

STRUKTURY CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO FORMOWANE PRZY KRAWĘDZI WIODĄCEJ KOMÓRKI PODCZAS PIERWSZEGO ETAPU MIGRACJI

CYTOSKELETAL ACTIN STRUCTURES FORMED AT THE LEADING
EDGE OF THE MIGRATING CELL DURING THE FIRST STEP
OF MIGRATION

Aleksandra STEPIEŃ, Alina GRZANKA, Adam SZPECHCIŃSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Streszczenie: Ekspansja krawędzi wiodącej stanowi pierwszy etap migracji komórek. Związany jest on z formowaniem zbudowanych z aktyny struktur cytoszkieletu – lamellipodiów oraz filopodiów. Ich reorganizacja, w odpowiedzi na szereg bodźców zewnątrzkomórkowych, kontrolowana jest m.in. przez białka należące do rodziny WASP (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*), będące efektorami GTPazy Rho i pośredniczące w aktywacji kompleksu Arp2/3 (ang. *actin-related protein 2-3 complex*). Najnowsze badania z zastosowaniem qFSM (ang. *quantitative fluorescent speckle microscopy*) wskazują na istnienie przy krawędzi wiodącej komórki odrębnego obszaru utworzonego z filamentów aktynowych – lamellum, odpowiedzialnego za trwałe wysunięcie krawędzi wiodącej w pierwszym etapie ruchu komórki. W pracy przedstawiono charakterystykę powyższych struktur z uwzględnieniem poznanych dotychczas mechanizmów oraz szlaków sygnałowych, prowadzących do ich formowania.

Słowa kluczowe: lamellipodium, filopodium, lamellum, WASP, WAVE.

Summary: Protrusion of the leading edge represents the first step of cell migration. This process is connected with formation of cytoskeletal actin-containing structures called lamellipodia and filopodia. Reorganization of cortical actin filaments in response to extracellular stimuli is controlled by The Wiskott-Aldrich syndrome proteins (WASP), a protein family members that are believed to be important effectors of Rho GTPases and to mediate in activating Arp2/3 (actin-related protein 2-3) complex. Recent studies using quantitative fluorescent speckle microscopy (qFSM) revealed the existence of the second region containing filamentous actin at the leading edge of migrating cells – lamellum, responsible for the persistent advancement of the cell. In this paper, characteristics of above-mentioned structures are presented and the mechanisms and signaling pathways leading to their formation, are discussed.

Key words: lamellipodium, filopodium, lamellum, WASP, WAVE.

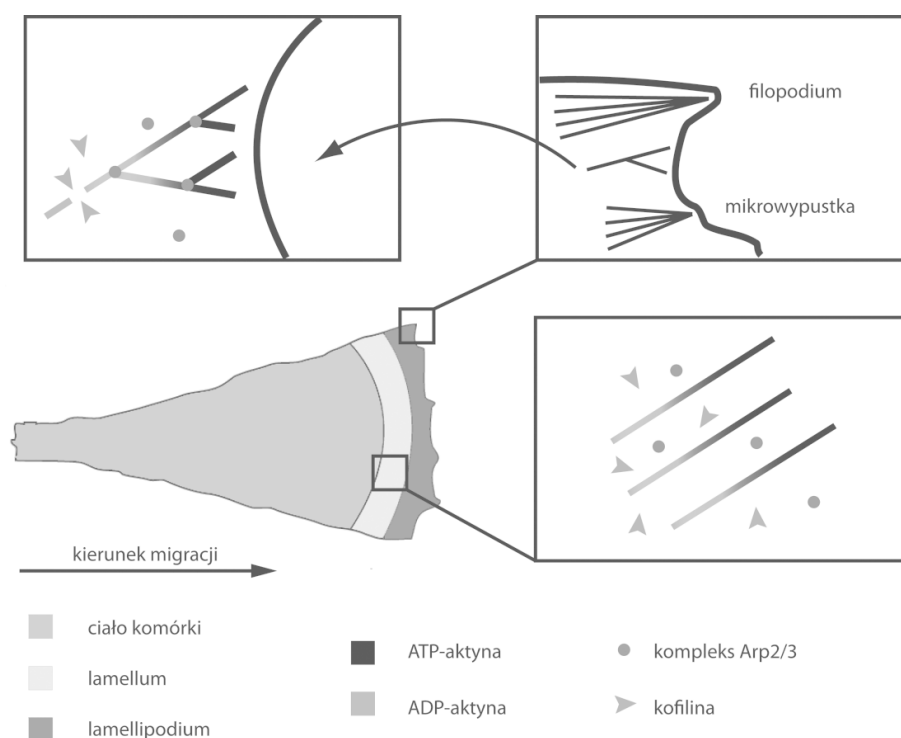
Wykaz stosowanych skrótów: **ABPs** (*actin binding proteins*) – białka wiążące aktyne; **Arp 2/3** (*actin-related protein 2-3 complex*) – kompleks 2/3 białek spokrewnionych z aktyną; **Cdc42** (*cell-division cycle 42*) – cykl podziału komórkowego 42; **CP** (*capping protein*) – białko czapeczkujące; **Ena/VASP** – *enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein*; **EVH1** (*Ena-VASP homology domain 1*) – domena białek homologiczna do domeny 1 Ena-VASP; **qFSM** – *quantitative fluorescent speckle microscopy*; **GBD** (*GTP-ase binding domain*) – domena wiążąca GTP-azę; **GBD/CRIB** – *GTPase-binding domain/Cdc42 and Rac interactive binding*; **PH** (*pleckstrin homology*) – domena białek homologiczna do domeny plekstryny; **Rac1** – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*; **Scar/WAVE** – *suppressor of cyclic AMP receptor mutation/Wiskott-Aldrich verprolin homologous protein*; **SHD** (*SCAR homology domain*) – domena homologiczna do domeny SCAR; **WASP** – *Wiskott-Aldrich syndrome protein*; **N-WASP** (*neuronal-WASP*) N-WASP – WASP w komórkach nerwowych; **WH1** (*WASP homology domain 1*) – domena białek homologiczna do domeny 1 WASP; **WHD** (*WAVE homology domain*) – domena białek homologiczna do domeny WAVE.

Migracja komórek umożliwia zachodzenie wielu procesów fizjologicznych, a także związana jest z szeregiem zjawisk patologicznych zachodzących w organizmie. W embriogenezie, przemieszczanie się komórek jest jednym z czynników warunkujących prawidłowy przebieg procesów morfogenezy. W organizmach dojrzałych migracja komórek zachodzi m.in. podczas gojenia się ran, odpowiedzi immunologicznej, angiogenezy oraz w jednym z etapów kancerogenezy – metastazie [17]. Ukierunkowany ruch komórek jest procesem złożonym, wymagającym integracji i precyzyjnej koordynacji szeregu zjawisk zachodzących w odrębnych obszarach komórki. Ze względu na tę czasowo-przestrzenną organizację, migracja może być rozpatrywana jako nieprzerwany cykl składający się z kilku niezależnych etapów: 1) ekspansji krawędzi wiodącej, 2) formowania miejsc przylegania powstałych wypustek do podłoża, 3) generacji naprężeń w obrębie nowo utworzonych struktur adhezyjnych, 4) deadhezji tylnej części ciała komórki i podciągnięcie jej do miejsc zakotwiczenia [1, 17, 24, 45].

Niniejsza praca przeglądowa ma na celu charakterystykę dynamicznych struktur zbudowanych z aktyny, powstających w trakcie migracji przy krawędzi wiodącej komórki oraz szlaków sygnałowych prowadzących do ich powstania.

KRAWĘDŹ WIODĄCA KOMÓRKI

Migracja komórki w kierunku chemoatraktanta wymaga posiadania przez nią przestrzennej asymetrii, której wyrazem jest spolaryzowana morfologia, czyli wyraźne rozróżnienie pomiędzy obszarami wiodącym i tylnym [17]. Obserwacje migrujących komórek pozwoliły wyodrębnić przy ich krawędziach wiodących dwie strefy – lamellipodium i lamellum – utworzone przez częściowo pokrywające się, ale kinematycznie, kinetycznie, molekularnie oraz funkcjonalnie odrębne sieci aktynowe. Lamellipodium obejmuje obszar znajdujący się tuż pod błoną komórkową, natomiast lamellum zlokalizowane jest pomiędzy lamellipodium a ciałem komórki [22, 25, 42]. W strefie lamellipodium wyodrębnia się rozgałęzioną sieć włókien F-aktyny, natomiast lamellum zbudowane jest z długich, nierozgałęzionych filamentów aktynowych [22]. Wiele komórek eksponuje ponadto przy krawędzi wiodącej dużą liczbę rozchodzących się promieniście wypustek zbudowanych z wiązek filamentów aktynowych, mających



Rycina 1. Model migrującej komórki, uwzględniający jej kompartmentację, wyznaczoną przez rodzaj struktury cytoszkieletu aktynowego [8, 22]

średnicę $0,1-0,2 \mu\text{m}$ i długość do kilku mikrometrów. Terminem mikrowypustki (ang. *mikrospikes*) określa się te niewykraczające poza obszar krawędzi komórki, natomiast wysunięte poza jej obręb cienkie, sztywne struktury zbudowane z wiązek filamentów nazwane zostały filopodiami. Zgodnie z powyższą nomenklaturą, mikrowypustki są częścią lamellipodium oraz potencjalnymi prekursorami filopodiów [30] (ryc. 1).

LAMELLIPODIA

Po zastosowaniu mikroiniekcji oznakowanej fluorescencyjnie G-aktyny do fibroblastów, stwierdzono, że po kilku minutach zostaje ona włączona w sieć filamentów znajdującą się bezpośrednio pod błoną komórki, w obszar lamellipodium [24, 29, 45]. Filamenty aktynowe są supramolekularnymi strukturami spolaryzowanymi, mającymi końce (+) oraz (-). Monomery aktyny (G-aktyna) dołączane są do końca (+) filamentów w procesie polimeryzacji. Powoduje to ich wydłużanie, formowanie się wypustek w strefie wiodącej komórki, a w rezultacie jej ukierunkowany ruch [24]. Wykazano, że obszar największego natężenia polimeryzacji obejmuje pasmo o szerokości $\sim 1 \mu\text{m}$,

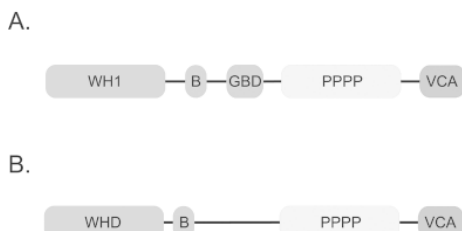
zlokalizowane wzdłuż krawędzi wiodącej komórki, przechodzące w równie wąskie pasmo depolimeryzacji [25, 42, 44].

Lamellipodia są cienkimi, blaszkowatymi strukturami o grubości ~ 200 nm, których szerokość, w zależności od typu komórki, waha się w granicach 1–5 μm (od podstawy do wierzchołka) [22, 28].

Klasyczny model opisujący drogę sygnałową prowadzącą do formowania sieci mikrofilamentów lamellipodium oraz wiązek filopodium przy krawędzi wiodącej komórki przedstawia się następująco: Aktywacja wewnątrzkomórkowych cząstek sygnałowych: Rac1 oraz Cdc42, białek należących do rodziny GTP-az Rho, stanowi sygnał do formowania odpowiednio lamellipodiów i filopodiów [10, 37]. Rac1 i Cdc42 wiążą się z białkami należącymi do rodziny WASP [2, 19, 35, 37]. Cdc42 wspólnie z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanem (PIP_2) aktywuje WASP oraz homologiczne: N-WASP, natomiast Rac1 białka zaliczane do Scar/WAVE, wśród których wyodrębnia się izomery WAVE1, WAVE2 i WAVE3 [37]. WASP, N-WASP oraz Scar/WAVE, należące do rodziny białek WASP, mają wspólne cechy strukturalne oraz wykazują podobieństwo pod względem biochemicznym, umożliwiające im poprzez przyłączenie monomeru aktyny oraz kompleksu Arp 2/3, formowanie trzyczęściowej jednostki funkcjonalnej. Powstanie tego trójskładnikowego kompleksu jest niezbędne do aktywacji Arp 2/3 i rozpoczęcia przez niego procesu nukleacji filamentów aktynowych jako odgałęzień już istniejących włókien F-aktyny [33].

Zrozumienie tak odmiennych mechanizmów regulacji dwóch głównych grup białek należących do rodziny WASP: WASP/N-WASP oraz Scar/WAVE [37] wymaga zapoznania się z budową ich cząsteczek (ryc. 2), a co się z tym wiąże – z szeregiem homologii i rozbieżności.

Zarówno WASP/N-WASP, jak i Scar/WAVE mają na końcu karboksylowym domenę katalityczną – VCA, do której przyłączają się G-aktyna oraz kompleks Arp2/3, inicjując tym samym formowanie nowych filamentów aktynowych (proces polimeryzacji).



RYCINA 2. Schemat budowy białek (A) WASP/N-WASP (B) Scar/WAVE [6, 33]: VCA – miejsce, do którego przyłącza się monomer aktyny oraz kompleks Arp2/3; PPPP – region bogaty w prolinę, zawiera miejsce wiązania dla profiliny oraz białek mających domeny SH3; B – odcinek zbudowany z aminokwasów konstytutywnych, pośredniczący w wiązaniu F-aktyny oraz (wylącznie białka WASP/N-WASP) PIP_2 ; GBD – miejsce wiązania Cdc42; WH1 – domena charakterystyczna dla WASP/N-WASP; WHD – domena charakterystyczna dla Scar/WAVE

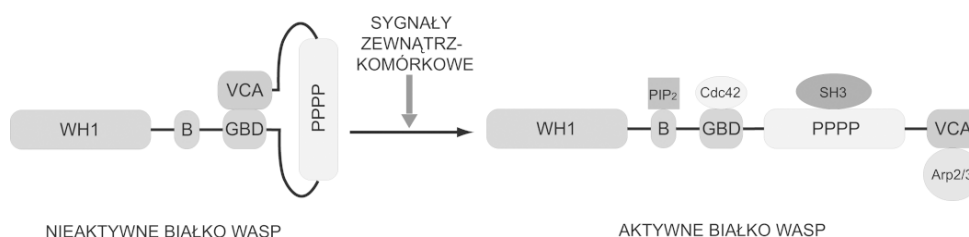
Kolejną cechą wspólną dla wszystkich białek rodziny WASP jest występowanie sąsiadującego z domeną VCA regionu bogatego w prolinę, zawierającego miejsca wiązania dla profiliny oraz mogącego wchodzić w interakcję z białkami mającymi domeny SH3. Wspólne jest ponadto występowanie fragmentu złożonego z aminokwasów konstytutywnych, który pośredniczy w wiązaniu trójskładnikowego kompleksu złożonego z cząsteczki białka rodziny WASP, G-aktyny oraz Arp2/3 do filamentu aktyny. W przypadku białek WASP/N-WASP do tego odcinka przyłączany jest także PIP_2 [33].

W przeciwieństwie do znaczącej homologii odcinka karboksylowego białek rodziny WASP, strukturę końca aminowego cechuje znaczne zróżnicowanie. Region N-terminalny cząsteczek WASP oraz N-WASP zawiera motyw GBD wiążący Cdc42 [39], określane również jako domena GBD/CRIB [37], oraz domenę WASP1 (WH1), nosząca także nazwy: domena Ena-VASP1 (EVH1) [6], domena plekstrynowa (PH) [35].

Białka Scar/WAVE natomiast mają na końcu aminowym odrębny, wysoce specyficzny motyw – domenę WAVE (WHD), określaną również jako SCAR (SHD). Brak domen GBD oraz WH1 w cząsteczkach Scar/WAVE [6].

Aktywacja WASP/N-WASP

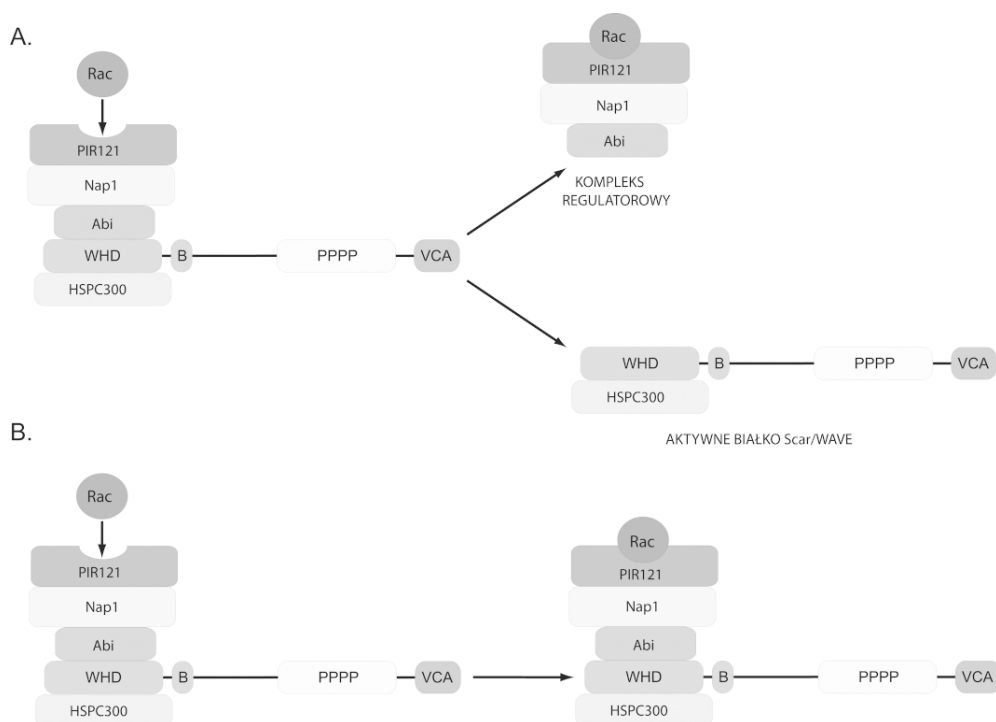
Oddziaływanie pomiędzy domenami VCA oraz GBD białek WASP i N-WASP prowadzi do zamaskowania regionu VCA, czego następstwem jest inaktywacja danych białek (proces autoinhibicji). Związanie się Cdc42 z domeną GBD oraz przyłączenie PIP_2 do sąsiadującego regionu, zbudowanego z aminokwasów konstytutywnych, powoduje zmiany konformacyjne cząsteczek – odsłonięcie domeny katalitycznej VCA, a w konsekwencji aktywację białek, umożliwiającą formowanie kompleksu: WASP – monomer aktyny – kompleks Arp 2/3 [33, 37] (ryc. 3).



RYCINA 3. Model aktywacji białek WASP (N-WASP) [6]. Autoinhibicja białek zachodzi w wyniku zablokowania domeny VCA przez motyw GBD. Związanie się Cdc42 oraz PIP_2 z odpowiednio: domenami GBD i B powoduje zmiany konformacyjne cząsteczek białek, prowadząc do uwolnienia końca karboksylowego i tym samym aktywacji WASP/N-WASP

Aktywacja Scar/WAVE

Brak domeny GBD w cząsteczkach białek należących do Scar/WAVE uniemożliwia bezpośrednie przyłączenie Rac1 [9, 37, 39]. Dowiedziono, że białko WAVE1, które zlokalizowane jest bliżej jądra [34] i odpowiedzialne najprawdopodobniej za stabilizację lamellipodiów poprzez udział w formowaniu struktur adhezyjnych [46], w formie nieaktywnej, w warunkach *in vitro* tworzy kompleks z białkami: PIR 121, Nap1, Abi2 oraz HSPC300 [5, 9]. Dysocjację kompleksu inicjują białka Nck bądź Rac1, wiążące się z PIR121 i tym samym powodujące uwolnienie aktywnego WAVE1, które pozostaje związane z HSPC300 [5, 9]. Wyniki innych badań [15] wskazują, że białko WAVE2, zlokalizowane przy krawędzi wiodącej komórki [34] ulega aktywacji w wyniku przyłączenia Rac i utworzenia kompleksu WAVE2-Abi1-Nap1-PIR121. Badacze twierdzą, że powstały kompleks nie ulega dysocjacji po przyłączeniu Rac, co pozostaje w



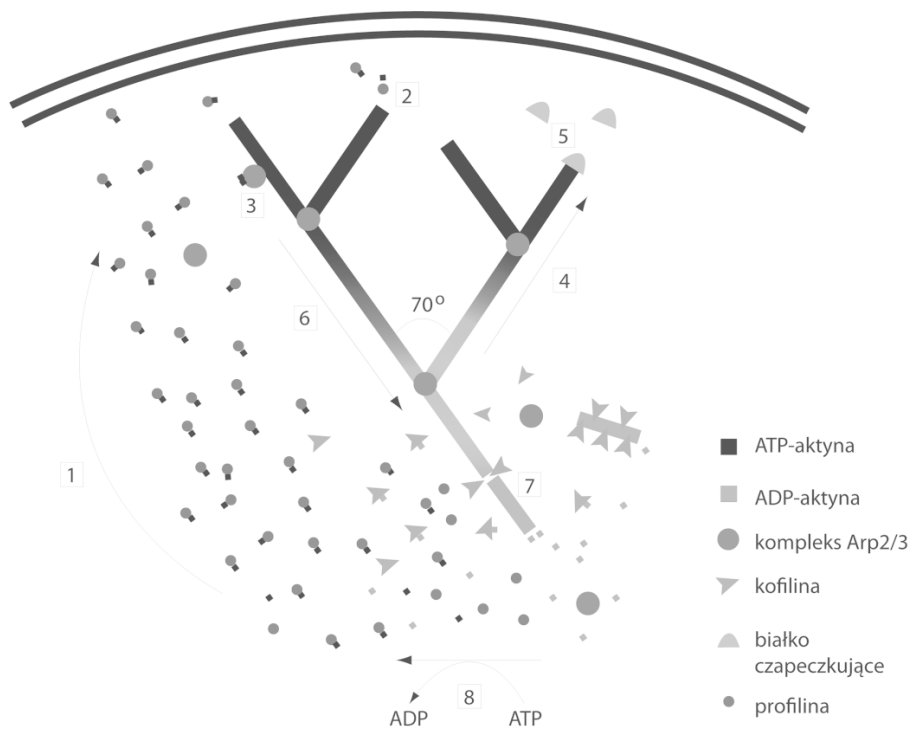
RYCINA 4. Modele aktywacji białek Scar/WAVE: A – Nieaktywne białko Scar/WAVE tworzy kompleks z białkami PIR121, Nap1, Abi oraz HSPC300. Przyłączenie Rac do PIR121 powoduje dysocjację kompleksu i tym samym aktywację Scar/WAVE, które pozostaje związane z HSPC300 [9]. B – Związanie Rac z PIR121 aktywuje Scar/WAVE. Powstały kompleks nie ulega dysocjacji [15]

opozycji do przedstawionych powyżej wyników badań [9] (ryc. 4). Została dowiedziona także możliwość aktywacji WAVE2 przez białko Rac za pośrednictwem białka IRSp53 [20]. Wnioskuje się, że WAVE 3 tworzy tego samego rodzaju kompleksy białkowe jak izoformy WAVE1 i WAVE2, a zidentyfikowane rozbieżności mają miejsce na poziomie tkankowym i wynikają z różnic w powinowactwie do określonych i niezidentyfikowanych jeszcze białek wiążących [32].

„Dendrytyczny” model nukleacji filamentów aktynowych (ang. *the dendritic nucleation model*) opisuje proces formowania rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium w strefie wiodącej komórki [7, 22, 23, 24, 31, 35] następująco:

Aktywne białka WASP przyłączają monomer aktyny oraz kompleks Arp2/3, co aktywuje Arp 2/3 i stanowi warunek rozpoczęcia przez kompleks procesu nukleacji *de novo* filamentów aktynowych jako odgałęzień wcześniej istniejących filamentów. W konsekwencji, powstają rozwidlenia (ang. *Y-junctions*) pod charakterystycznym dla opisywanych struktur kątem $\sim 70^\circ$. Do końców (+) powstałej w ten sposób, rozgałęzionej sieci mikrofilamentów są dodawane następnie monomery aktyny związane z ATP (w większości transportowane w kompleksie z profiliną). Proces elongacji włókien F-aktyny kontrolowany jest jednocześnie przez białka „czapczkujące” (CP), które wiążąc końce (+) filamentów hamują dalsze ich wydłużanie. Podczas polimeryzacji lub w krótkim czasie

po jej zejściu, nukleotyd ulega hydrolizie do ADP i Pi. Odłączenie fosforanu zmniejsza powinowactwo kompleksu Arp2/3 do F-aktyny ~ 20-krotnie, powodując dysocjację i rozpad filamentów aktynowych. Proces ten wzmacniany jest przez niektóre białka, m.in kofilinę, która przyłączając się do ADP-aktyny powoduje cięcie i depolimeryzację jej końca (-). Monomery aktyny związane z kofiliną, uwolnione w wyniku dysocjacji łączą się następnie z profiliną, rywalizującą z kofiliną o możliwość związania z G-aktyną. Profilina intensyfikuje ponadto wymianę ADP związanego z aktyną na obecny w cytoplazmie ATP. Powstała w ten sposób pula monomerów aktyny związanych z profiliną może być wykorzystana do elongacji rosnącego końca (+) (ryc. 5).



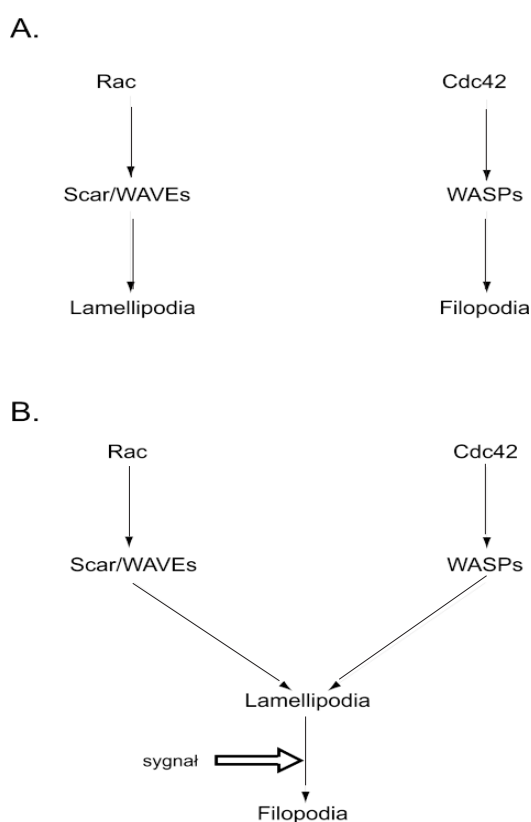
RYCINA 5. „Dendrytyczny” model nukleacji filamentów aktynowych [23, 24]: 1 – monomery ATP-aktyny transportowane w kompleksie z profiliną, 2 – przyłączenie cząstek G-aktyny do rosnącego końca (+) filamentu w procesie polimeryzacji, 3 – aktywny kompleks Arp2/3 formujący odgałęzienia filamentów aktynowych, 4 – wydłużanie włókien F-aktyny, 5 – przyłączenie się białek CP do końców (+) filamentów – zablokowanie polimeryzacji, 6 – hydroliza związanego z monomerem aktyny ATP do ADP i Pi, 7 – przyłączenie kofiliny do ADP-aktyny, cięcie i depolimeryzacja końca (-) filamentu, 8 – kataliza wymiany ADP na ATP zachodząca przy udziale profiliny

FILOPODIA

Filopodia obecne są przy krawędzi wiodącej pewnych typów komórek. Stożki wzrostu komórek nerwowych oraz większość fibroblastów wykształca te struktury, natomiast nie stwierdzono ich występowania w keratynocytach ryb i neutrofilach ssaków [22].

Filopodia, w przeciwieństwie do rozgałęzionej sieci filamentów aktynowych lamellipodium, zbudowane są z długich, dorastających w pewnych typach komórek do 50 μm [12] wiązek F-aktyny [7, 17, 35, 36]. Liczba filamentów aktynowych budujących filopodium oraz towarzyszących im białek sieciujących (ang. *cross linking proteins*)

determinuje elastyczność wypustki [41]. Twierdzi się, że podstawa filopodium, zakotwiczona jest w sieci włókien F-aktyny w obszarze lamellipodium [36, 40]. Mechanizm regulujący powstawanie tych struktur jest obecnie przedmiotem dyskusji. Część grup badawczych [4, 36, 43] podważa słuszność paradygmatu, który zakłada występowanie dwóch równoległych i niezależnych szlaków sygnałowych, prowadzących od WASP do lamellipodiów oraz od Scar/WAVE do filopodiów [37] (ryc. 6a). Biyasheva i współpracownicy [4] wysunęli hipotezę, która została nazwana „szlakiem kaskadowym” (ang. *the cascade pathway model*) (ryc. 6b). Według niej, aktywacja białek WASP oraz Scar/WAVE prowadzi do formowania lamellipodium stanowiącego jednocześnie „fundament”, w obrębie którego, przy udziale dodatkowych sygnałów, zachodzi reorganizacja cytoszkieletu i formowanie filopodiów. Równolegle, ta sama grupa badawcza zaproponowała będący dopełnieniem poprzedniego model, określany jako „konwergentne wydłużanie się” (ang. *convergent elongation*) [36, 43]. Zakłada on mianowicie, że białka kompleksu Arp2/3 biorą udział w powstawaniu rozgałęzionej sieci filamentów aktynowych, która poprzez formowanie struktur pośrednich, podlega następnie reor-



RYCINA 6. Modele regulacji powstawania lamellipodiów i filopodiów. A – Niezależne szlaki sygnałowe: aktywacja białek Scar/WAVEs poprzez przyłączenie Rac prowadzi do formowania lamellipodiów; związanie Cdc42 z białkami WASPs inicjuje tworzenie filopodiów [10, 37]. B – Szlak kaskadowy: aktywacja białek Scar/WAVEs oraz WASPs przez odpowiednio: Rac i Cdc42, prowadzi do formowania lamellipodiów, które po zadziałaniu dodatkowych sygnałów są transformowane w filopodia [4]

ganizacji w równoległe wiązki F-aktyny. Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań [3] dowodzą, że białka Ena/VASP oraz białka „czapeczkujące” rywalizują o wiązanie z końcem (+) nowo powstałych, przy udziale Arp 2/3, filamentów aktynowych, a funkcją Ena/VASP jest podtrzymanie dalszego ich wydłużania. Autorzy omawianego modelu twierdzą, że dzięki niewyjaśnionemu do tej pory mechanizmowi, prekursorzy filopodiów związane w regionie rosnącym (+) filamentu z grupą białek, najprawdopodobniej z Ena/VASP, tracą zdolność tworzenia rozgałęzień i formują równoległe wiązki, stabilizowane przez białko sieciujące – fascynę. Badacze sugerują, że rekrutacja i/lub aktywacja fascyny w części szczytowej prekursorów powoduje sieciowanie zlokalizowanych tam filamentów i tym samym formowanie ułożonych równoległe wiązek F-aktyny. Przeprowadzenie kolejnych doświadczeń, umożliwiło dalszą analizę opisywanego procesu oraz udoskonalenie wcześniejszych założeń. Stwierdzono [18], że „decyzja” o formowaniu wiązek filamentów filopodiów bądź kontynuowaniu tworzenia rozgałęzionej sieci F-aktyny lamellipodium zależna jest od aktywności białek „czapeczkujących” (CP). Autorzy sugerują, że CP funkcjonuje w cytoszkielecie jako negatywny regulator filopodiów oraz pozytywny lamellipodiów. Mechanizm regulacji CP nie został do końca wyjaśniony. Zidentyfikowano dotychczas dwa białka oddziałujące z CP: V-1, formujący stabilny kompleks z CP i tym samym hamujący jego wiązanie z F-aktyną [38] oraz CARMIL, wyizolowany z *Dictyostelium* i *Acanthamoeba* [16, 27], którego wpływ na CP pozostaje przedmiotem badań. W procesie regulacji wydłużania końców (+) filamentów podkreśla się także udział białek działających antagonistycznie w stosunku do CP, którymi są wspomniane wcześniej Ena/VASP [3] oraz zidentyfikowane niedawno forminy. W warunkach *in vitro*, forminy wiążą się z końcem (+) filamentów aktynowych [11, 26] zabezpieczając je przed „czapeczkowaniem” przez CP i tym samym umożliwiając dalszą elongację polimerów aktyny [11, 14, 21, 26, 47].

LAMELLA

Badania przeprowadzone z zastosowaniem qFSM dowiodły, że większość (80–95%) filamentów aktynowych, powstałych w procesie polimeryzacji w obszarze lamellipodium, ulega depolimeryzacji w odległości 1–3 μm od krawędzi komórki, w strefie przejściowej pomiędzy lamellipodium a lamellum [25, 42, 44]. Lamellum zbudowane jest z długich i nierozgałęzionych włókien F-aktyny, obejmujących obszar mieszczący się w granicach 3–15 μm (licząc od krawędzi komórki) [25], przestrzeń pomiędzy lamellipodium a ciałem komórki [22]. Przypuszcza się, że filamety aktynowe lamellum nie są formowane poprzez reorganizację sieci filamentów lamellipodium, ale powstają w wyniku niezależnej asocjacji [25, 42]. Charakterystyczne dla rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium białka kompleksu Arp2/3 oraz ADF/kofilina [23] nie są aktywne w obszarze lamellum. Zidentyfikowano tam natomiast miozynę II oraz tropomiozynę [8, 24]. Opisywane struktury różni ponadto natężenie procesów polimeryzacji i depolimeryzacji filamentów aktynowych, które w obszarze lamellipodium jest wyższe ~ 10-krotnie w stosunku do lamellum [25, 42], a cykl zachodzi w sposób ciągły [25, 44].

Lamellum cechuje wolniejsze tempo reorganizacji cytoszkieletu, a procesy polimeryzacji i depolimeryzacji występują punktowo [25, 42]. Połączenia pomiędzy filamentami lamellum i lamellipodium cechuje występowanie struktur adhezyjnych, utworzonych przez transmembranowe kompleksy integryn oraz białek wiążących aktynę (ABPs), odpowiadających za przełożenie aktomiozynowego skurczu powstałego w lamellum na siłę ciągnącą komórkę po powierzchni macierzy pozakomórkowej (zewnątrzkomórkowego matriks) [25]. Wyniki najnowszych badań [13, 25] wskazują, że między innymi lamella, a nie lamellipodia powodujące bezładne wypychanie i cofanie krawędzi wiodącej komórki [25], odpowiadają za jej efektywne i trwałe wysunięcie. Sugeruje się [13], że funkcją lamellipodium jest analiza środowiska oraz zapewnienie natychmiastowej odpowiedzi na różnorodne bodźce kierunkowe, natomiast lamellum odpowiedzialne jest za efektywny ruch komórki w pierwszym etapie migracji.

PODSUMOWANIE

Pierwszy etap migracji komórki polega na wysunięciu jej krawędzi wiodącej. Proces ten związany jest z dynamiczną reorganizacją cytoszkieletu aktynowego i formowaniem takich struktur cytoszkieletu, jak: lamellipodia, filopodia czy zidentyfikowane niedawno lamella. Drogi sygnałowe, prowadzące do powstania powyższych struktur są wciąż przedmiotem dyskusji. Część grup badawczych odrzuca założenie mówiące o występowaniu niezależnych szlaków sygnałowych, prowadzących od N-WASP do lamellipodiów oraz od Scar/WAVE do filopodiów. Sugeruje się natomiast formowanie filopodiów poprzez reorganizację sieci filamentów lamellipodium, w której decydującą rolę pełnią białka CP oraz Ena/VASP. Interesujących wyników dostarczyły badania prowadzone przez Ponti [25] i Vallotton [42] wskazujące na fakt występowania przy krawędzi wiodącej komórek długich, nierozgałęzionych włókien F-aktyny, różniących się istotnie od rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium. Wyniki ostatnich eksperymentów [13], w których zahamowano tworzenie się lamellipodiów, pozwalają przypuszczać, że są one zbędne w procesie generacji ruchu komórki. Sugeruje się, że za trwałe wysunięcie krawędzi wiodącej komórki w pierwszym etapie jej ruchu odpowiedzialne jest lamellum. Uzyskane w wyniku powyższych doświadczeń informacje nasuwają wiele pytań. Czy filopodia powstają w wyniku reorganizacji filamentów lamellipodium czy lamellum? Jaki jest mechanizm powstawania filamentów lamellum? Co determinuje szerokość lamellipodium? Odpowiedź na te i wiele innych pytań dostarczą kolejne badania w tym zakresie.

LITERATURA

- [1] BAILLY M, CONDEELIS J. Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: E292–294.
- [2] BEAR JE, KRAUSE M, GERTLER FB. Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 158–166.
- [3] BEAR JE, SVITKINA TM, KRAUSE M, SCHAFFER DA, LOUREIRO JJ, STRASSER GA, MALY IV, CHAGA OY, COOPER JA, BORISY GG, GERTLER FB. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 2002; **109**: 509–521.

- [4] BIYASHEVA A, SVITKINA T, KUNDA P, BAUMB, BORISY G. Cascade pathway of filopodia formation downstream of SCAR. *J Cell Sci* 2004; **117**: 837–848.
- [5] BLAGG SL, INSALL RH. Solving the WAVE function. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 279–281.
- [6] BOMPARD G, CARON E. Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 2004; **166**: 957–962.
- [7] BORISY GG, SVITKINA TM. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 104–112.
- [8] DesMARAIS V, ICHETOVKIN I, CONDEELIS J, HITCHCOCK-DeGREGORI SE. Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci* 2002; **115**: 4649–4660.
- [9] EDEN S, ROHATGIR, PODTELEJNIKOV AV, MANN M, KIRSCHNER MW. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 2002; **418**: 790–793.
- [10] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**: 629–635.
- [11] EVANGELISTA M, ZIGMOND S, BOONE C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2603–2611.
- [12] FRIEDL P, WOLF K. Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 2003; **3**: 362–374.
- [13] GUPTON SL, ANDERSON KL, KOLE TP, FISCHER RS, PONTI A, HITCHCOCK-DeGREGORI SE, DANUSER G, FOWLER VM, WIRTZ D, HANEIN D, WATERMAN-STORER CM. Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol* 2005; **168**: 619–631.
- [14] HARRIS ES, LI F, HIGGS HN. The mouse forming, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem* 2004; **279**: 20076–20087.
- [15] INNOCENTI M, ZUCCONI A, DISANZA A, FRITTOLE, ARECES LB, STEFFEN A, STRADAL TE, DI FIORE PP, CARLIER MF, SCITA G. Abi1 is essential for the formation and activation of WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 319–327.
- [16] JUNG G, REMMERT K, WU X, VOLOSKY JM, HAMMER JA. 3RD The Dictyostelium CARMIL protein links capping proteins and Arp 2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1479–1497.
- [17] LAUFFENBURGER DA, HORWITZ AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; **84**: 359–369.
- [18] MEJILLANO MR, KOJIMA S, APPLEWHITE DA, GERTLER FB, SVITKINA TM, BORISY GG. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 2004; **118**: 363–373.
- [19] MIKI H, TAKENAWA T. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem* 2003; **134**: 309–313.
- [20] MIKI H, YAMAGUCHI H, SUETSUGU S, TAKENAWA T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 2000; **408**: 732–735.
- [21] MOSELEY JB, SAGOT I, MANNING AL, XU Y, ECK MJ, PELLMAN D, GOODE BL. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 896–907.
- [22] NICHOLSON-DYKSTRA S, HIGGS HN, HARRIS ES. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol* 2005; **15**: R346–R357.
- [23] POLLARD TD, BLANCHOIN L, MULLINS RD. Actin dynamics. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3–4.
- [24] POLLARD TD, BORISY GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; **112**: 453–465.
- [25] PONTI A, MACHACEK M, GUPTON SL, WATERMAN-STORER CM, DANUSER G. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 2004; **305**: 1782–1786.
- [26] PRUYNE D, EVANGELISTA M, CHANGSONG Y, BIE, ZIGMOND S, BRETSCHER A, BOONE C. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 2002; **297**: 612–615.
- [27] REMMERT K, OLSZEWSKI TE, BOWERS MB, DIMITROVA M, GINSBURG A, HAMMER JA. 3RD CARMIL is a bona fide capping protein interactant. *J Biol Chem* 2004; **279**: 3068–3077.
- [28] SMALL JV, RESCH GP. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 517–523.
- [29] SMALL JV, ROTTNER K, KAVERINA I, ANDERSON KI. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 271–281.

- [30] SMALL JV, STRADAL T, VIGNAL E, ROTTNER K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 112–120.
- [31] STĘPIEŃ A, GRZANKA A, OSTROWSKI M. Białka kompleksu ADF/kofilina: regulacja dynamiki filamentów aktynowych. *Kosmos* 2005; **54**: 381–389.
- [32] STOVOLD CF, MILLARD TH, MACHESKY LM. Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BCM. Cell Biol* 2005; **6**: 11.
- [33] STRADAL TE, ROTTNER K, DISANZA A, CONFALONIERI S, INNOCENTI M, SCITA G. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 303–311.
- [34] SUETSUGU S, YAMAZAKI D, KURISU S, TAKENAWA T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* 2003; **5**: 595–609.
- [35] SVITKINA TM, BORISY GG. Progress in protrusion: the tell-tale scar. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 432–436.
- [36] SVITKINA TM, BULANOVA EA, CHAGA OY, VIGNJEVIC DM, KOJIMA S, VASILIEV JM, BORISY GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; **160**: 409–421.
- [37] TAKENAWA T, MIKI H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1801–1809.
- [38] TAOKA M, ICHIMURA T, WAKAMIYA-TSURUTA A, KUBOTA Y, ARAKI T, OBINATA T, ISOBE T. V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 5864–5870.
- [39] THRASHER AJ. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 635–646.
- [40] TSENG Y, AN KM, ESUE O, WIRTZ D. The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1819–1826.
- [41] TSENG Y, FEDOROV E, McCAFFERY JM, ALMO SC, WIRTZ D. Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with α -actinin. *J Mol Biol* 2001; **310**: 351–366.
- [42] VALLOTTON P, GUPTON SL, WATERMAN-STORER CM, DANUSER G. Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9660–9665.
- [43] VIGNJEVIC D, YARAR D, WELCH MD, PELOQUIN J, SVITKINA T, BORISY GG. Formation of filopodia-like bundles *in vitro* from a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; **160**: 951–962.
- [44] WATANABE N, MITCHISON TJ. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 2002; **295**: 1083–1086.
- [45] WEBB DJ, PARSONS JT, HORWITZ AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: E97–100.
- [46] YAMAZAKI D, FUJIWARA T, SUETSUGU S, TAKENAWA T. A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells* 2005; **10**: 381–392.
- [47] ZIGMOND SH, EVANGELISTA M, BOONE C, YANG C, DAR AC, SICHERI F, FORKEY J, PRING M. Formin leaky cap allowing elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* 2003; **13**: 1820–1823.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 04.02. 2006 r.

Przyjęto: 28.04. 2006 r.

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

e-mail: a_stepien@cm.umk.pl