

ANNA LITWINIEC, ALINA GRZANKA, ALEKSANDRA STĘPIEŃ

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

KOMPLEKS ARP2/3 JAKO KLUCZOWY CZYNNIK POLIMERYZACJI AKTYNY

WPROWADZENIE

Ukierunkowany ruch komórki jest wysoce zależny od precyzyjnej regulacji organizacji i dezorganizacji filamentów aktynowych. W trakcie przemieszczania się komórki, aktyna filamentarna pozostaje w stanie dynamicznej równowagi z pulą monomerycznej aktyny, umożliwiając tym samym ciągły obrót jednostek budulcowych, niezbędny dla efektywnej polimeryzacji zachodzącej na krawędzi wiodącej. Nowo powstające filamenty, wywierając nacisk na błonę plazmatyczną, wytwarzają siłę stymulującą wypchnięcie błony komór-

kowej i inicjują tym samym pierwszy etap ruchu komórki. Co interesujące, tworzą one uporządkowany układ przestrzenny, zapewniając w ten sposób mechaniczną wytrzymałość struktur niezbędnych do zapoczątkowania przemieszczania się komórki. Coraz dokładniejsze rozumienie szczegółów formowania tak regularnej sieci filamentów aktynowych stało się możliwe dzięki poznawaniu budowy i mechanizmu działania czynnika warunkującego nukleację aktyny w komórkach eukariotycznych – kompleksu Arp2/3.

WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE I BIOCHEMICZNE KOMPLEKSU ARP2/3, NOMENKLATURA PODJEDNOSTEK

Poliptydowe komponenty kompleksu Arp2/3 (o masach cząsteczkowych 47-kD, 44-kD, 40-kD, 35-kD, 19-kD, 18-kD i 13-kD) zostały po raz pierwszy wspólnie wyodrębnione jako kompleks wiążący profilinę (ang. profilin-binding complex) z ekstraktów komórkowych *Acanthamoeba castellanii*, z zastosowaniem chromatografii powinowactwa i jonowymiennej (MACHESKY i współaut. 1994; patrz WELCH 1999). Jednocześnie zwrócono szczególną uwagę na dwa białka składowe (47- i 44-kD), które określono mianem „niekonwencjonalnych aktyn” ze względu na sekwencyjne homologie odpowiednio do *S. pombe act2* i *S. cerevisiae ACT2* (MACHESKY i współaut. 1994). Dalsze badania ujawniły istnienie analogii dotyczących nie tylko struktur pierwszorzędowych (mimo pew-

nych insercji) między tymi podjednostkami a aktyną (KELLEHER i współaut. 1995, ROBINSON i współaut. 2001), stąd zaklasyfikowano je do białek spokrewnionych z aktyną – Arp (ang. actin related proteins) – jako Arp2 i Arp3 (patrz KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ 2002).

Pozostałe podjednostki zgodnie z nomenklaturą HUGO (ang. Human Genome Organization) oznaczono następująco: ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 i ARPC5 (patrz POLLARD i BELTZNER 2002), przy czym skrót „ARPC” wywodzi się od „Arp2/3 complex component” (patrz MAY 2001). Wśród nich, z uwagi na sekwencyjne homologie w stosunku do rodziny białek Sop2, dotyczące zwłaszcza powtórzeń motywów WD, wyróżnia się ARPC1 (BALASUBRAMANIAN i współaut. 1996, MACHESKY i współaut. 1997, WELCH

i współaut. 1997). Białkowe komponenty Arp2/3 mogą występować w postaci izoform, które powstają na bazie odmiennych sekwencji DNA albo w efekcie alternatywnego składania pre-mRNA (ang. alternative splicing) (JAY i współaut. 2000, POLLARD 2001). WELCH i współaut. (1997) zaobserwowali nieznaczne różnice mas cząsteczkowych podjednostki ARPC1 u człowieka (ARPC1A, ARPC1B – patrz także MAY 2001). JAY i współaut. (2000) zidentyfikowali natomiast ARP3 β (63% identyczności z Arp3) i zwrócili uwagę na możliwe implikacje obecności tego białka dla funkcjonowania komórek nerwowych centralnego układu nerwowego, ze względu na szczególnie wysoki poziom miejscowej ekspresji. Stwierdzono, że współistnienie różnych izoform nie zaburza stechiometrii poszczególnych elementów kompleksu 1:1:1:1:1:1 (WELCH i współaut. 1997), która została określona z zastosowaniem elektroforezy oraz densytometrii (MULLINS i współaut. 1997) i jest w przybliżeniu zgodna z proponowanymi wartościami masy molekularnej: 197($\pm$)10 kD (MULLINS i współaut. 1997) lub 220 kD (MACHESKY i współaut. 1994; patrz także POLLARD i BELTZNER 2002).

Z ewolucyjnego punktu widzenia znaną cechą Arp2/3 jest występowanie znacznych homologii strukturalnych, nawet pomiędzy odległymi filogenetycznie przedstawicielami Eucaryota. WELCH i współaut. (1997) po określeniu kompletnej aminokwasowej sekwencji wszystkich siedmiu komponentów ludzkiego kompleksu podkreślili, że odpowiadają one siedmiu rodzinom białek pochodzących z różnych organizmów (m. in. *A. castellanii*, *S. cerevisiae*). Natomiast BELTZNER i POLLARD (2004) zidentyfikowali regiony (o tym samym charakterze chemicznym aminokwasów w określonych pozycjach) specyficzne dla poszczególnych podjednostek, bazując na zestawieniu odpowiednich modeli odległych gatunków. Tak znaczne zbieżności strukturalne w obrębie wielobiałkowego kompleksu są odzwierciedleniem unikalnych funkcji biochemicznych poszczególnych jego komponentów (WELCH i współaut. 1997), stąd też zastosowanie precyzyjnych analiz budowy, m. in. krystalografii i kriomikroskopii, umożliwiających coraz pełniejsze rozumienie mechanizmu działania Arp2/3 w komórce (ROBINSON i współaut. 2001, VOLKMANN i współaut. 2001, NOLEN i współaut. 2004).

OGÓLNE FUNKCJE KOMPLEKSU

Ten powszechny u Eucaryota (patrz MULLINS i współaut. 1997) kompleks białek jest uznawany przez badaczy za niezwykle istotny czynnik warunkujący utrzymanie dynamiki cytoszkieletu aktynowego, zwłaszcza w odniesieniu do procesu nukleacji *de novo* F-aktyny z jej monomerów (WELCH 1999, GOURNIER i współaut. 2001, MAY 2001, POLLARD i BELTZNER 2002, WEAVER i współaut. 2003, STRASSER i współaut. 2004).

Kontrolowany obrót pulą aktyny w komórce, związany z miejscowo ukierunkowaną polimeryzacją/depolimeryzacją filamentów, jest warunkiem prawidłowego przebiegu licznych procesów, niezbędnych dla właściwego funkcjonowania nie tylko na poziomie pojedynczych komórek, ale również wielokomórkowych organizmów. Pomimo tego, że nie wyklucza się innych możliwych szlaków (WELCH 1999), np. z udziałem formin (patrz STRASSER i współaut. 2004), za najbardziej powszechny, a równocześnie najlepiej poznany mechanizm nukleacji i polimeryzacji aktyny uważany

jest ten, zachodzący z udziałem kompleksu Arp2/3 (HIGGS i POLLARD 2001). Od czasu zidentyfikowania kompleksu w korowej części komórki *Acanthamoeba* (MACHESKY i współaut. 1994, MULLINS i współaut. 1997), gdzie uczestniczy w kształtowaniu sieci filamentów aktynowych (MULLINS i współaut. 1998b), wykazano jego znaczenie w szeregu zjawisk, związanych z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego różnych typów komórek pochodzących z ewolucyjnie oddalonych organizmów (MACHESKY i współaut. 1997, CAMERON i współaut. 2001, ZALLEN i współaut. 2002; patrz także DEEKS i HUSSEY 2003).

Rozgałęziona sieć filamentów aktynowych, przy wiodącej krawędzi komórki, jest wyrazem obecności kompleksu Arp2/3 w miejscach połączeń Y (ang. Y-junctions), co zaobserwowali, w keratocytach i fibroblastach *Xenopus laevis*, SVITKINA i BORISY (1999). Zwrócili oni również uwagę na udział Arp2/3 w stabilizacji końców (-) F-aktyny (ang. pointed ends), a co za tym

idzie także w ochronie ich przed depolimeryzacją. FLANAGAN i współaut. (2001) stwierdzili, że dla rozgałęziania filamentów konieczne jest współdziałanie kompleksu z filaminą A, co gwarantuje mechaniczną stabilność brzegu wiodącego, natomiast znaczenie interakcji Arp2/3 z kofiliną podkreślili DESMARAIS i współaut. (2004). Na podstawie obserwacji *in vivo* wykazali oni, że powstawanie lamellipodiów o prawidłowej morfologii wymaga synergistycznego oddziaływania pomiędzy wymienionymi czynnikami. Kofilina, tnąc filamenty aktynowe, przyczynia się do zwiększenia puli ich wolnych końców (+), które w konsekwencji stają się dostępne dla polimeryzacji przez Arp2/3. Odpowiednie rozgałęzienie i precyzyjna geometria struktury aktyny uformowanej z udziałem Arp2/3, warunkują powstanie siły napędowej niezbędnej do wytwarzania lamellipodiów (BAILLY i współaut. 2001, DESMARAIS i współaut. 2004, EGILE i współaut. 2005). Szczególną funkcję pełni kompleks w komórkach nerwowych, gdzie zahamowanie jego aktywności jedynie nieznacznie zmienia organizację i dynamikę aktyny, powoduje natomiast znaczący wzrost długości aksonu – w tym przypadku Arp2/3 jest zatem negatywnym regulatorem translokacji i wzrostu neurytu (STRASSER i współaut. 2004). Polimeryzacja aktyny z udziałem kompleksu Arp2/3 jest ponadto niezbędna do efektywnego tworzenia miejsc kontaktu przez kadheryny, ponieważ umożliwia poszerzanie stref przylegania powierzchni sąsiadujących komórek. W tym celu Arp2/3 ulega selektywnej akumulacji w rejonach graniczących z miejscami formowania kontaktów międzykomórkowych (VERMA i współaut. 2004). Aktywne komponenty kompleksu Arp2/3 przyczyniają się nie tylko do polimeryzacji aktyny oraz regulacji dynamicznych struktur aktynowych w blastodermalnym zarodku, ale również do prawidłowej morfologii aksonu i rozwoju centralnego układu nerwowego, dla właściwego przebiegu oogenezy i wykształcenia narządów zmysłów, co wykazano u *Drosophila* (ZALLEN i współaut. 2002; patrz także KIEHART i FRANKE 2002). Ukierunkowane przemieszczanie się komórek w odpowiedzi na różnego typu bodźce zewnątrzkomórkowe jest zjawiskiem fundamentalnym dla rozwoju embrionalnego i tkankowego, ale także gojenia ran (patrz STEFFEN i współaut. 2004), odpowiedzi immunologicznej

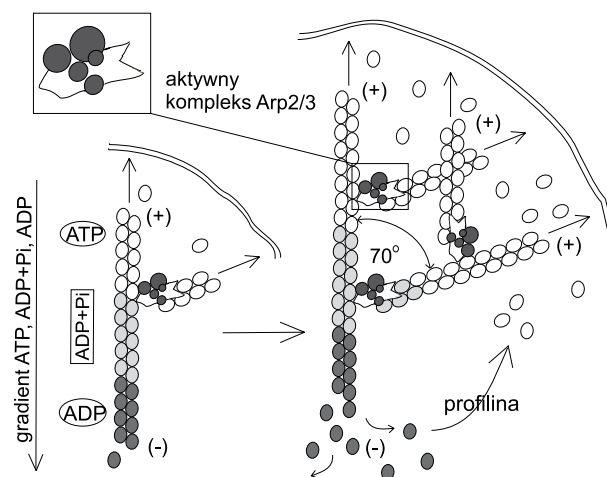
i procesów patologicznych (LAUFFENBURGER i HORWITZ 1996; patrz także POLLARD i BORISY 2003, DESMARAIS i współaut. 2004). Kompleks Arp2/3 uczestniczy zarówno w tworzeniu struktur związanych z migracją komórki – lamellipodiów (WELCH i współaut. 1997, SMALL i współaut. 2002, WEBB i współaut. 2002), jak również w innych procesach wymagających przekształcenia rusztowania aktynowego, takich jak: wewnątrzkomórkowy ruch patogenicznych mikroorganizmów, endocytoza i transport pęcherzyków (QUALMANN i KELLY 2000, SKOBLE i współaut. 2001; patrz także GOURNIER i współaut. 2001, WEAVER i współaut. 2003). Na szczególną uwagę zasługuje możliwość wykorzystania przez drobnoustroje chorobotwórcze aparatu polimeryzacji aktyny komórki gospodarza do przemieszczania się w jej wnętrzu (WELCH i współaut. 1997, SUZUKI i współaut. 1998, CAMERON i współaut. 2001). CAMERON i współaut. (2001) zwrócili uwagę na rozgałęzioną „dendrytyczną” organizację aktyny przy powierzchni komórek *Listeria monocytogenes* w postaci struktur przypominających ogon komety (ang. comet tail) oraz na lokalizację Arp2/3 w miejscach połączeń Y, podobnie jak w lamellipodiach. Taka organizacja wskazuje na analogiczny mechanizm formowania rozgałęzionej sieci filamentów w obu przypadkach (CAMERON i współaut. 2001). EGILE i współaut. (1999), badając mobilność *Shigella flexneri*, wykazali również, że jest ona zależna od procesu organizacji aktyny, w którym decydującą funkcję pełni aktywny kompleks Arp2/3. Oprócz zastosowania dynamiki aktyny do badań modelowych (MACHESKY i współaut. 1997), należy podkreślić inne ważne aspekty praktyczne poznania mechanizmów przemieszczania się patogenów. Stwierdzono, że nukleacja zależna od Arp2/3 może być niezbędna dla efektywnej infekcji niektórych wirusów, np. HIV-1, stąd też hamowanie zdolności HIV-1 do aktywacji kompleksu może mieć potencjalne znaczenie w terapii AIDS (KOMANO i współaut. 2004).

Niewątpliwie, spośród znacznej liczby czynników uczestniczących w transdukcji sygnału stymulującego ruch komórki, kompleks Arp2/3 pełni funkcję szczególną, gdyż stanowi ostatnie, wykonawcze ogniwo, warunkujące polimeryzację filamentów (patrz ROBINSON i współaut. 2001).

MODELE NUKLEACJI, IMPLIKACJE AKTYWACJI KOMPLEKSU ARP2/3 I UDZIAŁ POSZCZEGÓLNYCH PODJEDNOSTEK

Szczególnie interesującym aspektem polimeryzacji aktyny zależnej od Arp2/3 jest wytwarzanie ściśle określonej geometrycznej struktury, określanej jako tzw. dendrytyczna szczoteczka (ang. dendritic actin brush), zlokalizowanej w obszarze lamellipodium, w strefie wiodącej komórki (SVITKINA i BORISY 1999). Mechanizm organizacji aktyny z udziałem kompleksu Arp2/3 został dotychczas opisany za pomocą dwóch, budzących kontrowersje modeli: nukleacji „dendrytycznej” (ang. dendritic nucleation) (MULLINS i współaut. 1998a, BAILLY i współaut. 2001, MAY 2001) oraz nukleacji końca (+) filamentu (ang. barbed end nucleation) (PANTALONI i współaut. 2000). PANTALONI i współaut. (2000), na podstawie kinetyki polimeryzacji aktyny, zaproponowali, że wzrost filamentu maticznego i wytwarzanie odgałęzień bocznych zachodzi na końcu (+) filamentu, w wyniku miejscowego przyłączenia Arp2/3. Jednakże, badania z zastosowaniem krystalografii i kriomikroskopii elektronowej, dotyczące struktury Arp2/3 i rozgałęzień aktynowych, nie wykazały inkorporacji żadnej z podjednostek kompleksu do filamentu maticznego (ROBINSON i współaut. 2001, VOLKMANN i współaut. 2001). Natomiast, zgodnie z modelem „dendrytycznej” nukleacji, formowanie nowych filamentów w postaci odgałęzień bocznych pod kątem ok. 70° do filamentu maticznego, nie wymaga naruszenia jego struktury (VOLKMANN i współaut. 2001; AMANN i POLLARD 2001a, b; EGILE i współaut. 2005). Funkcję głównego łącznika ortogonalnej sieci aktynowej pełni wówczas Arp2/3 (MULLINS i współaut. 1998a, SVITKINA i BORISY 1999), którego podjednostki Arp2 i Arp3, wykazujące znaczne analogie strukturalne z aktyną, tworzą prawdopodobnie heterodimer czapeczkujący wolno rosnący koniec (-) nowo powstającego filamentu i inicjujący szybki wzrost w kierunku końca (+) (KELLERHER i współaut. 1995; patrz także MULLINS i współaut. 1997, POLLARD i BELTZNER 2002), podczas gdy inne komponenty kompleksu – podjednostki ARPC2 i ARPC4 (GOURNIER i współaut. 2001) – mogą uczestniczyć w organizacji miejsc kontaktu i bocznego wiązania z filamentem maticznym (BAILLY i współaut. 2001, ROBINSON i współaut. 2001, VOLKMANN i współaut. 2001). Zgodnie z gradientem ATP, ADP i P_i , ADP wzdłuż filamentu w kierunku końca (-) oraz zgodnie z największym

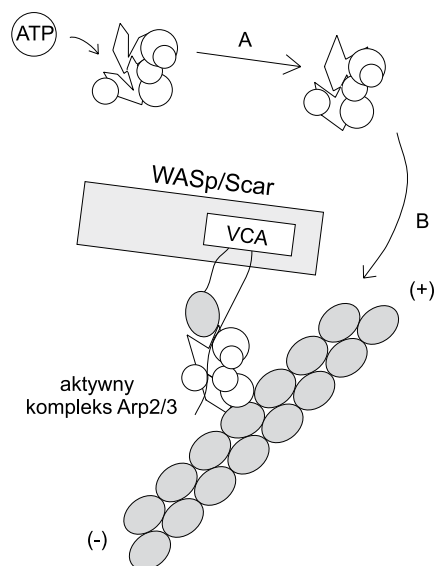
powinowactwem Arp2/3 do monomerów aktynowych wiążących ATP, odgałęzienia boczne powstają najczęściej z rejonu filamentu maticznego położonego bliżej końca (+) (AMANN i POLLARD 2001b; patrz także COOPER i współaut. 2001) (Ryc. 1). Stwierdzono, że wiązanie i hydroliza ATP są konieczne (GOLEY i współaut. 2004), chociaż niewystarczające, dla efektywnej nukleacji przez kompleks Arp2/3 (NOLEN i współaut. 2004), w którego aktywacji biorą udział przede wszystkim czynniki sprzyjające nukleacji – NPF (ang. nucleation promoting factors) (patrz BORTHS i WELCH 2002), a także utworzone uprzednio filamenty aktynowe (AMANN i POLLARD 2001a, POLLARD i BORISY 2003, DAYEL i MULLINS 2004, DESMARAIS i współaut. 2004). Niewykluczone, że wszystkie wymienione elementy sprzyjają podobnej konformacji Arp2/3 (ROBINSON i współaut. 2001), w której, ułożone w bliskim sąsiedztwie podjednostki Arp2 i Arp3, stanowią matrycę umożliwiającą dodawanie kolejnych monomerów aktyny (POLLARD i BORISY 2003, EGILE i współaut. 2005). Zgodnie z modelem „hydrofobowej wtyczki” (ang. hydrophobic plug), wsunięcie hydrofobowej sekwencji Arp2 do szczeliny między Arp3 i pierwszym monomerem potomnego filamentu stymu-



Ryc. 1. Schemat przedstawiający tendencję preferencyjnego powstawania nowych odgałęzień z części filamentu maticznego znajdującej się bliżej końca (+).

W lewym górnym rogu schemat aktywnego kompleksu Arp2/3 (układ podjednostek wg GOURNIER i współaut. 2001), elementy jasne – Arp2, Arp3, ciemne – ARPC (wielkość odpowiada w przybliżeniu masom cząsteczkowym).

luje hydrolizę ATP przez Arp2 (BELTZNER i POLLARD 2004, DAYEL i MULLINS 2004). Pokonana zostaje kinetyczna bariera procesu nukleacji (KELLEHER i współaut. 1995, ZIGMOND 1998). Jednakże, GOLEY i współaut. (2004), na podstawie obserwacji interakcji kompleksu Arp2/3 z kortaktyną, aktyną i WASP (ang. Wiskott-Aldrich syndrome protein), zasugerowali, że różne czynniki mogą oddziaływać na drodze odrębnych mechanizmów aktywacji przez stabilizację nieco odmiennej konformacji. Rearanżacja struktury przestrzennej wymaga nie tylko wiązania NPF z Arp3, ale także udziału innych podjednostek (GOURNIER i współaut. 2001, GOLEY i współaut. 2004). Rekonstrukcja komponentów aktywnego kompleksu w systemie ekspresji bakulowirusa wykazała, że Arp3 spełnia w procesie nukleacji krytyczną rolę, związaną prawdopodobnie z tworzeniem strukturalnego zřębu dla powstającego filamentu, podczas gdy ARPC1, ARPC3 i ARPC5 są istotne dla właściwej konformacji i oddziaływania z aktywatorami (GOURNIER i współaut. 2001). Identyfikacja funkcjonalnie znaczących sekwencji Arp2/3 pozwoliła natomiast na wyodrębnienie elementów predysponowanych zarówno do interakcji z czynnikami typu NPF: Arp3, Arp2 i ARPC3, z filamentem potomnym: Arp2 i Arp3 (przez konserwatywne rejony S3), jak również do współdziałania z filamentem matczym w tworzeniu rozgałęzień: ARPC1, ARPC2, ARPC4 oraz ARPC5 (BELTZNER i POLLARD 2004). Poza tym zaproponowano kolejność zdarzeń w wielostopniowej rearanżacji kompleksu Arp2/3 niezbędnej dla aktywacji. Początkowo wiązanie ATP do Arp2 i Arp3 powoduje strukturalne zmiany, związane ze wzrostem powinowactwa do NPF. Następnie oddziaływanie z czynnikiem nukleacji za pośrednictwem regionu CA wywołuje dalsze, decydujące przekształcenia, podczas gdy ele-



Ryc. 2. Schemat zmian konformacji kompleksu Arp2/3 związanych z aktywacją (wg GOURNIER i współaut. 2001, GOLEY i współaut. 2004, RODAL i współaut. 2005, zmodyfikowana).

A. Zmiany strukturalne związane z przyłączeniem ATP do podjednostek Arp2 i Arp3. B. Przekształcenia towarzyszące oddziaływaniom kompleksu Arp2/3 z domeną VCA białek z rodziny WASp/Scar.

ment V uczestniczy w dostarczeniu monomerycznej aktyny (GOLEY i współaut. 2004) (Ryc. 2). DAYEL i MULLINS (2004) zasugerowali natomiast, że przyłączenie boczne do filamentu matcznego indukuje zmianę konformacji kompleksu Arp2/3, co z kolei umożliwia interakcję z aktyną G związaną z domeną VCA (ang. verprolin-homology-cofilin-homology-acidic) czynnika z rodziny białek WASp/Scar. W konsekwencji, jeżeli aktywacja kompleksu wymaga tego sposobu oddziaływania z filamentem matczym, wszystkie nowo powstające filamenty mają postać odgałęzień bocznych.

PODSUMOWANIE

Współdziałanie poszczególnych komponentów kompleksu Arp2/3 w formowaniu filamentarnej aktyny jest procesem złożonym, regulowanym przez znaczną liczbę czynników, a jednocześnie wymagającym doskonałej organizacji czasowo-przestrzennej, zapewniającej właściwą reakcję na bodźce. Dla wystąpienia procesu nukleacji w wyniku stymulacji impulsami zewnętrznymi konieczne są nie tylko odbiór i przetwarzanie sygnału z

części peryferycznej komórki z udziałem szeregu cząstek receptorowych i sygnałowych tworzących ustalone szlaki, ale także rekrutacja samego efektora do określonych rejonów, jego aktywacja oraz dostępność jednostek budulcowych do polimeryzacji. Od momentu zidentyfikowania kompleksu Arp2/3, lokalizacja, funkcje i mechanizm działania tego zespołu białek zostały zbadane i poznane w szerokim zakresie, w migracji komórek towa-

rzyszając różnym zjawiskom biologicznym. Jakkolwiek, wciąż możliwy jest rozwój nowych kierunków oraz praktycznych aspektów dokonanych już odkryć – jak zastosowanie w terapii niektórych chorób wirusowych i zmian patologicznych. Dalsze szczegółowe analizy procesu aktywacji pozwoliłyby także

na uzupełnienie opisu regulacji kompleksu przy udziale odmiennych czynników oraz wyjaśnienie kontrowersyjnych kwestii dotyczących hydrolizy ATP, czy też detali przekształceń konformacyjnych w poszczególnych etapach nukleacji.

THE ARP2/3 COMPLEX AS A KEY FACTOR OF ACTIN POLYMERIZATION

Summary

Directed motility of the cell is strictly dependent on regulation of the assembly/disassembly of actin filaments. New formed „daughter” filaments press against the membrane, thus generating a protrusive force, which is necessary for the initial stage of the movement. Precisely ordered geometry of „dendritic actin brush” results from the action of the Arp2/3 complex i. e. actin polymerization. The complex composition of seven evolutionarily conserved subunits among Eucaryota indicates the uniformity of its biological functions in the cell. Consequently, the Arp2/3 complex plays an important role not

only in many physiological processes, such as embryogenesis, development of tissues, inflammatory response, wound healing, but also in propagating themselves of some intracellular pathogens through of the host's plasma. Moreover, it has been shown, that the most suitable model of the Arp2/3 complex function is „the dendritic nucleation model”. The emerging issues requiring explanation seem to be interactions of individual subunits with each other, with „mother” and „daughter” filament, as well as with nucleation promoting factors, in the process of actin polymerization according to this model.

LITERATURA

- AMANN K. J., POLLARD T. D., 2001a. *The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments*. Nat. Cell Biol. 3, 306–310.
- AMANN K. J., POLLARD T. D., 2001b. *Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 15009–15013.
- BAILLY M., ICHETOVKIN I., GRANT W., ZEBDA N., MACHESKY L. M., SEGALL J. E., CONDEELIS J., 2001. *The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension*. Curr. Biol. 11, 620–625.
- BALASUBRAMANIAN M. K., FEOKTISTOVA A., MCCOLLUM D., GOULD K. L., 1996. *Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionarily conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function*. EMBO J. 15, 6426–6437.
- BELTZNER C. C., POLLARD T. D., 2004. *Identification of functionally important residues of Arp2/3 complex by analysis of homology models from diverse species*. J. Mol. Biol. 336, 551–565.
- BORTHS E. L., WELCH M. D., 2002. *Turning on the Arp2/3 complex at atomic resolution*. Struct. 10, 131–135.
- CAMERON L. A., SVITKINA T. M., VIGNJEVIC D., THERIOT J. A., BORISY G. G., 2001. *Dendritic organization of actin comet tails*. Curr. Biol. 11, 130–135.
- COOPER J. A., WEAR M. A., WEAVER A. M., 2001. *Arp2/3 complex: advances on the inner workings of a molecular machine*. Cell 107, 703–705.
- DAYEL M. J., MULLINS R. D., 2004. *Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2*. PloS Biol. 2, 0476–0485.
- DEEKS M. J., HUSSEY P. J., 2003. *Arp2/3 and 'The shape of things to come'*. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 561–567.
- 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.
- EGILE C., LOISEL T. P., LAURENT V., LI R., PANTALONI D., SANSONETTI P. J., CARLIER M.-F., 1999. *Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility*. J. Cell Biol. 146, 1319–1332.
- EGILE C., ROUILLER I., XU X.-P., VOLKMAN N., LI R., HANEIN D., 2005. *Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions*. PloS Biol. 3, 1902–1909.
- FLANAGAN L. A., CHOU J., FALET H., NEUJAHN R., HARTWIG J. H., STOSSEL T. P., 2001. *Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells*. J. Cell Biol. 155, 511–517.
- GOLEY E. D., RODENBUSCH S. E., MARTIN A. C., WELCH M. D., 2004. *Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor*. Mol. Cell 16, 269–279.
- GOURNIER H., GOLEY E. D., NIEDERSTRASSER H., TRINH T., WELCH M. D., 2001. *Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity*. Moll. Cell 8, 1041–1052.
- 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.
- JAY P., BERGÉ-LEFRANC J.-L., MASSACRIER A., ROESSLER E., WALLIS D., MUENKE M., GASTALDI M., TAVIAUX S.,

- CAU P., BERTA P., 2000. *ARP3 β , the gene encoding a new human actin-related protein, is alternatively spliced and predominantly expressed in brain neuronal cells.* Eur. J. Biochem. 267, 2921–2928.
- KELLEHER J. F., ATKINSON S. J., POLLARD T. D., 1995. *Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba.* J. Cell Biol. 131, 385–397.
- KIEHART D. P., FRANKE J. D., 2002. *Actin dynamics: the Arp2/3 complex branches out.* Curr. Biol. 12, R557–R559.
- KEYSZEJKO-STEFANOWICZ L., 2002. *Cytobiochemia – Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba.* J. Cell Biol. 131, 385–397.
- KOMANO J., MIYAUCHI K., MATSUDA Z., YAMAMOTO N., 2004. *Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses.* Mol. Biol. Cell 15, 5197–5207.
- LAUFFENBURGER D. A., HORWITZ A. F., 1996. *Cell migration: a physically integrated molecular process.* Cell 84, 359–369.
- MACHESKY L. M., ATKINSON S. J., AMPE C., VDEKERCKHOVE J., POLLARD T. D., 1994. *Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose.* J. Cell Biol. 127, 107–115.
- MACHESKY L. M., REEVES E., WIENTJES F., MATTHEYSE F. J., GROGAN A., TOTTY N. F., BURLINGAME A. L., HSUAN J. J., SEGAL A. W., 1997. *Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins.* Biochem. J. 328, 105–112.
- MAY R. C., 2001. *The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton.* Cell. Mol. Life Sci. 58, 1607–1626.
- MULLINS R. D., STAFFORD W. F., POLLARD T. D., 1997. *Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from Acanthamoeba.* J. Cell Biol. 136, 331–343.
- MULLINS R. D., HEUSER J. A., POLLARD T. D., 1998a. *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6181–6186.
- MULLINS R. D., KELLEHER J. F., XU J., POLLARD T. D., 1998b. *Arp2/3 complex from Acanthamoeba binds profilin and cross-links actin filaments.* Mol. Biol. Cell 9, 841–852.
- NOLEN B. J., LITTLEFIELD R. S., POLLARD T. D., 2004. *Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound ATP or ADP.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 15627–15632.
- PANTALONI D., BOUJEMAA R., DIDRY D., GOUNON P., CARLIER M.-F., 2000. *The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins.* Nat. Cell Biol. 2, 385–391.
- POLLARD T. D., 2001. *Genomics, the cytoskeleton and motility.* Nature 409, 842–843.
- POLLARD T. D., BELTZNER C. C., 2002. *Structure and function of the Arp2/3 complex.* Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 768–774.
- POLLARD T. D., BORISY G. G., 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.* Cell 112, 453–465.
- QUALMANN B., KELLY R. B., 2000. *Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization.* J. Cell Biol. 148, 1047–1061.
- ROBINSON R. C., TURBEDSKY K., KAISER D. A., MARCHAND J.-B., HIGGS H. N., CHOE S., POLLARD T. D., 2001. *Crystal structure of Arp2/3 complex.* Science 294, 1679–1684.
- RODAL A. A., SOKOLOVA O., ROBINS D. B., DAUGHERTY K. M., HIPPENMEYER S., RIEZMAN H., GRIGORIEFF N., GOODE B. L., 2005. *Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation.* Nat. Struct. Mol. Biol. 12, 26–31.
- SKOBLE J., AUERBUCH V., GOLEY E. D., WELCH M. D., PORTNOY D. A., 2001. *Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and Listeria monocytogenes motility.* J. Cell Biol. 155, 89–100.
- SMALL J. V., STRADAL T., VIGNAL E., ROTTNER K., 2002. *The lamellipodium: where motility begins.* Trends Cell Biol. 12, 112–120.
- STEFFEN A., ROTTNER K., EHINGER J., INNOCENTI M., SCITA G., WEHLAND J., EB STRADAL T., 2004. *Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation.* EMBO J. 23, 749–759.
- STRASSER G. A., RAHIM N. A., VANDERWAAL K. E., GERTLER F. B., LANIER L. M., 2004. *Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation.* Neuron 43, 81–94.
- SUZUKI T., MIKI H., TAKENAWA T., SASAKAWA C., 1998. *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of Shigella flexneri.* EMBO J. 17, 2767–2776.
- SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1999. *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia.* J. Cell Biol. 145, 1009–1026.
- VOLKMANN N., AMANN K. J., STOILLOVA-MCPHIE S., EGILE C., WINTER D. C., HAZELWOOD L., HEUSER J. E., LI R., POLLARD T. D., HANEIN D., 2001. *Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions.* Science 293, 2456–2459.
- VERMA S., SHEWAN A. M., SCOTT J. A., HELWANI F. M., DEN ELZEN N. R., MIKI H., TAKENAWA T., YAP A. S., 2004. *Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts.* J. Biol. Chem. 279, 34062–34070.
- WEAVER A. M., YOUNG M. E., LEE W.-L., COOPER J. A., 2003. *Integration of signals to the Arp2/3 complex.* Curr. Opin. Cell Biol. 15, 23–30.
- WEBB D. J., PARSONS J. T., HORWITZ A. F., 2002. *Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again.* Nat. Cell Biol. 4, E97–E100.
- WELCH M. D., DEPACE A. H., VERMA S., IWAMATSU A., MITCHISON T. J., 1997. *The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localised to cellular regions of dynamic actin filament assembly.* J. Cell Biol. 138, 375–384.
- WELCH M. D., 1999. *The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex.* Trends Cell Biol. 9, 423–427.
- ZALLEN J. A., COHEN Y., HUDSON A. M., COOLEY L., WIESCHAUS E., SCHEJTER E. D., 2002. *SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in Drosophila.* J. Cell Biol. 156, 689–701.
- ZIGMOND S. H., 1998. *Actin cytoskeleton: the Arp2/3 complex gets to the point.* Curr. Biol. 8, R654–R657.