

WANDA KŁOPOCKA¹, JAROSŁAW KORCZYŃSKI²

¹*Wydział Biologii i Nauk o Środowisku
Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego
Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa*

²*Centrum Doradztwa Naukowo-Badawczego Kawa.ska Sp. z o.o.
Techniczna 3, 05-500 Piaseczno
E-mail: w.klopacka@uksw.edu.pl
jaroslaw.korczynski@kawaska.pl*

MIGRACJA – REGULACJA ZJAWISKA PRZEZ WYBRANE SZLAKI SYGNAŁOWE

WPROWADZENIE

Biologia komórki definiuje zjawisko migracji jako aktywne przemieszczanie się jednokomórkowych organizmów eukariotycznych i komórek tkankowych. Pojęcie to zawężone jest dodatkowo do wędrówki komórek przyczepionych do podłoża, czyli pełzających. Migrację zaobserwowano i badano najpierw w komórkach wolnożyjących ameb, stąd ten sposób przemieszczania się nazwano migracją ameboidalną. Mechanizm i podstawy molekularne tego zjawiska w jednokomórkowych organizmach bada się do dziś. Wiele białek zaangażowanych w migrację, a także procesów związanych z tym zjawiskiem odkryto właśnie u wczesnych Eukaryota. Badania migracji komórek tkankowych w zewnątrzkomórkowej macierzy pokazały, że nie wszystkie typy komórek przemieszczają się ruchem ameboidalnym. Niektóre komórki poruszają się tzw. ruchem mezenchymalnym, którego mechanizm jest nieco inny niż odpowiadający za migrację ameboidalną (RIDLEY 2011, REIG i współaut. 2014). Jednokomórkowe Eukaryota wędrują w poszukiwaniu pokarmu i optymalnych warunków środowiska. Migracja komórek tkankowych jest podstawą morfogenezy, reakcji układu odpornościowego czy gojenia ran. Przemieszczanie się komórek prawidłowych jest więc niezwykle ważnym zjawiskiem dla rozwoju i funkcjonowania wielu organizmów.

Bywa jednak niepożądane, jeśli migrację podejmują komórki nowotworowe, ponieważ inicjuje patologiczne procesy przerzutowania (metastazy) (COOPER 2000, YILMAZ i CHRISTOFORI 2010).

Migracja komórek, tak ameboidalna, jak i mezenchymalna, jest zjawiskiem obejmującym różnorodne procesy, regulowanym przez szlaki sygnałowe związane zarówno z białkowymi przekaźnikami sygnałów, jak też jonami wapnia. Kolejne etapy zjawiska obejmują: polaryzację i wysuwanie strefy frontальной, adhezję, proteolizę macierzy zewnątrzkomórkowej (w przypadku migracji mezenchymalnej), obkurczanie strefy tylnej i zerwanie jej kontaktów z podłożem, prowadzące do przemieszczenia się komórki w kierunku lokomocji. Aby komórka mogła podjąć migrację, muszą zajść ściśle ze sobą powiązane procesy takie jak: polaryzacja, polegająca na utworzeniu funkcjonalnie i morfologicznie zróżnicowanych dwóch biegunów komórki: frontu i strefy tylnej, oraz adhezja, umożliwiająca przesunięcie się komórki względem podłoża. Migracji towarzyszą zmiany kształtu komórki i silna aktywność błony komórkowej w strefie frontальной, zwana fałdowaniem błony (ang. ruffling), gdzie zachodzi pino-cytoza i fagocytoza. Bez względu na rodzaj migracji komórkowej, fundamentalną rolę w tych procesach odgrywa dynamiczna reorganizacja filamentów aktynowych. U podstaw zmian architektury filamentów aktynowych

leżą białka oddziałujące z aktyną, np. kofilina, żelsolina czy kompleks białek Arp2/3, regulujące proces polimeryzacji aktyny w sposób niezwykle dynamiczny (DOS REMEDIOS i współaut. 2003, RIDLEY 2015). Wydaje się, że wszystkie procesy w komórce, które można określić wspólnym mianem dynamiki cytoszkieletu (polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny, kurczenie się sieci mikrofilamentów z udziałem białek motorycznych, przemieszczanie się warstwy kurczliwej jako całości), wspólnie generują siłę niezbędną dla migracji komórki, a także wszystkich procesów związanych z ruchliwością komórki.

Organizacja cytoszkieletu i jego rola w migracji ameboidalnej i mezenchymalnej są różne. W migrację komórek przemieszczających się ruchem ameboidalnym nie są zaangażowane mikrotubule, komórki migrują szybciej, siła dla przesunięcia się komórki jest generowana przez skurcz warstwy korytkalnej, a ruch krawędzi wiodącej ma charakter skokowy. Tak migrują wolnożyjące ameby (np. *Amoeba proteus*, *Acanthamoeba castellanii*) czy komórki układu odpornościowego: limfocyty, leukocyty, monocyty. Te komórki tkankowe nie degradują zewnątrzkomórkowej macierzy. Podczas wędrówki zmieniają dynamicznie kształt, co umożliwia im przeciskanie się przez oczka trójwymiarowej sieci włókien macierzy zewnątrzkomórkowej. Migracja mezenchymalna jest wolniejsza, między innymi ze względu na formowanie silnych zogniskowanych kontaktów adhezyjnych, które nie powstają podczas ruchu ameboidalnego, a błona frontalna przesuwa się ze stałą szybkością. Ten typ ruchu jest charakterystyczny dla keratynocytów, fibroblastów, komórek śródbłonna i komórek mięśni gładkich. W fibroblastach mikrotubule odgrywają istotną rolę w tworzeniu funkcjonalnej asymetrii i utrzymaniu polaryzacji komórki, a ich interakcja z filamentami aktynowymi jest niezbędna dla wysuwania frontu. Natomiast w innych komórkach, np. epidermalnych keratynocytach ryb, a także ameboidalnej formie śluzowca *Dictyostelium discoideum*, mechanizm polaryzacji i wysuwania krawędzi frontальной nie angażuje mikrotubul, a ekspansja błony komórkowej jest wynikiem polimeryzacji aktyny we współdziałaniu z niekonwencjonalnymi miozynami z rodziny I (THERIOT i MITCHISON 1991, YUMURA i FUKUI 1998; patrz SUSZEK i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU).

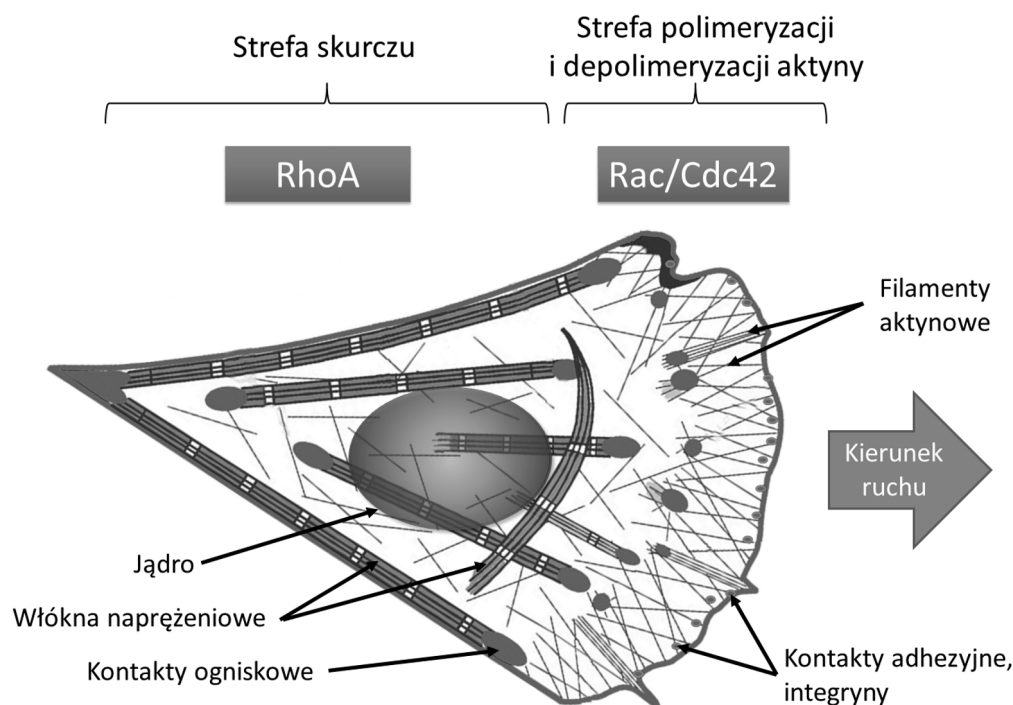
Ruch mezenchymalny, zachodzący w macierzy zewnątrzkomórkowej, jest zależny od degradacji białek formujących struktury włókniste i torowania sobie w ten sposób drogi w macierzy zewnątrzkomórkowej. Taką zdolność posiadają komórki dzięki syntezie i

wydzielaniu proteaz, głównie z rodziny metaloproteinaz (TROJANEK 2015). Aktywność proteolityczna, poza polaryzacją, dynamiką cytoszkieletu i adhezją, jest warunkiem migracji typu mezenchymalnego.

Opisane różnice dotyczą tego, co dzieje się w strefie frontальной migrującej komórki. Kurczliwość strefy tylnej związana jest z aktywnością konwencjonalnej miozyny II (podobnej w budowie i działaniu do miozyn mięśniowych, patrz Suszek i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU) i w obu rodzajach migracji przebiega podobnie. Opis mechanizmów leżących u podstaw procesów zachodzących w migrującej komórce oraz ich regulacja są tematem niniejszego artykułu.

POLARYZACJA KOMÓRKI

Polaryzacja jest reakcją nieaktywnej komórki na bodziec mechaniczny, fizyczny czy chemiczny. Komórki tkankowe odpowiadają polaryzacją najczęściej na bodźce chemiczne. Gradient stężeń stymulujących je substancji wywołuje reakcję chemotaktyczną i prowadzi komórki do miejsc przeznaczenia. Kierunkowa lokomocja jest jednym ze zjawisk, które zależą od rozwoju i stabilizacji dwóch różniących się funkcjonalnie i morfologicznie biegunów komórki. Biegun przedni jest wysuwany, drugi (strefa tylna) jest wycofywany i podąża za frontem. Polaryzacja komórek niezbędna dla podjęcia migracji dotyczy zmian w rozmieszczeniu i organizacji filamentów aktynowych oraz układu aktyna-miozyna II. Zachowanie polaryzacji w komórkach migrujących zarówno ruchem ameboidalnym, jak i mezenchymalnym jest związane z odmiennymi procesami zachodzącymi w dwóch przeciwległych obszarach komórki. Podczas gdy polimeryzacja aktyny zachodzi lokalnie na biegunie frontálním, a jej dezorganizacja jest rozproszona w pozostałych strefach komórki, to organizacja miozyny II prowadzi do formowania filamentów miozynowych (złożonych z kilku do kilkunastu cząsteczek miozyny konwencjonalnej) w całej komórce, a jej dezorganizacja zachodzi w tyle komórki (VERKHOVSKY i współaut. 1999). W komórkach pełzających ruchem ameboidalnym trójwymiarowa sieć filamentów aktynowych na krawędzi frontальной traci cyklicznie kontakt z błoną komórkową, która wypychana jest przez napływającą pod błonę endoplazmę. Ruch endoplazmy jest efektem skurczu akto-miozynowej sieci korytkalnej w całej migrującej komórce poza obszarem wiodącym albo tworzącym się nowym frontem. W komórkach przemieszczających się ruchem mezenchymalnym krawędź frontální jest przesuwana w wyniku wydłużania spolaryzowanych filamentów aktynowych, do których



Ryc. 1. Schemat struktur tworzonych przez cytoszkielet aktynowy w migrujących komórkach.

Na rycinie zaznaczono nazwy białek z rodziny Rho, odpowiedzialnych za procesy zachodzące podczas migracji w przedniej i tylnej strefie komórki.

przyłączane są nowe monomery aktyny po wewnętrznej stronie błony. Dzięki jednocześnie formowanym miejscom adhezji, filamenty pozostają stacjonarne względem podłoża. Przyczepienie lamellipodium do podłoża jest tak samo ważne dla zachowania polaryzacji komórki, jak lokalna polimeryzacja aktyny wypychająca błonę komórkową. Deadheza tyłu, czyli oderwanie tyłu od podłoża i przesunięcie ciała komórki w kierunku lokomocji, zachodzi w wyniku skurczu i dezorganizacji cytoszkieletu akto-miozynowego, podobnie jak w ruchu ameboidalnym. Taki podział procesów między dwa bieguny komórki wymaga kontroli przez odrębne szlaki sygnałowe (Ryc. 1). Strefa frontalna wymaga regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego; w strefie środkowej i tylnej komórki precyzyjnie kontrolowana jest interakcja aktyny z miozyną II, odpowiedzialna za skurcz oraz organizację i dezorganizację miejsc adhezji – kontaktów zogniskowanych.

Reorganizacja sieci filamentów aktynowych w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne zależna jest od aktywności białek wiążących aktynę. Dwa z nich, kofilina i miozyna II, odgrywają niezwykle ważną rolę w organizacji układu (albo cytoszkieletu akto-miozynowego) aktyna-miozyna zarówno w strefie frontальной, jak i poza nią (MCGOUGH 1998, DOS REMEDIOS i współaut. 2003, WINDER i AYSOUGH 2005). Oba te białka są aktywo-

wane i dezaktywowane przez wiele szlaków sygnałowych. Kofilina jest kluczowym regulatorem dynamiki cytoszkieletu aktynowego, a miozyna II odpowiada za procesy skurczu. Białka wchodzące w interakcję z aktyną są regulowane m. in. przez małe białka wiążące GTP (zwane również małymi GTPazami) z rodziny Rho (Rho, Rac, Cdc42) oraz jony Ca^{2+} . Te szlaki (ścieżki) regulacji procesów odpowiedzialnych za migrację komórek zostaną omówione w niniejszym artykule.

MECHANIZM I REGULACJA WYSUWANIA FRONTU

Niemal 40 lat temu Abercrombie zidentyfikował cienką warstwę cytoplazmy wysuwaną na froncie rozplaszczonej, migrującej komórki niemięśniowej, określając ją jako lamellipodium (ABERCROMBIE 1980). Późniejsze badania wykazały w tej strefie obecność filamentów aktynowych i bazujące na polimeryzacji aktyny wysuwanie krawędzi wiodącej komórki (HEATH i HOLIFIELD 1993, LASOTA i współaut. 2017). Doświadczenia z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanej aktyny pokazały, że lamellipodium jest pierwszym obszarem komórki, do którego inkorporowana jest znakowana aktyna (GLACY 1983). Lamellipodium stanowi strefę migrującej komórki, która odpowiada nie tylko za przesuwanie się jej krawędzi wiodącej, ale także

formowanie i rozwój miejsc adhezji (SMALL 1998), zwanych kompleksami adhezyjnymi. Mechanizm organizacji aktywności i generowania siły przesuwej błonę lamellipodium w kierunku lokomocji był i nadal jest tematem licznych badań (patrz KŁOPOCKA i współaut. 2009). Wyniki tych badań sugerują, że za ekspansję lamellipodium odpowiada proces polegający na ciągłej przebudowie filamentów aktynowych (ang. treadmilling) oraz zdeterminowana podczas polaryzacji komórki orientacja mikrofilamentów, z końcami kolczastymi skierowanymi ku wewnętrznej powierzchni błony frontальной (VERKHOVSKY i współaut. 1998). Polimeryzacja aktywności zachodzi więc pod błoną, a dezorganizacja sieci w tylnej strefie lamellipodium. Siła przesuująca błonę jest dodatkowo zwiększona dzięki rozgałęzieniu sieci mikrofilamentów (POLLARD i BORISY 2003). Aktywność krawędzi wiodącej komórki: wypychanie błony komórkowej, formowanie filopodiów czy tzw. „ruffles” (czyli fałdy błony komórkowej), bazujące na dynamicznej reorganizacji sieci filamentów aktynowych, polimeryzacja/depolimeryzacja aktywności, formowanie odgałęzień bocznych czy fragmentacja filamentów, jest regulowane przez małe białka G z rodziny Rho (HALL 1998, RIDLEY 2001).

Pierwszych dowodów na akto-miozynowy charakter układu kurczliwego ameb dostarczyły na początku lat 70. XX w. doświadczenia prowadzone w grupie Korna nad cytoszkieletem *Acanthamoeba castellanii* (POLLARD i KORN 1973). W przypadku *Amoeba proteus* dowodów takich dostarczyły badania modeli glicerynowych ameb, które kurczyły się w obecności adenozynotrifosforanu (ATP) i jonów nieorganicznych (SIMARD-DUQUESNE i COUILLARD 1962, RINALDI i współaut. 1975, OPAS i RINALDI 1976). Kortykalny cytoszkielecik komórek przemieszczających się ruchem ameboidalnym tworzy ciągłą warstwę podścielającą wewnętrzną powierzchnię błony (KŁOPOCKA 2001). Formuje go trójwymiarowa sieć filamentów aktynowych z krótkimi filamentami miozyny II rozmieszczonymi w strefie środkowej i tylnej komórki. W miejscach formowania nowych frontów, a także cyklicznie na krawędzi wiodącej, sieć filamentów aktynowych oddysocjowuje od błony i jest wycofywana do wnętrza komórki. Powstaje lokalny spadek ciśnienia hydrostatycznego, które jest wytwarzane w wyniku aktywności kurczliwej warstwy kortykalnej poza krawędzią wiodącą. Endoplazma płynąca w kierunku słabego punktu w obrębie korteksu - zgodnie z prawami hydrodynamiki - wypycha błonę komórkową. Stąd skokowa progresja krawędzi wiodącej (GREBECKI 1990). Rozdzielenie kompleksu błona-cytoszkielecik zachodzi prawdopodobnie dzięki zwiększone-

mu stężeniu jonów Ca^{2+} bezpośrednio pod błoną frontální. Wykazano, że podczas ruchu wielkich ameb poziom wapnia w ich strefach czołowych wzrasta rytmicznie co 1-4 sekund (TAYLOR i współaut. 1980). W tym tempie odklejane są również od błony kolejne warstwy sieci aktynowej (GREBECKI 1990). Jony Ca^{2+} regulują oddziaływania pomiędzy filamentami aktywności i błoną plazmatyczną (KAWAKATSU i współaut. 2000). Podobny mechanizm odpowiada za migrację komórek przemieszczających się ruchem ameboidalnym, np. leukocytów (KELLER i EGGLI 1998). Migracja ludzkich monocytów pierwotnych jest również regulowana przez zmiany poziomu cytoplazmatycznych jonów Ca^{2+} oraz białka z rodziny Rho (POMORSKI i współaut. 2004).

ROLA BIAŁEK Rho

Małe białka G działają jako molekularne aktywatory, regulujące nie tylko migrację komórek mięśniowych, ale także skurcz mięśni gładkich, endocytozę cytokinezę, wzrost i wycofanie się neurytu (RIDLEY i HALL 1992, RIDLEY 2001, KŁOPOCKA i BARAŃSKA, 2005). Ich działanie obserwowano w wielu typach komórek: fibroblastach, makrofagach, komórkach epitelialnych, astrocytach, komórkach nowotworowych, limfocytach czy płytkach krwi oraz neuronach (RIDLEY i współaut. 1995, ALLEN i współaut. 1997, RIDLEY 2015). Wydłużanie aksonu jest specjalną formą kierunkowej migracji, podczas której ciało komórki nie przemieszcza się. Cdc42 i Rac1 pozytywnie regulują wzrost neurytu, natomiast RhoA hamuje jego wydłużanie się (WONG i współaut. 2000).

Aktywne białka Rho przekazują sygnał wchodząc w interakcję ze swoimi efektorami. Są nimi kinazy białkowe, enzymy modyfikujące lipidy, aktywatory kompleksu białek Arp2/3, a także białka ERM i mDia (ETIENNE-MANNEVILLE i HALL 2002). Każde z małych białek Rho może być aktywowane przez receptory czynnika wzrostu (HALL 1998), integryny (PRICE i współaut. 1998) oraz receptory związane z heterotrimerycznymi białkami G (GPCRs) (ang. G protein-coupled receptors), przede wszystkim G_{12} , G_o , G_q . Receptory te aktywują odpowiednie dla danego białka czynniki GEFs (ang. guanine nucleotide exchange factors), których funkcja polega na wymianie GDP na GTP w cząsteczkach białek Rho, a w konsekwencji aktywację tych białek (HALL 1998, MAHONEY i SUNAHARA 2016). Aktywacja czynników GEFs dla białka Rac jest zależna od aktywności PI3-kinazy (KAIBUCHI i współaut. 1999, ROYAL i współaut. 2000).

Wykazano, że Rac1 kontroluje formowanie lamellipodium, Cdc42 filopodiów, a RhoA włókien naprężeniowych (NOBES i HALL 1995). Aktywacja białek Rac i Cdc42, np. w komórkach neuroblastomy, promuje formowanie odpowiednio lamellipodiów i filopodiów wzdłuż rosnącego neurytu (LUO 2000). Cdc42, zlokalizowane pod błoną komórkową na krawędzi frontальной, odpowiada także za polaryzację komórki i stabilizuje ruch kierunkowy – chemotaksję (ITOH i współaut. 2002). Badania z zastosowaniem jednej z technik fluorescencyjnych, rezonansowego przeniesienia energii (ang. Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), ujawniły gromadzenie się Rac1-GTP, czyli aktywnego białka Rac1, tuż pod błoną krawędzi wiodącej, w wyniku stymulacji receptorów czynnika wzrostu (KRAYNOV i współaut. 2000, ITOH i współaut. 2002). Szlak sygnałowy uruchamiany przez ten receptor prowadzi do aktywacji białek GEFs. W przypadku Rac1 są to m.in.: białko Vav (KRANEWITTER i współaut. 2001) i Sos (SCITA i współaut. 2000), aktywowane przez fosfatydyloinozytolo-trifosforan. Ten produkt aktywacji PI3-kinazy podczas chemotaktycznej migracji komórek, np. leukocytów, gromadzi się pod błoną krawędzi frontальной (RICKERT i współaut. 2000). Rac i Cdc42 regulują również adhezję strefy frontальной poprzez kontrolę formowania słabych wiązań lamellipodium z podłożem – kompleksów adhezyjnych (RIDLEY i współaut. 2003). Białka te włączone są także w aktywację kompleksu białek Arp2/3, katalizującego nukleację nowych filamentów aktynowych i formowanie odgałęzień istniejących już mikrofilamentów. Aktywacja kompleksu wymaga związania się z białkami z rodziny WASP czy WAVE (POLLARD i współaut. 2000, CONDEELIS 2001). Pierwsze z nich są efektorami Cdc42 (ASPENSTROM 1997, WELCH i MULLINS 2002), natomiast WAVE jest regulowane przez Rac (RIDLEY 2001, CORY i RIDLEY 2002). Aktywacja kompleksu Arp2/3 umożliwia jego interakcję z białkami promującymi nukleację aktyny (CHESARONE i GOODE 2009, CAMPPELLONE i WELCH 2010). Efektorom Rac, włączonym także w regulację polimeryzacji aktyny, jest kinaza PIP5 (kinaza 5 fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu). Enzym ten przekształca fosfatydyloinozytolo-fosforan (PIP) do fosfatydyloinozytolo-bisfosforanu (PIP₂) (HARTWIG i współaut. 1995, TOLIAS i współaut. 2000), który współdziała z Cdc42 podczas aktywacji WASP (BLANCHOIN i współaut. 2000). PIP₂ odgrywa niezwykle ważną rolę w kontroli dynamiki cytoszkieletu aktynowego modulując wiele białek wiążących aktynę (COOPER i SCHAFER 2000). Hamuje aktywność profiliny, kofiliny i białek zakrywających kolczaste końce mikro-

filamentów, takich jak białko CapZ i żelso-lina, natomiast aktywuje białka sieciujące filanty aktynowe, np. α -aktyninę (FUKAMI i współaut. 1992). Poziom fosfatydyloinozytolo-bisfosforanu w komórce regulują zarówno receptory mające aktywność kinazy tyrozynowej: receptor epitelialnego czynnika wzrostu (EGFR), receptor płytko pochodnego czynnika wzrostu (PDGFR), jak i receptory związane z białkami G, m.in. receptor P2Y₂.

Inny szlak sygnałowy, stymulujący formowanie lamellipodium, związany jest z aktywacją kinazy PAK (ang. p21-activated kinase), będącej bezpośrednim efektorom białek Rac1 i Cdc42. Ta serynowo-treoninowa kinaza aktywuje m.in. kinazy LIM, które fosforylują kofilinę, blokując w ten sposób jej aktywność, a tym samym hamując polimeryzację aktyny i wysuwanie lamellipodium (YANG i współaut. 1998, DANIELS i BOKOCH 1999, EDWARDS i współaut. 1999, MAEKAWA i współaut. 1999, DAN i współaut. 2001). Kofilina jest kluczowym regulatorem dynamiki cytoszkieletu aktynowego zarówno w lamellipodium, jak też poza nim, gdzie jej aktywność kontrolowana jest przez kinazę ROCK zależną od białka Rho (ang. Rho-dependent kinase). Jej efektorami są m.in. kinazy LIM i TES, które fosforylują kofilinę (ARBER i współaut. 1998, MAEKAWA i współaut. 1999, BERNARD 2007, PAK i współaut. 2008). Zdolność kofiliny do wiązania aktyny jest hamowana przez fosforylację (BAMBURG i współaut. 1999, DESMARAIS i współaut. 2005). Kofilinę defosforylują: fosfataza SSH (ang. sling-shot) oraz fosfataza CIN (ang. chronophin) (NIWA i współaut. 2002, HUANG i współaut. 2006). Aktywna, zdefosforylowana forma tego białka może poprzez fragmentację mikrofilamentów zwiększać liczbę kolczastych końców filamentów (ICHETOVKIN i współaut. 2002, VAN RHEENEN i współaut. 2009) albo aktywuje nukleację aktyny (ANDRIANANTO-ANDRO i POLLARD 2006). Z kolei aktywność depolimeryzująca kofiliny zwiększa pulę monomerów aktynowych dostępnych dla polimeryzacji (VAN RHEENEN i współaut. 2009). Kofilina determinuje więc szybkość polimeryzacji, wpływając tym samym na stosunek liczby filamentów (F-aktyny) do monomerów (G-aktyny), od którego zależy morfologia i migracja komórki (HOTULAINEN i współaut. 2005). Działanie kofiliny może być lokalnie ograniczane przez jej wiązanie z PIP₂ (YANG i współaut. 1998, EDWARDS i współaut. 1999, MAEKAWA i współaut. 1999, DAN i współaut. 2001, VAN RHEENEN i współaut. 2007, PAK i współaut. 2008). Sygnał dla uwolnienia kofiliny związany jest z aktywacją fosfolipazy C (PLC) i hydrolizą PIP₂.

W ekspansję lamellipodium zaangażowane są także miozyny I, które są zdolne do

bezpośredniego oddziaływania z lipidami błony komórkowej (MERMALL i współaut. 1998). Wykazano również, że w rejonie lamellipodium wzrasta poziom ufosforylowanych lekkich łańcuchów regulatorowych miozyny II (MATSUMURA i współaut. 1998). Regulacja aktywności miozyny w lamellipodium zależy od szlaku sygnałowego Rac1/PAK1. Aktywacja tego bezpośredniego efektora Rac1 może prowadzić zarówno do fosforylacji ciężkich łańcuchów miozyny (MHC) (VAN LEEUWEN i współaut. 1999), jak też lekkich łańcuchów regulatorowych (RLC) (BRZESKA i współaut. 2004). Regulacja wysuwania frontu w komórkach migrujących tzw. ruchem ameboidalnym jest słabo poznana. Badania prowadzone na *A. proteus* pokazały, że białka z rodziny Rho: RhoA i Rac1 odgrywają kluczową rolę w regulacji migracji tej ameby (KŁOPOCKA i REDOWICZ 2003). Badania *in vitro* udowodniły natomiast, iż amebowe białko Rac reguluje tempo polimeryzacji aktyny na etapie nukleacji (KŁOPOCKA i współaut. 2005). Niezależnie więc od rodzaju mechanizmu, który umożliwia przesunięcie błony frontalnej, u podstawy każdego z nich leży polimeryzacja aktyny.

ROLA RECEPTORA P2Y₂ (P2Y₂R) ORAZ INTEGRYN

Szlaki sygnałowe uruchamiane przez stymulację receptora P2Y₂R regulują aktywność małych białek G, fosfolipaz i kinaz, które kontrolują procesy zależne od dynamiki cytoszkieletu aktynowego: endocytozę, egzocytozę, cytokinezę, transport wewnątrzkomórkowy, adhezję i migrację komórki.

Receptor P2Y₂ jest metabotropowym receptorem aktywowanym przez nukleotydy ATP i UTP. Wiąże się on z heterotrimerycznym białkami G: G_q, G_o i G₁₂. Interakcja receptora z białkiem G_q aktywuje PLC (fosfolipazę C), która hydrolizuje PIP₂ do inzytolo 1,4,5-trifosforanu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG) (BOARDER i HOURANI 1998). IP₃ mobilizuje Ca²⁺ z siateczki endoplazmatycznej (PUTNEY 1990).

W polaryzujących i rozplaszczających się komórkach stymulowane są jednocześnie receptory integrynowe i receptory indukujące reorganizację cytoszkieletu aktynowego. Niektóre z nich wchodzi w interakcje z niektórymi typami integryn, czego konsekwencją może być uruchomienie konkretnego szlaku sygnałowego. Przykładem takiej zależności między rodzajem kompleksu receptor-integryna a indukowanym szlakiem sygnałowym jest interakcja receptora P2Y₂ z określoną integryną. Integryny są grupą heterodimerycznych cząsteczek regulujących adhezję komórka-komórka oraz komórka-macierz ze-

wnątrzkomórkowa. Ich nazwa wywodzi się od funkcji jakie pełnią, czyli integracji cytoszkieletu z środowiskiem zewnętrznym (HYNES 1987). Miejsca adhezji na powierzchni lamellipodium formowane w odpowiedzi na kontakt z ligandem takim jak: witronektyna, fibronektyna czy kolagen, gromadzą odpowiednie receptory integrynowe wokół zakończeń filamentów aktynowych. Zlokalizowane w tych miejscach białka: talina, winkulina i α -aktynina, łączą mikrofilamenty z kompleksami receptor-ligand (BALLESTREAM i współaut. 2001). Funkcjonalna różnorodność integryn wynika z różnych rodzajów budujących je podjednostek α/β . Przykładowo, integryny α_v są grupą receptorów regulujących adhezję i migrację komórek ośrodkowego układu nerwowego (CLEGG i współaut. 2003). Badania roli różnych grup integryn w zachowaniu komórek, podobnie jak funkcji wielu innych białek, polegają na analizie zmian wywoływanych blokadą badanych cząsteczek.

W jednej z zewnętrznych pętli receptora nukleotydowego P2Y₂ jest domena wiążąca integryny $\alpha_v\beta_5$ albo $\alpha_v\beta_3$ (ERB i współaut. 2001). Konsekwencją tej interakcji jest wiązanie P2Y₂ z konkretnym typem białka G: G_o albo G₁₂. Związanie z białkiem G_o wymaga interakcji receptora z $\alpha_v\beta_5$ albo $\alpha_v\beta_3$ (ERB i współaut. 2001, BAGCHI i współaut. 2005). Oddziaływanie z $\alpha_v\beta_5$ jest niezbędne dla związania receptora P2Y₂ z białkiem G₁₂ (LIAO i współaut. 2007). Ścieżki sygnałowe indukowane przez każde z tych białek zaangażowane są w procesy związane z ruchliwością komórek (SAUZEAU i współaut. 2000; ERB i współaut. 2001, 2006; BAGCHI i współaut. 2005; LIAO i współaut. 2007; SINGH i współaut. 2007). Aktywacja białka Rac1 za pośrednictwem G_o promuje polaryzację komórki i formowanie kompleksów adhezyjnych w obrębie strefy wiodącej. G₁₂ pośredniczy w aktywacji białka RhoA, kontrolującego procesy zachodzące poza lamellipodium: formowanie włókien naprężeniowych i kurczliwość poprzez regulację aktywności kofiliny i miozyny II (AMANO i współaut. 1997, BRZESKA i współaut. 2004).

Wykazano, że synteza integryn α_v jest niezbędna dla indukcji migracji przez P2Y₂R w wielu typach komórek (BAGCHI i współaut. 2005, WANG i współaut. 2005).

Wyniki badań prowadzonych na komórkach glejaka C6, w których hamowano aktywność kinazy ROCK, jednego z efektorów P2Y₂R pokazały, że możliwa jest kompensacja takiej blokady przez szlaki sygnałowe uruchamiane z udziałem integryn $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_v\beta_3$ przez ten sam receptor (TARGOS i współaut. 2006, KORCZYŃSKI i współaut. 2011). Interesujący jest fakt, że kompensacja ta jest

zależna od obecności jonów Ca^{2+} w środowisku, ponieważ tworzenie kompleksów P2Y₂R-integryna nie zachodzi w środowisku pozbawionym tych jonów. W komórkach glijaka C6 jedynie stymulacja szlaku sygnałowego *via* G_q zachodzi bez udziału integryn. W aktywacji szlaków przez G_o i G₁₂ konieczny jest udział integryn (Nowak i współaut. dane nieopublikowane). ZHANG i CHEN (2012) pokazali, że brak Ca^{2+} na zewnątrz komórki blokuje szlaki sygnałowe związane z G_o i G₁₂, ponieważ zaburzone jest w tych warunkach dojrzewanie integryn. Odpowiedzi komórek na stymulację receptora P2Y₂ zależą zarówno od typu komórki, jak też krzyżowania się szlaków sygnałowych i wzajemnego oddziaływania receptorów (ERB i współaut. 2006). Przykładowo, P2Y₂R moduluje aktywność receptora o aktywności kinazy tyrozynowej (LIU i współaut. 2004).

REGULACJA PROCESÓW W STREFIE SKURCZU

Podczas gdy w strefie frontalnej komórki generowana jest siła umożliwiająca wysuwanie lamellipodium i formowanie nowych miejsc przyczepu do podłoża, to poza tym rejonem kurczliwość cytoszkieletu akto-miozynowego generuje siłę odpowiedzialną za przesunięcie ciała komórki w kierunku ruchu (RIDLEY 2001, WORTHYLAKE i współaut. 2001). Migracja komórki jest efektem koordynacji obu tych sił.

Kurczliwość cytoszkieletu akto-miozynowego jest determinowana przez aktywność miozyny II. Białko to regulowane jest przez fosforylację i defosforylację lekkich łańcuchów regulatorowych (RLC), które to procesy są regulowane przez białko RhoA oraz jony Ca^{2+} . Inaktywacja białka Rho zmienia morfologię komórek, hamuje ich ruchliwość i inwazyjność, natomiast wzrost w cytoplazmie stężenia jonów Ca^{2+} jest sygnałem dla reorganizacji cytoszkieletu akto-miozynowego.

Działanie białka RhoA jest ograniczone do tylnej i środkowej strefy komórki (WORTHYLAKE i współaut. 2001). Bezpośrednim efektem RhoA, regulującym organizację systemu aktyna-miozyna II, jest serynowo-treoninowa kinaza ROCK oddziałująca z licznymi substratami (SCHMITZ i współaut. 2000, TSUJI i współaut. 2002). ROCK fosforyluje i hamuje działanie fosfatazy lekkich łańcuchów (MLCP) (KIMURA i współaut. 1996, HARTSHORNE i współaut. 1998, KAWANO i współaut. 1999, RAMACHANDRAN i współaut. 2011). Fosforyluje także bezpośrednio RLC, zwiększając aktywność ATPazową miozyny II (MOUSSAVI i współaut. 1993, AMANO i współaut. 1996, RIENTO i RIDLEY 2003, MATSUMURA 2005).

Od kurczliwości cytoszkieletu akto-miozynowego zależne jest formowanie włókien naprężeniowych (FUKATA i współaut. 2001) oraz silnych miejsc adhezji, tworzonych przez duże grupy integryn powiązanych z włóknami naprężeniowymi, czyli kontaktów ogniskowych (RIDLEY i współaut. 2003). Kontrolowana przez szlak sygnałowy RhoA/ROCK aktywacja miozyny II w migrujących komórkach mięśniowych jest odpowiedzialna zarówno za adhezję ciała komórki i formowanie włókien naprężeniowych, jak i za wycofywanie strefy tylnej (WORTHYLAKE i współaut. 2001). Innym efektem białka RhoA jest formina mDia1, indukująca polimeryzację aktyny poza obszarem lamellipodium i współdziałająca z ROCK w formowaniu włókien naprężeniowych (WATANABE i współaut. 1999).

Poza kinazą ROCK, miozynę aktywuje kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK). Podczas gdy ROCK działa niezależnie od obecności jonów Ca^{2+} (KIMURA i współaut. 1996), MLCK fosforyluje reszty Ser19 i/lub Thr18 po związaniu cząsteczki kalmoduliny i jonów Ca^{2+} (KATOH i współaut. 2001, SOMLYO i SOMLYO 2003). A zatem, MLCK jest aktywowana przez kompleks kalmodulina- Ca^{2+} co oznacza, że działanie tej kinazy zależy od sygnału wapniowego. MLCK aktywuje stymulacja receptorów związanych z białkami G (ang. G protein-coupled receptors, GPCRs), która indukuje reakcję wapniową w komórkach niepobudliwych. Obie kinazy fosforylujące RLC działają w różnych obszarach migrującej komórki. Szlak sygnałowy Rho/ROCK aktywuje miozynę II w strefie centralnej (CHRZANOWSKA-WODNICKA i BURRIDGE 1996, KIMURA i współaut. 1996, KAWANO i współaut. 1999, TOTSUKAWA i współaut. 2000). Regulacja *via* Ca^{2+} /kalmodulina/MLCK jest odpowiedzialna za fosforylację RLC w strefie peryferycznej komórki (TOTSUKAWA i współaut. 2000, KATOH i współaut. 2001, SOMLYO i SOMLYO 2003). Poza ROCK, niezależnie od jonów wapnia, aktywność miozyny II reguluje fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (MLCP), która, defosforylując RLC, powoduje relaksację cytoszkieletu akto-miozynowego (SOMLYO i SOMLYO 2000).

Regulacja aktywności ATPazowej miozyny II jest odpowiedzialna za formowanie włókien naprężeniowych w strefie brzusznej ciała komórki, tworzenie ognisk kontaktowych, skurcz ciała komórki, zerwanie przyczepów do podłoża, co powoduje przesunięcie obszaru poza lamellipodium w kierunku migracji, za wysuwaną krawędzią wiodącą. Skurcz i relaksacja, związane z procesami fosforylacji i defosforylacji RLC, oraz wysuwanie lamellipodium, to trzy podstawowe zjawiska migracji mezenchymalnej. Dwa pierwsze są charakterystyczne także dla migracji ameboidal-

nej, natomiast u podstaw wysuwania frontu leży inny mechanizm. W tylnej i środkowej strefie komórek przemieszczających się ruchem ameboidalnym skurcz połączony z zolifikacją cytoplazmy prowadzi do dezorganizacji aparatu kurczliwego, deadhezji i przesunięcia ciała komórki w kierunku migracji. Białka cytoszkieletu, w tym oligomery i monomery aktynowe, wraz ze strumieniem endoplazmy przenoszone są do strefy frontальной, pod błonę wysuwanej krawędzi wiodącej, gdzie zachodzi rekonstrukcja aparatu kurczliwego dzięki procesom polimeryzacji aktyny i sieciowania filamentów aktynowych.

Streszczenie

Ruch i migracja są jedną z głównych funkcji życiowych komórek. W odpowiedzi na różne bodźce, dynamiczny cytoszkielet aktynowy generuje siłę umożliwiającą komórce przemieszczanie się w trójwymiarowej sieci zewnątrzkomórkowej macierzy czy po płaskim podłożu. Wydłużanie filamentów aktynowych na ich kolczastych końcach wypycha błonę komórkową w kierunku migracji, formując strefę frontálną zwaną lamellipodium. Skurcz włókien naprężeniowych umożliwia oderwanie tylnej części komórki i przesunięcie jej do przodu. W odpowiedzi na bodźce ze środowiska, receptory komórki inicjują wiele szlaków sygnałowych powodujących reorganizację mikrofilamentów aktynowych oraz skurcz układu akto-miozynowego. Głównymi regulatorami tych procesów są białka z rodziny Rho, fosfolipidy PIP₂ oraz jony wapnia. Receptory nukleotydowe P2Y₂ w połączeniu z białkami G regulują poziom fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu (PIP₂), który moduluje funkcje białek wiążących aktynę i aktywuje białka Rac1 oraz RhoA. Szlak sygnałowy RhoA/ROCK odgrywa ważną rolę w generowaniu skurczu włókien naprężeniowych. Z kolei białko Rac1 poprzez swój efektor kinazę PAK1 reguluje procesy formujące lamellipodium oraz wysuwanie strefy wiodącej podczas migracji.

LITERATURA

- ABERCROMBIE M., 1980. *The crawling movement of metazoan cells*. Proc. R. Soc. London B Biol. Sci. 207, 129-147.
- ALLEN W. E., JONES G. E., POLLARD J. W., RIDLEY A. J., 1997. *Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages*. J. Cell Sci. 110, 707-720.
- AMANO M., CHIHARA K., KIMURA K., FUKATA Y., NAKAMURA N., MATSUURA Y., 1997. *Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase*. Science 275, 1308-1311.
- AMANO M., ITO M., KIMURA K., FUKATA Y., CHIHARA K., NAKANO T., MATSUURA Y., KAIBUCHI K., 1996. *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J. Biol. Chem. 271, 20246-20249.
- ANDRIANANTOANDRO E., POLLARD T. D., 2006. *Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin*. Mol. Cell 24, 13-23.
- ARBER S., BARBAYANNIS F. A., HANSER H., SCHNEIDER C., STANYON C. A., BERNARD O., CARONI P., 1998. *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase*. Nature 393, 805-809.
- ASPENSTROM P., 1997. *A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton*. Curr. Biol. 7, 479-487.
- BAGCHI S., LIAO Z., GONZALES F. A., CHORNA N. E., SEYE C. I., WEISMAN G. A., ERB L., 2005. *The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alpha integrins to activate Go and induce cell migration*. J. Biol. Chem. 280, 39050-39057.
- BALLESTREAM C., HINZ B., IMHOF B. A., WEHRLE-HALLER B., 2001. *Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior*. J. Cell Biol. 155, 1319-1332.
- BAMBURG J. R., MCGOUGH A., ONO S., 1999. *Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics*. Trends Cell Biol. 9, 364-370.
- BERNARD O., 2007. *Lim kinases, regulators of actin dynamics*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 1071-1076.
- BLANCHON L., POLLARD T. D., MULLINS R. D., 2000. *Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks*. Curr. Biol. 10, 1273-1282.
- BOARDER M. R., HOURANI S. M., 1998. *The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors*. Trends Pharmacol. Sci. 19, 99-107.
- BRZESKA H., SZCZEPANOWSKA J., MATSUMURA F., KORN E. D., 2004. *Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells*. Cell Motil. Cytoskel. 58, 186-199.
- CAMPELLONE K. G., WELCH M. D., 2010. *A nucleator arms race: cellular control of actin assembly*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 237-251.
- CHESARONE M. A., GOODE B. L., 2009. *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*. Curr. Opin. Cell Biol. 21, 28-37.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA M., BURRIDGE K., 1996. *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J. Cell Biol. 133, 1403-1415.
- CLEGG D. O., WINGERD K. L., HIKITA S. T., TOLHURST E. C., 2003. *Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system*. Front. Biosci. 8, 723-750.
- CONDEELIS J., 2001. *How is actin polymerization nucleated in vivo?* Trends Cell Biol. 11, 288-293.
- COOPER G., 2000. *Actin, Myosin, and Cell Movement*. Cell A Mol. Approach, Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- COOPER J. A., SCHAFFER D. A., 2000. *Control of actin assembly and disassembly at filament ends*. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 97-103.
- CORY G. O., RIDLEY A. J., 2002. *Cell motility: braking WAVES*. Nature 418, 732-733.
- DAN C., KELLY A., BERNARD O., MINDEN A., 2001. *Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin*. J. Biol. Chem. 276, 32115-32121.
- DANIELS R. H., BOKOCH G. M., 1999. *p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling?* Trends Biochem. Sci. 24, 350-355.
- 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 Pro-*

- teins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433-473.
- EDWARDS D. C., SANDERS L. C., BOKOCH G. M., GILL G. N., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253-259.
- ERB L., LIU J., OCKERHAUSEN J., KONG Q., GARRAD R. C., GRIFFIN K., NEAL C., KRUGH B., SANTIAGO-PÉREZ L. I., GONZÁLEZ F. A., GRESHAM H. D., TURNER J. T., WEISMAN G. A., 2001. An RGD sequence in the P2Y2 receptor interacts with $\alpha\beta 3$ integrins and is required for Go-mediated signal transduction. *J. Cell Biol.* 153, 491-501.
- ERB L., LIAO Z., SEYE C. I., WEISMAN G.A., 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Eur. J. Physiol.* 452, 552-562.
- ETIENNE-MANNEVILLE S., HALL A., 2002. Rho GTPases in cell Biology. *Nature* 420, 629-635.
- FUKAMI K., FURUHASHI K., INAGAKI M., ENDO T., HATANO S., TAKENAWA T., 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* 359, 150-152.
- FUKATA Y., AMANO M., KAIBUCHI K., 2001. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 32-39.
- GLACY S. D., 1983. Subcellular distribution of rhodamine-actin microinjected into living fibroblastic cells. *J. Cell Biol.* 97, 1207-1213.
- GREBECKI A., 1990. Dynamic of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement. *Protoplasma* 154, 98-111.
- HALL A., 1998. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280, 2074-2075.
- HARTSHORNE D. J., ITO M., ERDÖDI F., 1998. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 325-341.
- HARTWIG J. H., BOKOCH G. M., CARPENTER C. L., JANMEY P. A., TAYLOR L. A., TOKER A., 1995. Thrombin receptor ligation and activated rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82, 643-653.
- HEATH J. P., HOLIFIELD B. F., 1993. On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organization in fibroblasts. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 47, 35-56.
- 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.
- HUANG T. Y., DERMARDIROSIAN C., BOKOCH G. M., 2006. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 26-31.
- HYNES R. O., 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554.
- ICHETOVKIN I., GRANT W., CONDEELIS J., 2002. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12, 79-84.
- ITOH R. E., KUROKAWA K., OHBA Y., YOSHIZAKI H., MOCHIZUKI N., MATSUDA M., 2002. Activation of Rac and Cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 6582-6591.
- KAIBUCHI K., KURODA S., AMANO M., 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 459-486.
- KATOH K., KANO Y., AMANO M., ONISHI H., KAIBUCHI K., FUJIWARA K., 2001. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J. Cell Biol.* 153, 569-584.
- KAWAKATSU T., KIKUCHI A., SHIMMEN T., SONOBE S., 2000. Interaction of actin filaments with the plasma membrane in Amoeba proteus: studies using a cell model and isolated plasma membrane. *Cell Struct. Funct.* 25, 269-277.
- KAWANO Y., FUKATA Y., OSHIRO N., AMANO M., NAKAMURA T., ITO M., 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 147, 1023-1037.
- KELLER H., EGGLI P., 1998. Actin accumulation in pseudopods or in the tail of polarized walker carcinosarcoma cells quantitatively correlates with local folding of the cell surface membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton* 40, 342-353.
- KIMURA K., ITO M., AMANO M., CHIHARA K., FUKATA Y., NAKAFUKU M., YAMAMORI B., FENG J., NAKANO T., OKAWA K., IWAMATSU A., KAIBUCHI K., 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- KŁOPOCKA W., 2001. Struktura i funkcje cytoszkieletu kortykalnego Amoeba proteus. *Kosmos* 50, 233-241.
- KŁOPOCKA W., BARAŃSKA J., 2005. Rola białek z rodziny Rho w kontroli migracji komórek pelzających. *Post. Biochem.* 51, 36-43.
- KŁOPOCKA W., REDOWICZ M. J., 2003. Effect of Rho family GTP-binding proteins on Amoeba proteus. *Protoplasma* 220, 163-172.
- KŁOPOCKA W., MÓRACZEWSKA J., REDOWICZ M. J., 2005. Characterisation of the Rac/PAK pathway in Amoeba proteus. *Protoplasma* 225, 77-84.
- KŁOPOCKA W., REDOWICZ M. J., WASIK A., 2009. Regulacja dynamiki cytoszkieletu kortykalnego podczas migracji swobodnie żyjących ameb. *Post. Biochem.* 55, 129-137.
- KORCZYŃSKI J., SOBIEJAJSKA K., KRZEMIŃSKI P., WASIK A., WYPYCH D., POMORSKI P., KŁOPOCKA W., 2011. Is MLC phosphorylation essential for the recovery from ROCK inhibition in glioma C6 cells? *Acta Biochim. Pol.* 58, 125-130.
- KRANEWITTER W. J., DANNINGER C., GIMONA M., 2001. GEF at work: Vav in protruding filopodia. *Cell Motil. Cytoskeleton* 49, 154-160.
- KRAYNOV V. S., CHAMBERLAIN C., BOKOCH G. M., SCHWARTZ M. A., SLABAUGH S., HAHN K. M., 2000. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333-337.
- LASOTA S., BASTER Z., WITKO T., ZIMOLAG E., SROKA J., RAJFUR Z., MADEJA Z., 2017. Zastosowanie biosensorów typu ERET w badaniach mikroskopowych procesu migracji komórki. *Post. Biochem.* 63, 16-33.
- LIAO Z., SEYE C. I., WEISMAN G. A., ERB L., 2007. The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *J. Cell Sci.* 120, 1654-1662.
- LIU Y., SUZUKI Y. J., DAY R. M., FANBURG B. L., 2004. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ. Res.* 95, 579-586.
- LUO L., 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 173-180.

- MAEKAWA M., ISHIZAKI T., BOKU S., WATANABE N., FUJITA A., IWAMATSU A., OBINATA T., OHASHI K., MIZUNO K., NARUMIYA S., 1999. *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase*. Science 285, 895-898.
- MAHONEY J. P., SUNAHARA R. K., 2016. *Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions*. Curr. Opin. Struct. Biol. 41, 247-254.
- MATSUMURA F., 2005. *Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes*. Trends Cell Biol. 15, 371-377.
- MATSUMURA F., ONO S., YAMAKITA Y., TOTSUKAWA G., YAMASHIRO S., 1998. *Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells*. J. Cell Biol. 140, 119-129.
- MCGOUGH A., 1998. *F-actin-binding proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 166-176.
- MERMALL V., POST P. L., MOOSEKER M. S., 1998. *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*. Science 279, 527-533.
- MOUSSAVI R. S., KELLEY C. A., ADELSTEIN R. S., 1993. *Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains*. Mol. Cell. Biochem. 128, 219-227.
- 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.
- NOBES C. D., HALL A., 1995. *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell 81, 53-62.
- OPAS M., RINALDI R., 1976. *Ca⁺⁺ controlled contraction-relaxation cycle in glycerinated amoeboid cells*. Protoplasma 90, 393-397.
- PAK C. W., FLYNN K. C., BAMBURG J. R., 2008. *Actin-binding proteins take the reins in growth cones*. Nat. Rev. Neurosci. 9, 136-147.
- POLLARD T. D., BORISY G. G., 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell 112, 453-465.
- POLLARD T. D., KORN E. D., 1973. *Acanthamoeba myosin I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin*. J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.
- POLLARD T. D., BLANCHON L., MULINS R. D., 2000. *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 545-576.
- POMORSKI P., WATSON J. M., HASKILL S., JACOBSON K. A., 2004. *How adhesion, migration, and cytoplasmic calcium transients influence interleukin-1beta mRNA stabilization in human monocytes*. Cell Motil. Cytoskeleton 57, 143-157.
- PRICE L. S., LENG J., SCHWARTZ M. A., BOKOCH G. M., 1998. *Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading*. Mol. Biol. Cell 9, 1863-1871.
- PUTNEY J. W., 1990. *Capacitative calcium entry revisited*. Cell Calcium 11, 611-624.
- RAMACHANDRAN C., PATIL R. V., COMBRINK K., SHARIF N. A., SRINIVAS S. P., 2011. *Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork*. Mol. Vis. 17, 1877-1890.
- REIG G., PULGAR E., CONCHA M. L., 2014. *Cell migration: from tissue culture to embryos*. Development 141, 1999-2013.
- RICKERT P., WEINER O. D., WANG F., BOURNE H. R., SERVANT G., 2000. *Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products*. Trends Cell Biol. 10, 466-473.
- RIDLEY A. J., 2001. *Rho GTPases and cell migration*. J. Cell Sci. 114, 2713-2722.
- RIDLEY A. J., 2011. *Life at the leading edge*. Cell 145, 1012-1022.
- RIDLEY A. J., 2015. *Rho GTPase signalling in cell migration*. Curr. Opin. Cell Biol. 36: 103-112.
- RIDLEY A. J., HALL A., 1992. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell 70, 389-399.
- RIDLEY A. J., COMOGLIO P. M., HALL A., 1995. *Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells*. Mol. Cell. Biol. 15, 1110-1122.
- RIDLEY A. J., SCHWARTZ M. A., BURRIDGE K., FIRTTEL R. A., GINSBERG M. H., BORISY G., PARSONS J. T., HORWITZ A. R., 2003. *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science 302, 1704-1709.
- RIENTO K., RIDLEY A. J., 2003. *ROCKs: Multifunctional kinases in cell behavior*. Mol. Cell. Biol. 4, 446-456.
- RINALDI R., OPAS M., HREBENDA B., 1975. *Contractility of glycerinated Amoeba proteus and Chaos-chaos*. J. Protozool. 22, 286-292.
- ROYAL I., LAMARCHE-VANE N., LAMORTE L., KAIBUCHI K., PARK M., 2000. *Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation*. Mol. Biol. Cell 11, 1709-1725.
- SAUZEAU V., LE JEUNE H., CARIO-TOUMANIANTZ C., VAILLANT N., GADEAU A. P., DESGRANGES C., SCALBERT E., CHARDIN P., PACAUD P., LOIRAND G., 2000. *P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 278, 1751-1761.
- SCHMITZ A. A., GOVEK E. E., BOTTNER B., VAN AELST L., 2000. *Rho GTPases: signaling, migration, and invasion*. Exp. Cell Res. 261, 1-12.
- SCITA G., TENCA P., FRITTOLE E., TOCCHETTI A., INNOCENTI M., GIARDINA G., DI FIORE P. P., 2000. *Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs*. EMBO J. 19, 2393-2398.
- SIMARD-DUQUESNE N., COUILLARD P., 1962. *Ameboid movement. II. Research of contractile proteins in Amoeba proteus*. Exp. Cell Res. 28, 92-98.
- SINGH I., KNEZEVIC N., AHMED G. U., KINI V., MALIK A. B., MEHTA D., 2007. *Gaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin*. J. Biol. Chem. 282, 7833-7843.
- SMALL J. V., 1998. *Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement*. Biochim. Biophys. Acta 1404, 271-281.
- SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., 2000. *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II*. J. Physiol. 522, 177-185.
- SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., 2003. *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol. Rev. 83, 1325-1358.
- TARGOS B., POMORSKI P., KRZEMIŃSKI P., BARAŃSKA J., REDOWICZ M. J., KŁOPOCKA W., 2006. *Effect of Rho-associated kinase inhibition on*

- actin cytoskeleton structure and calcium response in glioma C6 cells. *Acta Biochim. Pol.* 53, 825-831.
- TAYLOR D. L., WANG Y. L., HEIPLE J. M., 1980. Contractile basis of ameboid movement. VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amebas. *J. Cell Biol.* 86, 590-598.
- THERIOT J. A., MITCHISON T. J., 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126-131.
- TOLIAS K. F., HARTWIG J. H., ISHIHARA H., SHIBASAKI Y., CANTLEY L. C., CARPENTER C. L., 2000. Type I α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr. Bio.* 10, 153-156.
- TOTSUKAWA G., YAMAKITA Y., YAMASHIRO S., HARTSHORNE D. J., SASAKI Y., MATSUMURA F., 2000. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesion in 3T3 Fibroblasts. *J. Cell Biol.* 150, 797-806.
- TROJANEK J., 2015. Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w nadciśnieniu tętniczym. *Patogeneza nadciśnienia a problem otyłości.* *Post. Biochem.* 61, 356-363.
- TSUJI T., ISHIZAKI T., OKAMOTO M., HIGASHIDA C., KIMURA K., FURUYASHIKI T., ARAKAWA Y., BIRGE R. B., NAKAMOTO T., HIRAI H., NARUMIYA S., 2002. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 157, 819-830.
- VAN LEEUWEN F. N., VAN DELFT S., KAIN H. E., VAN DER KAMMEN R. A., COLLARD J. G., 1999. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat. Cell Biol.* 1, 242-248.
- VAN RHEENEN J., SONG X., VAN ROOSMALEN W., CAMMER M., CHEN X., DESMARAIS V., YIP S. C., BACKER J. M., EDDY R. J., CONDEELIS J. S., 2007. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 179, 1247-1259.
- VAN RHEENEN J., CONDEELIS J., GLOGAUER M. A., 2009. A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J. Cell Sci.* 122, 305-311.
- VERKHOVSKY A. B., SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr. Biol.* 14, 11-20.
- WANG M., KONG Q., GONZALEZ F. A., SUN G., ERB L., SEYE C., WEISMAN G. A., 2005. P2Y2 nucleotide receptor interaction with αV integrin mediates astrocyte migration. *J. Neurochem.* 95, 630-640.
- WATANABE N., KATO T., FUJITA A., ISHIZAKI T., NARUMIYA S., 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136-143.
- WELCH M. D., MULLINS R. D., 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247-288.
- WINDER S. J., AYSCOUGH K. R., 2005. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118, 651-654.
- WONG W. T., FAULKNER-JONES B. E., SANES J. R., WONG R. O., 2000. Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J. Neurosci.* 20, 5024-5036.
- WORTHYLAKE R. A., LEMOINE S., WATSON J. M., BURRIDGE K., 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* 154, 147-160.
- YANG N., HIGUCHI O., OHASHI K., NAGATA K., WADA A., KANGAWA K., NISHIDA E., MIZUNO K., 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809-812.
- YILMAZ M., CHRISTOFORI G., 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 629-642.
- YUMURA S., FUKUI Y., 1998. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 111, 2097-2108.
- ZHANG K., CHEN J., 2012. The regulation of integrin by divalent cations. *Cell Adh. Migr.* 6, 20-29.

KOSMOS Vol. 67, 1, 207–218, 2018WANDA KŁOPOCKA¹, JAROSŁAW KORCZYŃSKI²

¹Faculty of *Biology* and Environmental Sciences, *Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw*, 1/3 Wóycicki Str., 01-938 Warsaw, ²*Scientific and Research Advisory Centre, Kawa.ska Ltd.*, 3 Techniczna Str., 05-500 Piaseczno, E-mail: w.klopocka@uksw.edu.pl, jaroslaw.korczynski@kawaska.pl

MIGRATION, MECHANISMS AND REGULATION PRINCIPLES

Summary

Motility is a common feature of numerous cell types. In response to various stimuli, the dynamic actin cytoskeleton and contractility generate forces needed to drive the cell forward. Actin filament elongation on the barbed ends pushes the plasma membrane forward during lamellipodium formation. Stress fibers contraction and/or the contraction of the cortical network are responsible for detaching the rear part of the cell and enable cell body to follow the progressing front. In response to extracellular stimuli, multiple signaling pathways are initiated resulting in the actin filament network reorganization and contractility of acto-myosin system. The key regulators of these processes are Rho family proteins, PIP₂ and calcium ions. Nucleotide receptors P2Y₂ coupled with G-proteins regulate the level of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), which in turn modulates a variety of actin binding proteins, is involved in calcium response, and activates Rac1 and RhoA proteins. The RhoA/ROCK signaling pathway plays an important role in contractile force generation needed for the assembly of stress fibers, focal adhesions and for tail retraction during cell migration. The Rac1 via its effector Pak1 regulates lamellipodium formation and protrusion of the leading edge.

Key words: actin cytoskeleton, migration, Rho proteins, stress fibers