawdopodobnie włączona w formowanie uwypukleń błony komórkowej poprzez fosforylację (inaktywację) kofiliny, a co za tym idzie intensywne wydłużanie filamentów aktynowych (TOMIYOSHI i współaut. 2004). Niedobór kinazy LIMK2 (defosforylacja kofiliny) powoduje istotne upośledzenie pewnych funkcji jądra komórkowego, prowadzące do apoptozy (TAKAHASHI i współaut. 2002). Ostatnie badania zespołu Yamaguchi (YAMAGUCHI i współaut. 2005) podkreślają rolę kofiliny w stabilizacji i dojrzewaniu inwadopodiów – struktur podobnych do filopodiów i lamellipodiów, tworzonych przez komórki nowotworowe. Wykluczają oni jednak udział kofiliny w inicjacji formowania inwadopodiów.

PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje dowodzą niezwykle istotnej funkcji białek kompleksu ADF/koofilina w regulacji przestrzennej organizacji cytoszkieletu i procesach z nią związanych. W aktualnych modelach, opisujących mechanizmy regulacji organizacji aktyny, białka AC określa się jako kluczowe regulatory, pozostające pod kontrolą szeregu czynników. Wśród nich wyróżnia się obecność innych białek związanych z cytoszkieletem, pH oraz fosforylację. Rozwój badań w tym kierunku, przyczynił się do odkrycia nowych obszarów aktywności białek kompleksu ADF/koofilina,

jakimi są udział w dojrzewaniu inwadopodiów czy współdziałanie z kompleksem Arp 2/3 w formowaniu sieci filamentów aktynowych w obszarze wiodącym komórki. Dużym wyzwaniem dla naukowców zajmujących się tym zagadnieniem, jest sprecyzowanie tych, nie do końca wyjaśnionych, zagadnień. Poznanie ich, będzie kolejnym krokiem do zrozumienia skomplikowanych mechanizmów związanych z procesami zachodzącymi w komórce i istotnym krokiem w kierunku naprawy ich dysfunkcji.

PROTEINS OF THE ADF/COFILIN FAMILY: REGULATION OF ACTIN FILAMENTS DYNAMICS

Summary

Many cellular events are directly related to the cytoskeleton's dynamics, which remain under control of the protein regulatory system. Proteins of the ADF/cofilin family have been shown to be active in depolymerizing F-actin, as well as severing actin filaments and creating free barbed ends. Their various functions are regulated, among others, by phosphorylation, pH, the state of the nucleotide bound

to actin or the presence of other proteins such as profilin, gelsolin, tropomyosin, AIP1 and the Arp 2/3 complex. In addition, the ability of ADF/cofilin to bind to actin appears to be modified by phalloidin. It has also been emphasized that these key actin dynamics' regulators are able to form intranuclear actin/cofilin rods and some of their activities are associated with apoptosis.

LITERATURA

- AMANO T., KAJI N., OHASHI K., MIZUNO K., 2002. *Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis*. J. Biol. Chem. 277, 22093-22102.
- ARAI H., ATOMI Y., 2003. *Suppression of cofilin phosphorylation in insulin-stimulated ruffling membrane formation in KB cells*. Cell Struct. Funct. 28, 41-48.
- ASHWORTH S. L., SOUTHGATE E. L., SANDOVAL R. M., MEYBERG P. J., BAMBURG J. R., MOLITORIS B. A., 2003. *ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 284, 852-862.
- BAMBURG J. R., 1999. *Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15, 185-230.
- BERNSTEIN B. W., BAMBURG J. R., 1982. *Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF)*. Cell Motil. 2, 1-8.
- BESSON A., ASSOIAN R. K., ROBERTS J. M., 2004. *Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors*. Nat. Rev. Cancer. 4, 948-955.
- BLANCHON L., POLLARD T. D., 1998. *Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin*. J. Biol. Chem. 273, 25106-25111.
- BLONDIN L., SAPOUNTZI V., MACIVER S. K., RENOULT C., BENYAMIN Y., ROUSTAN C., 2001. *The second ADF/cofilin actin-binding site exists in F-actin, the cofilin-G-actin complex, but not in G-actin*. Eur. J. Biochem. 268, 6426-6434.
- BLONDIN L., SAPOUNTZI V., MACIVER S. K., LAGARRIGUE E., BENYAMIN Y., ROUSTAN C., 2002. *A structural basis for the pH-dependence of cofilin. F-actin interactions*. Eur. J. Biochem. 269, 4194-4201.
- BONET C., TERNENT D., MACIVER S. K., MOZO-VILLARIAS A., 2000. *Rapid formation and high diffusibility of actin-cofilin filaments at low pH*. Eur. J. Biochem. 267, 3378-3384.
- BRYCE N. S., SCHEVZOV G., FERGUSON V., PERCIVAL J. M., LIN J. J., MATSUMURA F., BAMBURG J. R., JEFFREY P. L., HARDEMAN E. C., GUNNING P., WEINBERGER R. P., 2003. *Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms*. Mol. Biol. Cell 14, 1002-1016.
- CARLIER M. F., LAURENT V., SANTOLINI J., MELKI R., DIDRY D., XIA G. X., HONG Y., CHUA N. H., PANTALONI D., 1997. *Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility*. J. Cell Biol. 136, 1307-1322.
- CHHABRA D., BAO S., DOS REMEDIOS C. G., 2002. *The distribution of cofilin and DNase I in vivo*. Cell Res. 12, 207-214.
- DAWE H. R., MINAMIDE L. S., BAMBURG J. R., CRAMER L. P., 2003. *ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration*. Curr. Biol. 13, 252-257.
- DESMARAIS V., ICHETOVKIN I., CONDEELIS J., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2002. *Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge*. J. Cell Sci. 115, 4649-4660.
- DESMARAIS V., MACALUSO F., CONDEELIS J., BAILLY M., 2004. *Synergistic interaction between the Arp2/3 complex and cofilin drives stimulated lamellipod extension*. J. Cell Sci. 117, 3499-3510.
- DESMARAIS V., GHOSH M., EDDY R., CONDEELIS J., 2005. *Cofilin takes the lead*. J. Cell Sci. 118, 19-26.
- DOS REMEDIOS C. G., CHHABRA D., KEKIC M., DEDOVA I. V., TSUBAKIHARA M., BERRY D. A., NOSWORTHY N. J., 2003. *Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments*. Physiol. Rev. 83, 433-473.
- EIBERT S. M., LEE K. H., PIPKORN R., SESTER U., WABNITZ G. H., GIESE T., MEUER S. C., SAMSTAG Y., 2004. *Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 1957-1962.
- ENDO M., OHASHI K., SASAKI Y., GOSHIMA Y., NIWA R., UEMURA T., MIZUNO K., 2003. *Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin*. J. Neurosci. 23, 2527-2537.
- GALKIN V. E., ORLOVA A., LUKOYANOVA N., WRIGGERS W., EGELMAN E. H., 2001. *Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits*. J. Cell Biol. 153, 75-86.
- GALKIN V. E., ORLOVA A., VAN LOOCK M. S., SHVETSOV A., REISLER E., EGELMAN E. H., 2003. *ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments*. J. Cell Biol. 163, 1057-1066.
- GHOSH M., SONG X., MOUNEIMNE G., SIDANI M., LAWRENCE D. S., CONDEELIS J. S., 2004. *Cofilin promotes actin depolymerization and defines the direction of cell motility*. Science 304, 743-746.
- HOTULAINEN P., PAUNOLA E., VARTIAINEN M. K., LAPPALAINEN P., 2005. *Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells*. Mol. Biol. Cell 16, 649-664.
- IIDA K., MATSUMOTO S., YAHARA I., 1992. *The KKRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein, cofilin*. Cell Struct. Funct. 17, 39-46.
- KUHN T. B., MEYBERG P. J., BROWN M. D., BERNSTEIN B. W., MINAMIDE L. S., JENSEN J. R., OKADA K., SODA E. A., BAMBURG J. R., 2000. *Regulating actin filament dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases*. J. Neurobiol. 44, 126-144.
- MABUCHI I., 1983. *An actin-depolymerizing protein (depactin) from starfish oocytes: properties and interaction with actin*. J. Cell Biol. 97, 1612-1621.
- MACIVER S. K., WEEDS A. G., 1994. *Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion*. FEBS Lett. 347, 251-256.
- MACIVER S. K., POPE B. J., WHYTOCK S., WEEDS A. G., 1998. *The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of Acanthamoeba Actophorin*. Eur. J. Biochem. 256, 388-397.
- MATSUZAKI F., MATSUMOTO S., YAHARA I., YONEZAWA N., NISHIDA E., SAKAI H., 1988. *Cloning and characterization of porcine brain cofilin cDNA*. J. Biol. Chem. 263, 11564-11568.
- MCGOUGH A., POPE B., CHIU W., WEEDS A., 1997. *Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function*. J. Cell Biol. 138, 771-781.
- MINAMIDE L. S., STRIEGL A. M., BOYLE J. A., MEYBERG P. J., BAMBURG J. R., 2000. *Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function*. Nat. Cell Biol. 2, 628-636.

- MIZUNO K., OKANO I., OHASHI K., NUNOUE K., KUMA K., MIYATA T., NAKAMURA T., 1994. *Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif*. *Oncogene* 9, 1605-1612.
- NAGATA-OHASHI K., OHTA Y., GOTO K., CHIBA S., MORI R., NISHITA M., OHASHI K., KOUSAKA K., IWAMATSU A., NIWA R., UEMURA T., MIZUNO K., 2004. *A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia*. *J. Cell Biol.* 165, 465-471.
- NEBL G., MEUER S. C., SAMSTAG Y., 1996. *Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin*. *J. Biol. Chem.* 271, 26276-26280.
- NISHIDA E., 1985. *Oposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate*. *Biochemistry* 24, 1160-1164.
- NISHIDA E., MAEKAWA S., MUNIYUKI E., SAKAI H., 1984. *Action of 19K protein from porcine brain on actin polymerization: a new functional class of actin-binding proteins*. *J. Biochem.* 95, 387-398.
- NISHIDA E., IIDA K., YONEZAWA N., KOYASU S., YAHARA I., SAKAI H., 1987. *Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5262-5266.
- NISHITA M., AIZAWA H., MIZUNO K., 2002. *Stromal cell-derived factor 1 activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis*. *Mol. Cell Biol.* 22, 774-783.
- NIWA R., NAGATA-OHASHI K., TAKEICHI M., MIZUNO K., UEMURA T., 2002. *Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin*. *Cell* 108, 233-246.
- OHASHI K., NAGATA K., MAEKAWA M., ISHIZAKI T., NARUMIYA S., MIZUNO K., 2000. *Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop*. *J. Biol. Chem.* 275, 3577-3582.
- OHTA Y., NISHIDA E., SAKAI H., MIYAMOTO E., 1989. *Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin*. *J. Biol. Chem.* 264, 16143-16148.
- OKANO I., HIRAOKA J., OTERA H., NUNOUE K., OHASHI K., IWASHITA S., HIRAI M., MIZUNO K., 1995. *Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs*. *J. Biol. Chem.* 270, 31321-31330.
- ONO S., MCGOUGH A., POPE B. J., TOLBERT V. T., BUI A., POHL J., BENIAN G. M., GERNERT K. M., WEEDS A. G., 2001. *The C-terminal tail of UNC-60B (actin depolymerizing factor/cofilin) is critical for maintaining its stable association with F-actin and is implicated in the second actin-binding site*. *J. Biol. Chem.* 276, 5952-5958.
- ONO S., MOHRI K., ONO K., 2004. *Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments*. *J. Biol. Chem.* 279, 14207-14212.
- OSTROWSKI M., GRZANKA A., IZDEBSKA M., 2005. *Rola aktywny w chorobie Alzheimerera*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 59, 224-228.
- PENDELTON A., POPE B., WEEDS A., KOFFER A., 2003. *Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells*. *J. Biol. Chem.* 278, 14394-14400.
- PFANNSTIEL J., CYRKLAF M., HABERMANN A., STOEVA S., GRIFFITHS G., SHOEMAN R., FAULSTICH H., 2001. *Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity*. *J. Biol. Chem.* 276, 49476-49484.
- POLLARD T. D., BLANCHON L., MULLINS R. D., 2000. *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545-576.
- POLLARD T. D., BLANCHON L., MULLINS R. D., 2001. *Actin dynamics*. *J. Cell Sci.* 114, 3.
- PRITCHARD C. A., HAYES L., WOJNOWSKI L., ZIMMER A., MARAIS R. M., NORMAN J. C., 2004. *B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts*. *Mol. Cell Biol.* 24, 5937-5952.
- RENOULT C., TERNENT D., MACIVER S. K., FATTOUM A., ASTIER C., BENYAMIN Y., ROUSTAN C., 1999. *The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding*. *J. Biol. Chem.* 274, 28893-28899.
- RESSAD F., DIDRY D., EGILE C., PANTALONI D., CARLIER M. F., 1999. *Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and Arp2/3 complex*. *J. Biol. Chem.* 274, 20970-20976.
- SAMSTAG Y., ECKERSKORN CH., WESSELBORG S., HENNING S., WALLICH R., MEUER S. C., 1994. *Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4494-4498.
- SONG Y., HOANG B.Q., CHANG D.D., 2002. *ROCK-II-induced membrane blebbing and chromatin condensation require actin cytoskeleton*. *Exp. Cell Res.* 278, 45-52.
- SUN H. Q., WOOTEN D. C., JANMEY P. A., YIN H. L., 1994. *The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implications for actin filament severing*. *J. Biol. Chem.* 269, 9473-9479.
- SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1999. *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmill of actin filament array in lamellipodia*. *J. Cell Biol.* 145, 1009-1026.
- TAKAHASHI H., KOSHIMIZU U., MIYAZAKI J., NAKAMURA T., 2002. *Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene*. *Dev. Biol.* 241, 259-272.
- TOMIYOSHI G., HORITA Y., NISHITA M., OHASHI K., MIZUNO K., 2004. *Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing*. *Genes Cells* 9, 591-600.
- TOSHIMA J., TOSHIMA J.Y., AMANO T., YANG N., NARUMIYA S., MIZUNO K., 2001a. *Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation*. *Mol. Biol. Cell* 12, 1131-1145.
- TOSHIMA J., TOSHIMA J. Y., TEKEUCHI K., MORI R., MIZUNO K., 2001b. *Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular sertoli cells*. *J. Biol. Chem.* 276, 31449-31458.
- VAN TROYS M., DEWITTE D., VERSCHELDE J. L., GOETHALS M., VANDEKERCKHOFE J., AMPE C., 1997. *Analogous F-actin binding by cofilin and gelsolin segment 2 substantiates their structural relationship*. *J. Biol. Chem.* 272, 32750-32758.
- VARTAINEN M. K., MUSTONEN T., MATTILA P. K., OJALA P. J., THESLEFF I., PARTANEN J., LAPPALAINEN P., 2002. *The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics*. *Mol. Biol. Cell* 13, 183-194.
- WADA A., FUKUDA M., MISHIMA M., NISHIDA E., 1998. *Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal proteins*. *EMBO J* 17, 1635-1641.

- WIGGAN O., BERNSTEIN B. W., BAMBURG J. R., 2005. *A phosphatase for cofilin to be HAD*. Nat. Cell Biol. 7, 8-9.
- YAMAGUCHI H., LORENZ M., KEMPIAK S., SARMIENTO C., CONIGLIO S., SYMONS M., SEGALL J., EDDY R., MIKI H., TAKENAWA T., CONDEELIS J., 2005. *Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin*. J. Cell Biol. 168, 441-452.
- YONEZAWA N., NISHIDA E., MAEKAWA S., SAKAI H., 1988. *Studies on the interaction between actin and cofilin purified by a new method*. Biochem. J. 251, 121-127.
- ZIMMERLE C.T., FRIEDEN C., 1988. *Effect of pH on the mechanism of actin polymerization*. Biochemistry 27, 7766-7772.