

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

MARIA JOLANTA REDOWICZ

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Zakład Biochemii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Pasteura 3, 02-093 Warszawa E-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

# MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE AKTYNY

## WPROWADZENIE

Aktyna to jedno z białek najobficiej występujących u eukariontów, stanowi bowiem 10-20% całkowitej ilości białka, w zależności od typu komórki. Choć wykryta początkowo w mięśniu szkieletowym, występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych, od pierwotniaków i grzybów, po rośliny i kręgowce, stanowiąc integralną część cytoszkieletu (POLLARD i COOPER 2009, BLANCHOIN i współaut. 2014). Homologi aktyny wykryto również w bakteriach (SHAEVITZ i GITAI 2010). U ludzi aktyna jest kodowana przez sześć genów:

 ACTA1, kodujący izoformę a występującą w mięśniu poprzecznie prążkowanym;

 – ACTA2 i ACTA3 (ACTG2) kodujące, odpowiednio, izoformy α i γ występujące w mięśniach gładkich, przy czym ACTA3 występuje w mięśniówce gładkiej układu pokarmowego;

 ACTC1, kodujący izoformę a występującą w mięśniu sercowym;

– ACTB i ACTG1 kodujące tzw. cytoplazmatyczne aktyny, odpowiednio  $\beta$  i  $\gamma$  (VAN-DEKERCKHOVE i WEBER 1978, HERMAN 1993, PERRIN i ERVASTI 2010).

Masa cząsteczkowa wszystkich znanych izoform aktyny wynosi około 42,3 kDa; składa się na nią, w zależności od izoformy i pochodzenia białka, od 375 do 377 reszt aminokwasowych. Zarówno sekwencje genów, jak i kodowanych przez nie izoform aktyny są wysoce zachowane w toku ewolucji i wykazują około 90% identyczności pomiędzy poszczególnymi białkami (VANDEKERCKHOVE i WEBER 1978, HERMAN 1993, PERRIN i ERVA-

Słowa kluczowe: aktyna, cytoszkielet, filament, regulacja

STI 2010). Także struktura trzeciorzędowa wszystkich znanych aktyn jest bardzo zbliżona. Dzięki poznaniu struktury krystalicznej tego globularnego białka, w aktynie wyróżniono 4 subdomeny, które są zaangażowane bądź w oddziaływania niekowalencyjne pomiędzy monomerami w tworzonym przez aktyne filamencie (monomery w filamencie zwane są protomerami), bądź w oddziaływania z innymi białkami, determinującymi stan organizacji aktyny (Ryc. 1A). W szczelinie (zwanej również katalityczną) pomiędzy subdomenami, znajdują się miejsca wiązania kationów dwuwartościowych i nukleotydów. Ich związanie oraz zdolność do hydrolizy ATP do ADP i ortofosforanu (P<sub>i</sub>) są niezbędne dla utrzymania prawidłowej konformacji aktyny, a więc i funkcji białka (OTTERBEIN i współaut. 2001). Aktyna występuje w dwóch zasadniczych formach: monomerycznej (globularnej, G-aktyna) i filamentowej (F-aktyna) (Ryc. 1A i B), a przejście pomiędzy obiema formami jest procesem niezwykle dynamicznym i ściśle regulowanym w komórce przez liczne białka wiążące aktynę (ang. actin--binding proteins) (ODA i współaut. 2009, POLLARD i COOPER 2009, BLANCHOIN i współaut. 2014). Grubość filamentów tworzonych przez aktynę wynosi ok. 7 nm, a ich długość może osiągać nawet kilka µm. Tworzą one podwójną prawoskretną helisę o skręcie około 166°, w której każdy protomer oddziałuje siłami niekowalencyjnymi z czterema sąsiednimi. Podstawową jednostką filamentu, o długości około 37 nm, jest para siedmiu protomerów przypadających na jeden skręt helisy (Ryc. 1B).



Ryc. 1. Budowa i organizacja aktyny w komórce.

A - Schemat struktury krystalicznej monomeru aktyny ze związanym ADP w kieszeni katalitycznej. Subdomeny są wyróżnione następującymi kolorami: pierwsza - fiolet; druga - zielony; trzecia - żółty i czwarta - czerwony. Czerwone kulki, jony Ca2+ związane przez monomer aktyny w subdomenach 1, 2 i 4 oraz w kieszeni katalitycznej obok związanego nukleotydu. TMR, (tetrametylorodamino-5-maleimid) przyłączony kowalencyjnie do reszty Cys-374 w celu zapobieżenia polimeryzacji uniemożliwiającej otrzymanie kryształu aktyny. Struktura zdeponowana w bazie PDBj jako 1J6Z przez OTTERBEIN i współaut.(2001). B - Schemat budowy filamentu aktynowego w oparciu o strukturę krystaliczną monomeru. Poszczególne monomery w filamencie (protomery) zaznaczone są różnymi kolorami. Schemat przedstawia podstawową jednostkę filamentu. C - Organizacja filamentów aktynowych (wyznakowanych znacznikiem fluorescencyjnym Alexa488 skoniugowanym z faloidyną, mikotosyną specyficznie wiążącą się z filamentami aktyny) w migrującej komórce glioblastoma U251-MG. Schematy przedstawiają organizację filamentów w zaznaczonych rejonach komórki. Kolorem fioletowym oznaczono miejsce przyczepu włókien naprężeniowych w strukturach adhezyjnych. Jądro komórkowe wybarwiono znacznikiem fluorescencyjnym DAPI (kolor niebieski). Przekrój komórki (o grubości 0,5 µm) uzyskano w konfokalnym mikroskopie fluorescencyjnym przez mgr Olenę Karatsai, doktorantkę w pracowni kierowanej przez autorkę artykułu. Skala, 20 µm. Rycinę przygotowano w oparciu o adaptację ilustracji zawartych w artykułach: A, OTTERBEIN i współaut. (2001); B, ODA i współaut. (2009) i C, BLANCHOIN i współaut. (2014).

Podobnie jak mikrotubule, filamenty aktynowe są spolaryzowane, tzn. mają nierównocenne końce (patrz KŁOPOCKA oraz JAWOR-SKI w tym zeszycie KOSMOSU). Wyróżnia się (i) koniec ostry (ang. pointed-end), w którym protomery zawierają ADP, do którego kolejne monomery ATP-aktyny przyłączają się wolno, stąd zwany jest on również końcem wolno rosnacym lub końcem minus oraz (ii) koniec kolczasty (ang. barbed-end), zwany także końcem brodatym, w którym protomery zawierają ATP, do którego kolejne monomery ATP-aktyny przyłączają się szybko, stąd jego nazwa koniec szybko rosnący lub koniec plus (Ryc. 1B). W komórce końce kolczaste filamentów znajdują się z reguły w pobliżu błony komórkowej oraz błon organelli i pęcherzyków lipidowych (ODA i współaut. 2009, POLLARD i COOPEr 2009, BLANCHOIN i współaut. 2014).

Filamenty aktynowe nie tylko pełnią funkcję podporową i swoistego łącznika po-

między błoną komórkową a wnętrzem komórki (jest to możliwe dzięki bezpośredniemu lub pośredniemu oddziaływaniu aktyny z białkami błonowymi), ale wspólnie z miozyną biorą również udział w aktywności kurczliwej komórek (w tym mięśni). Filamenty aktynowe stanowią również tory, po których, przy udziale miozyn niekonwencjonalnych (POL-LARD i COOPER 2009; patrz SUSZEK i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU), przenoszone są ładunki (cargo), którymi mogą być pęcherzyki, organelle i kompleksy białkowe. Wykazano także obecność aktyny w jądrze komórkowym i jej zaangażowanie w regulacji transkrypcji i transporcie w nukleoplazmie (BELIN i MULLINS 2013; patrz NOWAK i REDO-WICZ w tym zeszycie KOSMOSU). Filamenty tworzone przez aktynę w mięśniu wraz ze związanymi z nią białkami noszą nazwę filamentów cienkich; ich odpowiednikiem w komórkach niemieśniowych sa mikrofilamenty. Mikrofilamenty tworzą supramolekularne



Ryc. 2. Schemat reakcji modyfikujących reszty aminokwasowe aktyny (na zielono).

Wzory/skróty przyłączonych związków/białek oraz możliwe modyfikacje typu redox grup tiolowych zaznaczono kolorem czerwonym. Schemat inspirowany ryciną w artykule przeglądowym TERMAN I KASHINA (2013).

struktury, takie jak sieci aktynowe występujące głównie w krawędzi wiodącej migrującej komórki (lamellipodium) i pod błoną komórkową (ang. cortex), wiązki filamentów (ang. actin bundles) obecne głównie w filopodiach oraz włóknach naprężeniowych (ang. stress fibers), niezbędnych dla generacji siły umożliwiającej translokację komórki (Ryc. 1C) (BLANCHOIN i współaut. 2014). Powstawanie tych złożonych struktur jest możliwe dzięki precyzyjnie regulowanemu i dynamicznemu oddziaływaniu mikrofilamentów z całą plejadą białek wiążących filamenty aktynowe (POLLARD i COOPER 2009). Funkcje aktyny w komórce sa również modulowane/regulowane przez modyfikacje potranslacyjne, którym ulega to białko (TERMAN i KASHINA 2013). Wpływowi tych najczęściej odwracalnych modyfikacji kowalencyjnych na funkcje aktyny poświęcony jest niniejszy artykuł.

### ACETYLACJA

Acetylacja białek to proces przyłączania reszty acetylowej, pochodzącej z acetylo-CoA, do białka w miejsce aktywnego atomu wodoru w bocznej grupie funkcyjnej (najczęściej aminowej) reszty aminokwasowej białka (Ryc. 2). Najczęściej acetylacji ulegają reszty lizynowe, ale inne reszty również mogą być acetylowane.

Pierwsze informacje o acetylacji aktyny pochodzą z końca lat 70. XX w., kiedy to podczas sekwencjonowania aktyn cytoplazmatycznych poprzez hydrolizę aminokwasów zaobserwowano, że na końcu aminowym znajduje się reszta acetylowa, zamiast (VANDEKERCKHOVE spodziewanej metioniny i WEBER 1978). Obecnie wiadomo, że poza Met-1 i Glu-2, acetylowanych może być osiem innych reszt aminokwasowych (Tabela 1). Acetylację aktyny katalizują acetylotransferazy, które w przypadku acetylacji reszt na końcu aminowym są wspomagane przez aminopeptydazy, które odcinają Met-1. Natomiast proces odwrotny katalizują deacetylazy, przy czym nie są to enzymy specyficzne dla aktyny. I tak np. deacetylacja aktyny przez deacetylazę histonu HDAC6 prowadzi do przebudowy cytoszkieletu aktynowego, zaś acetylacja aktyny obecnej w jądrze komórkowym przez acetylotransferazę histonu reguluje udział aktyny w procesie transkrypcji (KOVACS i współaut. 2004, MOT-TET i CASTRONOVO 2008, STARHEIM i współaut. 2012, TERMAN i KASHINA 2013). U zdecydowanej większości gatunków acetylacja na końcu aminowym jest niezbędna dla zachowania struktury i funkcji aktyny (TER-MAN i KASHINA 2013). W przypadku izoform mięśniowych zaobserwowano, że acetylacja przyspiesza oddziaływanie aktyny z miozyną oraz może warunkować ubikwitynację aktyny, determinujac dalsze losy białka w ko-mórce (TERMAN i KASHINA 2013). Natomiast w przypadku organizmów niższych, wpływ tej modyfikacji jest zróżnicowany. Dla przykładu, u Drosophila melanogaster nie dochodzi do acetylacji jednej z izoform aktyny mięśniowej (ACT88F) (SCHMITZ i współaut. 2000), a u drożdży Saccharomyces cerevisiae acetylacja wprawdzie zachodzi, ale nie jest niezbędna dla funkcjonowania aktyny (COOK i współaut. 1991).

### ADP-RYBOZYLACJA

ADP-rybozylacja to przyłączenie reszty ADP-rybozylowej z dinukleotydu nikotyno--amidoadeninowego do reszt aminokwasowych białka; najczęściej modyfikowana jest reszta arginylowa (Tabela 1, Ryc. 2). Proces ten katalizują ADP-rybozylotransferazy, syn-

Modyfikacja	Zidentyfikowane modyfikowane reszty aminokwasowe			
Acetylacja	Met -1, Asp/Glu-2, Asp-3, Lys-50, Lys-61, Lys-68, Lys-191, Lys-326, Lys-328			
ADP-rybozylacja	Arg-28, Arg-95, Thr-148, Arg-177, Arg-206, Arg-372			
Arginylacja	Asp-3, Ser-52, Ile-87, Phe-90, Gly-152, Leu-295, Asn-299			
Fosforylacja	<ul> <li>Ser-14, Ser-33, Ser-52, Tyr-53, Ser-60, Thr-66, Tyr-69, Thr-89, Tyr-91, Thr-148, Thr-160, Thr-162, Tyr-166, Tyr-169, Thr-186, Tyr-188, Tyr-198, Ser-199, Thr/Ser-201, Thr-202, Thr-203, Tyr-218, Thr-229, Ser-233, Ser-239, Tyr-240, Thr-262, Tyr-294, Thr-297, Tyr-306, Thr-318, Ser-323, Ser-324, Tyr-362, Ser-365</li> </ul>			
Glutationylacja	Cys-217, <b>Cys-374</b>			
O-Glikozylacja	Ser-52, Ser-155, Ser-199, Ser-232, Ser-323, Ser-368			
Isoaspartylacja	Asp-25, Asp-179			
Karbonylacja	His-40, His-87, His-173, <b>Cys-374</b>			
Malonylacja	Lys-61			
Metylacja	His-73, Ile-87, Asn-299, Lys-326			
Nitracja	Tyr-53, <b>Tyr-69</b> , Tyr-91, Tyr-198, Tyr-218, Tyr-240, Tyr-294, Tyr-362			
Nitrozylacja	Cys-217, Cys-257, Cys-285, <b>Cys-374</b>			
Oksydacja	Met-44, Met-47, Trp-79, Met-82, Trp-86, Met-178, Met-190, Cys-217, Met-227, Cys-2 Met-269, Cys-272, Cys-285, Met-325, Trp-340, Met-355, Trp-356, Cys-374			
Sieciowanie	Lys-50 (z Glu-270 w sąsiadującym protomerze)			
SUMO-ilacja	Lys-68, <b>Lys-284</b>			
Transglutaminacja	Gln-41			
Ubikwitynacja	Lys-50, Lys-61, Lys-68, Lys-84, Lys-113, <b>Lys-118</b> , Lys-191, Lys-291, Lys-315, Lys-3 Lys-328			

Tabela	1.	Modyfikacje	potranslacyjne	aktyny.*

\*Modyfikacje reszt oznaczonych pogrubioną czcionką mają znaczenie dla funkcji aktyny.

tetyzowane przez patogeny bakteryjne i eukariotyczne, aczkolwiek obecność tych transferaz stwierdzono w szeregu tkanek i komórek prawidłowych, np. w mózgu i mięśniach oraz w płytkach krwi (OKAZAKI i MOSS 1996). W przypadku ADP-rybozylotransferazy patogenów, najlepiej poznana jest toksyna C2 laseczki jadu kiełbasianego (Clostridium botulinum), która ADP-rybozyluje reszte Arg-177 (zlokalizowaną w subdomenie 3) w monomerach aktyn cytoplazmatycznych. Powoduje to zahamowanie polimeryzacji aktyny, co prowadzi do dezorganizacji sieci aktynowej i do zaokrąglania się komórek, a w konsekwencji do ich śmierci. Jest to jeden z mechanizmów związanych z toksycznością jadu kiełbasianego (MONTECUCCO i RASOTTO 2015). Zaobserwowano również, że modyfikowana aktyna blokuje polimeryzację niemodyfikowanego białka poprzez przyłączanie się (przykrywanie, ang. capping) do końca szybko rosnącego niemodyfikowanej aktyny. Ponadto, ADP-rybozylacja reszty Arg-177 wpływa na aktywność ATPazowa aktyny i jej oddziaływanie z żelsoliną, białkiem wpływającym m.in. na zdolność inicjacji aktyny do tworzenia filamentów, czyli na proces nukleacji filamentów. Z kolei modyfikacja reszty Thr-148 przez ADP-rybozylotransferazę TccC3 z *Photorhabdus luminescens*, śmiertelnego patogenu owadów, powoduje zwiększenie puli F-aktyny.

ADP-rybozylacji katalizowanej Wpływ przez enzymy syntetyzowane w komórkach eukariotycznych zależy od rodzaju toksyny i miejsca modyfikacji. ADP-rybozylotransferaza A otrzymana z erytrocytów indyka, modyfikująca reszty Arg-95 i Arg-372 (obie zlokalizowane w subdomenie 1), wpływa jedynie na proces nukleacji filamentów i w konsekwencji spowalnia proces polimeryzacji (JUST i współaut. 1995). Natomiast ADP-rybozylotransferaza z granulocytów kurczaka, modyfikująca reszty Arg-28 i Arg-206, blokuje polimeryzację i wiązanie przez aktynę DNazy I, przy czym to modyfikacja reszty Arg-206 (zlokalizowanej w subdomenie 4 cząsteczki aktyny) wydaje się wywierać negatywne skutki. Może to wynikać z faktu, że reszta Arg-206 ulega ADP-rybozylacji w aktynie monomerycznej, a reszta Arg-28 (zlokalizowana w subdomenie 1) jest modyfikowana w aktynie filamentowej (Tabela 1) (TERASHIMA i współaut. 1995).

Przyłączone reszty ADP-rybozylowe usuwane są przez hydrolazę ADP-rybozyloaktyny, natomiast niewiele wiadomo o mechanizmie działania tego enzymu (OKAMOTO i współaut. 1997, AKTORIES i współaut. 2011).

#### ARGINYLACJA

Arginylacja to wciąż mało poznany proces przenoszenia reszty arginylowej na reszty aminokwasowe w łańcuchu polipeptydowym białek (Ryc. 2), który zachodzi przy udziale transferazy arginylowej Ate1 (KASHINA 2006). Niewiele wiadomo o mechanizmach dearginylacji i uczestniczących w tym procesie enzymach; in vitro wykazano, że mogą to być amino- lub karboksypeptydazy w przypadku, gdy arginylowana jest reszta na, odpowiednio, aminowym lub karboksylowym końcu łańcucha polipeptydowego albuminy (WANG i współaut. 2014). Badania ostatniej dekady wykazały, że wiele białek ulega arginylacji, z czego około 30% to białka cytoszkieletalne, w tym izoforma  $\beta$  aktyny (WONG i współaut. 2007). Dane uzyskane przy użyciu spektrometrii mas wykazały, że arginylacji ulegają głównie reszty kwasu asparaginowego (Asp-2 i/lub Asp3) znajdujące się na końcu aminowym β-aktyny (KASHINA 2006). Arginylacja wpływa na wydłużanie się filamentów i zapobiega tworzeniu przez nie wiązek i agregatów. Wykazano, że obniżenie poziomu, bądź wręcz zahamowanie możliwości arginylacji białek (w tym aktyny) prowadzi do zaburzenia migracji komórek i skurczu mięśni (KA-RAKOZOVA i współaut. 2006, RAI i współaut. 2008, KUROSAKA i współaut. 2010). Myszy nie syntetyzujące Ate1 (Ate1-KO) umierały z powodu defektów mięśnia sercowego, naczyń krwionośnych i grzebienia nerwowego (KWON i współaut. 2002, KUROSAKA i współaut. 2010). Z kolei w fibroblastach zauważono rozpad lamellipodium krawędzi wiodącej oraz spadek ilości F-aktyny, bez istotnych zmian w poziomie całkowitej aktyny (SAHA i współaut. 2010). Wprowadzenie do komórek Ate1-KO arginylowanej β-aktyny przywracało zdolność do tworzenia krawędzi wiodącej i migracji. Wykazano, że niearginylowana aktyna nie jest w stanie tworzyć sieci, typowej dla podbłonowej strefy lamellipodium, stąd zapewne obserwowane zmiany na froncie komórek. Co ciekawe, reszta Asp-2 ulega również acetylacji; obie te modyfikacje wzajemnie się wykluczają i decyzja, która z grup, acetylowa czy arginylowa, zostanie przyłączona zachodzi prawdopodobnie kotranslacyjnie w kontekście stanu funkcjonalnego komórki.

Szereg innych reszt aminokwasowych  $\beta$ -aktyny także ulega arginylacji (Tabela 1).

Uważa się, że modyfikacja tych reszt może wpływać na proces polimeryzacji aktyny i jej oddziaływania z białkami wiążącymi aktynę. Wciąż jednak niewiele wiemy, kiedy i w jaki sposób arginylowane są reszty znajdujące się we wnętrzu cząsteczki  $\beta$ -aktyny.

Choć  $\gamma$ -aktyna może być również arginylowana, to jednak wysoce specyficzny dla tej izoformy aktyny mechanizm usuwa arginylowane białko już na poziomie translacji, tak aby jego arginylowana forma nie była obecna w komórce (ZHANG i współaut. 2010). Wciąż niewiele wiadomo dlaczego tak się dzieje, zwłaszcza że obie cytoplazmatyczne aktyny, tzn.  $\beta$ - i  $\gamma$ -aktyna mają bardzo podobne i wręcz wymienne funkcje.

### FOSFORYLACJA

Fosforylacja białek, czyli kowalencyjne przyłączenie reszty fosforanowej do reszt aminokwasowych (Ryc. 2), jest najczęściej występującą modyfikacją potranslacyjną, kontrolującą większość procesów zachodzących w komórkach. Enzymami, które katalizują fosforylację są kinazy, które przenoszą grupę fosforanową z ATP na grupę wodorotlenową w najczęściej fosforylowanych resztach seryny, treoniny lub tyrozyny. Aktyny również ulegają fosforylacji. Dotychczas zidentyfikowano fosforylację 35 reszt aminokwasowych (Tabela 1). O ile dość dużo wiadomo o wpływie fosforylacji aktyny na jej strukturę i funkcje u śluzowców, to wciąż niewiele wiemy o roli tej potranslacyjnej modyfikacji w aktynie u innych organizmów (TERMAN i KASHINA 2013).

Najlepiej scharakteryzowana jest fosforylacja aktyny śluzowców: Dictyostelium discoideum i Physarum polycephalum. W przypadku aktyny Dictyostelium fosforylacja zachodzi na reszcie Tyr-53, znajdującej się w pobliżu pętli wiążącej DNazę I, ważnej dla oddziaływań pomiędzy protomerami aktyny w filamencie (BENDER i współaut. 1976). Fosforylacja tej reszty wpływa na proces polimeryzacji, prawdopodobnie przez stabilizację pętli D poprzez tworzenie wiązań wodorowych z grupą fosforanową oraz zaburza oddziaływanie z profiliną. Fosforylacja reszty Tyr-53 wydaje się być kluczowa dla tego organizmu, w jego odpowiedzi na specyficzne bodźce prowadzące do stanu uśpienia (tworzenie zarodników). W przypadku Physarum fosforylacji z udziałem zależnej od jonów Ca2+ kinazy aktynowo-fragminowej (AFK) ulegają trzy reszty treoninowe (Thr 201-203). Za proces odwrotny, defosforylację, odpowiadają fosfatazy z grup PP1 i PP2A (WAELKENS i współaut. 1995). Fosforylowane reszty są zachowane w toku

ewolucji i znajdują się na końcu ostrym, w obrebie subdomeny 4 (Ryc. 1A), a ich fosforylacja prowadzi do przyśpieszenia etapu wydłużenia filamentów poprzez osłabienie oddziaływania aktyny z fragminą, jednym z białek regulujących proces polimeryzacji (WAELKENS i współaut. 1995). Sugeruje się również, że modyfikacja tych reszt może ułatwiać dodawanie monomerów do końca ostrego, do którego przyłączanie zachodzi dużo wolniej niż w przypadku końca kolczastego. Podobnie jak w przypadku aktyny Dictyostelium, u Physarum fosforylacja jest elementem odpowiedzi na bodźce związane z przejściem śluzowca w stan uśpienia i może stanowić mechanizm adaptacyjny, modulujący przejście pomiędzy sporulacją i kiełkowaniem, przez umożliwienie szybkiej reorganizacji aktyny. Podobny efekt wywołuje w tych komórkach fosforylacja z udziałem kinazy kazeinowej I, która fosforyluje te same reszty treoninowe (TERMAN i KASHI-NA 2013).

W przypadku aktyny ssaków zdecydowana większość informacji o miejscach fosforylacji pochodzi z analiz proteomicznych, prowadzonych na różnych rodzajach komórek, w warunkach prawidłowych i patologicznych oraz w odpowiedzi komórek na różne bodźce (TERMAN i KASHINA 2013). W przypadku β-aktyny stwierdzono fosforylacje tych samych reszt, co u wspomnianych tu śluzowców, a ogrom informacji na ten temat, przekracza ramy niniejszego opracowania (TERMAN i KASHINA 2013). Przykładowo, zauważono, że fosforylacja szeregu reszt serynowych i treoninowych po stymulacji insuliną, prowadzi do osłabienia wiązania przez aktynę DNazy I. Jak dotychczas nie zidentyfikowano kinazy odpowiedzialnej za fosforylację w tych warunkach. Z kolei fosforylacja aktyny przez kinazę PAK1 (ang. p21-activated kinase), aktywowaną przez małe białka G, Cdc42 i Rac1, prowadzi do dysocjacji włókien naprężeniowych i redystrybucji filamentów aktynowych. Aktyna jest także fosforylowana przez kinazy tyrozynowe z rodziny Src; prowadzi to również do depolimeryzacji filamentów. Najbardziej znane są badania nad wpływem fosforylacji aktyny przez zależną od cAMP kinazę białkową A (PKA) oraz przez zależną od jonów Ca2+ i fosfoinozytoli kinazę białkową C (PKC). Fosforylacja przez obie te kinazy wywiera przeciwstawny wpływ na aktynę. Podczas gdy działanie PKA zaburza proces polimeryzacji, to działanie PKC pobudza ten proces (OHTA i współaut. 1987). Wyniki te wskazują zatem na istnienie dynamicznej zależności pomiędzy ścieżkami sygnałowymi regulowanymi przez obie te kinazy a zmianami w morfologii komórek wynikających z reorganizacji aktyny.

# MODYFIKACJE Z UDZIAŁEM GLUKOZY

Aktyna, podobnie jak szereg innych białek, może być modyfikowana kowalencyjnie przez cukry. Najbardziej znana jest glikozylacja z wytworzeniem wiązania N- lub O-glikozydowego (Ryc. 2), które to modyfikacje są typowe dla białek błonowych, związanych z procesami sekrecji i procesowania pęcherzyków błonowych. W proces ten zaangażowane są dwa zachowane w toku ewolucji enzymy: O-GlcNAc transferaza (OGT) i O-Glc-NAc hydrolaza (OGA), które w odpowiedzi na bodźce odpowiednio przyłączają lub usuwają resztę N-acetyloglukozaminy z reszty serynowej lub treoninowej łańcucha polipeptydowego (HART i współaut. 2007).

Aktyna jest podatna na O-glikozylację, do której dochodzi zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym (Ryc. 2, Tabela 1). Modyfikację tę wykryto zaledwie kilka lat temu, podczas analiz proteomicznych szczurów, którym już w życiu płodowym podawano alkohol (FOFANA i współaut. 2010). Glikozylacja aktyny wpływa na modulację skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych, kardioprotekcję i zmiany w tkankach diabetyków (AKIMOTO i współaut. 2011).

Zmiany te są podobne do zmian wywołanych przez glikację aktyny, która polega na nieenzymatycznym przyłączaniu glukozy do reszt lizynowych białka. Okazało się, że glikacji ulega nie tylko aktyna u diabetycznych pacjentów, ale również aktyna otrzymana z mięśni szkieletowych królika (TERMAN i KA-SHINA 2013). Glikacja powoduje zaburzenia w procesie polimeryzacji aktyny, co w komórce przekłada się na zmiany kształtu i elastyczności komórek, zwłaszcza takich jak leukocyty. Dla przykładu, retinopatie u cukrzyków są związane z glikacją aktyny i w konsekwencji z zaburzeniami organizacji cytoszkieletu aktynowego granulocytów (RE-SMI i współaut. 2005, KULEVA i KOVALENKO 1997, TERMAN i KASHINA 2013). Prowadzi to do upośledzenia zdolności tych białych krwinek do przechodzenia przez ścianę naczyń krwionośnych, co powoduje zablokowanie światła naczyń włosowatych w siatkówce i w konsekwencji upośledzenie widzenia.

# METYLACJA

Metylacja to enzymatyczne przeniesienie reszt metylowych z S-adenozylometioniny na reszty aminokwasowe białek, najczęściej lizyny i argininy, przy udziale metylotransferaz (Ryc. 2).

Aktyna ulega metylacji na His-73 (Tabela 1) i modyfikacja ta jest istotna dla zachowania giętkości i stabilności filamentów, poprzez regulację oddziaływań pomiędzy subdomenami poszczególnych protomerów w filamencie. Sugeruje się, że metylacja reszty His-73 spowalnia uwalnianie ze szczeliny katalitycznj ortofosforanu powstałego podczas hydrolizy ATP, co stabilizuje filament (VIJAY-ASARATHY i RAO 1987, RAGHAVAN i współaut. 1992). Zidentyfikowano metylazy modyfikujące aktynę, aczkolwiek nie ma pewności, czy faktycznie biorą one udział w metylacji tej reszty, gdyż metylacji może również ulegać reszta Lys-326, a także reszty już arginylowane (SAHA i współaut. 2011). Co ciekawe, obniżony poziom metylacji aktyny stwierdzono po transformacji komórek onkogenem, jakim jest kinaza Src (CHIOU i współaut. 2012). Wskazuje to na istotną rolę metylacji aktyny w jej funkcjonowaniu w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

## MODYFIKACJE TYPU REDOX

Pierwsze obserwacje o wpływie oksydacji aktyny pochodzą z lat 40. ubiegłego stulecia, a więc tuż po wykryciu i oczyszczeniu tego białka z mięśni szkieletowych. Stwierdzono wówczas, że dodanie H2O2 uniemożliwiało polimeryzację aktyny i prowadziło do destrukcji już istniejących filamentów (FEU-ER i współaut. 1948). W kolejnych dekadach ukazały się liczne doniesienia wskazujące, że aktyna rzeczywiście jest podatna na modyfikacje potranslacyjne typu redox, takie jak: oksydacja (Ryc. 2), nitrozylacja, nitracja, karbonylacja i glutationylacja (Tabela 1) (WILSON i współaut. 2016). Stwierdzono, że podatność aktyny w warunkach in vitro na poszczególne typy modyfikacji redox zależy od tego, czy jest ona w formie monomerycznej czy spolimeryzowanej, od rodzaju związanego przez nią nukleotydu i kationu dwuwartościowego oraz siły jonowej roztworu. Ta zależność może przekładać się na warunki in vivo, przy czym różne formy utlenienia aktyny mogą stanowić o jej udziale w stanach patologicznych. Faktycznie, zaobserwowano, iż stres oksydacyjny wpływa na organizację aktyny w komórce i generuje powstanie wielu modyfikacji typu redox. Ponadto, w wielu schorzeniach, np. w chorobach neurodegeneracyjnych, cukrzycy, zaburzeniach krążenia, gruźlicy płuc czy anemii sierpowatej zidentyfikowano w aktynie szereg modyfikacji oksydacyjnych, co sugeruje ich powiązanie z etiopatogenezą tych schorzeń (TERMAN i KASHINA 2013, WILSON i współaut. 2016). Należy jednak zdawać sobie sprawę, że w stanach prawidłowych mogą występować podobne modyfikacje, które są wynikiem aktywacji specyficznych szlaków przekazywania sygnałów. Mimo licznych doniesień, fizjologiczne znaczenie modyfikacji potranslacyjnych typu redox jest wciąż mało poznane i badania powinny skupić się na poznaniu zależności pomiędzy miejscem i rodzajem modyfikacji a wpływem na funkcjonowanie aktyny *in vivo*.

polipeptydowym W łańcuchu aktyny znajduje się pięć reszt cysteinowych, które są podatne na reaktywne formy tlenu, azotu i lipidów (Tabela 1), przy czym zlokalizowana na w końcu karboksylowym reszta Cys-374 jest najbardziej aktywna i ulega oksydacji, glutationylacji, karbonylacji i nitrozylacji. W oczyszczonym białku reszta ta jest utleniana wskutek ekspozycji na powietrze, w trakcie przechowywania oraz w czasie cyklu rozmrażania lub zamrażania próbki; co prowadzi do tworzenia mostków dwusiarczkowych pomiędzy monomerami aktyny (WILSON i współaut. 2016). Dla zahamowania procesu utleniania do roztworu aktyny dodaje się czynnik redukujący, zazwyczaj jest to ditiotreitol (DTT). Modyfikacje typu redox są również wewnetrznych związane  $\mathbf{Z}$ tworzeniem mostków dwusiarczkowych w monomerze aktyny i prowadzą do zahamowania tempa polimeryzacji, wzrostu stężenia krytycznego poniżej takiego, (tzn. którego aktyna stanie polimeryzować) nie jest W oraz osłabienia struktury filamentów powstałych z modyfikowanej aktyny. Powoduje to zmiany w cytoszkielecie aktynowym, co zaobserwowano w sierpowatych erytrocytach u pacjentów z tym typem anemii (SHARTAVA i współaut. 1995). Natomiast wysoka reaktywność reszty Cys-374 i jej zdolność do oddziaływania ze znacznikami fluorescencyjnymi (np. pyrenylem) jest wykorzystywana do badania właściwości samej aktyny i jej oddziaływań z innymi białkami. Również modyfikacja reszt Cys-272 i Cys-285, znajdujących się wewnątrz sfałdowanej cząsteczki, prowadzi do obniżenia poziomu polimeryzacji i zaburzeń w wiązaniu oddziałujących z aktyną białek (Tabela 1). Stwierdzono także, iż w warunkach in vitro oksydowana reszta Cys-285 może tworzyć mostek dwusiarczkowy z aktywną resztą Cys-374, co skutkuje tworzeniem miedzycząsteczkowych dimerów i krótkich oligomerów, a w konsekwencji zahamowaniem polimeryzacji aktyny (SHARTAVA i współaut. 1995).

Čzęść z 16. reszt metioniny w cząsteczce aktyny jest także podatna na oksydację (Tabela 1), a ich modyfikacja prowadzi do zaburzenia funkcji białka (WILSON i współaut. 2016). Modyfikacja reszty Met-44, znajdującej się w pętli wiażącej DNazę I, z jednej strony depolimeryzuje filamenty, a z drugiej, hamuje polimeryzację *de novo* (HUNG i współaut. 2011). Oksydacja reszty Met-44 wprowadza ujemny ładunek w oddziaływania między protomerami, co prowadzi do zaburzenia tych oddziaływań i w konsekwencji rozpadu filamentu (HUNG i współaut. 2011). Należy zwrócić uwagę, że reszta ta jest schowana wewnątrz filamentu i w zasadzie nie powinna być dostępna dla czynników utleniających. Nasuwa się więc przypuszczenie, że pewne warunki panujące w komórce zmieniają konformację filamentu, czyniąc tę resztę bardziej podatną na działanie czynników utleniających (WILSON i współaut. 2016).

Stwierdzono, że specyficzne reszty tyrozyny, histydyny i tryptofanu w cząsteczce aktyny są również podatne na modyfikacje typu redox, aczkolwiek wpływ tych zmian na funkcje aktyny nie został jak dotąd opisany (Tabela1).

Wiadomo, że wiele związków chemicznych i czynników utleniających w komórce wpływa na strukturę i funkcje aktyny, natomiast nie wiemy, czy są procesy redox specyficznie "atakujące" tylko to białko. Dla przykładu, enzymy, które generują reaktywne formy tlenu, azotu i lipidów są związane z modyfikacjami aktyny, jednak z powodu ich niespecyficzności i opartego na dyfuzji mechanizmu uwalniania reaktywnych form, to aktyna, jako wszechobecne w komórce białko, jest jednym z wielu modyfikowanych białek. Ta wszechobecność i obfitość może do pewnego stopnia czynić aktynę niespecyficznym "zmiataczem" reaktywnych form, chroniącym komórkę przed szkodliwym działaniem endogennych oksydantów. Natomiast niektóre z enzymów, jak np. syntaza tlenku azotu (NOS), oksydaza NADPH i 5-lipooksygenaza, nie tylko kolokalizują z aktyną (Kang i Vanderhoek 1998, Wilson i współaut. 2016), ale i ich aktywność jest regulowana przez aktynę (MILLER i współaut. 2001, SU i współaut. 2007).

Co więcej wykryto, iż wielodomenowy monooksygenaza flawinowa enzym, (Mical), specyficznie modyfikuje aktynę (HUNG i współaut. 2010, 2011). Ten znajdujący się w cytoplazmie enzym bierze udział w ukierunkowanym rozwoju/wzroście komórek (np. nakierowywaniu aksonów), który jest zależny od semaforyn, białek błonowych kontrolujących szlaki przekazywania sygnałów. Enzym ten, oddziałuje poprzez koniec karboksylowy z pleksyną, receptorem dla semaforyn, podczas gdy znajdująca się na końcu aminowym domena monooksygenazowa wiąże się bezpośrednio z aktyną (HUNG i współaut. 2010, HUNG i TERMAN 2011). Wiązanie F-aktyny aktywuje Mical, co powoduje oksydację reszt Met-44 i Met-47 w aktynie, a w konsekwencji prowadzi do depolimeryzacji filamentów i zahamowania polimeryzacji (HUNG

i współaut. 2011). Modelowanie molekularne wykazało, że miejsce katalityczne tego enzymu mieści się w szczelinie między protomerami aktyny, co prawdopodobnie umożliwia jego dostęp do tych trudno dostępnych reszt aminokwasowych i ich modyfikację. Z kolei zamiana reszty Met-44 na leucynę zaburza regulację organizacji aktyny poprzez Mical, prowadząc do akumulacji nieprawidłowych struktur aktynowych w komórce (HUNG i TERMAN 2011, HUNG i współaut. 2011).

### SIECIOWANIE

Sieciowanie (ang. crosslinking) filamentów aktynowych to nieenzymatyczny proces zachodzący w każdej komórce, niezbędny dla pożądanej w danym momencie i w danym przedziale komórki organizacji cytoszkieletu aktynowego. Biorą w tym udział białka sieciujące takie, jak np. filamina, spektryna, fascyna czy a-aktynina, które umożliwiają tworzenie sieci i/lub wiązek filamentów aktynowych (POLLARD i COOPER 2009). Okazało sie natomiast, że również bakterie, zwłaszcza te patogenne, są zdolne do nieplanowanego, często nadmiernego sieciowania aktyny w zainfekowanej komórce, co ma negatywne skutki dla jej funkcjonowania. Jednym z przykładów jest kowalencyjne sieciowanie monomerów aktyny w oligomery przez toksyny MARTX i VgrG-1 przecinkowca cholery (Vibrio cholerae), co powoduje spadek dostępnej F-aktyny. Prowadzi to do zaokrąglenia komórki i, w konsekwencji, jej śmierć (Tabela 1) (AKTORIES i współaut. 2011). W sieciowanie zaangażowane są reszty Lys-50 z jednego protomeru i Glu-270 z drugiego protomeru (KUDRYASHOV i współaut. 2008). Obie te reszty znajdują się w rejonach istotnych dla tworzenia filamentu.

Innym czynnikami sieciującymi aktynę są transglutaminazy (TGazy), które modyfikują resztę Gln-41 i indukują jej sieciowanie z innymi resztami w cząsteczce aktyny, np. z resztą Lys-50 w tym samym monomerze (sieciowanie wewnątrzcząsteczkowe) lub z resztą Lys-113 w sąsiednim protomerze (sieciowanie międzycząsteczkowe) (Tabela 1). TGazy mogą również sieciować aktynę z innymi białkami i związkami niskocząsteczkowymi, co zostało także wykorzystane jako narzędzie do badania właściwości aktyny. Sieciowanie przez TGazy stabilizuje filamenty aktynowe, czyniąc je bardziej odpornymi na depolimeryzację, fragmentację i działaproteaz. Zaobserwowano wpływ działanie nia TGaz na związane z cytoszkieletem aktynowym procesy takie jak: sekrecja insuliny, wzrost łagiewki pyłkowej, przekazywanie sygnału przez czynniki wzrostu, apoptoza, a także funkcjonowanie komórek neuronalnych w śródbłonku (TERMAN i KASHINA 2013). Postuluje się, że TGazy w pyłkach kontrolują równowagę pomiędzy krótkimi i niestabilnymi filamentami a stabilnymi wiązkami F--aktyny na pograniczu wierzchołka i u podstawy wydłużającej się łagiewki (DEL DUCA i współaut. 2009). TGazy wpływają pośrednio również na funkcjonowanie szeregu białek związanych z aktyną, np. miozyny, gdyż transglutaminowana aktyna słabiej wiąże się z domeną motoryczną miozyny i tym samym aktywność ATPazowa miozyny jest obniżona (DEL DUCA i współaut. 2009).

#### MODYFIKACJA MAŁYMI BIAŁKAMI: UBIKWITYNACJA, SUMO-ILACJA I ISG-ILACJA

Aktyna, podobnie jak znaczna część białek, może być ubikwitynowana i SUMO--ilowana (Tabela 1) oraz ISG-ilowana, czyli zawierać kowalencyjnie przyłączone do grupy wodorotlenowej reszt lizynowych niskocząsteczkowe białka takie, jak ubikwityna (m.cz. ok. 8.6 kDa), SUMO (m.cz. ok. 12 kDa) lub ISG15 (m.cz. ok. 17 kDa). Procesy te są kilkuetapowe, katalizowane przez trzy grupy enzymów: E1 (zależny od ATP; w przypadku ubikwitynacji to enzym aktywujący ubikwitynę), E2 (w przypadku ubikwitynacji to enzym koniugujący ubikwityne) oraz E3 (w przypadku ubikwitynacji to enzym ligaza ubikwityna-białko). Niewiele wiadomo o procesie odwrotnym, który również wymaga obecności specyficznych enzymów. Dla przykładu, zidentyfikowano enzymy SENP/Ulp, które nie degradując kompleksu SUMO--białko, usuwają SUMO poprzez przecinanie wiązania peptydowego pomiędzy glicyną w SUMO a modyfikowaną lizyną (ALONSO i współaut. 2015).

Białka mogą ulegać monoukwibitynacji, czyli przyłączeniu monomeru ubikwityny do jednej lub więcej reszt, oraz poliubikwitynacji, czyli przyłączeniu łańcucha cząsteczek ubikwityny (poliubikwityny) do jednej reszty aminokwasowej (Ryc. 2). Poliubikwitynacja kieruje białka do degradacji proteasomalnej, natomiast monoubikwitynacja wydaje się determinować specyficzne funkcje tak modyfikowanych białek (FINLEY i CHAU 1991).

Aktyna także ulega poliubikwitynacji przez enzymy takie, jak MuRF1 i Trim32 (ligazy E3) oraz UbcH5 (enzym E2) (KUDRY-ASHOVA i współaut. 2005, COHEN i współaut. 2009, POLGE i współaut. 2011), co w konsekwencji prowadzi do obniżenia poziomu aktyny w komórce. Indukowana poliubikwitynacją degradacja aktyny jest szczególnie intensywna w procesach związanych z patologią mięśni (KUDRYASHOVA i współaut. 2005, COHEN i współaut. 2009, POLGE i współaut. 2011). W przeciwieństwie do poliubikwitynacji, monoubikwitynacja jest uważana za czynnik stabilizujący aktynę i warunkujący jej lokalizację komórkową (DANTAN-GONZALEZ i współaut. 2001). Na przykład, u *Drosophila* reszta Lys-118 aktyny mięśni skrzydeł jest monoubikwitynowana na co siódmym protomerze filamentu cienkiego i modyfikacja ta wydaje się regulować siłę skurczu mięśni (BURGESS i współaut. 2004).

SUMO-ilacja, czyli przyłączanie białka SUMO (ang. small ubiquitin-like modifier) (Ryc. 2) zachodzi w przypadku aktyny najprawdopodobniej na reszcie Lys-284, znajdującej się w subdomenie 3. Modyfikacja ta jest odpowiedzialna za obecność aktyny w jądrze komórkowym, poprzez blokowanie miejsca determinującego eksport aktyny z jądra (ang. nuclear export sequence, NES) (ALONSO i współaut. 2015). Uważa się również, że SUMO-ilacja uniemożliwia tworzenie klasycznych filamentów aktynowych, co wydaje się tłumaczyć obecność w nukleoplazmie krótszych, nieprawidłowo spolimeryzowanych filamentów, nie występujących w cytoplazmie (HOFMANN i współaut. 2009).

Ponadto stwierdzono, że do aktyny mogą przyłączać się reszty białka ISG15 (ang. interferon stimulated gene-15), co świadczy, że ulega ona ISG-ilacji, aczkolwiek rola tej niedawno wykrytej modyfikacji dla funkcjonowania aktyny jest nieznana. Synteza ISG15, małego białka sekrecyjnego, jest podwyższona podczas leczenia interferonem i wskutek infekcji wirusowych. Uważa się więc, iż ISGilacja jest związana z procesami zapalnymi (ZHANG i ZHANG 2011).

### INNE MODYFIKACJE

Aktyna jest również podatna na szereg innych modyfikacji potranslacyjnych, których znaczenie dla funkcjonowania tego białka jest mało znane (TERMAN i KASHINA 2013).

Stwierdzono, że aktyna ulega izoaspartylacji, czyli izomeryzacji reszt Asp-25 i Asp179 (Tabela 1), oraz do deamidacji tych reszt (CIMMINO i współaut. 2008). Białko to może być również substratem dla metylotransferazy L-izoaspartylu (PIMT), która powoduje zamianę reszty izoaspartylowej ponownie w aspartylową (ZHU i współaut. 2006).

Aktyna podlega także enzymatycznym procesom acylacji/alkanoilacji takim, jak mirystoilacja i palmitoilacja, co sugeruje możliwość oddziaływania tak zmodyfikowanej aktyny z lipidami błony komórkowej (STADLER i współaut. 1985, BANO i współaut. 1998).

Aktyna może także podlegać fragmentacji proteolitycznej i zdarza się, że proteoliza i acylacja resztami kwasów tłuszczowych występują jednocześnie. Przykładem tego jest działanie kaspaz (enzymów proteolitycznych, których aktywacja prowadzi do apoptozy), które inicjują myristoilację aktyny, co prowadzi do kierowania jej do mitochondriów i zaangażowanie w procesie apoptozy (UTSUMI i współaut. 2003).

Aktyna może być również siarczanowana (tzn. zawierać przyłączone kowalencyjnie reszty siarczanowe). Nie wiadomo, jak ten proces wpływa na jej funkcjonowanie, wiadomo natomiast, że sulfotransferazy wiążą się z F-aktyną i mogą ją wykorzystywać jako platformę do rekrutowania hydroksysteroidów (np. cholesterolu) w celu przyłączenia do nich reszty siarczanowej w określonych przedziałach komórki (KUROGI i współaut. 2010). Wykazano również, że do reszt cysteinowych aktyny mogą być przyłączone reszty sulfohydrylowe (tiolowe) i modyfikacja ta, katalizowana przez  $\gamma$ -liazę cystationinową (CSE), stymuluje polimeryzację aktyny (MU-STAFA i współaut. 2009).

Stwierdzono też, że do aktyny mogą być kowalencyjnie przyłączane w warunkach *in vitro* reszty kwasu bursztynowego (bursztynylacja) oraz *in vivo* – kwasu malonowego (malonylacja; przyłączanie do reszty Lys-61), które to modyfikacje mogą potencjalnie regulować organizację aktyny (TERMAN i KASHI-NA 2013). Nie ma doniesień o wpływie tych modyfikacji na strukturę i funkcje aktyny.

#### PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje, będące zaledwie krótkim streszczeniem dostępnej wiedzy wskazują, że aktyna, jedno z najpowszechniej występujacych najistotniejszych i dla życia białek, jest podatna na większość dotychczas poznanych modyfikacji z translacyjnych. Modyfikacje te wpływają mogą potencjalnie wpływać na jej lub strukturę i funkcjonowanie w komórce, co przyczynia się do jeszcze większej złożoności kontroli organizacji białka, tego które przecież jest także regulowane przez plejadę białek zdolnych do wiązania aktyny. Wciąż niewiele wiadomo o wpływie większości ze zidentyfikowanych modyfikacji na strukturę i funkcje aktyny oraz związku tych modyfikacji z udziałem aktyny w stanach fizjologicznych i patologicznych. Nie wiemy też, dlaczego natura wykształciła dodatkowe sposoby regulacji aktyny, wymagające w większości wypadków obecności dodatkowych białek i nakładu energii. Czemu służy tak ogromna, wielopoziomowa sieć regulacji i oddziaływań. Co więcej, należy też zdawać sobie sprawę, że modyfikacjom potranslacyjnym ulegają też białka oddziałujące z aktyną. Czy taka złożoność jest niezbędna do zapewnienia/zabezpieczenia dynamiki reorganizacji tworzonych przez aktynę struktur?

Nasuwa się też wiele bardziej szczegółowych pytań, że wspomnę tylko o kilku z nich. Na przykład, dlaczego i w jakiej kolejności te same reszty aminokwasowe mogą ulegać różnym, często przeciwstawnym w działaniu modyfikacjom, jak to ma miejsce w przypadku acetylacji i arginylacji. Odpowiedzi wymaga też pytanie, czy pewne rejony cząsteczki są bardziej podatne na modyfikacje w formie monomerycznej czy filamentowej. Czy inne modyfikacje poza transglutaminacją i acetylacją wpływają na oddziaływanie aktyny z miozynami, a zwłaszcza tymi niekonwencjonalnymi, które biorą Z udział w transporcie wewnatrzkomórkowym.

Odpowiedź na przynajmniej część z tych pytań staje się możliwa wraz z rozwojem nowoczesnych technik biologii komórkowej i molekularnej oraz zaawansowanej proteomiki, aczkolwiek należy zdawać sobie sprawę, że złożoność zagadnień nie ułatwia zadania. Osoby zainteresowane odsyłam do artykułu przeglądowego TERMANA i KASHINY (2013), który jest jedynym jak dotąd, tak wszechstronnym opracowaniem tego interesującego zagadnienia. Artykuł ten stanowił inspirację do przygotowania przedstawionego artykułu.

#### Streszczenie

Aktyna, komponent cytoszkieletu komórek eukariotycznych, to jedno z białek najistotniejszych dla funkcjonowania organizmów i najlepiej zachowanych w toku ewolucji. Ta globularna cząsteczka o masie cząsteczkowej około 42,3 kDa występuje zarówno w formie monomerycznej, jak i spolimeryzowanej (filamenty), a zdolność do dynamicznej reorganizacji aktyny jest niezbędna dla życia komórki. Przejście pomiędzy obiema formami jest możliwe dzięki precyzyjnej w czasie i przestrzeni, dynamicznej regulacji organizacji aktyny przez szereg białek wiążących się zarówno z monomerami, jak i filamentami aktyny. Istotnym czynnikiem wpływającym na stopień spolimeryzowania aktyny są także liczne modyfikacje potranslacyjne tego białka. Niniejszy artykuł przeglądowy jest poświęcony omówieniu tego obszernego i wciąż mało poznanego zagadnienia, a w szczególności opisowi jakim modyfikacjom ulega aktyna i w jaki sposób modyfikacje te wpływają na strukturę i funkcje tego wyjątkowego białka.

### LITERATURA

- AKIMOTO Y., MIURA Y., TODA T., WOLFERT M. A., WELLS L., BOONS G. J., HART G. W., ENDO T., KAWAKAMI H., 2011. Morphological changes in diabetic kidney are associated with increased OGlcNAcylation of cytoskeletal proteins including alpha-actinin 4. Clin. Proteomics 8, 15. AKTORIES K., LANG A. E., SCHWAN C., MANNHERZ
- AKTORIES K., LANG A. E., SCHWAN C., MANNHERZ H. G., 2011. Actin as target for modification by bacterial protein toxins. FEBS J. 278, 4526-4543.
- ALONSO A., GREENLEE M., MATTS J., KLINE J., DA-VIS K. J., MILLER R. K., 2015. Emerging roles of sumoylation in the regulation of actin,

microtubules, intermediate filaments, and sep-

- *tins.* Cytoskeleton 72, 305-339. BANO M. C., JACKSON C. S., MAGEE A. I., 1998. Pseudo-enzymatic Sacylation of a myristoylated yes protein tyrosine kinase peptide in vitro may reflect non-enzymatic S-acylation in vivo. Biochem. J. 330, 723-731. BELIN B. J., MULLINS R. D. 2013. What we talk
- about when we talk about nuclear actin. Nucleus 4, 291-297. Bender N., FASOLD H., KENMOKU A., MIDDELHOFF
- G., VOLK K. E., 1976. The selective blocking of the polymerization reaction of striated muscle actin leading to a derivative suitable for crystallization. Modification of Tyr-53 by 5-dia-zonium-(1H)tetrazole. Eur. J. Biochem. 64, 215-218.
- BLANCHOIN L., BOUJEMAA-PATERSKI R., SYKES C., PLASTINO J., 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. Physiol. Rev. 94, 235-263.
- BURGESS S., WALKER M., KNIGHT P. J., SPARROW J., SCHMITZ S., OFFER G., BULLARD B., LE-ONARD K., HOLT J., TRINICK J., 2004. Structural studies of arthrin: monoubiquitinated actin. J. Mol. Biol. 341, 1161-1173.
- CHIOU Y. Y., FU S. L., LIN W. J., LIN C. H., 2012. Proteomics analysis of in vitro protein methylation during Src-induced transformation. Electrophoresis 33, 451-461.
  CIMMINO A., CAPASSO R., MULLER F., SAMBRI I., MARGELLA L. PAMO M. DE PONES M. L. D'AN.
- MASELLA L., RAIMO M., DE BONIS M. L., D'AN-GELO S., ZAPPIA V., GALLETTI P., INGROSSO D., 2008. Protein isoaspartate methyltransferase
- 2008. Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-Xl deamidation and methylation. PLoS One 3, e3258.
  COHEN S., BRAULT J. J., GYGI S. P., GLASS D. J., VALENZUELA D. M., GARTNER C., LATRES E., GOLDBERG A. L., 2009. During muscle atro-phy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquityla-tion. J. Cell Biol. 185, 1083-1095.
  COOK R. K., SHEFF D. R., RUBENSTEIN P. A., 1991 Unusual metabolism of the ueast actin amino
- Unusual metabolism of the yeast actin amino terminus. J. Biol. Chem. 266, 16825-16833.
- DANTAN-GONZALEZ E., ROSENSTEIN Y., QUINTO C., SANCHEZ F., 2001. Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. Mol. Plant Microbe Interact. 14, 1267-1273.
- DEL DUCA S., SERAFINI-FRACASSINI D., BONNER P., CRESTI M., CAI G. 2009. Effects of post-translational modifications catalysed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments. Biochem.
- J. 418, 651-664. FEUER G., MOLNAR F., PETTKO E., STRAUB F. B., 1948. Studies on the composition and polymerization of actin. Hung. Acta Physiol. 1, 150-163.
- FINLEY D., CHAU V., 1991. Ubiquitination. Annu. Rev. Cell Biol. 7, 25-69.
  FOFANA B., YAO X.H., RAMPITSCH C., CLOUTIER S., WILKINS J. A., NYOMBA B. L., 2010. Prenatal glashed support alternation and alternative support of the sup alcohol exposure alters phosphorylation and glycosylation of proteins in rat offspring liver. Proteomics 10, 417-434. HART G. W., HOUSLEY M. P., SLAWSON C., 2007.
- Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature 446, 1017-1022.
- HERMAN I. M., 1993. Actin isoforms. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 48-55.
- HOFMANN W. A., ARDUINI A., NICOL S. M., CAMA-CHO C. J., LESSARD J. L., FULLER-PACE F. V.,

DE LANEROLLE P., 2009. SUMOylation of nuclear actin. J. Cell Biol. 186, 193-200. HUNG R. J., TERMAN J. R. 2011. Extracellular in-

- hibitors, repellents, and Semaphorin/Plexin/ MICAL-mediated actin filament disassembly. Cytoskeleton 68, 415-433.
- HUNG R. J., YAZDANI U., YOON J., WU H., YANG T., GUPTA N., HUANG Z., VAN BERKEL W. J., TERMAN J. R., 2010. Mical links semaphorins
- to F-actin disassembly. Nature 463, 823-827. HUNG R. J., PAK C. W., TERMAN J. R., 2011. Di-rect redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical. Science 334, 1710-1713.
- JUST I., SEHR P., JUNG M., VAN DAMME J., PUY-PE M., VANDEKERCKHOVE .J, MOSS J., AKTORIES K., 1995. ADP-ribosyltransferase type A from
- turkey erythrocytes modifies actin at Arg-95 and Arg-372. Biochemistry 34, 326-333. KANG L. T., VANDERHOEK J. Y., 1998. Mono(S)hy-droxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin L Linid Dec 20, 1476 1480. actin. J. Lipid Res. 39, 1476-1482. KARAKOZOVA M., KOZAK M., WONG C. C. L., BAILEY
- KARAKOZOVA M., KOZAK M., WONG C. C. L., BAILEY A. O., YATES J. R., MOGILNER A., ZEBROSKI H., KASHINA A., 2006. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. Science 313, 192-196.
  KASHINA A. S., 2006. Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-ter-minus. Trends Cell Biol. 16, 610-615.
  KOVACS J. J., HUBBERT C., YAO T. P., 2004. The HDAC complex and cutoskeleton. Novartis Fo-
- HDAC complex and cytoskeleton. Novartis Found Symp. 259;170-177; dyskusja 178-181, 223-175.
- KUDRYASHOV D. S., DURER Z. A., YTTERBERG A. J., SAWAYA M. R., PASHKOV I., PROCHAZKOVA K., YEATES T. O., LOO R. R., LOO J. A., SATCHELL K. J., REISLER E., 2008. Connecting actin monomers by iso-peptide bond is a toxicity me-
- Homers by iso-peptide bond is a toxicity me-chanism of the Vibrio cholerae MARTX toxin.
  Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 18537-18542
  KUDRYASHOVA E., KUDRYASHOV D., KRAMEROVA I., SPENCER M. J., 2005. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dys-tronbu tupe 2H that binds to skeletal muscle trophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. J. Mol. Biol. 354, 413-424. KULEVA N. V., KOVALENKO Z. S., 1997. Change in
- the functional properties of actin by its glyca-tion in vitro. Biochemistry 62, 1119-1123.
- KUROGI K., SAKAKIBARA Y., KAMEMOTO Y., TAKAHA-SHI S., YASUDA S., LIU M. C., SUIKO M., 2010. Mouse cytosolic sulfotransferase SULT2B1b interacts with cytoskeletal proteins via a proli-ne/serine-rich Cterminus. FEBS J. 277, 3804-3811.
- KUROSAKA S., LEU N.A., ZHANG F., BUNTE R., SAHA S., WANG J., GUO C., HE W., KASHINA A., 2010. Arginylation-dependent neural crest cell migration is essential for mouse development. PLoS Genet 6, e1000878.
- KWON Y. T., KASHINA A. S., DAVYDOV I. V., HU R. G., AN J. Y., SEO J. W., DU F., VARSHAVSKY A., 2002. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. Science 297, 96-99.
- MILLER Y. I., CHANG M. K., FUNK C. D., FERAMI-SCO J. R., WITZTUM J. L., 2001. 12/15-lipo-xygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. J. Biol. Chem. 276, 19431-19439.
- MONTECUCCO C., RASOTTO M. B., 2015. On botuli-num neurotoxin variability. MBio 6, e02131-14

- MOTTET D., CASTRONOVO V., 2008. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. Clin. Exp. Metastasis 25, 183-189.
- MUSTAFA A. K., GADALLA M. M., SEN N., KIM S., MU W., GAZI S. K., BARROW R. K., YANG G., WANG R., SNYDER S. H., 2009. H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. Sci. Signal. 2, ra72.
- Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maeda Y., Narita A., 2009. The nature of the globular- to fibro-us-actin transition. Nature 457, 441-445.
  OHTA Y., AKIYAMA T., NISHIDA E., SAKAI H., 1987: Protein kinase C and cAMP-dependent protein
- kinase induce opposite effects on actin poly-merizability. FEBS Lett. 222, 305-310.
- Merizability. FEBS Lett. 222, 505-510. OKAMOTO H., FUJITA H., MATSUYAMA S., TSUYAMA S., 1997. Purification, characterization, and localization of an ADP-ribosylactin hydrola-se that uses ADP-ribosylated actin from rat brains as a substrate. J. Biol. Chem. 272, 08116-08105 28116-28125.
- OKAZAKI I. J., MOSS J., 1996. Mono-ADP-ribosyla-
- OKAZAKI I. J., MOSS J., 1996. Mono-ADP-robosylation: a reversible posttranslational modification of proteins. Adv. Pharmacol. 35, 247-280.
  OTTERBEIN L. R., GRACEFFA P., DOMINGUEZ R., 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. Science 293, 708-711.
  PERRIN B. J., ERVASTI J. M., 2010. The actin gene family: function follows isoform. Cytoskeleton 67, 630-634.
- 67, 630-634. POLGE C., HENG A. E., JARZAGUET M., VENTADO-UR S., CLAUSTRE A., COMBARET L., BECHET D., MATONDO M., UTTENWEILER-JOSEPH S., MON-SARRAT B., ATTAIX D., TAILLANDIER D., 2011. Muscle actin is polyubiquitinylated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. FASEB J. 25, 3790-3802. POLLARD T. D., COOPER J. A., 2009. Actin, a cen-
- tral player in cell shape and movement. Science 326, 1208-1212.
- RAGHAVAN M., LINDBERG U., SCHUTT C., 1992. The use of alternative substrates in the characterization of actin-methylating and carnosine--methylating enzymes. Eur. J. Biochem. 210, 311-318.
- RAI R., WONG C. C., XU T., LEU N. A., DONG D. W., GUO C., MCLAUGHLIN K. J., YATES J. R. 3RD, KASHINA A. 2008. Arginyltransferase regulates alpha-cardiac actin function, myofibril formation and contractility during heart deve-lopment. Development 135, 3881-3889.
- RESMI H., AKHUNLAR H., TEMIZ ARTMANN A., GU-NER G., 2005. In vitro effects of high glucose concentrations on membrane protein oxidation, *G-actin and deformability of human erythrocy-tes.* Cell Biochem. Funct. 23, 163-168.
- SAHA S., MUNDIA M. M., ZHANG F., DEMERS R. W., KOROBOVA F., SVITKINA T., PERIETEANU A. A., DAWSON J. F., KASHINA A., 2010. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins. Mol. Biol. Cell
- 21, 1350-1361. SAHA S., WONG C. C., XU T., NAMGOONG S., ZE-BROSKI H., YATES J. R. 3RD, KASHINA A., 2011. Arginylation and methylation double up to regulate nuclear proteins and nuclear architectu-
- re in vivo. Chem. Biol. 18, 1369-1378. SCHMITZ S., CLAYTON J., NONGTHOMBA U., PRINZ H., VEIGEL C., GEEVES M., SPARROW J., 2000. Drosophila ACT88F indirect flight muscle-specific actin is not N-terminally acetylated: a mutation in N-terminal processing affects actin function. J. Mol. Biol. 295, 1201-1210.

- SHAEVITZ J. W., GITAI Z., 2010. The structure and function of bacterial actin homologs. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a000364.
- Spiring Harb Ferspect Biol 2, a000004.
  SHARTAVA A., MONTEIRO C. A., BENCSATH F. A., SCHNEIDER K., CHAIT B. T., GUSSIO R., CASO-RIA-SCOTT L. A., SHAH A. K., HEUERMAN C. A., GOODMAN S. R., 1995. A posttranslational mo-dification of beta-actin contributes to the slow dification of the constring protein. dissociation of the spectrin-protein 4.1-actin complex of irreversibly sickled cells. J. Cell Biol. 128, 805-818. STADLER J., GERISCH G., BAUER G., DEPPERT W.,
- 1985. In vivo acylation of Dictyostelium actin with palmitic acid. EMBO J. 4, 1153-1156.
- STARHEIM K. K., GEVAERT K., ARNESEN T., 2012. Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. Trends Biochem. Sci. 37, 152-161.
- SU Y., KONDRIKOV D., BLOCK E. R., 2007. β-actin: a regulator of NOS-3. Sci. STKE 2007, pe52. TERASHIMA M., YAMAMORI C., SHIMOYAMA M., 1995. ADP-ribosylation of Arg28 and Arg206 on the acting molecula of Arg28 and Arg206 on the actin molecule by chicken arginine-specific ADP-ribosyltransferase. Eur. J. Biochem. 231, 242-249.
- TERMAN J. R., KASHINA A., 2013. Post-translatio-Indiana O. R., Informati II., 2010. 1000 translated nal modification and regulation of actin. Curr. Opin. Cell Biol. 25, 30-38.
   UTSUMI T., SAKURAI N., NAKANO K., ISHISAKA R., 2003. C-terminal 15 kDa fragment of cytoske-lattice is most translationally. New interview.
- letal actin is posttranslationally Nmyristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted
- to mitochondria. FEBS Lett. 539, 37-44. VANDEKERCKHOVE J., WEBER K., 1978. Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1106-1110.
- VIJAYASARATHY C., RAO B. S., 1987. Partial puri-fication and characterisation of S-adenosylmethionine: protein-histidine N-methyltransferase from rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 923, 156-165.
- Acta 923, 156-165.
  WAELKENS E., GETTEMANS J., DE CORTE V., DE VILLE Y., GORIS J., VANDEKERCKHOVE J., MER-LEVEDE W., 1995. Microfilament dynamics:re-gulation of actin polymerization by actin-frag-min kinase and phosphatases. Adv. Enzyme Regul. 35, 199-227.
  WANG J., HAN X., WONG C. C., CHENG H., ASLA-NIAN A., XU T., LEAVIS P., RODER H., HED-STROM L., YATES J. R. 3RD, KASHINA A., 2014. Arginyltransferase ATE1 catalyzes midchain arginylation of proteins at side chain carboxy-
- arginylation of proteins at side chain carboxy-lates in vivo. Chem. Biol. 21, 331-337.
- WILSON C., TERMAN J. R., GONZÁLEZ-BILLAULT C., AHMED G., 2016. Actin filaments-A target for redox regulation. Cytoskeleton 73, 577-595.
- Wong C. C., Xu T., RAI R., BAILEY A. O., YATES J. R. 3RD, WOLF Y. I., ZEBROSKI H., KASHINA A., 2007. Global analysis of posttranslational protein arginylation. PLoS Biol 5, e258. ZHANG D., ZHANG D.-E., 2011. Interferon-Stimula-
- ted Gene 15 and the Protein ISGylation System. J. Interferon Cytokine Res. 31, 119-130.
- ZHANG F., SAHA S., SHABALINA S. A., KASHINA A., 2010. Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent de-gradation. Science 329, 1534-1537. J. X., DOYLE H. A., MAMULA M. J., ASWAD D. W., 2006. Protein repair in the brain, pro-
- ZHU teomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain. J. Biol. Chem. 281, 33802-33813.

#### KOSMOS Vol. 67, 1, 43-55, 2018

#### MARIA JOLANTA REDOWICZ

Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, E-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

#### POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF ACTIN

#### Summary

Actin, a constituent of the cytoskeleton of eukaryotic cells, is one of the most important as well as best evolutionary conserved proteins. This globular protein with molecular mass of ~42.3 kDa exists in the cell both in the monomeric and filamentous form, and ability to undergo dynamic reorganization of these two forms is absolutely crucial for cell survival. The monomer-filament transition, precisely controlled in time and space, is possible due to interaction of actin with a panoply of proteins binding to either monomeric or filamentous actin. Yet another factor is affecting actin organization, namely numerous posttranslational modifications. This review article is devoted to presentation of this broad and still unrecognized topic with emphasis on description of the type of actin modifications and how they affect actin structure and function.

Key words; actin, cytoskeleton, filament, regulation