

Received: 2015.04.21
Accepted: 2016.11.28
Published: 2017.05.05

Kofilina – białko kontrolujące dynamikę filamentów aktynowych*

Cofilin – a protein controlling dynamics of actin filaments

Zofia Ostrowska, Joanna Moraczewska

Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Streszczenie

Kofiliny to zachowane w toku ewolucji białka obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych. Ich podstawową funkcją jest dynamiczna reorganizacja cytoszkieletu aktynowego. Znane są dwie izoformy kofiliny – kofilina 1, występująca we wszystkich badanych komórkach mięśniowych i w embrionalnych komórkach mięśniowych oraz kofilina 2, dominująca w dojrzałych mięśniach szkieletowych i sercowym. Łańcuchy polipeptydowe obu izoform związają się w strukturę homologiczną do zachowanej w ewolucji domeny ADF (actin depolymerizing factor) charakterystycznej dla czynnika depolimeryzującego aktynę. W cząsteczce kofiliny znaleziono dwa miejsca wiążące aktynę. Jedno jest odpowiedzialne za wiązanie z aktyną monomeryczną i filamentową, drugie oddziałuje tylko z filamentem. Wiązanie kofiliny do filamentowej aktyny powoduje zmianę w orientacji podjednostek aktynowych i doprowadza do pęknięcia filamentów. Tym samym zwiększa się liczba końców, które w zależności od warunków mogą ulegać wydłużaniu lub skracaniu. Oddziaływanie kofiliny z aktyną monomeryczną ograniczają dostępność podjednostek dla rosnącego filamentu aktynowego. Aktywność kofiliny jest kontrolowana przez fosforylację i wiązanie fosfolipidów błonowych, pH środowiska i stres oksydacyjny. W stanie stresu oksydacyjnego utlenienie reszt cysteiny powoduje tworzenie dimerów kofiliny, które mogą sieciować aktynę. Stabilne pałeczki aktynowo-koofilinowe oszczędzają komórkowy ATP, który nie jest zużywany w procesie polimeryzacji. Dzięki temu komórka szybciej wychodzi ze stanu stresu. Końcowa reakcja komórki na różne czynniki środowiskowe jest wypadkową aktywności kofiliny oraz aktywności różnych białek wiążących aktynę, które działają synergistycznie bądź antagonistycznie w stosunku do kofiliny. Ze względu na jej podstawową rolę w regulacji dynamiki filamentów aktynowych, kofilina jest uwikłana w rozwój patologii, takich jak choroby neurodegeneracyjne, nowotworowe, wrodzone miopatie i kardiomiopatie.

Słowa kluczowe: kofilina • cytoszkielet aktynowy • mikrofilamenty • regulacja polimeryzacji aktyny

Summary

Cofilins are evolutionary conserved proteins present in all *Eukaryotic* cells. Their primary function is dynamic reorganization of actin cytoskeleton. Two cofilin isoforms are known: cofilin 1, present in all studied non-muscle cells and in embryonic muscle cells, and cofilin 2, which dominates in mature skeletal and cardiac muscles. Polypeptide chains of both isoforms fold into a structure homological to a conservative ADF (actin depolymerizing factor) domain, which is characteristic of actin depolymerizing factor. In cofilin molecule two actin-binding sites were found. One site binds monomeric and filamentous actin, the second one interacts only with the filament. Binding of cofilin to actin filament causes a change in the orientation of subunits, which results in filament severing. This increases number of ends which can either elongate or shorten the filament, depending on the conditions. Cofilin interactions

*Artykuł powstał w ramach realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, numer decyzji: DEC-2012/07/N/NZ1/03094.

with monomeric actin decreases availability of polymerization-competent actin subunits. Cofilin activity is controlled by phosphorylation, binding membrane phospholipids, local pH and oxidative stress. Under conditions of oxidative stress oxidation of cysteine residues leads to formation of dimers, which are able to cross-link actin filaments. Stable actin-cofilin rods save cellular ATP, which is not used during active polymerization process. This facilitates faster cell recovery from the stress. The final cellular reaction on the environmental stimuli is a resultant of cofilin activity and activities of other actin-binding proteins, which function either synergistically or antagonistically. Due to the central role in the regulation of actin filaments dynamics, cofilin is involved in development of cancer, neurodegenerative diseases, congenital myopathies and cardiomyopathies.

Keywords: cofilin • actin cytoskeleton • microfilaments • regulation of actin polymerization

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1237162>
DOI: 11.1111/1111.111.
Word count: 6082
Tables: 1
Figures: 5
References: 68

Adres autorki: dr hab. Joanna Moraczewska prof. nadzw., Zakład Biochemii i Biologii Komórki, ul. Ks. J. Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz; e-mail: joanna.moraczewska@ukw.edu.pl

Wykaz skrótów: **ADF** – czynnik depolimeryzujący aktynę (actin depolymerizing factor), **ADF-H** – homologiczna domena czynnika depolimeryzującego aktynę (actin depolymerizing factor homology domain), **ADP** – adenozylo-5'-difosforan, **Aip1** – białko oddziałujące z aktyną (actin-interacting protein 1), **Arp 2/3** – kompleks białek bocznie wiążących się do filamentów aktynowych (actin related proteins Arp2 and Arp3), **ATP** – adenozylo-5'-trifosforan, **CAP** – białko aktywujące cyklazę (cyclase associated protein), **c_c** – stężenie krytyczne (critical concentration), **Cof1** – kofilina mięśniowa, **Cof2** – kofilina mięśniowa, **CP** – białko zakrywające koniec kolczasty mikrofilamentu (capping protein), **F-aktyna** – aktyna filamentowa, **G-aktyna** – aktyna monomeryczna, **NHE1** – antyporter sodowo-potasowy 1 (sodium-hydrogen antiporter 1), **NLS** – sekwencja kierująca białko do jądra komórkowego (nuclear localization signal), **NMR** – jądrowy rezonans magnetyczny (nuclear magnetic resonance), **PIP₂** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), **PIP₃** – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), **S1** – subfragment 1 miozyny, **SD(1-4)** – subdomeny aktyny monomerycznej.

WPROWADZENIE

Kofiliny są białkami wywierającymi wpływ na dynamikę polimeryzacji filamentów aktynowych. Zostały wykryte ponad 30 lat temu w tkance nerwowej. Wykazano wówczas, że działają jako czynniki wiążące monomeryczną aktynę i depolimeryzujące filamenty [7,39,40]. W toku dalszych badań stwierdzono, że kofiliny należą do dużej rodziny homologicznych białek zawierających zachowaną w ewolucji domenę ADF-H (actin-depolymerizing factor homology domain), rozpowszechnionych we wszystkich komórkach eukariotycznych [27,52].

Podstawowa funkcja kofiliny to reorganizacja filamentów aktynowych, proces podlegający ścisłej i skomplikowanej kontroli przez systemy sygnalizacji komórkowej. Dynamiczna polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych jest siłą napędową migracji komórkowej, cytokinezy, egzo- i endocytozy, a kofilina okazała

się głównym regulatorem dynamiki filamentów. Liczne badania prowadzone w ostatnich latach pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmów umożliwiających kofilinie nadzorowanie polimeryzacji aktyny w odpowiedzi na specyficzne potrzeby komórek [10,14,51,62]. Aby w pełni oddać zróżnicowanie mechanizmów, dzięki którym kofilina reguluje procesy komórkowe, należy wspomnieć, że białko to pełni w komórkach również funkcje, które nie zawsze są bezpośrednio związane z dynamiką filamentów aktynowych. Stwierdzono bowiem, że kofilina może być przenoszona do mitochondrium, gdzie bierze udział we wczesnej fazie apoptozy polegającej na uwalnianiu cytochromu c. Wiele doniesień wskazuje też na udział kofiliny w transporcie aktyny do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w procesie przebudowy chromatyny. Sama kofilina może mieć wpływ na regulację ekspresji genów. Inna zaskakująca funkcja kofiliny to aktywacja fosfolipazy D1, dzięki której kofilina reguluje metabolizm lipidów błonowych, a przez to wpływa na

aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów. Te niekonwencjonalne funkcje kofiliny nie są do końca zrozumiane i nie będą szerzej omawiane. Zainteresowanych czytelników odsyłamy do artykułów przeglądowych przedstawiających ADF/kofilinę jako „funkcjonalny węzeł biologii komórki” [10,14,22,56].

Celem artykułu jest omówienie molekularnych mechanizmów wykorzystywanych przez kofilinę w sprawowaniu kontroli nad stanem spolimeryzowania aktyny oraz przedstawienie patologicznych zmian, które są wywołane zaburzeniami w strukturze i funkcji tego ważnego białka. W pierwszej części pracy omówiono strukturę aktyny i proces spontanicznej polimeryzacji tego białka, co ułatwi wyjaśnienie mechanizmów regulacji dynamiki filamentów aktynowych przez kofilinę.

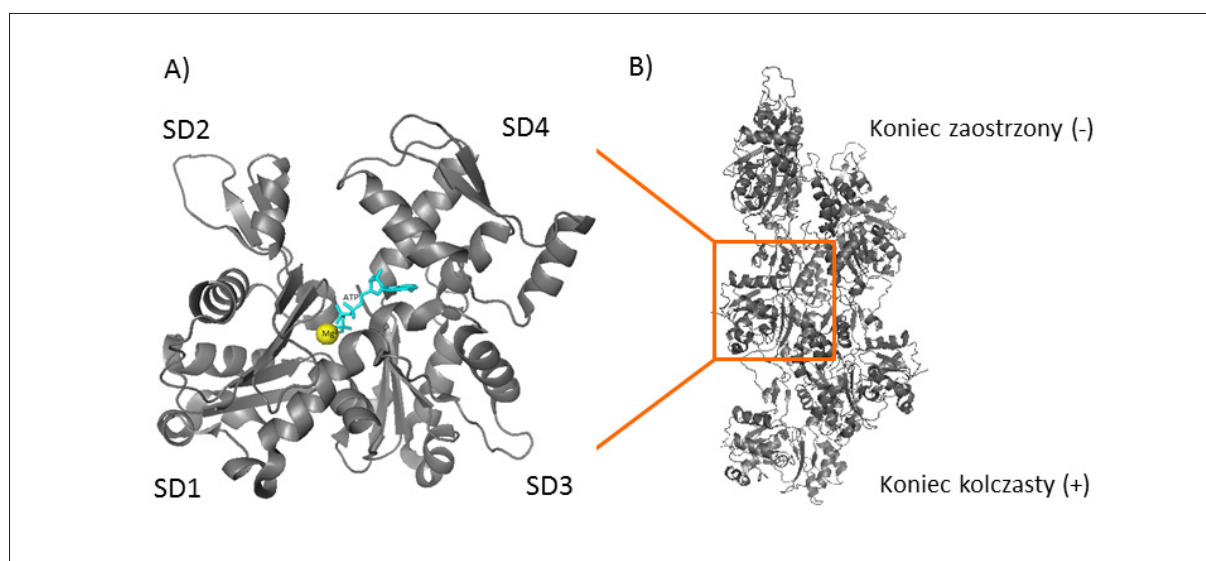
STRUKTURA MONOMERYCZNEJ I FILAMENTOWEJ AKTYNY

Monomeryczna aktyna (G-aktyna) jest globularną cząsteczką, której wymiary zewnętrzne pozwalają na wpisanie jej w prostopadłościan o bokach 5–6 nm i grubości 3,5 nm (ryc. 1A). Głęboka szczelina dzieli cząsteczkę aktyny na dwie domeny: zewnętrzną i wewnętrzną. Nazwy domen utworzono w oparciu o orientację podjednostek monomerycznej aktyny po ich wbudowaniu do filamentu. Domena zewnętrzna jest odsunięta od centralnej osi i wyeksponowana na zewnątrz filamentu, natomiast domena wewnętrzna jest skierowana do środka filamentu i położona bliżej centralnej osi. Każda z domen jest wyraźnie podzielona na dwie subdomeny – 1 i 2 (SD1 i SD2), które tworzą domenę zewnętrzną, a subdomeny 3 i 4 (SD3 i SD4) są częścią domeny wewnętrznej. W szczelinie międzydomenowej znajduje się miejsce wiązania nukleotydu adeninowego – ATP bądź ADP oraz kationów dwuwartościowych, którymi w warunkach fizjologicznych są Mg^{2+} [25].

Filamentowa aktyna (F-aktyna) jest strukturą zbudowaną z dwóch helikalnie, prawoskrętnie zwiniętych łańcuchów o średnicy 9–10 nm (ryc. 1B). Według najnowszego modelu filamentu, który uzyskano z rozdzielczością bliską atomowej, skok helisy i rotacja azymutalna na podjednostkę wynoszą odpowiednio 27,5 i 166,4 Å [64]. Podjednostki aktyny wbudowane do filamentu są tak zorientowane, że ich subdomeny 1 i 3 są skierowane w stronę jednego końca, zwanego końcem kolczastym, natomiast subdomeny 2 i 4 w stronę przeciwnego końca, zwanego końcem zaokrąglonym. Nazwy końców utworzono w oparciu o obrazy mikroskopowe filamentów udekorowane subfragmentami zawierającymi części główkowe miozyny (S1). Po hydrolizie wolnego ATP przez aktomiozynę, główki miozyny silnie wiążą się do aktyny i układają pod ostrym kątem w stosunku do osi filamentu nadając mu charakterystyczny kształt połączonych równoległe i zwróconych w tę samą stronę grotów strzał. Każdy protomer aktyny jest w ścisłym kontakcie z dwiema podjednostkami tego samego łańcucha oraz z dwiema podjednostkami należącymi do sąsiedniego łańcucha. Stabilizujące filament kontakty w obrębie jednego łańcucha zachodzą między SD2 i SD4 jednej podjednostki oraz SD1 i SD3 sąsiedniej podjednostki [25,28].

MECHANIZM POLIMERYZACJI AKTYNY

Szczególną cechą G-aktyny jest zdolność do spontanicznej polimeryzacji pod wpływem fizjologicznych stężeń soli jedno- i dwuwartościowych. Polimeryzacja rozpoczyna się, gdy stężenie monomerycznej aktyny przekroczy stężenie krytyczne (c_c). Badania *in vitro* przeprowadzone na wyizolowanej i oczyszczonej aktynie wykazały, że proces polimeryzacji jest wieloetapowy. Początkowy etap to aktywacja monomeru i nukleacja związana z tworzeniem się zarodki polimeryzacji w formie trimerów. W następnym etapie, zwanym elongacją,



Ryc. 1. (A) Struktura monomerycznej aktyny. Kolorem żółtym zaznaczono pozycję dwuwartościowego kationu, niebieskim – nukleotydu. (B) Struktura filamentowej aktyny. Struktury zobrazowano w programie PyMol na podstawie współrzędnych zdeponowanych w bazie PDB, monomer – PDB 3U9D, polimer 3J8A

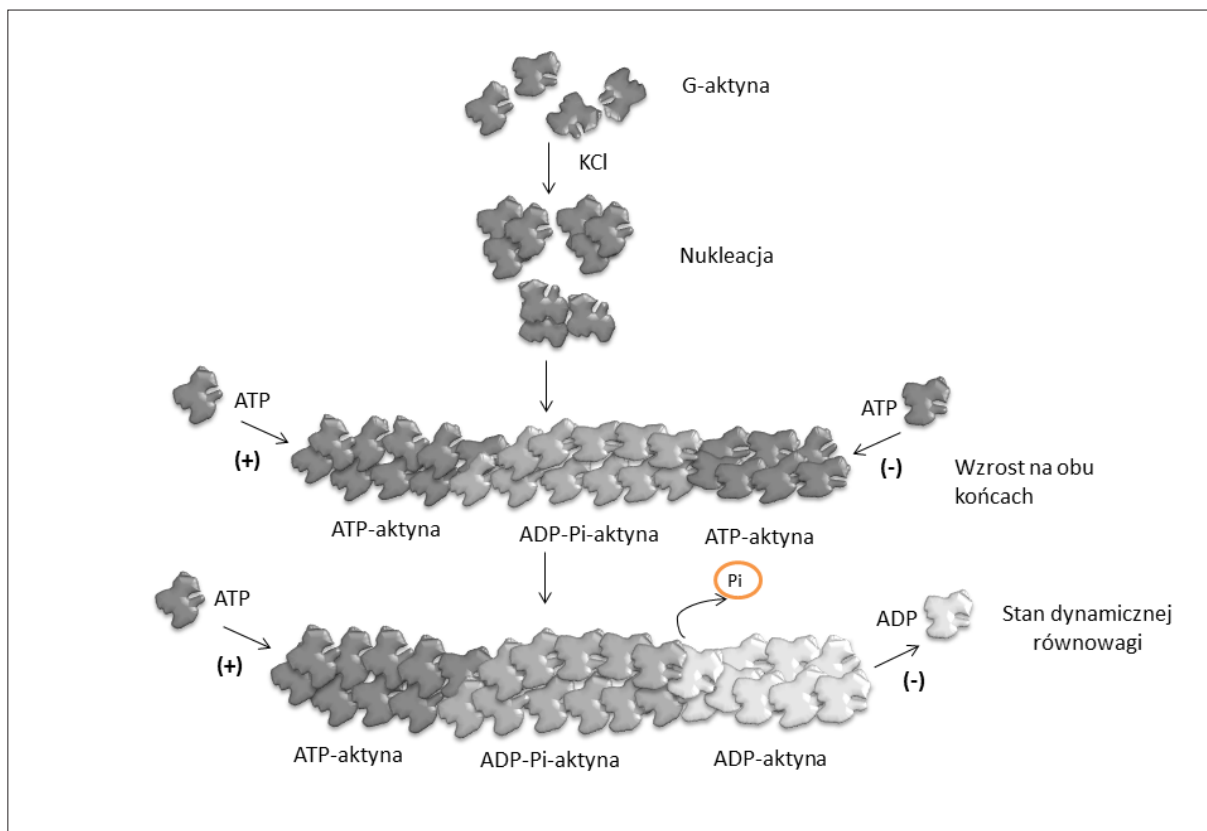
dochodzi do wydłużania polimeru. Elongacja trwa do czasu osiągnięcia stanu równowagi, w którym szybkość wydłużania filamentu aktynowego jest równoważona szybkością dysocjacji podjednostek na jego przeciwnych końcach (ryc. 2) [17,50].

Pod względem kinetyki polimeryzacji końce filamentu aktynowego nie są równocenne [50]. Koniec kolczasty jest bardziej dynamiczny i charakteryzuje się wyższą stałą asocjacji i dysocjacji niż koniec zaokrąglony. Ponieważ c_c zależy od stałej szybkości dysocjacji, na końcu kolczastym wartość c_c dla polimeryzacji ATP-G-aktyny jest 5-krotnie niższa niż na końcu zaokrąglonym [50]. W wysokich stężeniach G-aktyny, przekraczających c_c dla obu końców, filament rośnie z obu stron, ale szybkość wzrostu końca kolczastego jest większa. Z tego względu koniec kolczasty nosi też nazwę końca szybko rosnącego (+), a koniec zaokrąglony jest nazywany wolno rosnącym (-). W stanie równowagi wartość c_c dla całego filamentu przekracza c_c końca (+) i jest poniżej c_c końca (-). Taki stan jest odpowiedzialny za zjawisko zwane „treadmillingiem”, które polega na przepływie podjednostek aktyny wzdłuż filamentu w kierunku od końca kolczastego do zaokrąglonego, bez wpływu na całkowitą długość filamentu [65].

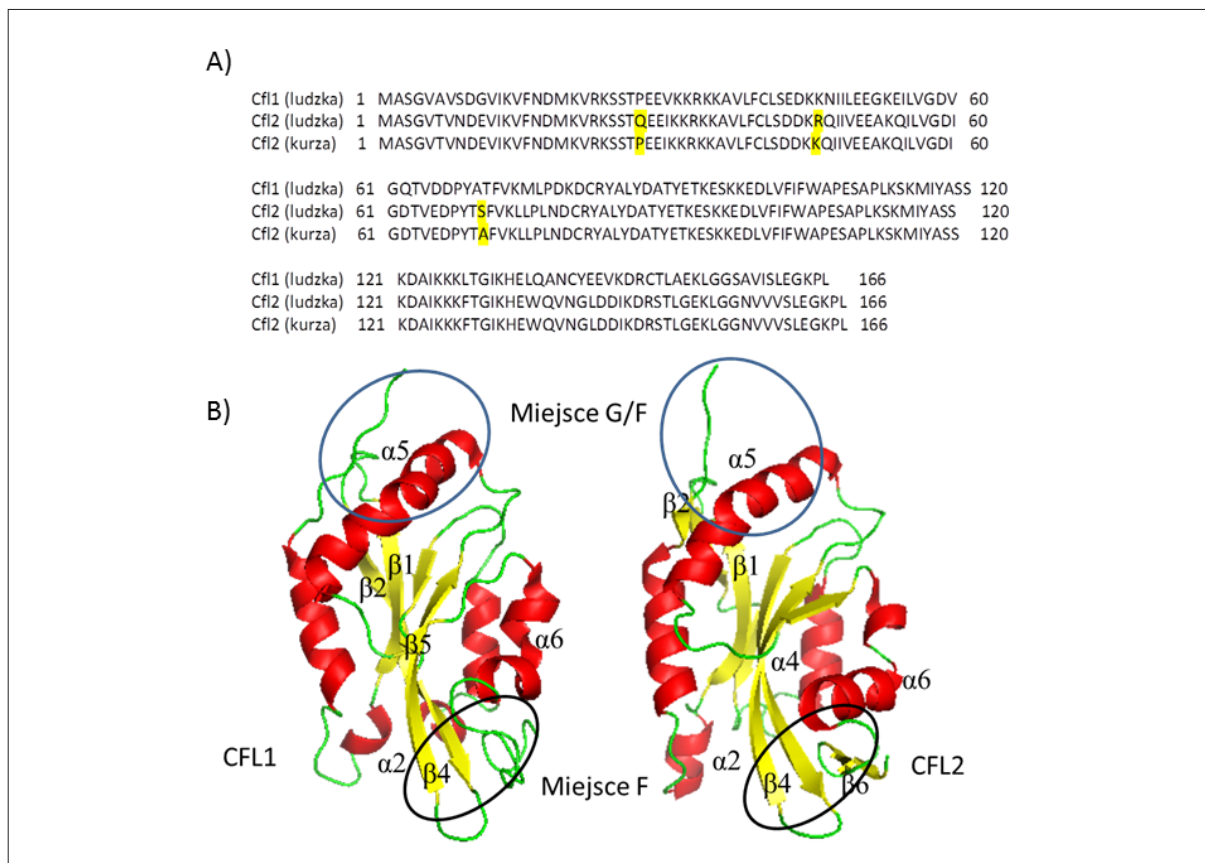
Po inkorporacji podjednostek ATP-G-aktyny do filamentu, dochodzi do hydrolizy γ -fosforanu. Uwalnia-

nie reszty fosforanowej jest procesem wolniejszym od hydrolizy, zatem jeszcze przez pewien czas podjednostki wiążą oba produkty hydrolizy – ADP i P_i (ryc. 2). Gdy podjednostki są przesuwane w kierunku końca zaokrąglonego, następuje dysocjacja fosforanu nieorganicznego, natomiast ADP pozostaje związany aż do odłączenia podjednostki ADP-G-aktyny na końcu (-) filamentu. Hydroliza ATP sprawia zatem, że wraz z przepływem podjednostek od końca kolczastego do zaokrąglonego następuje zmiana w rodzaju związanego nukleotydu z ATP przez ADP-Pi, na ADP [19,50].

W komórkach końce kolczaste filamentów aktynowych są skierowane w stronę błony komórkowej. Naturalna właściwość aktyny, którą jest wydłużanie filamentów na końcach kolczastych i skracanie na końcach zaokrąglonych mogłaby być doskonałym mechanizmem umożliwiającym ukierunkowany ruch, taki jak wysuwanie krawędzi wiodącej lamellipodium i wypustek filopodiów. Badania kinetyczne wykazały jednak, że w roztworze „treadmilling” zachodzi z prędkością o rząd wielkości wolniejszą niż w komórce [50]. Zatem w środowisku naturalnym muszą istnieć czynniki przyspieszające ten proces. Okazało się, że są nimi białka wiążące aktynę monomeryczną i filamentową, wśród których naczelną miejsce zajmuje kofilina.



Ryc. 2. Schemat polimeryzacji aktyny i hydrolizy ATP na filamencie



Ryc. 3. (A) Porównanie sekwencji aminokwasowej ludzkiej kofiliny niemięśniowej (Cof1) i mięśniowej (Cof2) z kurzą izoformą mięśniową. Sekwencje pobrano z bazy UniProt, kody dostępu: P23528, Q9Y281, P21566. Na żółto zaznaczono reszty aminokwasowe, które różnią ludzką i kurczą Cof2. (B) Związanie łańcucha polipeptydowego ludzkiej kofiliny niemięśniowej (Cof1, PDB 1Q8G) oraz kurzej kofiliny mięśniowej (Cof2, PDB 1TVJ). Elipsami zaznaczono miejsca wiązania kofiliny z aktywną monomeryczną i filamentową (miejsce G/F) oraz drugie miejsce wiązania z filamentem (miejsce F). Strukturę białek przedstawiono w programie PyMol

TKANKOWA SWOISTOŚĆ I WEWNĄTRZKOMÓRKOWE UMIEJSCOWIENIE BIAŁEK Z RODZINY ADF/KOFILINY

Kofiliny oraz homologiczne białko ADF są szeroko rozpowszechnione zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych. U ssaków znaleziono jedną izoformę ADF i dwie izoformy kofiliny – niemięśniową kofilinę 1 (Cof1) oraz mięśniową kofilinę 2 (Cof2). Porównanie sekwencji ludzkiej kofiliny niemięśniowej i mięśniowej oraz tych samych izoform występujących u myszy wykazało podobieństwo 99%, co świadczy o wysokim stopniu homologii międzygatunkowej tego białka wśród ssaków. Spore różnice dzielą natomiast obie izoformy Cof1 i Cof2 tego samego organizmu. Ich sekwencja aminokwasowa jest identyczna w około 80% (ryc. 3A) [63].

Badania przeprowadzone na mysich embrionach wykazały, że Cof1 jest izoformą dominującą we wszystkich fazach rozwojowych. Cof2 pojawia się w fazie postembrionalnej, a jej występowanie jest ograniczone do komórek rozwijających się mięśni. Natomiast syntezę ADF obserwowano w komórkach

nerwowych i nabłonkowych jelita i skóry. W większości badanych tkanek dojrzałych narządów myszy syntezie ulega Cof1. Uderzające jest jednak to, że Cof1 nie jest syntetyzowana w mięśniach szkieletowych, gdzie jest całkowicie zastąpiona przez swoistą mięśniowo Cof2 [43,63]. Obie izoformy kofiliny występują w dojrzałym mięśniu sercowym, w którym Cof2 jest postacią dominującą [36,38,63]. ADF natomiast jest syntetyzowana w postnatalnych komórkach nabłonkowych i śródbłonna naczyń [43,63]. Różnice w syntezie izoform kofiliny w niektórych komórkach ssaków przedstawiono w tabeli 1.

STRUKTURA KOFILINY

U kręgowców obie izoformy kofiliny, niemięśniowa Cof1 i mięśniowa Cof2, mają długość 166 aminokwasów (ryc. 3A). Analiza sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w bazie UniProt wskazuje, że ludzkie kofiliny są dłuższe od odpowiedników występujących u niższych organizmów o 23-42 reszty aminokwasowe. Pomimo tych różnic, trzyczłonowe struktury kofilin są bardzo podobne i odpowiadają domenie ADF-H [52].

Tabela 1. Miejsce ekspresji genów kodujących kofilinę 1 i 2 w komórkach ssaków

Miejsce ekspresji	Kofilina 1 (niemięśniowa)	Kofilina 2 (mięśniowa)	Źródło
Mięśnie gładkie naczyń krwionośnych	+	-	[57,66]
Mięśnie gładkie tchawicy	+	+ (7% całej kofiliny)	[67]
Mięśnie szkieletowe	-	+	[38]
Mięsień sercowy	+	+	[38]
Komórki nerwowe	+	-	[8,9]
Nerki	+	-	[31]

Według [8,9,31,38,57,66,67].

Atomowa struktura ludzkiej niemięśniowej kofiliny została wyznaczona metodą jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [52] oraz metodą krystalograficzną [29]. Rdzeniowa część cząsteczki jest zbudowana z sześciolańcuchowej skręconej harmonijki β typu mieszanego, charakteryzującej się zarówno przeciwnoległym, jak i równoległym przebiegiem łańcuchów. Rdzeń jest otoczony z dwóch stron przez odcinki zwinięte α -helikalnie (ryc. 3B). Helisa $\alpha 5$ charakteryzuje się zgięciem przy Ser120, które odgrywa ważną rolę w wiązaniu kofiliny do G-aktyny. W pętli 1, poprzedzającej helisę $\alpha 2$, wykryto obecność sekwencji NLS (nuclear localization signal), która umożliwia translokację kofiliny do jądra komórkowego przez pory jądrowe.

Różnice w sekwencji aminokwasowej między Cof1 i Cof2 wynoszą prawie 20%, co niewątpliwie wpływa na ostateczną strukturę trójwymiarową obu izoform białka. Atomowa struktura ludzkiej mięśniowej Cof2 nie została jeszcze ujawniona metodą krystalografii, zatem bezpośrednio porównanie struktur ludzkich izoform kofiliny nie jest możliwe. Natomiast znana jest struktura krurzej mięśniowej kofiliny otrzymana metodą jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, nuclear magnetic resonance). Kurza Cof2 jest analogiem ludzkiej kofiliny niemięśniowej i różni się od niej jedynie trzema podstawieniami aminokwasowymi. Z porównania struktur Cof1 i Cof2 przedstawionego na ryc. 3B wynika, że różnice między kofilinami dotyczą długości i orientacji helis α oraz harmonijek β . Te różnice strukturalne determinują specyficzne funkcje izoform.

WIĄZANIE KOFILINY DO AKTYNY I JEJ WPŁYW NA STRUKTURĘ FILAMENTU AKTYNOWEGO

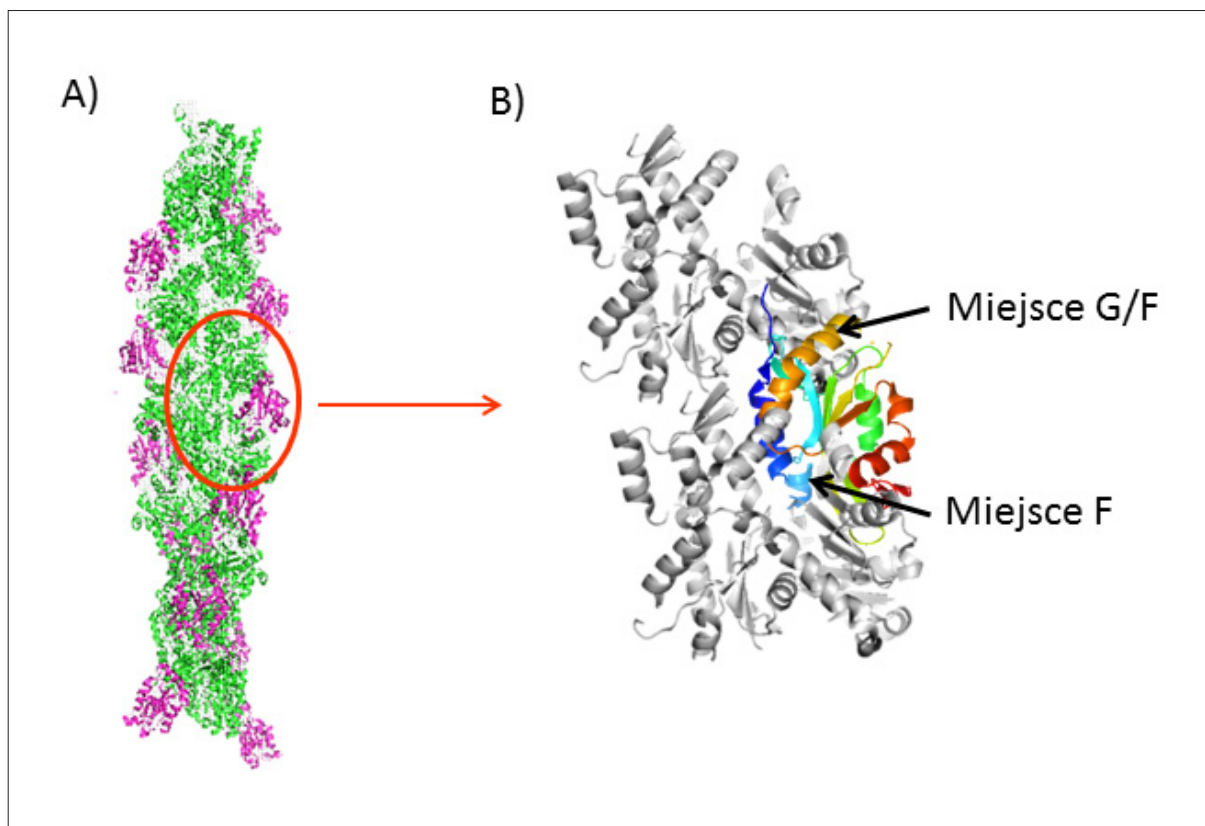
Kofilina zawiera dwa specyficzne miejsca oddziaływania z aktyną (ryc. 4). Pierwsze zwane miejscem G, pozwala

na wiązanie kofiliny zarówno do aktywnej monomerycznej, jak i filamentowej. Drugie to miejsce F, które znajduje się po przeciwnej do miejsca G stronie cząsteczki i oddziałuje tylko z aktyną filamentową [32].

Miejsce G zdefiniowano w oparciu o krystaliczną strukturę kompleksu G-aktyny z fragmentem twinfiliny, homologicznego białka z rodziny ADF-H [47]. Badania nad wiązaniem kofiliny do filamentowej aktyny wykazały duże podobieństwo między wiązaniem twinfiliny i kofiliny poprzez miejsce G [26]. Miejsce G jest wykorzystywane w wiązaniu kofiliny do aktywnej monomerycznej oraz do podjednostki aktywnej wbudowanej do filamentu, stąd często jest nazywane miejscem G/F. Głównym elementem wiążącym aktynę jest helisa $\alpha 5$, która umiejscawia się w szczelinie między subdomenami SD1 i SD3 aktyny. W wiązanie do aktywnej włączony jest N-końcowy odcinek kofiliny wraz z pętlą łączącą harmonijki $\beta 1$ i $\beta 2$ (ryc. 3B) [26,29]. Koniec N jest elastyczny i dzięki temu łatwo przybiera konformację optymalną do oddziaływania z aktyną. Jest to szczególnie ważne ze względu na regulację oddziaływań kofiliny z aktyną przez fosforylację Ser3, co będzie bardziej szczegółowo omówione w dalszej części artykułu.

Miejsce F wiąże się do podjednostki sąsiadującej wzdłuż tego samego łańcucha filamentu aktynowego, położonej niżej podjednostki związanej przez miejsce G kofiliny (ryc. 4). Miejsce to jest utworzone z dwóch rejonów. Leżąca blisko końca C pętla łącząca helisę $\alpha 6$ i harmonijkę $\beta 6$ oddziałuje z resztami położonymi w górnej części SD4 aktyny, natomiast N-końcowy odcinek harmonijki $\beta 4$ tworzy kontakt z SD1 (ryc. 3B) [26,27,29].

Powinowactwo z jakim kofilina wiąże się do aktywnej zależy od rodzaju nukleotydu związanego w międzydomenowej szczelinie aktywnej. Najsilniej wiąże ADP-aktynę,



Ryc. 4. Model wiązania kofiliny do filamentu aktynowego. (A) F-aktyna (zielony) wysycona kofiliną (amarantowy). (B) Dimer aktyny w kompleksie z kofiliną. Zobrazowano w programie PyMol, kod dostępu PDB 3J05

a najsłabiej ATP-aktyne, co powoduje akumulację kofiliny w starszych rejonach filamentów, w których nastąpiła hydroliza i uwolnienie fosforanu (ryc. 5). Kofilina wpływa na „dojrzewanie” filamentów, przyspieszając dysocjację fosforanu z podjednostek ADP-Pi-aktyny [12,27].

Zaawansowane techniki mikroskopowe i rekonstrukcja trójwymiarowych obrazów filamentów aktynowych w kompleksie z kofiliną pozwoliły na zrozumienie podstaw strukturalnych zależnej od kofiliny fragmentacji filamentów. Stwierdzono, że pod wpływem kofiliny następuje dodatkowe skręcenie filamentu, wynikające ze skręcenia podjednostki aktyny związanej z kofiliną o $4-5^\circ$ [33]. Zewnętrzna domena podjednostki aktyny ulega rotacji w kierunku sąsiedniego łańcucha, a pętla znajdującej się na szczycie subdomeny 2 staje się nieuporządkowana. To powoduje zerwanie kontaktu między SD2 i końcem C w rejonie SD1 sąsiedniej podjednostki położonej wzdłuż tego samego łańcucha i znaczne zwiększenie elastyczności filamentu. Indukowane przez kofilinę zmiany konformacyjne są przekazywane do odległych, niezwiązanych z kofiliną podjednostek aktyny [13,26].

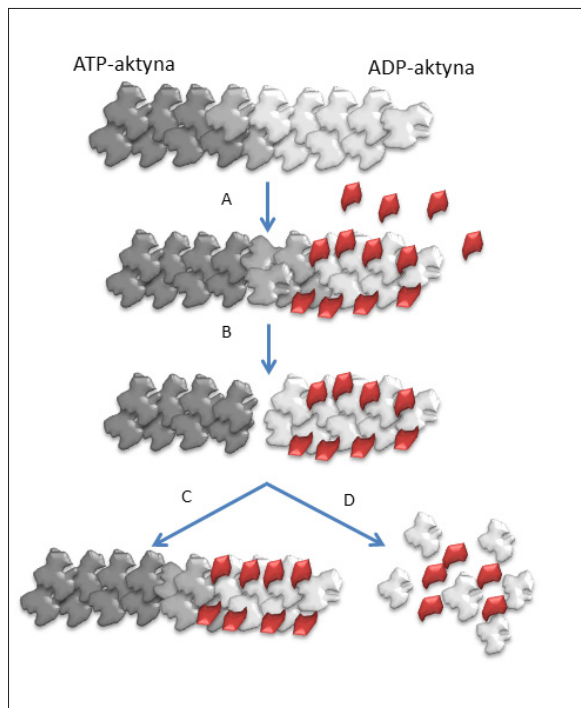
Wiązanie kofiliny do filamentu aktynowego ma charakter kooperatywny, co prowadzi do powstania klastrów kofilinowych na filamencie (ryc. 5). Fragmentacja filamentu zachodzi preferencyjnie na granicy między

klastrami i segmentami aktyny wolnej od kofiliny. W obrębie segmentów udekorowanych kofiliną dochodzi do zmiany konformacyjnej destabilizującej filament. Jednak strony cząsteczki kofiliny działają jak mostki utrzymujące kontakty między sąsiednimi podjednostkami aktyny. W przeciwieństwie do segmentów wiążących kofilinę, segmenty niezwiązane z kofiliną są zdestabilizowane, co ułatwia ich fragmentację [60]. To sprawia, że fragmentacja filamentu aktynowego zachodzi z największą efektywnością przy jego niskim wysyceniu kofiliną, gdyż jego wyższe stężenia mają wpływ stabilizujący [2].

MECHANIZMY KONTROLI DYNAMIKI FILAMENTÓW AKTYNOWYCH Z UDZIAŁEM KOFILINY

Końcowy skutek działania kofiliny na F-aktyne jest uzależniony od stosunku stężeń kofiliny do aktyny, stężenia ATP-G-aktyny oraz aktywności innych białek wiążących aktyne. O tym, czy w danym miejscu zajdzie polimeryzacja filamentów, czy raczej ich depolimeryzacja, decyduje stan równowagi między tymi czynnikami.

Wiązanie niewielkich ilości kofiliny (stężenia submikromolowe) powoduje fragmentację filamentów aktynowych i wzrostu liczby wolnych końców. W zależności od warunków prowadzi to do wydłużania bądź też skracania filamentów. Wyniki analiz biochemicznych sugerowały, że dominującą funkcją kofiliny jest depolimeryzacja



Ryc. 5. Model dynamiki filamentowej aktyny z udziałem kofiliny. (A) Wiązanie kofiliny do podjednostek ADP-aktyny, (B) rotacja podjednostek i rozerwanie filamentu na granicy pomiędzy segmentami udekorowanymi przez kofilinę i nieudekorowanymi, (C) wzrost filamentu na nowo powstałych końcach, (D) depolimeryzacja filamentu

F-aktyny, która zachodzi w wyniku zwiększania szybkości tego procesu na końcach zaokrąglonych [16,18]. Jednak badania, w których zastosowano techniki mikroskopowe wskazują, że interpretacja wyników biochemicznych była błędna, gdyż kofilina nie wzmacnia depolimeryzacji na końcach zaokrąglonych, natomiast przecinając filamenty aktynowe generuje dużą liczbę depolimeryzujących końców, co przyspiesza depolimeryzację pewnej populacji filamentów [2,23,48]. Nowo powstałe szybko rosnące końce kolczaste mogą służyć jako miejsca nukleacji i wydłużania filamentów. W stężeniach mikromolowych kofilina powoduje nukleację *de novo*, czym przyczynia się do wzrostu aktywności polimeryzacyjnej aktyny [2]. Należy jednak zwrócić uwagę na konieczność utrzymania równowagi między polimeryzacją i depolimeryzacją. Wzrost filamentów jest możliwy, gdy stężenie monomerycznej aktyny przekracza stężenie krytyczne. Ponieważ w komórce szybko rosnące końce filamentów aktynowych są skierowane w stronę błony komórkowej, w komórkach charakteryzujących się dużą ruchliwością (np. komórki embrionalne, nabłonkowe, czy nowotworowe) działanie kofiliny sprzyja wysuwaniu krawędzi wiodącej lamellipodium i tworzeniu wypustek koniecznych do ukierunkowanego ruchu. Stymulowana przez kofilinę szybka polimeryzacja pod błoną komórkową wymaga ciągłego dostarczania monomerycznej aktyny, zatem depolimeryzacja na końcach zaokrąglonych, skierowanych do wnętrza komórki, zasila proces polimeryzacji. W konsekwencji, wzrost filamentu aktynowego

w jednym regionie komórkowym jest zasilany przez jego skracanie w innym.

Stężenie aktyny G, dostępnej dla procesu polimeryzacji, jest pod kontrolą białek wiążących monomery aktynowe, do których należy również kofilina. Wiązanie przez kofilinę ADP-G-aktyny hamuje spontaniczną wymianę nukleotydu na ATP i obniża stężenie cząsteczek ATP-G-aktyny, co wydatnie zmniejsza szybkość wydłużania filamentów [12,27]. ADP-G-aktyna podlega również wiązaniu przez konkurencyjne w stosunku do kofiliny białko twinfilinę, która zawiera dwie domeny ADF-H połączone elastycznym odcinkiem. C-końcowa domena ADF-H twinfiliny wykazuje bardzo duże powinowactwo do ADP-G-aktyny ($K_d = 50$ nM) i podobnie jak kofilina hamuje wymianę nukleotydu na aktynie. Obecność dwóch domen ADF-H nadaje twinfilinie dodatkowe właściwości. Pierwsza z nich to bezpośrednie wiązanie do końca kolczastego filamentowej aktyny i zabezpieczenie go przed wydłużaniem. Ponadto, twinfilina wiąże białko CP (capping protein) zakrywające koniec kolczasty. Oddziaływania między twinfiliną i CP są podstawowe dla komórkowego umiejscowienia twinfiliny w pobliżu szybko rosnącego końca mikrofilamentu [27,53].

Odmianą funkcję pełni małe białko profilina, które wiąże G-aktynę i katalizuje wymianę ADP na ATP w cząsteczce monomerycznej aktyny. Profilina konkuruje z kofiliną o miejsca wiązania na aktynie i jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie odpowiedniego poziomu ATP-G-aktyny w komórce. Ponadto, przyspiesza polimeryzację dostarczając ATP-G-aktynę do szybko rosnących końców filamentów [46].

Drugim białkiem wzmagającym recykling kofiliny i aktyny jest CAP (cyclase associated protein). CAP jest wielodomowym białkiem, które uwalnia aktynę monomeryczną z kompleksu z kofiliną i stymuluje wymianę nukleotydu na monomerze aktynowym. CAP wspomaga aktywność fragmentującą kofiliny, przez co zwiększa dynamikę filamentów [53].

Interesujący mechanizm regulacji dynamiki aktyny zależnej od kofiliny zachodzi z udziałem białka Aip1 (actin interacting protein), które wiąże się do filamentów aktynowych udekorowanych przez kofilinę i wspomaga ich fragmentację. Jednocześnie Aip1 zakrywa nowo powstałe kolczaste końce i w ten sposób przesuwają równowagę filamentu w stronę depolimeryzacji. Dzięki temu, Aip1 przyczynia się do utrzymywania odpowiedniej puli monomerycznej aktyny w komórce [53].

Bezpośrednie oddziaływania kofiliny z filamentową aktyną są kontrolowane przez tropomiozyny, dwułańcuchowe superhelikalne białka, które polimeryzują wzdłuż filamentu. Tropomiozyny stabilizują filamenty aktynowe, a w komórce są obecne w tych rejonach komórek, w których jest konieczne tworzenie długich, nierozgałęzionych filamentów. Wcześniejsze badania nad współwystępowaniem tropomiozyny i kofiliny w komórkach

wskazywały, że kofilina i tropomiozyny nie wiążą się do tych samych filamentów [30]. Wyjątkiem była mózgową izoforma tropomiozyny TMB α 3, która zwiększała wiązanie kofiliny do filamentu [15]. Najnowsze badania biochemiczne prowadzone w naszym laboratorium na filamentach aktynowych zrekonstruowanych za pomocą oczyszczonych białek wskazują, że mięśniowe i niemięśniowe izoformy tropomiozyny są wypierane z filamentu przez kofilinę. Jednak skuteczność z jaką kofilina usuwa tropomiozynę jest uzależniona zarówno od izoformy tropomiozyny jak i kofiliny [45,55]. Stąd wniosek, że izoformy tropomiozyny mogą w różnicowany sposób regulować aktywność izoform kofiliny.

Oprócz bezpośredniej regulacji dynamiki aktyny, kofilina moduluje także aktywność kompleksu białkowego Arp2/3, który wiąże się boczenie do istniejących filamentów aktynowych inicjując ich rozgałęzienia. Wpływ kofiliny na nukleację rozgałęzień ma dwojaki charakter. Kompleks Arp2/3, przyłączony do segmentów nowo utworzonej ATP-F-aktyny, jest bardziej stabilny niż związany z segmentami F-aktyny zawierającymi podjednostki ADP-aktyny. Zatem zwiększanie liczby szybko rosnących końców, do których przyłączają się podjednostki ATP-aktyny, wzmacnia wiązanie Arp2/3 i inicjowanie rozgałęzień filamentów aktynowych. Jednak wiązanie kofiliny do podjednostek ADP-aktyny powoduje wypieranie kompleksu Arp2/3 z filamentu i likwidację rozgałęzień. Mechanizm wypierania nie jest poznany. Wyniki wskazują, że kofilina albo bezpośrednio konkuruje z Arp 2/3 o miejsca wiązania na aktynie, albo wpływa pośrednio na wiązanie Arp2/3 przez zmiany konformacyjne filamentu [14,21].

REGULACJA AKTYWNOŚCI KOFILINY

Czynniki regulujące podstawowe funkcje kofiliny są bardzo różnorodne. Zdolność wiązania aktyny jest skutecznie hamowana przez fosforylację, wiązanie błonowych fosfatydyloinozytoli oraz tworzenie kompleksu z kortaktyną – białkiem funkcjonującym w rejonie korteksu aktynowego na peryferiach komórek, np. w lamellipodiach i invadopodiach. W warunkach stresu oksydacyjnego cząsteczka kofiliny ulega utlenieniu, co powoduje inaktywację funkcji tnącej kofiliny przy zachowaniu zdolności do wiązania aktyny.

Fosforylacja reszty Ser3 hamuje wiązanie kofiliny z G-aktyną i depolimeryzację filamentu. N-końcowy segment kofiliny bezpośrednio oddziałuje z subdomeną 1 aktyny, zatem zwiększenie ujemnego ładunku tego rejonu przez przyłączenie ujemnie naładowanej reszty fosforanowej silnie osłabia wiązanie [12,47]. Ufosforylowana kofilina jest rozproszona w cytoplazmie i występuje głównie w mało ruchliwych komórkach. Stymulowana przez wiele czynników ruchliwość komórek wiąże się z defosforylacją i uaktywnieniem cząsteczek kofiliny, której największe stężenie zaobserwowano przy krawędzi wiodącej migrujących komórek i w wypustkach wyspecjalizowanych komórek [3,37,42].

Poziom ufosforylowania komórkowej kofiliny jest pod kontrolą enzymów aktywowanych przez wewnątrzkomórkowe kaskady przekaźników. Fosforylacja jest katalizowana przez kinazy LIMK (LIM kinases) oraz kinazy jądrowe TESK (testicular kinases). Główne fosfatazy, które usuwają resztę fosforanową, a tym samym uaktywniają kofilinę to fosfatazy SSH1 należące do rodziny białek zawierających domenę o strukturze procy (SSH, slingshot homology) oraz fosfataza CIN (chronophin phosphatase). Udział kinaz i fosfatyz w regulacji aktywności kofiliny jest uwarunkowany przez swoiste tkankowo enzymy, ich dystrybucję w określonych rejonach komórkowych oraz modulację aktywności w odpowiedzi na czynniki stymulujące komórkę. Kinazy LIM są głównymi regulatorami reorganizacji cytoskieletu kontrolowanymi przez szlaki transdukcji sygnałów zależne od GTPaz Rac, Rho i Cdc-42 powiązane z błonowym receptorem kinazy tyrozynowej oraz integrzynami. Fosforylacja kinazy LIM przez kinazy ROCK1, 2 i PAK1, 2 prowadzi do jej aktywacji. Natomiast jedyne znane fosfatazy defosforylujące i dezaktywujące LIMK to fosfatazy SSH, które defosforylują również kofilinę, a tym samym dodatkowo wzmacniają sygnał aktywujący kofilinę. Wzajemne powiązania między elementami różnych szlaków sygnalizacji są bardzo zawiłe i dokładne ich omówienie przekraczałoby zakres opracowania. Zainteresowanym czytelnikom polecamy świetne artykuły przeglądowe [10,14,44,62].

Przy omawianiu fosforylacji, jako mechanizmu regulacji aktywności kofiliny, należy wspomnieć fosforylację reszty Tyr68, która działa w zupełnie inny sposób niż fosforylacja Ser3. Fosforylacja Tyr68 nie wpływa zasadniczo na wiązanie kofiliny do aktyny, ale stymuluje jej ubikwitynację na proteosomach, co obniża stężenie tego białka w komórce [4,35]. Ponieważ o aktywności kofiliny decyduje jej względne stężenie w stosunku do aktyny, to regulacja ilości kofiliny dostępnej w komórce może działać jak przełącznik aktywujący różne funkcje tego białka.

Dezaktywacja i wiązanie w pobliżu błony komórkowej nieufosforylowanej kofiliny zachodzi za pośrednictwem wiązania przez kofilinę błonowych fosfatydyloinozytoli, a zwłaszcza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP $_2$) oraz fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PIP $_3$). Fosfolipidy inozytolowe współzawodniczą z F-aktyną o miejsce wiązania w cząsteczce kofiliny, co prowadzi do jej dezaktywacji. Stymulowana przez ligand (np. epidermalny czynnik wzrostu) aktywacja fosfolipazy C indukuje hydrolizę PIP $_2$, uwalnia i aktywuje kofilinę, a przez to przyczynia się do generowania szybko rosnących końców filamentów, które polimeryzują i wzmagają ruchliwość komórki. Wiązanie z lipidami błonowymi koncentruje kofilinę w rejonie krawędzi wiodącej komórki, gdzie polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny jest najbardziej dynamiczna. Zmiany w stężeniu fosfolipidów błonowych mogą skutecznie regulować stężenie kofiliny znajdującej się w rejonie korowym komórki [14,53,62].

Ważnym czynnikiem wpływającym na oddziaływanie kofiliny z lipidami błonowymi jest jej wrażliwość na lokalne zmiany pH. W fizjologicznym zakresie pH (6,8-7,2) His133 przybiera postać uprotonowaną. Działanie wymiennicza $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE1) obniża podbłonowe stężenie H^+ , a w konsekwencji powoduje przejście His133 w postać nieuprotonowaną, co pociąga za sobą zmiany konformacyjne białka, zmniejszenie powinowactwa do PIP_2 i aktywację. Wzrost pH zwiększa również aktywność fosfolipazy C, co dodatkowo wzmacnia uwalnianie kofiliny z kompleksu z PIP_2 [14].

Inny zależny od pH mechanizm regulacji aktywności kofiliny wymaga udziału kortaktyny. Kortaktyna tworzy kompleks z kofiliną, który rozpada się przy niskim stężeniu H^+ . Pod wpływem ligandów stymulujących komórkę kortaktyna ulega fosforylacji i wiąże się z NHE1, co powoduje rekrutację błonowego wymiennicza NHE1 w miejscu stymulacji. Wzrost pH uwalnia kofilinę z kompleksu, dzięki czemu następuje lokalne zwiększenie dynamiki aktywny w rejonie wypustki komórkowej [10,14].

W warunkach stresu oksydacyjnego kofilina ulega utlenieniu, czego skutkiem jest tworzenie wewnętrznych mostków disiarczkowych lub dimerów. W sekwencji nie mięśniowej izoformy Cof1 znajdują się cztery reszty Cys w pozycjach: 39, 80, 139 i 147. Wykazano, że w obecności czynników utleniających Cys39 i Cys80 tworzą mostek disiarczkowy, natomiast Cys139 ulega utlenieniu do $\text{Cys-SO}_3\text{H}$ lub tworzy mostek z Cys147. Skutkiem tych oksydacyjnych zmian jest utrata zdolności do fragmentacji aktywny. Utleniona kofilina wiąże aktywnę i stabilizuje filamenty, zaburzając dynamikę aktywny i zdolności migracyjne komórek [56]. Tworzenie mostków między Cys39 i Cys147 dwóch różnych cząsteczek zachodzi natomiast w obecności utlenionego glutationu i prowadzi do dimeryzacji kofiliny. Dimery zachowują zdolność do wiązania filamentowej aktywny, co przy dużych stężeniach kofiliny powoduje sieciowanie filamentów i powstawanie pałeczek w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu [11]. Tworzenie stabilnych pałeczek aktynowych kofilinowo jest uważane za reakcję komórki na uszkodzenie mitochondriów i obniżenie poziomu ATP. Ponieważ polimeryzacja aktywny zużywa znaczną część puli komórkowego ATP, to zahamowanie tego procesu jest elementem homeostazy energii, która stwarza możliwość dojścia do równowagi po ustąpieniu czynników stresowych [10].

KOFILINA A PATOLOGIE

Kofilina jest zaangażowana w regulację wielu procesów komórkowych, zatem można się spodziewać, że modyfikacje w strukturze tego białka, zmiany w poziomie jego syntezy oraz wadliwa modulacja aktywności białka są odpowiedzialne za rozwój różnych stanów patologicznych.

Badania wykazały silny związek między tworzeniem pałeczek aktynowo-koofilinowych i chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroby Alzheimera, Par-

kinsona i Huntingtona. Jak już wspomniano, pałeczki powstają w odpowiedzi na stres i chronią komórki przed zużywaniem energii przez aktywnę. W pierwszej fazie tworzenia są niestabilne, natomiast w komórkach poddawanych długotrwałemu stresowi pałeczki stabilizują się i w niektórych przypadkach przechodzą w postać nieregularnych agregatów lub cytoplazmatycznych krystalicznych sieci (ciał Hirano), które są charakterystyczną cechą patologicznych komórek w chorobach neurodegeneracyjnych. W neuronach takie inkluzje akumulują się w neurytach, gdzie blokują transport pęcherzykowy i prawdopodobnie są przyczyną wczesnej demencji spowodowanej zniszczeniem funkcji synaptycznych [5,6,58].

Inny mechanizm odpowiedzialny za utratę pamięci i funkcji poznawczych pacjentów z chorobą Alzheimera jest związany z bezpośrednim udziałem kofiliny w kształtowaniu dynamiki kolców dendrytycznych – postsynaptycznych wypustek wielu neuronów. Plastyczność kolców jest stymulowana przez neuroprzekazniki i bezpośrednio zależy od intensywności „treadmilingu” filamentów aktynowych, procesu który jest kontrolowany przez kofilinę i inne białka wiążące aktywnę konkurujące z kofiliną. Obniżenie aktywności modulatorów fosforylacji kofiliny, obserwowane w komórkach pacjentów, powoduje wzrost aktywności kofiliny i utratę prawidłowych funkcji synapsy [6].

Związek kofiliny z procesami ruchliwości komórkowej sprawia, że poziom syntezy i aktywacji tego białka wpływa na szybkość podziałów komórkowych i zdolność do tworzenia przerzutów nowotworowych. W komórkach inwazyjnych obserwowano zmiany w poziomie syntezy i aktywności kofiliny oraz białek regulujących jej fosforylację – LIMK i SSH1. Jednak nie ma prostej korelacji między aktywnością białek regulujących kofilinę, a szybkością podziałów komórek i powstawaniem przerzutów. W zależności od typu nowotworu zwiększona synteza i aktywacja LIMK1 działa stymulująco bądź hamująco na inwazyjność komórek rakowych [35]. Analizy materiału biopsyjnego pobranego od pacjentek z nowotworem jajników wykazały, że stężenie kofiliny w komórkach wykazujących pełnoobjawowe stadium choroby było bardzo wysokie w stosunku do grupy kontrolnej [68]. Poziom syntezy kofiliny jest wykorzystywany w prognozowaniu niedrobnokomórkowego raka płuc. Wykazano, że wysokie stężenie Cof1 koreluje z opornością na leczenie i skraca czas życia pacjentów. Zwrócono również uwagę, że kofilina może służyć jako wskaźnik odpowiedzi na leczenie chemioterapeutyczne gruczolakoraka płuc [20,49].

Mutacje w genie *CFL2*, kodującym mięśniową izoformę kofiliny, wykryto u pacjentów cierpiących z powodu wrodzonych chorób mięśni – miopatii nemalinowej i miopatii miotubularnej. Wrodzone miopatie są heterogennymi chorobami prowadzącymi do osłabienia i utraty napięcia w różnych partiach mięśni szkieletowych, którym towarzyszą poważne zaburzenia struktury komórek mięśniowych. W miopatii nemalinowej, w obrazie histo-

logicznym obserwowana jest agregacja cienkich filamentów w postaci pałeczkowatych wtrętów zwanych ciałami nemalinowymi [54]. Natomiast cechą miopatii miotubularnej jest rozpad miofibryli, co powoduje akumulację w sarkoplazmie białek związanych z linią Z [24]. Mutacje w *CFL2* są bardzo rzadką przyczyną miopatii. Dotąd wykryto dwie substytucje, które prowadzą do zamiany Ala35Thr [1] oraz Val7Met [41] w cząsteczce Cof2. Kofilina z substytucją Ala35Thr syntetyzowana w komórkach bakterii wykazywała tendencję do precypitacji, co wskazywało na nieprawidłowe zwinięcie cząsteczki białka, jego agregację i wytrącanie. Podobny mechanizm może powodować utratę funkcji zmutowanej kofiliny wytwarzanej w komórkach mięśni pacjentów [1]. Przypuszcza się, że niefunkcjonalne białko powstaje również w przypadku mutacji Val7Met, która może powodować nieprawidłowe odczytanie kodonu startowej metioniny podczas procesu translacji i wytwarzanie skróconej wersji białka. Inny przypuszczalny negatywny wpływ

mutacji Val7Met na funkcje kofiliny to zakłócenie fosforylacji położonej w pobliżu reszty Ser3 [41]. Na ogromną rolę kofiliny w rozwoju i utrzymaniu prawidłowej struktury mięśni wskazują doświadczenia przeprowadzone na komórkach kurzych. Badania te wykazały, że obniżenie stężenia kofiliny prowadzi do powstawania agregatów aktynowych i nieprawidłowego rozwoju miofibryli [34].

Najnowsze badania również wykazały związek Cof2 z kardiomiopatią rozstrzeniową. W komórkach mięśnia sercowego pacjentów wykryto agregaty białkowe wzbogacone w nieaktywną, ufosforylowaną kofilinę [61]. Ponieważ wykazano, że eksperymentalne obniżenie poziomu syntezy kofiliny w szczurzych kardiomiocytach dezorganizuje architekturę sarkomerycznych filamentów aktynowych [59], zwiększenie poziomu nieaktywnej kofiliny może być również przyczyną dysfunkcji ludzkiego mięśnia sercowego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agrawal P.B., Greenleaf R.S., Tomczak K.K., Lehtokari V.L., Wallgren-Pettersson C., Wallefeld W., Laing N.G., Darras B.T., Maciver S.K., Dormitzer P.R., Beggs A.H.: Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am. J. Hum. Genet.*, 2007; 80: 162-167
- [2] Andrianantoandro E., Pollard T.D.: Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell*, 2006; 24: 13-23
- [3] Arai H., Atomi Y.: Suppression of cofilin phosphorylation in insulin-stimulated ruffling membrane formation in KB cells. *Cell Struct. Funct.*, 2003; 28: 41-48
- [4] Bamburg J.R., Bernstein B.W.: Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol. Rep.*, 2010; 2: 62
- [5] Bamburg J.R., Bernstein B.W., Davis R.C., Flynn K.C., Goldsbury C., Jensen J.R., Maloney M.T., Marsden I.T., Minamide L.S., Pak C.W., Shaw A.E., Whiteman I., Wiggan O.: ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Curr. Alzheimer Res.*, 2010; 7: 241-250
- [6] Bamburg J.R., Bloom G.S.: Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2009; 66: 635-649
- [7] Bamburg J.R., Harris H.E., Weeds A.G.: Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.*, 1980; 121: 178-182
- [8] Bellenchi G.C., Gurniak C.B., Perlas E., Middei S., Ammassari-Teule M., Witke W.: N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.*, 2007; 21: 2347-2357
- [9] Bender M., Eckly A., Hartwig J.H., Elvers M., Pleines I., Gupta S., Krohne G., Jeanclos E., Gohla A., Gurniak C., Gachet C., Witke W., Nieswandt B.: ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood*, 2010; 116: 1767-1775
- [10] Bernstein B.W., Bamburg J.R.: ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell. Biol.*, 2010; 20: 187-195
- [11] Bernstein B.W., Shaw A.E., Minamide L.S., Pak C.W., Bamburg J.R.: Incorporation of cofilin into rods depends on disulfide intermolecular bonds: implications for actin regulation and neurodegenerative disease. *J. Neurosci.*, 2012; 32: 6670-6681
- [12] Blanchoin L., Pollard T.D.: Mechanism of interaction of *Acanthamoeba actophorin* (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 15538-15546
- [13] Bobkov A.A., Muhrad A., Pavlov D.A., Kokabi K., Yilmaz A., Reiser E.: Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.*, 2006; 356: 325-334
- [14] Bravo-Cordero J.J., Magalhaes M.A., Eddy R.J., Hodgson L., Condeelis J.: Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013; 14: 405-415
- [15] 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.: Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 1002-1016
- [16] Carlier M.F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G.X., Hong Y., Chua N.H., Pantaloni D.: Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.*, 1997; 136: 1307-1322
- [17] Carlier M.F., Le Clainche C., Wiesner S., Pantaloni D.: Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays*, 2003; 25: 336-345
- [18] Carlier M.F., Pantaloni D.: Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.*, 1997; 269: 459-467
- [19] Carlier M.F., Pantaloni D.: Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry*, 1986; 25: 7789-7792
- [20] Castro M.A., Dal-Pizzol F., Zdanov S., Soares M., Muller C.B., Lopes F.M., Zanotto-Filho A., da Cruz Fernandes M., Moreira J.C., Shacter E., Klamt F.: CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 2010; 116: 3645-3655
- [21] Chan C., Beltzner C.C., Pollard T.D.: Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.*, 2009; 19: 537-545
- [22] Chang C.Y., Leu J.D., Lee Y.J.: The actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin signaling pathway and DNA damage responses in cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015; 16: 4095-4120
- [23] Chen Q., Pollard T.D.: Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Cell Biol.*, 2011; 195: 485-498

- [24] Claeys K.G., Fardeau M.: Myofibrillar myopathies. *Handb. Clin. Neurol.*, 2013; 113: 1337-1342
- [25] Dominguez R., Holmes K.C.: Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.*, 2011; 40: 169-186
- [26] Galkin V.E., Orlova A., Kudryashov D.S., Solodukhin A., Reisler E., Schroder G.F., Egelman E.H.: Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 20568-20572
- [27] Hild G., Kalmár L., Kardos R., Nyitrai M., Bugyi B.: The other side of the coin: functional and structural versatility of ADF/cofilins. *Eur. J. Cell Biol.*, 2014; 93: 238-251
- [28] Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W.: Atomic model of the actin filament. *Nature*, 1990; 347: 44-49
- [29] Klejnót M., Gabrielsen M., Cameron J., Mleczak A., Talapatra S.K., Kozielski F., Pannifer A., Olson M.F.: Analysis of the human cofilin 1 structure reveals conformational changes required for actin binding. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2013; 69: 1780-1788
- [30] Kuhn T.B., Bamberg J.R.: Tropomyosin and ADF/cofilin as collaborators and competitors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008; 644: 232-249
- [31] Kuure S., Cebrian C., Machingo Q., Lu B.C., Chi X., Hyink D., D'Agati V., Gurniak C., Witke W., Costantini F.: Actin depolymerizing factors cofilin1 and destrin are required for ureteric bud branching morphogenesis. *PLoS. Genet.*, 2010; 6: e1001176
- [32] Lappalainen P., Fedorov E.V., Fedorov A.A., Almo S.C., Drubin D.G.: Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J.*, 1997; 16: 5520-5530
- [33] McGough A., Pope B., Chiu W., Weeds A.: Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.*, 1997; 138: 771-781
- [34] Miyauchi-Nomura S., Obinata T., Sato N.: Cofilin is required for organization of sarcomeric actin filaments in chicken skeletal muscle cells. *Cytoskeleton*, 2012; 69: 290-302
- [35] Mizuno K.: Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal.*, 2013; 25: 457-469
- [36] Mohri K., Takano-Ohmuro H., Nakashima H., Hayakawa K., Endo T., Hanaoka K., Obinata T.: Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2000; 21: 49-57
- [37] Moriyama K., Iida K., Yahara I.: Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells*, 1996; 1: 73-86
- [38] Nakashima K., Sato N., Nakagaki T., Abe H., Ono S., Obinata T.: Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies. *J. Biochem.*, 2005; 138: 519-526
- [39] Nishida E., Kuwaki T., Maekawa S., Sakai H.: A new regulatory protein that affects the state of actin polymerization. *J. Biochem.*, 1981; 89: 1655-1658
- [40] Nishida E., Maekawa S., Sakai H.: Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry*, 1984; 23: 5307-5313
- [41] Ockeloen C.W., Gilhuis H.J., Pfundt R., Kamsteeg E.J., Agrawal P.B., Beggs A.H., Dara Hama-Amin A., Diekstra A., Knoers N.V., Lammens M., van Alfen N.: Congenital myopathy caused by a novel missense mutation in the CFL2 gene. *Neuromuscul. Disord.*, 2012; 22: 632-639
- [42] Okada K., Takano-Ohmuro H., Obinata T., Abe H.: Dephosphorylation of cofilin in polymorphonuclear leukocytes derived from peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 1996; 227: 116-122.
- [43] Ono S., Minami N., Abe H., Obinata T.: Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 15280-15286
- [44] Oser M., Condeelis J.: The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 108: 1252-1262
- [45] Ostrowska Z., Robaszkiewicz K., Moraczewska J.: Regulation of actin filament turnover by cofilin-1 and cytoplasmic tropomyosin isoforms. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016; 1865: 88-98
- [46] Paavilainen V.O., Bertling E., Falck S., Lappalainen P.: Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.*, 2004; 14: 386-394
- [47] Paavilainen V.O., Oksanen E., Goldman A., Lappalainen P.: Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.*, 2008; 182: 51-59
- [48] Pavlov D., Muhrad A., Cooper J., Wear M., Reisler E.: Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.*, 2007; 365: 1350-1358
- [49] Peng X.C., Gong F.M., Zhao Y.W., Zhou L.X., Xie Y.W., Liao H.L., Lin H.J., Li Z.Y., Tang M.H., Tong A.P.: Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma. *PLoS One*, 2011; 6: e27309
- [50] Pollard T.D., Borisy G.G.: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003; 112: 453-465
- [51] Pollard T.D., Cooper J.A.: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 2009; 326: 1208-1212
- [52] Pope B.J., Zierler-Gould K.M., Kühne R., Weeds A.G., Ball L.J.: Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 4840-4848
- [53] Poukkula M., Kremneva E., Serlachius M., Lappalainen P.: Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton*, 2011; 68: 471-490
- [54] Robaszkiewicz K., Moraczewska J.: Congenital myopathies - skeletal muscle diseases related to disorder of actin filament structure and functions. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 347-356
- [55] Robaszkiewicz K., Ostrowska Z., Marchlewicz K., Moraczewska J.: Tropomyosin isoforms differentially modulate the regulation of actin filament polymerization and depolymerization by cofilins. *FEBS J.*, 2016; 283: 723-737
- [56] Samstag Y., John I., Wabnitz G.H.: Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol. Rev.*, 2013; 256: 30-47
- [57] San Martin A., Lee M.Y., Williams H.C., Mizuno K., Lassegue B., Griendling K.K.: Dual regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot-1L phosphatase controls platelet-derived growth factor-induced migration of human aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 2008; 102: 432-438
- [58] Schönhofen P., de Medeiros L.M., Chatain C.P., Bristot I.J., Klamt F.: Cofilin/actin rod formation by dysregulation of cofilin-1 activity as a central initial step in neurodegeneration. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2014; 14: 393-400
- [59] Skwarek-Maruszewska A., Hotulainen P., Mattila P.K., Lappalainen P.: Contractility-dependent actin dynamics in cardiomyocyte sarcomeres. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 2119-2126
- [60] Suarez C., Roland J., Boujemaa-Paterski R., Kang H., McCullough B.R., Reymann A.C., Guérin C., Martiel J.L., De la Cruz E.M., Blanchoin L.: Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr. Biol.*, 2011; 21: 862-868
- [61] Subramanian K., Gianni D., Balla C., Assenza G.E., Joshi M., Semigran M.J., Macgillivray T.E., Van Eyk J.E., Agnetti G., Paolocci N., Bamberg J.R., Agrawal P.B., Del Monte F.: Cofilin-2 phosphorylation and sequestration in myocardial aggregates: novel pathogenetic mechanisms for idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2015; 65: 1199-1214
- [62] Van Troys M., Huyck L., Leyman S., Dhaese S., Vandekerckhove

J., Ampe C.: Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.*, 2008; 87: 649-667

[63] Vartiainen M.K., Mustonen T., Mattila P.K., Ojala P.J., Thesleff I., Partanen J., Lappalainen P.: The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell*, 2002; 13: 183-194

[64] von der Ecken J., Müller M., Lehman W., Manstein D.J., Penczek P.A., Raunser S.: Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature*, 2015; 519, 114-117

[65] Wegner A.: Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.*, 1976; 108: 139-150

[66] Won K.J., Park S.H., Park T., Lee C.K., Lee H.M., Choi W.S., Kim S.J.,

Park P.J., Jang H.K., Kim S.H., Kim B.: Cofilin phosphorylation mediates proliferation in response to platelet-derived growth factor-BB in rat aortic smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 2008; 108: 372-379

[67] Zhao R., Du L., Huang Y., Wu Y., Gunst S.J.: Actin depolymerization factor/cofilin activation regulates actin polymerization and tension development in canine tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 36522-36531

[68] Zhou J., Wang Y., Fei J., Zhang W.: Expression of cofilin 1 is positively correlated with the differentiation of human epithelial ovarian cancer. *Oncol. Lett.*, 2012; 4: 1187-1190

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.