

JOANNA MORACZEWSKA

*Zakład Biochemii i Biologii Komórki
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz
E-mail: joanna.moraczewska@ukw.edu.pl*

Artykuł dedykuje Pani Profesor Hannie Strzeleckiej-Gołaszewskiej, która pokazała mi jak niezwykłym białkiem jest aktyna

FILAMENTY CIENKIE I MIKROFILAMENTY – FUNKCJONALNE KOMPLEKSY AKTYNY Z TROPOMIOZYNA*

WPROWADZENIE

Aktyna jest białkiem znanym od ponad 75 lat. Została odkryta przez Bruno Strauba w mięśniach szkieletowych jako składnik filamentów cienkich w aparacie kurczliwym mięśni. Wykazano, że cykliczne oddziaływanie pomiędzy globularnymi główkami miozyny i filamentami aktynowymi, połączone z hydrolizą ATP, stanowią podstawę skurczu mięśni (SZENT-GYORGYI 2004). Późniejsze badania ujawniły, że aktyna to białko uniwersalne, obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, w których, wraz z filamentami pośrednimi i mikrotubulami, współtworzy cytoszkielet (SCHLEICHER i JOCKUSCH 2008).

Aktyna pełni w komórce wiele funkcji. Skurcz mięśni, podział i migracja komórek, endocytoza, transport organelli wewnątrzkomórkowych, transkrypcja i architektura chromatyny, to tylko kilka przykładów życiowej aktywności komórek, w których aktyna pełni główną rolę. U podstaw funkcjonalnej różnorodności aktyny leżą dwa podstawowe mechanizmy. Pierwszym z nich jest zdolność do polimeryzacji monomerycznej aktyny (G-aktyny). To skutkuje utworzeniem filamentów (F-aktyna), które z kolei mogą być wydłużane, na drodze dołączania nowych podjednostek na końcach, lub skracane, w pro-

cesach depolimeryzacji końców i przecinania długich filamentów (CARLIER i współaut. 2015). Drugi mechanizm to oddziaływanie filamentów aktynowych z główkami wielu izoform miozyny, umożliwiające ruch miozyny wzdłuż torów wyznaczanych przez filamenty aktynowe (więcej informacji o miozynach w artykułach SUSZEK i współaut. oraz NOWAK i REDOWICZ w tym zeszycie KOSMOSU; SQUIRE i współaut. 2017). Oba rodzaje aktywności są ściśle regulowane przez paletę białek wiążących aktynę (ang. actin-binding proteins, ABP), wśród których główną rolę odgrywają regulatorowe białka z rodziny tropomiozyn (Tpm).

STRUKTURA AKTYNY I MECHANIZM POLIMERYZACJI

Aktyna istnieje w postaci kilku izoform kodowanych przez oddzielne geny (patrz REDOWICZ w tym zeszycie KOSMOSU). Pierwszą atomową strukturę G-aktyny uzyskanej z mięśni szkieletowych królika otrzymano w kompleksie z DNazą I, wiązanie której zapobiegało polimeryzacji aktyny (KABSCH i współaut. 1990). Struktura ta jest uważana za „złoty standard”, pomimo tego, że od czasu jej publikacji w 1990 r. poznano około 50 struktur różnych izoform aktyny, zarówno w kompleksach z białkami wiążącymi

*Artykuł jest finansowany z funduszy NCN przeznaczonych na realizację projektu nr 2014/15/B/NZ1/01017.

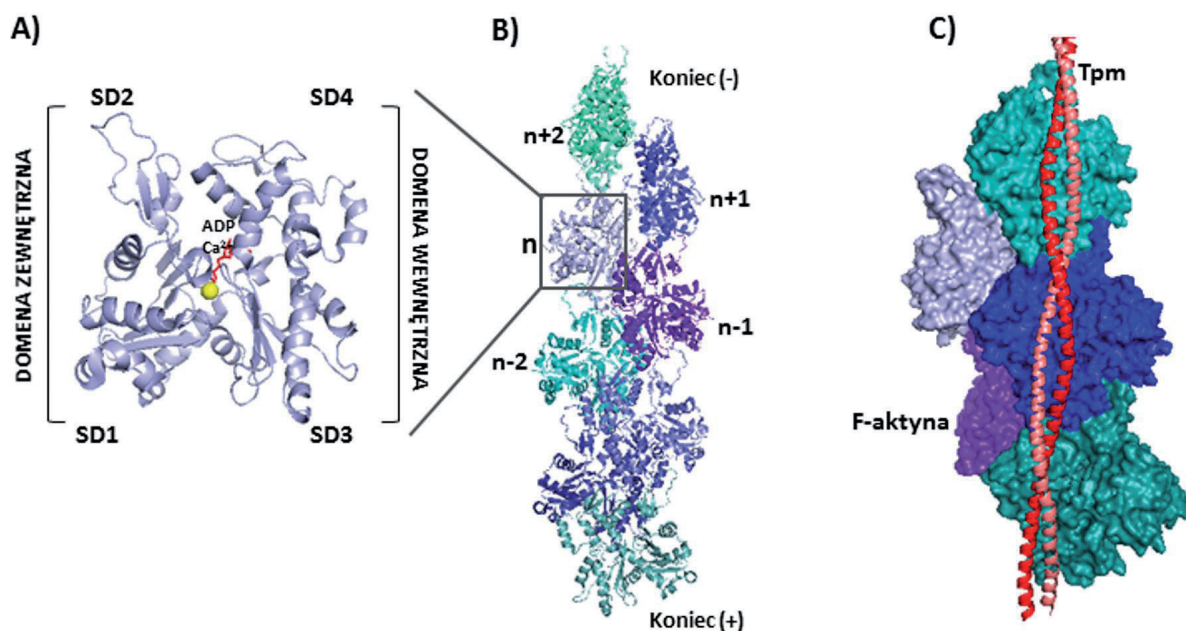
aktyne, jak i niezwiązanej z innymi białkami. We wszystkich strukturach łańcuch polipeptydowy aktyny jest podobnie zwinięty i tworzy dwie główne domeny, zwane domeną zewnętrzną i wewnętrzną, które są od siebie oddzielone szczeliną wiążącą dwuwartościowy kation i nukleotyd. Każda z domen jest dodatkowo podzielona na dwie subdomeny (Ryc. 1A) (DOMINGUEZ i HOLMES 2011).

Nukleotydy związane w szczelinie międzydomenowej monomeru to ATP lub ADP, natomiast kationem silnie wiązonym na dnie szczeliny jest jon Mg^{2+} , który po oczyszczeniu aktyny do badań *in vitro* jest najczęściej wymieniany na jon Ca^{2+} (ESTES i współaut. 1992). Rodzaj związanego nukleotydu i kationu wpływa na strukturę monomeru, w szczególności na pętlę wiążącą DNazę I (pętla D) (STRZELECKA-GOŁASZEWSKA i współaut. 1993), która odgrywa ważną rolę w stabilizacji kontaktów pomiędzy podjednostkami (protomerami) w filamencie (STRZELECKA-GOŁASZEWSKA i współaut. 1996, MORACZEWSKA i współaut. 1999, VON DER ECKEN i współaut. 2015).

Z powodu problemów wynikających z konkurencji pomiędzy procesami krystalizacji

i polimeryzacji, atomowa struktura filamentów nie została do tej pory określona metodami rentgenograficznymi. Pojawiają się jednak coraz doskonalsze modele uzyskane metodami kriomikroskopii elektronowej, których rozdzielczość jest zbliżona do rozdzielczości atomowej. Modele te ujawniają kluczowe dla struktury filamentu oddziaływania pomiędzy podjednostkami oraz zmiany strukturalne w obrębie podjednostek, jakie towarzyszą polimeryzacji (ODA i współaut. 2009, FUJII i współaut. 2010, MURAKAMI i współaut. 2010, VON DER ECKEN i współaut. 2015).

Filament aktynowy jest strukturą o średnicy 9-10 nm, złożoną z podjednostek aktynowych tworzących dwa helikalnie zwinięte łańcuchy (Ryc. 1B). Podczas polimeryzacji struktura podjednostek ulega przekształceniom, które przede wszystkim dotyczą pętli D zlokalizowanej na szczycie subdomeny 2 oraz powodują skręcenie domen o około 20° . W konsekwencji podjednostki wbudowane do filamentu są bardziej spłaszczone niż cząsteczka G-aktyny (ODA i współaut. 2009). Filament jest stabilizowany przez oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe i van



Ryc. 1. Aktyna i jej kompleks z tropomiozyna.

(A) Atomowa struktura podjednostki aktyny, (B) atomowy model F-aktyny, (C) atomowy model kompleksu F-aktyny z tropomiozyna – fragment obejmujący środkowy segment tropomiozyny rozciągający się wzdłuż trzech podjednostek F-aktyny. Druga cząsteczka tropomiozyny znajduje się po drugiej stronie filamentu i nie została pokazana. Wizualizacje struktur zostały wykonane w programie PyMol w oparciu o współrzędne atomowe zdeponowane w bazie PDB, kody dostępu: 2ZWH (podjednostka aktyny), 6BNO (F-aktyna) i 5JLF (F-aktyna-Tpm).

der Waalsa, zarówno wzdłuż pojedynczego łańcucha, jak i pomiędzy łańcuchami w poprzek filamentu. Kontakty w obrębie tego samego łańcucha zachodzą pomiędzy subdomenami 2 i 4 podjednostki n i subdomeną 3 podjednostki $n+2$. Oddziaływania między łańcuchami są stabilizowane przez dwa główne miejsca. Pierwsze z nich to miejsce znajdujące się na styku pomiędzy subdomeną 3 podjednostki n i subdomeną 2 podjednostki $n-1$. Drugie jest bardziej rozległe i obejmuje subdomenę 4 podjednostki n oraz subdomenę 1 i 3 podjednostki $n+1$ (ODA i współaut. 2009, FUJII i współaut. 2010, VON DER ECKEN i współaut. 2015). Istniejące modele filamentu aktynowego są zgodne w kwestii miejsc oddziaływania pomiędzy podjednostkami, jednak należy zwrócić uwagę na fakt, że w roztworze filament aktynowy jest dynamiczną strukturą, która może przyjmować różne stany konformacyjne, natomiast utrwalanie materiału przygotowywanego do mikroskopii może tę dynamikę ograniczyć (REISLER i EGELMAN 2007).

Wszystkie podjednostki w filamencie są podobnie zorientowane. Domena zewnętrzna, obejmująca subdomenę 1 i 2, jest zwrócona na zewnątrz i przez to jest odsunięta od osi filamentu, a domena wewnętrzna z subdomenami 3 i 4 znajduje się bliżej podłużnej osi filamentu, zatem skierowana jest do środka. Subdomenę 2 i 4 są skierowane w stronę końca minus (zwanego też końcem ostrym) filamentu, a subdomenę 1 i 3 są zwrócone w stronę końca plus (zwanego też końcem kolczastym lub brodatym) filamentu (HOLMES i współaut. 1990). Taka orientacja podjednostek sprawia, że końce nie są równocenne nie tylko pod względem strukturalnym, ale i funkcjonalnym.

Wewnętrzną cechą aktyny jest zdolność do spontanicznej polimeryzacji. W warunkach *in vitro*, w stężeniach soli zbliżonych do stężenia fizjologicznego, polimeryzacja oczyszczonej aktyny zachodzi dopiero wówczas, gdy stężenie monomeru jest wyższe niż tzw. stężenie krytyczne polimeryzacji (c_c). Pierwszym etapem polimeryzacji jest aktywacja monomeru i tworzenie ziaren (zarodki) polimeryzacji złożonych z oligomerów zawierających 3-4 podjednostki, co daje zaczątek filamentów wydłużających się na obu końcach. W procesie polimeryzacji nierównocenneść końców przejawia się tym, że wydłużają się one z różną szybkością i charakteryzują się różnym c_c . Stałe szybkości asocjacji i dysocjacji na końcu plus są większe od ich wartości na końcu minus, co sprawia, że na końcu plus filament przyrasta ~5 razy szybciej. Wydłużanie filamentu trwa do momentu osiągnięcia stanu równowagi. Ponieważ c_c na końcu minus jest wyższe niż na

końcu plus, spadek stężenia monomerów poniżej wartości charakterystycznej dla tego końca prowadzi do jego skracania, stąd też jego nazwa – koniec minus. W tym samym czasie koniec plus wciąż może się wydłużać, co w konsekwencji prowadzi do przepływu (przesuwania) podjednostek w kierunku od końca plus do końca minus. Zjawisko to zostało opisane przez Wegnera na podstawie badań nad aktyną oczyszczoną z komórek i nosi nazwę „treadmilling” (WEGNER 1976).

Różnice pomiędzy szybkością polimeryzacji na każdym z końców są dodatkowo zwiększane przez aktywność ATP. Związaną z monomerem jest bardzo wolna, ale konformacyjne zmiany jakie towarzyszą włączaniu G-aktyny ze związanym ATP (ATP-G-aktyna) do filamentu przyspieszają hydrolizę reszty γ -fosforanowej ponad 40.000 razy (POLLARD i WEEDS 1984). W wysokich stężeniach ATP-G-aktyny szybkość przyłączania monomerów przewyższa szybkość hydrolizy ATP, co prowadzi do akumulacji rejonów ATP-aktyny na końcu minus. Ponieważ uwalnianie reszt fosforanowych jest o rząd wielkości wolniejsze niż hydroliza wiązania fosforanowego, podjednostki znajdujące się w środkowej części filamentu są związane z ADP- P_i . Przesuwaniu podjednostek w stronę końca minus towarzyszy uwalnianie P_i i powstawanie podjednostek ADP-aktyny (POLLARD i BORISY 2003). W podjednostce filamentu ADP nie jest wymieniane na ATP, co oznacza, że z włączeniem jednej podjednostki aktyny do filamentu jest związana hydroliza jednej cząsteczki ATP. Szybkość dysocjacji ADP-aktyny na końcach filamentu jest szybsza od dysocjacji ATP-aktyny, a dojrzałe filamente łatwiej ulegają depolimeryzacji. W związku z tym hydrolizę ATP można rozpatrywać jako molekularny zegar odmierzający wiek filamentów aktynowych i wyznaczający czas ich rozpadu.

STRUKTURA I RÓŻNORODNOŚĆ TROPOMIOZYN

Tropomiozyny są dimerycznymi białkami złożonymi z dwóch α -helikalnych łańcuchów polipeptydowych tworzących superhelisę, która jest stabilizowana przez oddziaływania hydrofobowe w obrębie rdzenia powstającego na styku pomiędzy dwiema α -helisami. W sekwencji aminokwasowej tropomiozyny powtarza się wzór siedmiu reszt aminokwasowych ($a-b-c-d-e-f-g$), wśród których pozycje a i d są najczęściej zajęte przez duże hydrofobowe reszty, takie jak leucyna (Leu), izoleucyna (Ile) czy walina (Val). α -Helikalne zwinięcie każdego łańcucha sprawia, że hydrofobowe reszty są wyeksponowane po tej

samej stronie helisy, co umożliwia tworzenie hydrofobowego rdzenia silnie stabilizującego superhelisę. Unikatową cechą tropomiozyny występujących u kręgowców jest pojawianie się tzw. klastrów alaninowych, czyli kilku następujących po sobie reszt alaniny (Ala) i seryny (Ser), skupionych w pozycjach *a* i *d* superhelisy. Ze względu na małe rozmiary reszt Ala, średnica superhelisy w rejonie klastrów ulega zwichnięciu, co prowadzi do przesunięcia względem siebie łańcuchów i zagięcia dimeru Tpm. Taka lokalna destabilizacja superhelisy nadaje cząsteczkom tropomiozyny giętkość odpowiednią dla jej właściwego dopasowania do polimeru aktyny, który ma również helikalną strukturę (HITCHCOCK-DEGREGORI i SINGH 2010). Inny typ okresowości w sekwencji tropomiozyny to następujące po sobie powtórzenia aminokwasów o długości 35-42 reszt. Aminowe (N-końcowe) segmenty tych powtórzeń zawierają homologiczne miejsca wiążące aktynę. Są to reszty zlokalizowane w pozycjach *b*, *c* i *f*, które wiążą aktynę przede wszystkim na drodze oddziaływań elektrostatycznych i w mniejszym stopniu hydrofobowych (HITCHCOCK-DEGREGORI 2008, HITCHCOCK-DEGREGORI i SINGH 2010, BARUA 2013).

U ludzi istnieją cztery geny kodujące tropomiozyny (*TPM1-TPM4*). Początek transkrypcji genów *TPM1*, *TPM3* i *TPM4* wyznaczają dwa alternatywne promotory, które prowadzą do powstawania izoform długich, rozciągających się wzdłuż siedmiu podjednostek aktyny, oraz krótkich, o długości odpowiadającej sześciu podjednostkom. Innym źródłem różnorodności wśród izoform jest proces alternatywnego składania eksonów. W konsekwencji powstaje około czterdziestu form tropomiozyny różniących się sekwencją aminokwasową w odcinkach aminowych i karboksylowych oraz w obrębie dwóch środkowych segmentów (GUNNING i współaut. 2008, VINDIN i GUNNING 2013).

W tym miejscu warto nadmienić, że duża liczba izoform tropomiozyny i stosowanie przez autorów publikacji niejednolitego nazewnictwa były często przyczyną nieporozumień, dlatego w 2015 r. została zaproponowana systematyczna nomenklatura tej grupy białek występujących u ssaków. Zgodnie z nowymi zasadami każdej izoformie nadano numer kolejnego genu, po którym następuje numer właściwy dla izoformy. Na przykład, nowa nazwa α -tropomiozyny z szybkich włókien mięśni szkieletowych to Tpm1.1, natomiast γ -tropomiozyna, nazywana również wolną α -tropomiozyna, gdyż jest syntetyzowana w wolnych włóknach mięśni szkieletowych, obecnie nosi nazwę Tpm3.12 (GEEVES i współaut. 2015).

Dodatkowym mechanizmem zwiększającym strukturalną i funkcjonalną różnorodność wśród tropomiozyny jest istnienie heterodimerów złożonych z różnych izoform (GIMONA 2008). Wykazano, że powinowactwo do aktyny i właściwości regulatorowe heterodimerów nie są prostym uśrednieniem właściwości homodimerów (KALYVA i współaut. 2012). Badania prowadzone w moim laboratorium wskazują na to, że tworzenie heterodimerów tropomiozyny ma znaczenie dla rozwoju chorób mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego, związanych z punktowymi mutacjami w genach tropomiozyny. Dane uzyskane przez nas w badaniach *in vitro* sugerują, że podstawienia aminokwasowe będące wynikiem punktowych mutacji mają dużo bardziej destrukcyjny wpływ na właściwości białka, gdy są obecne tylko w jednym łańcuchu dimeru (ŚLIWINSKA i współaut. 2018).

Liczba izoform tropomiozyny zależy od stopnia rozwoju ewolucyjnego organizmu. Jak wcześniej wspomniano, u ludzi jest około 40 izoform, natomiast w komórkach drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano tylko dwie izoformy, które są krótsze od izoform występujących u kręgowców. Dominująca u *S. cerevisiae* izoforma Tpm1p wiąże się wzdłuż pięciu podjednostek aktyny, natomiast izoforma Tpm2p ma długość zaledwie czterech aktyń (STRAND i współaut. 2001). W komórkach drożdży rozszczepkowych *Shizosaccharomyces pombe* funkcjonuje tylko jedna izoforma tropomiozyny (Cdc8p) o długości odpowiadającej czterem podjednostkom aktyny (BALASUBRAMANIAN i współaut. 1992). Tropomiozyny drożdżowe są nie tylko krótsze od tropomiozyny występujących u kręgowców, ale cechują się też nieco odmienną strukturą. W ich sekwencji nie znaleziono klastrów alaninowych, za to zidentyfikowano delecję prowadzącą do braku czterech reszt aminokwasowych, która zaburza heptapeptydowe powtórzenie superhelisy i przez to zwiększa giętkość cząsteczki (BARUA 2013).

STRUKTURA KOMPLEKSU AKTYNY Z TROPOMIOZYNA

Tropomiozyny są zdolne do tworzenia polimerów rozciągających się wzdłuż całego filamentu aktynowego, dzięki czemu powstają nieprzerwane łańcuchy oplatające filament po jego obu stronach (Ryc. 1C). Polimeryzacja zachodzi poprzez tworzenie zakładki pomiędzy końcami aminowymi i karboksylowymi cząsteczek tropomiozyny sąsiadujących wzdłuż filamentu. Na końcu karboksylowym superhelisa tropomiozyny jest rozpleciona i tworzy widełki, które obej-

mują jednaścicie N-końcowych reszt kolejnej cząsteczki Tpm. Oddziaływania w obrębie zakładki warunkują ustawienie płaszczyzny sąsiadujących cząsteczek pod kątem 90°, dzięki czemu następujące po sobie tropomiozyny przyjmują taką pozycję, aby odcinki wiążące aktyne znajdowały się w orientacji odpowiedniej dla tworzenia wiązań z podjednostkami aktyny (HITCHCOCK-DEGREGORI i SINGH 2010). Pod nieobecność innych białek wiążących aktyne (tzw. stan Apo), powtarzające się okresowo odcinki wiążące aktyne oddziałują elektrostatycznie ze specyficznymi resztami aminokwasowymi aktyny, wyeksponowanymi głównie na powierzchni subdomeny 3 (BARUA 2013, VON DER ECKEN i współaut. 2015). Stosunkowo słabe oddziaływania z aktyną oraz konformacyjna elastyczność w rejonie zakładki międzytropomiozynowej sprawiają, że przy niedużym nakładzie energii Tpm może przechodzić pomiędzy różnymi stanami wiązania aktyny, co przejawia się zmianą azymutalnego położenia łańcuchów Tpm na filamencie. Proces ten odgrywa ogromną rolę w regulacji oddziaływań filamentu aktynowego z miozyną i innymi białkami wiążącymi aktyne (patrz poniżej). Białka wiążące aktyne, a w szczególności troponina i główki miozyny, ułatwiają przejście pomiędzy różnymi stanami wiązania tropomiozyny (VIBERT i współaut. 1997).

REGULATOROWE FUNKCJE TROPOMIOZYN

Zdecydowana większość filamentów aktynowych istniejących w komórkach funkcjonuje w kompleksie z białkami z rodziny tropomiozyn, które stabilizują filament. Polimeryzacja cząsteczek tropomiozyny po obu stronach filamentu aktynowego ustawia tropomiozynę w pozycji idealnej do sprawowania nadzoru nad oddziaływaniami aktyny z innymi białkami wiążącymi, które warunkują swoiste funkcje aktyny. Z tego względu tropomiozyny można nazwać „dozorcami” aktyny. Bogata literatura związana z tym zagadnieniem dostarcza informacji o regulacji oddziaływań z miozynami (FANNING i współaut. 1994; TANG i OSTAP 2001; BRYCE i współaut. 2003; CLAYTON i współaut. 2010, 2015; COULTON i współaut. 2010, STARK i współaut. 2010, BARUA i współaut. 2012), białkami inicjującymi (nukleującymi) polimeryzację (BLANCHOIN i współaut. 2001, WAWRO i współaut. 2007, SKAU i współaut. 2009), białkami sieciującymi filamenty (CREED i współaut. 2008, SKAU i współaut. 2009, CLAYTON i współaut. 2010), przecinającymi filamenty (BERNSTEIN i BAMBURG 1982; FATTOUM i współaut. 1983; ISHIKAWA i współaut. 1989a, b; ONO i ONO 2002; NAKANO i MABU-

CHI 2006; FAN i współaut. 2008) oraz zakrywającymi końce filamentów („czapczkującymi”) (FOWLER i współaut. 1993). W dalszej części artykułu zostanie omówionych kilka interesujących przykładów wskazujących na istotny udział izoform tropomiozyny w regulacji ruchliwości zależnej od miozyn oraz od dynamicznej polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny.

REGULACJA ODDZIAŁYWAŃ AKTYNY Z MIOZYNAMI

Klasyczną i najlepiej poznaną funkcją regulatorową tropomiozyny jest kontrola oddziaływań aktyny z główkami miozyny (globularnymi częściami miozyny zawierającymi domenę motoryczną, która oddziałuje z aktyną, oraz helikalną szyjkę, do której przylączają się łańcuchy lekkie miozyny) (więcej informacji o budowie i funkcjach miozyn w artykule SUSZEK i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU). Regulacja skurczu w komórkach mięśni poprzecznie-prążkowanych odbywa się głównie na poziomie filamentu cienkiego, który funkcjonuje jako kompleks aktyny z tropomiozyną i troponiną (GORDON i współaut. 2000). Współdziałanie pomiędzy tymi białkami regulatorowymi pozwala na ustalenie równowagi pomiędzy trzema stanami aktywacji filamentu cienkiego (MCKILLOP i GEEVES 1993). Gdy stężenie jonów Ca^{2+} w środowisku jest niskie, wówczas filament znajduje się w stanie „zablokowanym”. Jak wykazały badania strukturalne, w tym stanie łańcuchy tropomiozyny wiążą się z zewnętrzną domeną aktyny i blokują miejsca wiązania główek miozyny na aktynie. Wiązanie jonów Ca^{2+} do troponiny powoduje przejście filamentu do stanu „zamkniętego”, który charakteryzuje się azymutalnym przesunięciem tropomiozyny w kierunku wewnętrznej domeny aktyny i częściowym odsłonięciem miejsc wiążących miozynę. Przejście do stanu „otwartego” jest indukowane przez miozynę, która, wiążąc się z aktyną, powoduje dalsze przesunięcie tropomiozyny, całkowite udostępnienie miejsc wiązania na aktynie i pełną aktywację filamentu (VIBERT i współaut. 1997).

Wiedza o udziale tropomiozyn w regulacji aktywności miozyn, zwłaszcza tzw. izoform niemięśniowych, jest jeszcze niekompletna. Z uwagi na fakt, że w komórkach niemięśniowych funkcjonują tropomiozyny i miozyny zaliczane do wielu klas, badania nad mechanizmami regulacji układu akto-miozynowego stanowią spore wyzwanie.

U ssaków zidentyfikowano trzy izoformy niemięśniowej miozyny II (NM-2A, NM-2B i NM-2C), które, podobnie jak klasyczne miozyny mięśniowe, są zdolne do tworzenia fi-

lamentów. Każdej z tych izoform przypisuje się odmienne, acz redundantne funkcje w komórce (SHUTOVA i współaut. 2014). Podstawowym mechanizmem regulacji aktywności niemięśniowych miozyn II jest fosforylacja regulatorowego lekkiego łańcucha przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny i kinazę zależną od białka Rho (HEISLER i MANSTEIN 2013). Oprócz tego, ogromną rolę w regulacji oddziaływań niemięśniowych miozyn z aktyną pełnią izoformy tropomiozyny. Przykładem filamentów aktynowych, współpracujących z filamentami miozyny, są włókna naprężeniowe, czyli kurczliwe wiązki filamentów (przypominające do pewnego stopnia strukturę sarkomerów w mięśniach poprzecznie-prążkowanych), które znajdują się w różnych przedziałach komórkowych, biorąc udział w morfogenezie, adhezji i migracji komórek oraz transdukcji mechanicznego sygnału (TOJKANDER i współaut. 2012). Izofomy tropomiozyny związane z włóknami naprężeniowymi w zróżnicowany sposób regulują aktywność ATPazową niemięśniowych miozyn II. Podczas gdy długie niemięśniowe tropomiozyny (Tpm1.6, Tpm1.7 i Tpm1.8) nie mają wpływu na aktywność NM-2A, to krótkie izoformy (Tpm3.1, Tpm3.2 i Tpm4.2) znacząco ją aktywują. Te same tropomiozyny aktywują NM-2C, ale pozostają bez wpływu na aktywność ATPazową NM-2B (BARUA i współaut. 2014, GATEVA i współaut. 2017). Nadprodukcja tropomiozyny Tpm3.1 promuje tworzenie stabilnych włókien naprężeniowych i rekrutację niemięśniowej NM-2A (BRYCE i współaut. 2003). Podobne działanie ma Tpm4.2, która dodatkowo synchronizuje działanie główek miozyny związanych z tym samym filamentem, nadając im zdolność do procesywnego przemieszczania się wzdłuż filamentów bez utraty kontaktu z podjednostkami aktyny (HUNDT i współaut. 2016). Najnowsze badania nad regulacją aktywności NM-2B przez tropomiozyny wykazały, że Tpm1.8 i Tpm3.1 zwiększają częstość oddziaływań NM-2B z aktyną i przez to wzmagają jej aktywność kurczliwą. Z kolei specyficzna dla komórek nerwowych Tpm1.12 przełącza aktywność NM-2B w stronę cząsteczki zdolnej do długotrwałego utrzymywania napięcia (PATHAN-CHHATBAR i współaut. 2018).

Dotychczasowe badania wskazują na to, że tropomiozyny hamują aktywność miozyn należących do rodziny I. Są to monomeryczne, a więc zawierające jedynie jedną główkę miozyny, które nie są zdolne do tworzenia filamentów. Poza klasyczną główką z domeną motoryczną i szyjką (w przypadku tej grupy miozyn łańcuchami lekkimi są cząsteczki kalmoduliny), zawierają one ogonek, który bezpośrednio oddziałuje z lipidami błon komórkowych. Dzięki temu miozyny te

są zaangażowane m.in. w procesy związane z wewnątrzkomórkowym transportem pęcherzyków i organelli oraz w transdukcji mechanicznego sygnału (OSTAP 2008, McINTOSH i OSTAP 2016). Analizy *in vitro* wykazały, że tropomiozyny powodują ponad 75 procentowe hamowanie aktywności ATPazowej miozyny I występującej w rąbku szczoteczki nabłonka jelita i całkowite zahamowanie ruchu miozyny I wzdłuż filamentów (FANNING i współaut. 1994). Uważa się, że miozyna I nie może wiązać się z filamentami owiniętymi tropomiozyną ze względu na jej niskie powinowactwo do aktyny i stosunkowo krótki czas, przez jaki pozostaje związana z filamentem (tzw. low duty ratio). A zatem, nie jest ona w stanie konkurować z tropomiozyną o miejsca wiązania na aktynie. Ten negatywny tryb regulacji ogranicza obecność miozyny I do rejonów zawierających krótkie i rozgałęzione filamentey pozbawione Tpm, które mieszczą się w pobliżu błon komórkowych (OSTAP 2008).

Kolejnymi, nietypowymi miozynomami są miozyny tworzące rodzinę V (patrz SUSZEK i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU). Są to dimeryczne (a więc zawierające dwie główki) miozyny, które są typowymi transporterami. To, co wyróżnia główki tej klasy miozyn, to długie szyjki, do których przyłącza się po 6 łańcuchów lekkich, stanowiące tzw. ramiona dźwigni, zaangażowane w generację ruchu. Po szyjce następuje ogonek, w którym znajdują się sekwencje umożliwiające dimeryzację (poprzez tworzenie superhelisy) oraz domena wiążąca ładunek (cargo), którym mogą być organella, pęcherzyki i kompleksy białkowe. Dzięki tak długiej szyjce, miozyny V są procesywnymi motorami, które, wykonując długie kroki robocze wzdłuż filamentów aktynowych, przemieszczają ładunek w kierunku końca plus filamentów, a więc w kierunku błony komórkowej (POLLARD i LORD 2014). Badania na białkach drożdży wykazały, że tropomiozyna może przełączać jedną z dwóch tam występujących miozyn V, z motoru nieprocesywnego w procesywny. Myo2p, miozyna V z *S. cerevisiae*, oddziałuje w sposób nieprocesywny z nieregulowaną aktyną, ale obecność na filamentach drożdżowej izoformy tropomiozyny Tpm1p zmienia ją w bardzo wydajny motor procesywny. W obecności tropomiozyny zmniejsza się szybkość uwalniania ADP pozostającego po hydrolizie ATP. Ponieważ główki miozyny wiążące ADP silniej wiążą się z aktyną niż główki wiążące ATP, dłuższy czas w stanie ADP zwiększa prawdopodobieństwo, że jedna z główek pozostaje związana z aktyną w czasie, gdy druga oddysocjowuje od filamentu, co umożliwia procesywny ruch (HODGES i współaut. 2012).

Interesujący mechanizm regulacji różnych izoform miozyny wykryto w komórkach *S. pombe*. Polega on na odwracalnej acetylacji końca aminowego Cdc8p, jedynej izoformy Tpm występującej w tych komórkach. Cdc8p jest związana z długimi, nierozgałęzionymi filamentami tworzącymi obrączki kurczliwe zaangażowane w proces cytokinezy oraz z kablami aktynowymi (ang. actin cables), które biorą udział w transporcie wewnątrzkomórkowym. Cdc8p nie występuje w podbłonowych rejonach zawierających sieci krótkich, rozgałęzionych filamentów (KOVAR i współaut. 2011). W przeciwieństwie do Cdc8p związanej z obrączką kurczliwą, która jest w większości acetylowana, cząsteczki Cdc8p oplatające kable aktynowe nie są acetylowane. Badania wykazały, że acetylowana Cdc8p stabilizuje filamente i zwiększa wiązanie drożdżowej miozyny II generującej skurcz pierścienia podziałowego, nie ma natomiast wpływu na aktywność miozyny V, zaangażowanej w transport wzdłuż kabli aktynowych (COULTON i współaut. 2010). Wiązanie miozyny I z aktyną jest hamowane przez Cdc8p, a to sprawia, że w komórkach obecność miozyny I jest ograniczona do rozgałęzionych filamentów aktynowych, nie zawierających Cdc8p (CLAYTON i współaut. 2010). Zatem, Cdc8p oraz jej acetylacja nie tylko regulują aktywności trzech różnych klas miozyn, ale również umożliwiają sortowanie miozyn do odpowiednich przedziałów komórkowych.

TROPOMIOZYN Y JAKO REGULATORY DYNAMICZNEJ POLIMERYZACJI I DEPOLIMERYZACJI AKTYNY

Obecność tropomiozyny na filamencie aktynowym jest kluczowym czynnikiem regulującym dostęp do aktyny dla białek wiążących, które kształtują architekturę filamentów aktynowych oraz kontrolują dynamikę polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny. W lamellipodium dynamikę filamentów zapewnia zestaw białek, wśród których kluczowe funkcje pełnią Arp2/3 i kofilina. Kompleks Arp2/3 przyłącza się do boku istniejącego filamentu, co prowadzi do powstania rozgałęzienia wydłużającego się od końca minus w kierunku końca plus. Dzięki rozgałęzieniom powstaje gęsta sieć podbłonowych filamentów w rejonie krawędzi wodzącej lamellipodium (PIZARRO-CERDA i współaut. 2017). Kofilina wiąże się pomiędzy podjednostkami ADP-aktyny sąsiadującymi wzdłuż tego samego łańcucha i powoduje ich skręcenie, co prowadzi do rozerwania długich filamentów i generowania wolnych końców, które, w zależności od dostępności monomerycznej aktyny, będą albo wydłużane albo skraca-

ne. Dodatkowo, kofilina wiąże monomeryczną ADP-aktynę i w ten sposób zmniejsza pulę G-aktyny wykorzystywanej do wzrostu filamentów w innych rejonach komórki. Konkurencja o G-aktynę pomiędzy kofiliną i innymi białkami wiążącymi monomer (m.in. profiliną) uwalnia część aktyny, która jest ponownie wbudowywana do filamentów (POLLARD i BORISY 2003, OSTROWSKA i MORACZEWSKA 2017). Wczesne badania wskazywały na to, że tropomiozyna, Arp2/3 i kofilina konkurują ze sobą o wiązanie do filamentów (BERNSTEIN i BAMBURG 1982, BLANCHON i współaut. 2001, ONO i ONO 2002), jednak szczegółowe analizy odsłoniły dość skomplikowany obraz regulacji dynamiki filamentów z udziałem tych białek.

Tropomiozyna wiąże się wzdłuż całego filamentu, jednak jako miejsce początkowego wiązania preferuje koniec minus, od którego rozpoczyna oplatanie filamentu. Zatem wiązanie Arp2/3 z końcem ostrym uniemożliwia przyłączenie tropomiozyny do nowo powstających rozgałęzień (HSIAO i współaut. 2015). Tropomiozyna nie wiąże się z dendrytycznie rozgałęzionymi sieciami filamentów, nawet gdy jest obecna w wysokich stężeniach. Sugeruje to, że działanie Arp2/3 nie ogranicza się tylko do końców zaokrąglonych, ale rozprzestrzenia się wzdłuż filamentów. Wzajemne wykluczanie się Arp2/3 i tropomiozyny nie polega więc na współzawodnictwie o miejsca wiązania na aktynie, a raczej na indukowaniu takiej zmiany w strukturze aktyny, która jest niekompatybilna z wiązaniem konkurencyjnego białka (BUGYI i współaut. 2010, HSIAO i współaut. 2015). W przestrzeni komórkowej prowadzi to do przestrzennego rozdzielania Arp2/3 i tropomiozyn, a w konsekwencji do powstawania filamentów o odmiennej architekturze (BLANCHON i współaut. 2001, DESMARAIS i współaut. 2002, BRAYFORD i współaut. 2016). Mechanizm regulacji dynamiki polimeryzacji filamentów przez Arp2/3 jest dodatkowo komplikowany przez istnienie w komórkach licznych izoform tropomiozyny. Chociaż większość badanych izoform hamuje aktywność Arp2/3, to znane są też takie, które promują tworzenie rozgałęzień (KIS-BICSKEI i współaut. 2013). Okazało się również, że Arp2/3 i tropomiozyny nie zawsze segregują do różnych przedziałów komórkowych. W lamellipodium komórek nerwowych i fibroblastów pewne izoformy tropomiozyny współistnieją z Arp2/3, z tym, że białka te nie wiążą się z tymi samymi filamentami. Uważa się, że obecność dwóch różnych typów filamentów jest istotna dla utrzymania odpowiedniej szybkości poruszania się migrujących komórek (BRYCE i współaut. 2003, BRAYFORD i współaut. 2016).

Działanie kofiliny ma dwojaki charakter. Obecna w dużych stężeniach kofilina wysyca filamety i usuwa z nich tropomiozynę (ONO i ONO 2002, ROBASZKIEWICZ i współaut. 2016). W niższych stężeniach kofiliny dominuje aktywność fragmentująca, która zwiększa liczbę wolnych końców filamentów i przez to wzmacnia wiązanie tropomiozyny (HSIAO i współaut. 2015). Większość izoform Tpm chroni filamety przed działaniem kofiliny, choć mechanizm ich działania jest różnicowany (ROBASZKIEWICZ i współaut. 2016, GATEVA i współaut. 2017, OSTROWSKA i współaut. 2017). Niektóre izoformy obecne w komórkach nerwowych wzmagają wiązanie i aktywność kofiliny. Wykazano, że w komórkach neuronów, w których indukowano nadprodukcję Tpm1.12, kofilina preferencyjnie wiąże się z filamentami oplecionymi tą właśnie izoformą (BRYCE i współaut. 2003). Badania *in vitro* nad aktywnością kofiliny ujawniły również, że charakterystyczna dla komórek nerwowych izoforma Tpm3.4 wyraźnie zwiększa fragmentującą aktywność kofiliny (OSTROWSKA i współaut. 2017).

Molekularny mechanizm wykorzystywany przez tropomiozyny w regulacji aktywności kofiliny przez tropomiozyny nie jest jeszcze w pełni poznany. Otrzymane do tej pory wyniki wskazują na to, że tropomiozyny mogą konkurować z kofiliną o miejsce wiązania na aktynie lub utrzymywać konformację aktyny, która nie sprzyja wiązaniu kofiliny. Taki model nie wyjaśnia jednak synergistycznego działania niektórych izoform tropomiozyny i kofiliny.

PODSUMOWANIE

Aktyna jest uniwersalnym i bardzo konserwatywnym białkiem, które w toku ewolucji nie podlegało większym zmianom. Zaskakująca jest zatem ogromna różnorodność funkcji komórkowych, które zależą od aktyny. Wytłumaczeniem tej pozornej sprzeczności jest konformacyjna plastyczność aktyny oraz tworzenie kompleksów z regulatorowymi białkami należącymi do licznej rodziny tropomiozyn. Wiążąc się wzdłuż filamentów aktynowych, tropomiozyny stabilizują aktynę w formie spolimeryzowanej i stoją na straży oddziaływań pomiędzy aktyną i białkami wiążącymi. Dzięki przełomowym odkryciom ostatnich lat poznaliśmy strukturę aktyny monomerycznej i filamentowej oraz jej kompleksu z tropomiozyną, co umożliwiło zrozumienie niektórych mechanizmów regulacji procesów zależnych od aktyny. Pełny opis powiązań pomiędzy strukturą i funkcją kompleksu aktyny z tropomiozynami wymaga jednak dalszych badań strukturalnych, biochemicznych i komórkowych.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję mgr Zofii Ostrowskiej za pomoc w przygotowaniu ryciny.

Streszczenie

Aktyna jest uniwersalnym białkiem o strukturze dobrze zachowanej w toku ewolucji. W komórkach aktyna istnieje w równowadze pomiędzy formą monomeryczną i filamentową. Pomimo zachowanej w toku ewolucji struktury, aktyna pełni zdumiewająco wiele różnorodnych funkcji. Jest to możliwe dzięki zdolności aktyny do oddziaływania z wieloma białkami, wśród których znajdują się motory miozynowe oraz białka regulujące dynamiczną polimeryzację i depolimeryzację aktyny. Nadrzędnymi regulatorami filamentów aktynowych są tropomiozyny, rodzina superhelikalnych białek, które polimeryzują wzdłuż filamentowej aktyny, dzięki czemu stabilizują filamety zapobiegając ich depolimeryzacji oraz kontrolują dostęp i aktywność białek wiążących aktynę. Tropomiozyny działają jako „stróże” filamentu, którzy kontrolują oddziaływanie aktyny, co prowadzi do segregacji białek wiążących aktynę do swoistych przedziałów komórkowych gdzie białka te realizują określone funkcje komórkowe. W artykule zostały omówione zależne od tropomiozyny mechanizmy regulacji oddziaływań aktyny z niektórymi miozynami oraz z Arp2/3 i kofiliną – białkami, które inicjują rozgałęzianie, polimeryzację i depolimeryzację filamentów aktynowych.

LITERATURA

- BALASUBRAMANIAN M. K., HELFMAN D. M., HEMMINGSEN S. M., 1992. *A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast S. pombe*. Nature 360, 84-87.
- BARUA B., 2013. *Periodicities designed in the tropomyosin sequence and structure define its functions*. Bioarchitecture 3, 51-56.
- BARUA B., WINKELMANN D. A., WHITE H. D., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2012. *Regulation of actin-myosin interaction by conserved periodic sites of tropomyosin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 18425-18430.
- BARUA B., NAGY A., SELLERS J. R., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2014. *Regulation of nonmuscle myosin II by tropomyosin*. Biochemistry 53, 4015-4024.
- 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.
- BLANCHOIN L., POLLARD T. D., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2001. *Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin*. Curr. Biol. 11, 1300-1304.
- BRAYFORD S., BRYCE N. S., SCHEVZOV G., HAYNES E. M., BEAR J. E., HARDEMAN E. C., GUNNING P. W., 2016. *Tropomyosin promotes lamellipodial persistence by collaborating with arp2/3 at the leading edge*. Curr. Biol. 26, 1312-1318.
- 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.
- BUGYI B., DIDRY D., CARLIER M. F., 2010. *How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based*

- motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach.* EMBO J. 29, 14-26.
- CARLIER M. F., PERNIER J., MONTAVILLE P., SHEKHAR S., KUHN S., CYTOSKELETON D., MOTILITY G., 2015. *Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility.* Cell. Mol. Life Sci. 72, 3051-3067.
- CLAYTON J. E., SAMMONS M. R., STARK B. C., HODGES A. R., LORD M., 2010. *Differential regulation of unconventional fission yeast myosins via the actin track.* Curr. Biol. 20, 1423-1431.
- CLAYTON J. E., POLLARD L. W., MURRAY G. G., LORD M., 2015. *Myosin motor isoforms direct specification of actomyosin function by tropomyosins.* Cytoskeleton 72, 131-145.
- COULTON A. T., EAST D. A., GALINSKA-RAKOCZY A., LEHMAN W., MULVIHILL D. P., 2010. *The recruitment of acetylated and unacetylated tropomyosin to distinct actin polymers permits the discrete regulation of specific myosins in fission yeast.* J. Cell. Sci. 123, 3235-3243.
- CREED S. J., BRYCE N., NAUMANEN P., WEINBERGER R., LAPPALAINEN P., STEHN J., GUNNING P., 2008. *Tropomyosin isoforms define distinct microfilament populations with different drug susceptibility.* Eur. J. Cell Biol. 87, 709-720.
- 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.
- DOMINGUEZ R., HOLMES K. C., 2011. *Actin structure and function.* Annu. Rev. Biophys. 40, 169-186.
- ESTES J. E., SELDEN L. A., KINOSIAN H. J., GERSHMAN L. C., 1992. *Tightly-bound divalent cation of actin.* J. Muscle Res. Cell Motil. 13, 272-284.
- FAN X., MARTIN-BROWN S., FLORENS L., LI R., 2008. *Intrinsic capability of budding yeast cofilin to promote turnover of tropomyosin-bound actin filaments.* PLoS One 3, e3641.
- FANNING A. S., WOLENSKI J. S., MOOSEKER M. S., IZANT J. G., 1994. *Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanochemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms.* Cell Motil. Cytoskeleton 29, 29-45.
- FATTOUM A., HARTWIG J. H., STOSSEL T. P., 1983. *Isolation and some structural and functional properties of macrophage tropomyosin.* Biochemistry 22, 1187-1193.
- FOWLER V. M., SUSSMANN M. A., MILLER P. G., FLUCHER B. E., DANIELS M. P., 1993. *Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle.* J. Cell Biol. 120, 411-420.
- FUJII T., IWANE A. H., YANAGIDA T., NAMBA K., 2010. *Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy.* Nature 467, 724-728.
- GATEVA G., KREMNEVA E., REINDL T., KOTILA T., KOGAN K., GRESSIN L., GUNNING P. W., MANSTEIN D. J., MICHELOT A., LAPPALAINEN P., 2017. *Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations in vitro.* Curr. Biol. 27, 705-713.
- GEEVES M. A., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., GUNNING P. W., 2015. *A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms.* J. Muscle Res. Cell Motil. 6, 147-153.
- GIMONA M., 2008. *Dimerization of tropomyosins.* Adv. Exp. Med. Biol. 644, 73-84.
- GORDON A. M., HOMSHER E., REGNIER M., 2000. *Regulation of contraction in striated muscle.* Physiol. Rev. 80, 853-924.
- GUNNING P., O'NEILL G., HARDEMAN E., 2008. *Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space.* Physiol. Rev. 88, 1-35.
- HEISSLER S. M., MANSTEIN D. J., 2013. *Nonmuscle myosin-2: mix and match.* Cell. Mol. Life Sci. 70, 1-21.
- HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2008. *Tropomyosin: function follows structure.* Adv. Exp. Med. Biol. 644, 60-72.
- HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., SINGH A., 2010. *What makes tropomyosin an actin binding protein? A perspective.* J. Struct. Biol. 170, 319-324.
- HODGES A. R., KREMENTSOVA E. B., BOOKWALTER C. S., FAGNANT P. M., SLADEWSKI T. E., TRYBUS K. M., 2012. *Tropomyosin is essential for processive movement of a class V myosin from budding yeast.* Curr. Biol. 22, 1410-1416.
- HOLMES K. C., POPP D., GEBHARD W., KABSCH W., 1990. *Atomic model of the actin filament.* Nature 347, 44-49.
- HSIAO J. Y., GOINS L. M., PETEK N. A., MULLINS R. D., 2015. *Arp2/3 complex and cofilin modulate binding of tropomyosin to branched actin networks.* Curr. Biol. 25, 1573-1582.
- HUNDT N., STEFFEN W., PATHAN-CHHATBAR S., TAFT M. H., MANSTEIN D. J., 2016. *Load-dependent modulation of non-muscle myosin-2A function by tropomyosin 4.2.* Sci. Rep. 6, 20554.
- ISHIKAWA R., YAMASHIRO S., MATSUMURA F., 1989a. *Annealing of gelsolin-severed actin fragments by tropomyosin in the presence of Ca²⁺. Potentiation of the annealing process by caldesmon.* J. Biol. Chem. 264, 16764-16770.
- ISHIKAWA R., YAMASHIRO S., MATSUMURA F., 1989b. *Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon.* J. Biol. Chem. 264, 7490-7497.
- KABSCH W., MANNHERZ H. G., SUCK D., PAI E. F., HOLMES K. C., 1990. *Atomic structure of the actin: DNase I complex.* Nature 347, 37-44.
- KALYVA A., SCHMIDTMANN A., GEEVES M. A., 2012. *In vitro formation and characterization of the skeletal muscle $\alpha\beta$ tropomyosin heterodimers.* Biochemistry 51, 6388-6399.
- KIS-BICSKEI N., VIG A., NYITRAI M., BUGYI B., TALIAN G. C., 2013. *Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin.* Cytoskeleton 70, 755-765.
- KOVAR D. R., SIROTKIN V., LORD M., 2011. *Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton.* Trends. Cell Biol. 21, 177-187.
- MCINTOSH B. B., OSTAP E. M., 2016. *Myosin-I molecular motors at a glance.* J. Cell Sci. 129, 2689-2695.
- MCKILLOP D. F., GEEVES M. A., 1993. *Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament.* Biophys. J. 65, 693-701.
- MORACZEWSKA J., WAWRO B., SEGURO K., STRZELCKA-GOLASZEWSKA H., 1999. *Divalent cation-, nucleotide-, and polymerization-dependent changes in the conformation of subdomain 2 of actin.* Biophys. J. 77, 373-385.
- MURAKAMI K., YASUNAGA T., NOGUCHI T. Q., GOMIBUCHI Y., NGO K. X., UYEDA T. Q., WAKABAYASHI T., 2010. *Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release.* Cell 143, 275-287.

- NAKANO K., MABUCHI I., 2006. *Actin-depolymerizing protein Adf1 is required for formation and maintenance of the contractile ring during cytokinesis in fission yeast*. *Mol. Biol. Cell* 17, 1933-1945.
- ODA T., IWASA M., AIHARA T., MAEDA Y., NARITA A., 2009. *The nature of the globular- to fibrous-actin transition*. *Nature* 457, 441-445.
- ONO S., ONO K., 2002. *Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics*. *J. Cell Biol.* 156, 1065-1076.
- OSTAP E. M., 2008. *Tropomyosins as discriminators of myosin function*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 644, 273-282.
- OSTROWSKA Z., MORACZEWSKA J., 2017. *Cofilin - a protein controlling dynamics of actin filaments*. *Post. Hig. Med. Dosw.* 71, 339-351.
- OSTROWSKA Z., ROBASZKIEWICZ K., MORACZEWSKA J., 2017. *Regulation of actin filament turnover by cofilin-1 and cytoplasmic tropomyosin isoforms*. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 88-98.
- PATHAN-CHHATBAR S., TAFT M. H., REINDL T., HUNDT N., LATHAM S. L., MANSTEIN D. J., 2018. *Three mammalian tropomyosin isoforms have different regulatory effects on nonmuscle myosin-2B and filamentous beta-actin in vitro*. *J. Biol. Chem.* 293, 863-875.
- PIZARRO-CERDA J., CHOREV D. S., GEIGER B., COSART P., 2017. *The Diverse Family of Arp2/3 Complexes*. *Trends Cell Biol.* 27, 93-100.
- POLLARD L. W., LORD M., 2014. *Getting myosin-V on the right track: tropomyosin sorts transport in yeast*. *Bioarchitecture* 4, 35-38.
- POLLARD T. D., WEEDS A. G., 1984. *The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin*. *FEBS Lett.* 170, 94-98.
- POLLARD T. D., BORISY G. G., 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell* 112, 453-465.
- REISLER E., EGELMAN E. H., 2007. *Actin structure and function: what we still do not understand*. *J. Biol. Chem.* 282, 36133-36137.
- ROBASZKIEWICZ K., OSTROWSKA Z., MARCHLEWICZ K., MORACZEWSKA J., 2016. *Tropomyosin isoforms differentially modulate the regulation of actin filament polymerization and depolymerization by cofilins*. *FEBS J.* 283, 723-737.
- SCHLEICHER M., JOCKUSCH B. M., 2008. *Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments*. *Histochem. Cell Biol.* 129, 695-704.
- SHUTOVA M. S., SPESSOTT W. A., GIRAUDO C. G., SVITKINA T., 2014. *Endogenous species of mammalian nonmuscle myosin IIA and IIB include activated monomers and heteropolymers*. *Curr. Biol.* 24, 1958-1968.
- SKAU C. T., NEIDT E. M., KOVAR D. R., 2009. *Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast*. *Mol. Biol. Cell* 20, 2160-2173.
- SQUIRE J. M., PAUL D. M., MORRIS E. P., 2017. *Myosin and Actin Filaments in Muscle: Structures and Interactions*. *Subcell. Biochem.* 82, 319-371.
- STARK B. C., SLADEWSKI T. E., POLLARD L. W., LORD M., 2010. *Tropomyosin and myosin-II cellular levels promote actomyosin ring assembly in fission yeast*. *Mol. Biol. Cell* 21, 989-1000.
- STRAND J., NILI M., HOMSHER E., TOBACMAN L.S. 2001. *Modulation of myosin function by isoform-specific properties of Saccharomyces cerevisiae and muscle tropomyosins*. *J. Biol. Chem.* 276, 34832-34839.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., MORACZEWSKA J., KHAITLINA S. Y., MOSSAKOWSKA M., 1993. *Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion*. *Eur. J. Biochem.* 211, 731-742.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., WOZNIAK A., HULT T., LINDBERG U., 1996. *Effects of the type of divalent cation, Ca²⁺ or Mg²⁺, bound at the high-affinity site and of the ionic composition of the solution on the structure of F-actin*. *Biochem. J.* 316, 713-721.
- SZENT-GYORGYI A. G., 2004. *The early history of the biochemistry of muscle contraction*. *J. Gen. Physiol.* 123, 631-641.
- ŚLIWIŃSKA M., ROBASZKIEWICZ K., CZAJKOWSKA M., ZHENG W., MORACZEWSKA J., 2018. *Functional effects of substitutions I92T and V95A in actin-binding periods 3 of tropomyosin*. *Biochem. Biophys. Acta* 1866, 558-568.
- TANG N., OSTAP E. M., 2001. *Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1)*. *Curr. Biol.* 11, 1131-1135.
- TOJKANDER S., GATEVA G., LAPPALAINEN P., 2012. *Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles*. *J. Cell Sci.* 125, 1855-1864.
- VIBERT P., CRAIG R., LEHMAN W., 1997. *Steric-model for activation of muscle thin filaments*. *J. Mol. Biol.* 266, 8-14.
- VINDIN H., GUNNING P., 2013. *Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34, 261-274.
- VON DER ECKEN J., MULLER M., LEHMAN W., MANSTEIN D. J., PENCZEK P. A., RAUNSER S., 2015. *Structure of the F-actin-tropomyosin complex*. *Nature* 519, 114-117.
- WAWRO B., GREENFIELD N. J., WEAR M. A., COOPER J. A., HIGGS H. N., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 2007. *Tropomyosin regulates elongation by formin at the fast-growing end of the actin filament*. *Biochemistry* 46, 8146-8155.
- WEGNER A., 1976. *Head to tail polymerization of actin*. *J. Mol. Biol.* 108, 139-150.

KOSMOS Vol. 67, 1, 31–41, 2018

JOANNA MORACZEWSKA

*Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Natural Sciences, Kazimierz Wielki University, 12 Poniatowski Str.,
85-671 Bydgoszcz, E-mail: joanna.moraczewska@ukw.edu.pl*

THIN FILAMENTS AND MICROFILAMENTS – FUNCTIONAL COMPLEXES OF ACTIN AND TROPOMYOSIN

Summary

Actin is a universal protein highly conserved in evolution. In cells, actin exists in equilibrium between a monomeric and filamentous form. In spite of a conservative structure, actin plays amazingly versatile functions. This is possible due to its interactions with numerous actin-binding proteins, among them with myosin motors and proteins regulating dynamic polymerization and depolymerization of actin. Tropomyosins, superhelical proteins, which polymerize along the filament and stabilize actin by preventing its depolymerization, are superior actin filament regulators. Tropomyosins control the access and activity of various actin-binding proteins. Tropomyosins act thus as actin “gate-keepers” which control actin interactions leading to the segregation of actin-binding proteins into specific cell compartments where they perform specific cellular functions. This article discusses tropomyosin-dependent mechanisms of regulation of actin interactions with some myosins as well as Arp2/3 and cofilin – the proteins, which initiate branching, polymerization and depolymerization of actin filaments.

Key words: actin, dynamics, filament, regulation, tropomyosin