

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



Bakalářská práce

**Regulátory aktinové dynamiky profilin a β -thymosin mají funkce
v buněčném jádře**

2008

Tomáš Chum

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Pavlu Hozákovi za vedení bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat spolupracovníkům z laboratoře, především Mgr. Janě Hofmannové za cenné rady a obětování drahocenného času. Za zázemí, podporu a pomoc děkuji své rodině a kamarádům, jmenovitě Kodulce.

Použité zkratky:

ADP	<u>adenosindiphosphate</u>
AMK	<u>aminokyselina</u>
ARP	<u>actin related protein</u>
ATP	<u>adenosintrisphosphate</u>
CB	<u>Cajal bodies</u>
DFMO	<u>α-difluoromethylornithinu</u>
DMSO	<u>dimethylsulfoxid</u>
EGF	<u>epidermal growth factor</u>
Exp6	<u>exportin 6</u>
GBD	<u>GTPase binding domain</u>
HSP	<u>heat-shock protein</u>
IAF	<u>5-iodoacetoamido-fluorescein</u>
mDia	<u>mouse homologue of <i>Drosophila diaphanous</i></u>
Mena	<u>mouse homologue of <i>Drosophila enabled</i></u>
Nap	<u>nck-<u>asociovaný</u> proteinu</u>
NEF	<u>nucleotide exchange factor</u>
NES	<u>nuclear export sequence</u>
NMDA	<u>N-methyl-D-aspartát</u>
NMR	<u>nuclear magnetic rezonanc</u>
NLS	<u>nuclear localizing sequence</u>
PAI	<u>plasminogen activator inhibitor</u>
PFN	<u>profilin</u>
PIP ₂	<u>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</u>
PIP ₃	<u>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</u>
PLC	<u>phospholipase C</u>
PLP	<u>poly-L-prolin</u>
POP	<u>partner of profilin</u>
PUT	<u>putrescin = 1,4-diaminobutan</u>
ROCK	<u>Rho-dependent coiled-coil kinase</u>
SH	<u>Src-homolog</u>
SIP	<u>SMN-interacting protein</u>
SMN	<u>survival motor neuron protein</u>
snRNP	<u>small nuclear ribonucleoprotein</u>
T β	<u>thymosin-β</u>
VASP	<u>vasodilator-stimulated phosphoprotein</u>
VCP	<u>valosin-containing protein</u>
WASP	<u>Wiskott-Aldrich syndrome protein</u>
WAVE	<u>WASP family verprolin-homologous protein</u>
β T	<u>rodina β-thymosinů</u>

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce shrnuje známé poznatky o dvou zástupcích aktin sekvestračních proteinů profilinu a β -thymosinu. Oba váží G-aktin ve stehiometrickém poměru 1:1, čímž zásadně ovlivňují jeho dynamiku. β -thymosin svou vazbou inhibuje výměnu nukleotidu na navázaném monomeru a slouží rovněž jako „puf“ monomerního aktinu. Profilin naopak svou vazbou výměnu nukleotidu usnadňuje, a tím udržuje pool G-aktinu v ATP-nabité formě, který následně přivádí k plus konci aktinového vlákna. Přesto, že si oba proteiny kompetují o tentýž monomer aktinu, svou spolupráci značně urychlují jeho polymeraci.

Profilin je nedílnou součástí signalizace tří druh – tyrosin kinasové, Ras/G-proteinové a Rac-Rho GTPasové. Tyto dráhy jsou spojené s dynamikou cytoskeletu, jejíž správná funkce je důležitá v mnohých buněčných procesech (transport váčků, dělení buněk, stabilizace kortikálních struktur). Nejnovější poznatky pochází z buněčného jádra, kde se podílí během celého buněčného cyklu na sestřihu mRNA interakcí se SMN. Reguluje transkripci ovlivněním transkripčních faktorů. Přenáší sem signály z NMDA receptoru a slouží k exportu aktinu z jaderného kompartmentu.

β -thymosin má mnohé fyziologické účinky na celkový organismus. Jako glutaminový prekurzor pomáhá při léčení ran vyvoláním angiogeneze. Tlumí záněty a ovlivňuje metastatické schopnosti rakovinných buněk. Je aktivně přesouván i do jádra, a to především při depleci polyaminů a jeho zvýšené expresi. Zde má spolu s vazbou na ATP-dependentní DNA helikasu II represorové vlastnosti některých proteinů.

Klíčová slova: profilin, β -thymosin, aktinová dynamika, profilaktin, jaderná lokalizace profilinu, jaderná lokalizace β -thymosinu

Abstract

Actin dynamic regulators profilin and β-thymosin play a role in cell nucleus

In the submitted Bachelor thesis I have focused on two actin-sequestering proteins - profilin and β-thymosin. These proteins bind to G-actin forming a 1:1 complex and influence consequently actin dynamics. While β-thymosin inhibits the exchange of nucleotide on actin monomer and acts as a G-actin buffer, profilin-binding facilitates nucleotide exchange and holds a pool of G-actin in ATP-form. This ATP-G-actin is then brought to the barbed end of actin filament. Despite competing for the same actin monomer, their resulting action is cooperative and accelerates actin polymerization significantly.

Profilin figures in three signaling pathways – tyrosin kinase-, Ras/G-protein- and Rac-Rho GTPase-pathway. These pathways are important for actin dynamics, regular function of which influences many cell processes (vesicular transport, cell dividing, stabilization of cortex microfilaments). Recently, profilin was found in cell nucleus, acting in SMN proteins pre-mRNA splicing interaction during the whole cell cycle. It regulates transcription by affecting transcription factors. Profilin transmits signals from NMDA receptor to the cell nucleus and plays a role in export of actin from the nuclear compartment.

β-thymosin has many physiological outcomes on the whole organism. As a glutamine precursor, it facilitates wound healing by angiogenesis stimulation. It supresses inflammatory reactions and affects metastatic abilities of carcinoma cells. It is dynamically transported into the cell nucleus, especially when the polyamine depletion is in process or during its increased expression. In the nucleus β-thymosin binds to ATP-dependent DNA helicase II, the resulting complex having repressor activities of some proteins.

Keywords: profilin, β-thymosin, actin dynamics, profilactin, nuclear localization of profilin, nuclear localization of β-thymosin

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Aktin a jeho dynamika	2
3. Profilin	3
3.1. Základní informace	3
3.2. Struktura profilinu	4
3.3. Funkce profilinu v cytoplazmě	5
3.3.1. Profilin a jeho vazebné schopnosti	5
3.3.2. Profilin jako faktor výměny nukleotidů	6
3.3.3. Profilin a aktinová dynamika <i>in vitro</i>	6
3.3.4. Profilin je esenciální pro život.....	6
3.3.5. Profilin a vezikulární transport.....	7
3.3.6. Profilin v synapsích	7
3.3.7. Signalizace spojená s polymerací aktinu	8
3.4. Funkce profilinu v buněčném jádře.....	9
3.4.1. Profilin v kolokalizaci se SMN	10
3.4.2. Profilin a jeho jaderná lokalizace během buněčného cyklu	10
3.4.3. Profilaktin jako substrát pro Exportin 6.....	11
3.4.4. Profilin I jako možný regulátor pre-mRNA sestřihu	11
3.4.5. Profilin jako možný regulátor transkripce.....	12
3.4.6. Profilin reverzibilně vstupuje do jádra jako odpověď na signál.....	13
4. β-Thymosin	13
4.1. Základní informace	13
4.2. Struktura β-thymosinu	14
4.3. Funkce β-thymosinu v cytoplazmě	15
4.3.1. Thymosiny jako aktinové pufry	15
4.3.2. Thymosiny a aktinová dynamika.....	15
4.3.3. Vliv oxidativních modifikací na schopnosti thymosinů.....	16
4.3.4. Proteolytické modifikace thymosinů	16
4.3.5. Thymosiny a rakovina	17
4.3.6. Thymosiny jako fyziologický regulátor	17
4.4. Funkce β-thymosinu v buněčném jádře.....	18
4.4.1. Thymosin-β4 v jádře při depleci polyaminů	18
4.4.2. Overexprese thymosin-β4 vede k jaderné lokalizaci	19
4.4.3. Thymosin-β4 v jádru rakovinných buněk MCF-7	19
4.4.4. Ku80 jako receptor pro thymosin-β4	20
5. Závěr	21
6. Perspektivy	22
7. Seznam literatury	23
8. Obrazové přílohy	31

1. Úvod

Aktin je známý především díky své funkci ve svalových buňkách, kde spolu s myosinem tvoří kontraktilní aparát jako základní jednotku pro svalový stah. To ovšem není jeho jediná funkce, kterou v buňce zastává. Tou hlavní je tvorba mikrofilamentárních vláken jako součástí cytoskeletu. Jako cytoskeletální struktura napomáhá buňkám v nejrůznějších pochodech jako pohyb, transport vácků a signalizace. Tyto funkce jsou primárně umístěny v cytoplazmatickém prostoru.

První zmínky o jeho lokalizaci v jádře jsou známy již ze 70. a 80. let minulého století (např. *Clark a Meriam, 1977; Bremer et al., 1981; Peters et al., 1982; Nakayasu, Ueda, 1983*). Odborná veřejnost je zamítla jako kontaminaci jaderné frakce cytoplazmatickým aktinem. Po přelomu století se začal tento názor měnit (*Bettinger et al., 2004; Pederson a Aebi, 2002; Olave et al., 2002*). Od stejné doby se řeší otázka jaderné lokalizace aktin vazebných proteinů.

Pro svou práci jsem si z této bohaté skupiny vybral dvě rodiny vážící aktinové monomery - profiliny a β -thymosiny. Díky vazbě monomerního aktinu a zásadnímu ovlivnění aktinové dynamiky patří mezi tzv. sekvestrační proteiny. Vybrané proteiny si během své funkce zásadně kompetují ve vazbě monomeru a zároveň svou činnost doplňují.

Shrnul jsem dosud známé informace o těchto zástupcích, jakožto základního východiska pro studium jejich funkce v jaderném prostoru, kterým jsem se věnoval podrobněji vzhledem k tomu, že jsou pro mne důležité do budoucna.

Jaderná lokalizace profilinu a β -thymosinu vyvolává mnoho otázek:

Váží tyto proteiny v jádře aktin, či je jejich funkce zde úplně rozdílná od funkce v cytoplazmě?

Dá se, vzhledem k jejich velmi dobře prostudované funkci v cytoplazmě, odvodit jejich vliv na dynamiku aktinu i v buněčném jádře?

Jací jsou jejich další vazební partneři v jaderném prostoru?

V této rešerši jsem se snažil dopodrobna zmapovat funkce profilinů a β -thymosinů v cytoplazmě a dále zjistit, dají-li se jejich základní mechanizmy aplikovat i na jaderný prostor. Vzhledem k málo probádanému tématu jsem moc odpovědí na výše zmíněné otázky

nezískal. Jde spíše o náznaky celé problematiky, která je, jak se ukazuje, mnohdy spojená s některými závažnými chorobami postihujími lidstvo. Studium jaderné lokalizace a funkcí těchto proteinů patří do předmětů současného výzkumu laboratoře Biologie jádra na Ústavu molekulární genetiky AV ČR pod vedením prof. Pavla Hozáka.

2. Aktin a jeho dynamika

Aktin je globulární protein o velikosti téměř 42 kDa. Jeho struktura je vysoce konzervovaná a od řas k člověku se liší pouze nepatrně. U člověka byly identifikovány 3 základní izoformy aktinu - α -aktin produkuje výhradně svalové buňky, β a γ -aktin produkuje všechny buňky.

Každá molekula G-aktinu má jedno místo pro vazbu a hydrolýzu ATP v podobě ATP-vazebné kapsy uprostřed molekuly (actin fold), které tvoří spojovací článek aktinu s aktinu podobnými proteiny (actin related proteins; ARP). Správná konformace actin foldu závisí na přítomnosti Mg^{2+} iontů.

Aktin se vyskytuje ve dvou formách, mezi nimiž může volně přecházet. Monomerní forma jsou globulární bílkoviny aktinu (G-aktin). Polymerní forma vzniká nekovalentním spojením jednotlivých molekul aktinu do tvaru vlákna (F-aktin - filamentární forma).

Mikrofilamentum o tloušťce 7 nm tvoří množství nekovalentních interakcí mezi jednotlivými molekulami aktinových monomerů. Tyto monomery se přikládají do dvou vláken, která jsou okolo sebe ovinutá. Jejich délka závisí na fyziologickém stavu buňky a může dosahovat až několika mikrometrů. Při neměnné délce vlákna, kdy dochází ke srovnatelné polymeraci na jednom jeho konci, jako je depolymerace na konci druhém, se mluví o tzv. filament treadmilingu.

Vzhledem k tomu, že molekula G-aktinu má polární orientaci, přenáší se tato polarita i na aktinové vlákno, kde rozeznáváme dva konce. Konec, ke kterému míří vazebné místo pro ATP je tzv. minus konec (pointed end). Na něm dochází k masivnější depolymeraci díky destabilizaci celé struktury přítomností ADP po hydrolýze ATP. Druhý konec je tzv. plus konec (barbed end). Zde dochází k častějšímu přikládání dalších ATP-aktinových monomerů a tedy růstu vlákna.

Za vysokých koncentrací aktinu *in vitro* dochází k samovolnému vzniku trimeru G-aktinu jako iniciačního očka pro polymeraci. Ta dále probíhá samovolně bez nutnosti dodání energie, kdy je snížení koncentrace G-aktinu hnacím prvkem pro přísun nových monomerů (izoenergetická teorie polymerace).

Polymerace za nižšího obsahu *in vivo* vyžaduje iniciační očko v podobě aktin-vazebného proteinu jako například vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP; vyskytuje se ve fokálních adhezích), komplex Arp 2/3 (větví vlákna v úhlu okolo 70°), a fimbrinu (spojuje filamentární síť). Polymerace za koncentrací aktinu v buňkách je rovněž umožněna proteiny snižujícími jeho kritickou koncentraci (právě taková koncentrace, která je nutná pro jeho polymeraci). Tu nejvíce ovlivňuje přítomnost profilinu (PFN). Ten svým připojením blokuje místo vazby G-aktinu k minus konci vlákna. Komplex profilin-aktin (profilaktin) způsobuje přednostní růst na plus konci mikrofilamenta. Po připojení k F-aktinu způsobí konformační změnu oslabení vazby a odpadnutí PFN.

Přidání aktinových podjednotek do vlákna po určité době vyvolá štěpení ATP a vznikne ADP-F-aktin, který je méně stabilní. Hydrolýza nukleotidu vyvolává postupný rozpadu mikrofilamenta. Odpadu monomerů (tím i stabilizaci vlákna) na minus konci brání „čepečkovací protein“ (capping protein) tropomodulin. Naopak na plus konci znemožňuje další přikládání nových molekul G-aktinu (tím brání růstu vlákna) CapZ, který zabrání jeho přístupnosti. Tyto proteiny spolu se stříhacími proteiny gelsolinem cofilinem jsou základními regulátory růstu a délky vlákna.

Toto vlákno je v případě potřeby stabilizováno bočním přiložením dalších aktin-vazebného proteinu tropomyosinu. Takto stabilizované vlákno poté slouží jako dráha pro přesun nákladu motorovými proteiny myosiny. (vypracováno na základě učebnice Albert et al.)

3. Profilin

3.1. Základní informace

Profilin (PFN) je jedním z prvních objevených proteinů se schopností vázat aktinové monomery. Prvně byl izolován ze sleziny skotu (Carlsson et al., 1976; Carlsson et al., 1977). Jedná se o malý všudypřítomný bazický protein o molekulární hmotnosti 12-15 kDa společný všem organismům (Carlsson et al., 1977; Cooley et al., 1992; Meagher, 1991; Valenta et al., 1991; Staiger et al., 1997), mezi něž patří dokonce i některé viry (Machesky et al., 1994). Původně se myslelo, že jeho základní funkcí je pouze vázat G-aktin ve stechiometrickém poměru 1:1 (Carlsson et al., 1977), a tak udržovat jeho pool spolu s inhibicí spontánní polymerace do vláken ve vysoké koncentraci (Reichstein a Korn, 1979; Carlsson et al., 1977).

Později bylo objeveno, že PFN dokáže G-aktin uvolnit při stimulaci růstu aktinových vláken vyvolané zvýšenou koncentrací fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP₂), a tím značně zrychlit jeho polymeraci (*Lassing a Linberg, 1985; Gieselmann et al., 1995; Lambrecht et al., 1997*). Jeho celková koncentrace v buňce však sama nedokáže udržet poměr mezi G-aktinem a F-aktinem. Proto je nutná spolupráce s dalším sekvestračním proteinem β -thymosinem, který zároveň funguje jako pufrovací činidlo G-aktinu (*Southwick a Young, 1990*).

Vazba PFN v komplexu PFN-aktin vyvolává velmi značné konformační změny molekuly aktinu (*Schutt et al., 1993*) usnadňujících výměnu navázaného nukleotidu (ATP za ADP). PFN funguje jako nukleotid výměnný faktor (nucleotide exchange factor; NEF) (*Goldschmidt-Clermont et al., 1992*). Výjimkou jsou některé rostlinné PFN, které tuto funkci nezastávají, a je nahrazena zastupujícími proteiny, nebo díky rychlejší samovolné výměně není nutná (*Perelroizen et al., 1996*).

Přesto, že funkce a prostorová struktura je evolučně velmi konzervována a prostupuje všechny homology patřící do této rodiny, jejich primární struktura se značně liší. Proto se jednotliví zástupci těžko srovnávají podle sekvence aminokyselin (AMK) (*Arasada et al., 2007*) (viz přílohy Obrázek 1).

V živočisné říši známe nejméně 4 izofory profilinu, z nichž některé jsou druhově a tkáňově specifické (*Machesky et al., 1990*) - PFN I je produkován ve všech tkáních, PFN II je specializovaná forma vyskytující se v centrálním nervovém systému, PFN III je minoritní dosud dopodrobna neprozkananá forma a PFN IV je lokalizován v myších a lidských varlatech a spermích. Navíc alternativní sestřih některých známých izoforem PFN vede ke vzniku nových izoforem s odlišnými vlastnostmi (*Di Nardo et al., 2000; Lambrechts et al., 2000*). V rostlinách se jich vyskytuje mnohem více (*Arasada et al., 2007*).

3.2. Struktura profilinu

Základní struktura PFN byla získána pomocí rentgenové krystalografie (X-ray crystallography) a za pomoci spektroskopie spojené s nukleární magnetickou rezonancí (NMR) především na lidském PFN I v komplexu s β -aktinem, či peptidem se sekvencí poly-L-prolinů (PLP). Byla zjištěna struktura 7 β -listů z obou stran lemovaných 4 α -helixy (*Metzler et al., 1993; Schutt et al., 1993; Vinson et al., 1993; Mahoney et al., 1997; Mahoney et al., 1999; Rozycski et al., 1994*).

Vazebné místo pro aktin se nachází mezi zbytky helixu 3, 4 a β -listy 4, 5 a 6. Naproti tomuto místu leží PLP vazebný klastr šesti aromatických aminokyselin (AMK) ohraničených

C a N-koncovými α -helixy (*Metzler et al., 1993; Mahoney et al., 1999*), který může interagovat se šesti proliny v sérii (*Metzler et al., 1994; Vinson et al., 1993; Björkegren et al., 1993*). Obě tato místa částečně překrývá místo pro vazbu PIP₂ (*Mahoney et al., 1997; Mahoney et al., 1999*), jako základního regulátoru (*Lassing a Lindberg, 1985; Lambrechts et al., 1997*).

Molekuly aktinu v profilaktin zaujímají tvar nepřetržité pásky, která se podobá spíše oligomernímu aktinu, než monomernímu. PFN je schopen vázat dvě molekuly aktinu v této páscce na různých místech. Druhá vazba je nejspíše vyvolána přes PLP vazebný klastr. To vede ke spekulacím, že kontakt druhé molekuly napomáhá přibližovat G-aktin na plus konec aktinového vlákna.

Na základě porovnání struktur lidských izoforem PFN (podobnost primární struktury 62 %) rentgenovou krystalografií byly objeveny mírné rozdíly ve vazebném místě pro aktin, prolinový motiv a PIP₂ (*Nodelman et al., 1999*). Přesto tyto změny nemají vliv na schopnost obou izoforem vázat G-aktin (*Gieselmann et al., 1995; Lambrechts et al., 1995*), ale ovlivňují vazbu PLP či PIP₂ (*Nodelman et al. 1999*). Vlivem všech rozdílů primárních struktur se obě izoformy liší izoelektrickým bodem (*Honoré et al., 1993*).

3.3. Funkce profilinu v cytoplazmě

Základní funkcí PFN je vázat molekuly G-aktinu. PFN ovlivňuje koncentraci a dynamiku aktinu pomocí výměny ATP za ADP a přiváděním ATP-G-aktin k rostoucímu konci vlákna. Při nízkých koncentracích dokáže PFN aktinová vlákna stabilizovat (*Rothkegel et al., 1996*). Správná funkce aktinového cytoskeletu je esenciální pro život (transport váčků) a vývoj organismu (dělení buněk). Díky přítomnosti PLP a PIP₂ vazebného místa je PFN spojovacím článkem cytoskeletu a membrány ve třech signálních drahách – tyrosin kinasové, Ras/G-proteinové a Rac-Rho GTPasové

3.3.1. Profilin a jeho vazebné schopnosti

Díky přítomnosti PLP vazebného místa je PFN schopen vázat ligandy ovlivňující kromě dynamiky cytoskeletu i mnoho jiných buněčných pochodů (vezikulární transport, signalizace, propojení jaderného transportu). I když existence PLP vazebného místa byla známa po dlouhou dobu, nebyl do roku 1995 znám žádný vazebný partner. Prvním objeveným je VASP (*Reinhard et. al., 1995*). VASP reguluje aktinovou polymeraci jako antagonistu čepičkovacího proteinu (*Krause et al., 2003*) a sám polymeraci indukuje (*Walders-Halberg et al., 2002*). Počet vazebných partnerů rapidně stoupal - proteiny spojené s aktinovou polymerací, či její

iniciací, receptory pro jaderný export, regulátory endocytózy, Rac a Rho efektorové molekuly a některé předpokládané transkripční faktory (viz přílohy Tabulka 1) (*Witke W., 2004*).

Dále je velmi důležitá regulace přes PIP₂ vazebné místo, které váže s různou afinitou fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PIP₃) (*Fedorov et al., 1994*). Vazba inhibuje vazbu přes PLP a vznik profilaktinu. (PFN v různých buněčných pochodech dle Witke W., 2004 viz přílohy Obrázek 3)

3.3.2. Profilin jako faktor výměny nukleotidů

Změna konformace G-aktinu během vazby PFN dokáže urychlit výměnu nukleotidu více než 1000× (*Mockrin a Korn, 1980; Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Wolven et al., 2000, Lu a Pollard, 2001*). Udržuje se tak pool G-aktinu především v jeho ATP-nabité formě, která je vhodnějším substrátem pro β-thymosin (*Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Pantaloni a Carlier, 1993*). Vzhledem k tomu, že pro rychlou polymeraci je díky svým vlastnostem vhodnější nabitý ATP-aktin, který polymeruje s větší účinností (při o mnoho nižší kritické koncentraci oproti ADP-aktinu), ovlivňuje PFN zrychlenou polymeraci aktinu i v době, kdy je většina aktinu v monomerní formě s ADP (např. při masivní depolymeraci).

3.3.3. Profilin a aktinová dynamika *in vitro*

PFN přivádí v komplexu potřebné jednotky ATP-G-aktinu na plus konec aktinového vlákna. Snižuje tak jeho kritickou koncentraci až 1000× (*Pring et al., 1992; Pantaloni a Carlier, 1993; Carlier a Pantaloni, 1994; Holt a Koffer, 2001*). S tímto poznatkem kolidovala původní myšlenka izoenergetického modelu polymerace (viz aktin a jeho dynamika), protože pro takto nepřirozené chování je nutné dodávat energii (*Pring et al., 1992*).

Efekt snížení kritické koncentrace je ještě více patrný za přítomnosti thymosinu-β4, který udržuje zvýšený pool G-aktinu jako substrát PFN pro přenos na rostoucí konec vlákna (*Pantaloni a Carlier, 1993; Carlier a Pantaloni, 1997*). Ukazuje to na spolupráci dvou naprosto odlišných proteinů vážících G-aktin, které jsou si zároveň i kompetenty o tentýž aktinový monomer (viz přílohy Obrázek 2) (*Sun et al., 1995*).

3.3.4. Profilin je esenciální pro život

PFN se vyskytuje především na místech aktivní polymerace aktinového vlákna (membránové výběžky, kontraktilní kroužek (*Balasubramanian et al., 1994*) a kortikální aktinová vlákna (*Giuliano a Taylor, 1994*)). Zde je ho nejvíce potřeba jako zprostředkovatele zásobních molekul ATP-aktinu (*Sohn a Goldschmidt-Clermont, 1994*). Studium jeho vlivu se, odehrávalo sledováním mutovaných organismů. Mutace v genech kódujících PFN měly často

až fatální následky pro daný organizmus či jeho vývoj, který je závislých na správné funkci aktinových struktur.

U *Drosophila* defekt genů pro PFN vedl během vývoje k narušení správné morfogeneze (*Verheyen a Cooley, 1994*). Podobné výsledky byly zjištěny i u jiných organizmů. Nedostatek PFN byl pro daný organizmus často letální již v několika buněčném stádiu vývoje (často 2 - 8 buněk) (*Witke et al., 2001*). Dalším příkladem může být zastavení pučení kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*Haarer et al., 1990*).

U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* vedla zvýšená exprese PFN k problémům cytokineze, defektní buňky nebyly s to formovat kontraktilní kroužek (*Balasubramanian et al., 1994*). Vysoká koncentrace PFN vede k depolymeraci aktinových vláken živočišných buněk (*Cao et al., 1992*) a rostlinných (*Staiger et al., 1994*), což má negativní vliv i při formování fragmoplastu během dělení rostlinné buňky (*Valster et al., 1997*). Vysoká koncentrace profilaktinu vede ke vzniku nových vláken (*Cao et al., 1992*). Správná funkce PFN je esenciální pro vývoj, proto musí být jeho koncentrace v závislosti na koncentraci aktinu řádně kontrolována. Zvýšení množství aktinu vedlo k samovolnému nárůstu produkce PFN a snížení obsahu PFN mělo za následek menší koncentraci aktinu (*Magdolen et al., 1993; Balasubramanian et al., 1994*).

3.3.5. Profilin a vezikulární transport

Svou funkci zastává PFN i ve vezikulárním transportu a endocytóze nižších eukaryot (*Wolven et al., 2000; Pearson et al., 2003*). V savčích buňkách je na PFN I závislý *trans*-Golgi transportní systém, protože přivádí dynamin 2 (*Dong et al., 2000*), nutný pro odškrcení pučícího váčku. V neuronech PFN částečně reguluje endocytózu a recyklaci synaptických váčků.

Na základě proteomické studie myšího mozku byla zjištěna přítomnost klatrinu a valosin-obsahujícího proteinu (valosin-containing protein; VCP) v komplexu s PFN a dynaminu 1, synapsin a nck-asociovaný proteinu 1 (nck-associated protein; Nap1) s PFN II (*Witke et al., 1998*). Synapsiny jsou zanořené do membrány sekretorického váčku a slouží k jeho kontaktu s cytoskeletem. Nap1 je adaptorová molekula v membráně váčku.

3.3.6. Profilin v synapsích

PFN v obou majoritních izoformách hraje roli v neuronech, kde interaguje s proteiny ovlivňujícími jejich morfologii a propojení cytoskeletu s receptory jak v presynaptických tak v postsynaptických buňkách.

Profilin zde reaguje s gephyrinem a dalšími „scaffoldovými“ proteiny drebrinem, aczoninem a delphilinem. Gephyrin je komponent postsynaptické proteinové sítě inhibičních synapsí spojující membránu s cytoskeletem, zodpovědný za agregaci glycinových receptorů a jejich propojení s mikrotubulárním a možná i aktinovým cytoskeletem (*Mammoto et al., 1998; Giesemann et al., 2003; Kneussel a Betz, 2000*). Drebrin je aktin-vazebný protein hrající roli při morfologii dendritické struktury. Aczonin utváří cytoskeletální výstuhu presynaptických buněk a jeho funkce je spojena s vezikulárním transportem neurotransmiterů (*Witke W., 2004*).

3.3.7. Signalizace spojená s polymerací aktinu

Přes relativně malou velikost (12-15 kDa a 124 - 154 AMK) má PFN, díky své struktuře zmíněné výše, schopnost vázat mnoho dalších vazebných partnerů: PIP₂, stejně jako proteiny s PLP klastrem, či pouze na prolin bohatou strukturu. Podobá se touto vlastností proteinům obsahujícím SH3 doménu (*Src homologní doména 3*, která váže nekatalytické části fosfolipasy a tyrosin kinas, čímž umožňuje jejich propojení do agregátů s jinými efektorami) (*Ren et al., 1993*). Přesto PFN nemá SH3 doménu, a oproti proteinům, které ji mají, je schopen vázat oligoprolin (*Björkegren et al., 1993; Metzler et al., 1994*).

Schopnosti PFN jako jednoho z hlavních přenášečů signálu z membrány na cytoskeletální struktury jsou využity ve třech signálních drahách – tyrosin kinasové, Ras/G-proteinové a Rac-Rho GTPasové. Profilin jako spojovací článek mnoha signalizačních pochodů je znázorněn v přílohách (viz přílohy Obrázek 3).

3.3.7.1. Tyrosin-kinasová signální dráha

Tuto signální dráhu PFN umlčuje afinitní vazbou PIP₂ a PIP₃ (*Fedorov et al., 1994*) a inhibicí funkce PLC (fosfolipasa C; phospholipase C) přes kontakt PLP vazebné oblasti. Inhibice je při stimulaci růstovým faktorem zrušena následnou fosforylací PLC, která způsobí konformační změny PLC znemožňující vazbu PFN (*Goldschmidt-Clermont et al., 1991*). Při vazbě PIP₂ dochází rovněž k inhibici vzniku profilaktinu a k následnému rychlému uvolnění navázaného G-aktinu z komplexu (*Lassing a Lindberg, 1985; Fedorov et al., 1994; Chaundhary et al., 1998*).

3.3.7.2. Ras/G-protein signální dráha

Detailnější funkce PFN v Ras/G-proteinové signální dráze není zatím přesně známa, pouze bylo zjištěno, že správně fungující PFN je schopen nahradit defektní funkci kvasinkového proteinu asociovaného s cyklasou Srv2p. Mutantní formy PFN se sníženou afinitou PIP₂ byly méně účinné (*Vojtek et al., 1991; Haarer et al., 1993*).

3.3.7.3. Rac-Rho GTPasová signální dráha

Mnoho ligandů PFN jsou dobře známé Rac a Rho (malé signální GTPasy) efektorové molekuly. Není dosud zřejmé, zda je vazba PFN s těmito malými GTPasami zprostředkována přímo, či nikoliv.

Kinasa ROCK (Rho-dependent coiled-coil kinase) byla objevena v komplexu s PFN II (*Witke et al., 1998*). Jak se zdá, je tato interakce důležitá pro růst neuritu, který je regulovaný ROCK (*Da Silva et al., 2003*).

Byly objeveny další proteiny Rac signální dráhy v komplexu s PFN II, jedním je Nap1 a druhým POP-130 (partner of profilin) s neznámou funkcí (*Witke et al., 1998*). Oba jsou součástí heterotetramerního komplexu: WAVE1 (WASP family verprolin-homologous protein), HSP-C300 (heat-shock protein), Nap1 a POP-130. GTP-Rac1 váže POP-130, způsobí rozpad tetrametru, a tím aktivuje polymeraci aktinového vlákna na WAVE1 (*Eden et al., 2002*).

Další ligand PFN, tentokrát z rodiny Rho-GTPas, je myší homolog genů *diaphanous* (*mDia1, mDia2 a mDia3*) z *Drosophila*. Jedná se o geny proteinů z rodiny tzv. forminů, které mají schopnost vyvolat aktinovou polymeraci (*Wallar a Alberts, 2003*). Tyto proteiny s autoinhibiční schopností na N-konci vazebné domény pro GTPasu (GTPase binding domain; GBD) jsou aktivovány právě vazbou GTPasy RhoA, čímž indukují nukleaci aktinu (*Alberts A.S., 2002; Li a Higgs, 2003*). Forminy obsahují obsahující 13 prolin bohatých úseků FH1 (formin homology), což z nich dělá ligandy PFN a tvoří s ním obrovské signální platformy (*Watanabe et al., 1997*). Možná dochází k mobilizaci aktinu navázaného na PFN, a tím k indukci polymerace aktinového vlákna (*Li a Higgs, 2003*).

3.4. Funkce profilinu v buněčném jádře

Přítomnost PFN v jádře je ještě diskutabilnější než jaderná lokalizace aktinu. Přesto se stále více ukazuje, že jejich funkce jsou zde nezastupitelné a jsou buňkami využité ve všech fázích buněčného cyklu.

Funkce PFN v jádře se od cytoplazmatických často liší. Jejich objev byl spojen s nálezem nových proteinů, které jsou, jak se zdá, velmi důležitými regulačními faktory buněčných fyziologických procesů (splicing mRNA, transkripce, jaderný export). Proto jsem se jim věnoval detailněji. Bylo by také zajímavé potvrdit či vyvrátit, že funkce známé z cytoplazmy jsou aplikovatelné na buněčné jádro.

3.4.1. Profilin v kolokalizaci se SMN

PFN byl lokalizován se survival motor neuron proteinem (SMN). Výskyt mutované izoformy SMN I, která má mimo jiné PLP klastr, je spojen s výskytem spinální svalové dystrofie. SMN slouží během recyklace tzv. malých jaderných ribonukleoproteinů (small nuclear ribonucleoproteins; snRNP - prostředníci interakce mRNA s proteiny spliceosomu) a napomáhají správnému složení spliceosomového komplexu (spliceosom). Jedná se tedy o jeden ze základních regulátorů sestřihu pre-mRNA a transkripce.

Díky přítomnosti PLP motivu je SMN I ligandem PFN. Afinita vazby je silnější k PFN II, který je především neurální formou. Kolokalizace obou proteinů byla zaznamenána jak v cytoplazmě (skládání spliceosomu), tak v jádře, kde SMN I tvoří jaderné tečky v komplexu s proteinem SIP-1 (SMN-interacting protein - recyklace snRNP). (Gieseemann et al., 1999)

3.4.2. Profilin a jeho jaderná lokalizace během buněčného cyklu

V roce 2003 Valster se svými kolegy publikovali změny v rozložení PFN během buněčného cyklu buněk z tyčinek druhu *Tradescantia virginiana*. Pro vizualizaci využívali PFN značený 5-iodoacetoamido-fluoresceinem (IAF). Tato značka na rozdíl od jiných neovlivňuje žádnou ze zásadních fyziologických funkcí PFN.

Během interfáze byl PFN takřka rovnoměrně rozšířen po celé cytoplazmě a začal se velmi rychle akumulovat v buněčném jádře v podobě teček. Toto rozložení se nijak neměnilo ani během profáze, kdy dochází ke kondenzaci chromozomů.

Těsně před rozpadem jaderného obalu se rozplynuly tečky PFN do homogenního značení jaderného segmentu. Po rozpadu membrány byl uvolněn do cytoplazmy, kde došlo k rovnoměrné redistribuci do prostoru. Po znovuobnovení jaderné membrány a dekondenzaci chromozomů došlo opět k signifikantní zpětné akumulaci PFN do jaderného prostoru. Toto napovídá skutečné fyziologické významnosti jaderné lokalizace PFN při buněčných pochodech. Během tvorby fragmoplastu se zdálo, že se PFN akumuluje do tohoto místa, to ovšem nebylo nijak potvrzeno.

Stejných výsledků dosáhli i na dalších modelech *Physcomitrella patens*, *Phaseolus vulgaris*, *Lilium longiflorum* a *Gibasis scheldiana*, kde navíc sledovali lokalizaci PFN v jaderném kompartmentu pomocí imunodetekce v elektronovém mikroskopu. (Valster et al., 2003)

3.4.3. Profilaktin jako substrát pro Exportin 6

Tato funkce prezentovaná roku 2003 není zcela spojena s funkcí PFN v jádře. Vzhledem k tomu, že recyklace proteinů mezi jaderným a cytoplazmatickým prostorem je často prvkem signálních drah a úzce s jadernou funkcí souvisí, je tento objev velmi cenný.

Stüven se svými kolegy objevili nový exportní protein patřící do rodiny transportních receptorů z importin β -superrodiny - exportin 6 (Exp6). Exportiny váží proteiny v jaderném prostoru přes jejich jaderný exportní signál (nuclear export signal; NES), a díky vazbě Ran-GTP jsou i s „nákladem“ exportovány skrz póry do cytoplazmy, kde se komplex po hydrolyze GTP rozpadne.

Specifickými ligandy Exp6 jsou především zástupci aktin-vazebných proteinů mDia, Mena (mouse homolog of Drosophila enabled), VASP, PFN a aktin. Při detailnějším zkoumání profilaktinu zjistili, že Exp6 váže β -aktin v jeho G-formě. Jak se zdá, změny konformace vyvolané vazbou PFN vedou k zesílení specificity vazby Exp6.

Bez regulace pomocí Ran-GTPas se začíná aktin hromadit v jádře, kde polymeruje do vláken, která probíhají celým kompartmentem, nebo dokonce tvoří parakrystalické struktury podobné strukturám po inkubaci buněk ve vysoké koncentraci dimethylsulfoxidu (DMSO) (*Osborn a Weber, 1980; Sanger et al., 1980*).

Pro nezbytný export aktinu z jádra do cytoplazmy jsou všechny izoformy PFN vhodným prostředníkem, který díky své velikosti (14 kDa) může prostupovat do jádra pouhou difuzí. Aktin, či dokonce profilaktin, musí být specificky odstraňován do cytoplazmatického prostoru, protože pro molekuly o velikosti přes 40 kDa není tento proces prakticky možný.

Stüven s kolektivem tím vyvrátili původní předpoklad exportu aktinu, ať už v komplexu s PFN, či samotného, exporterem CRM1 (*Wada et al., 1998*). Buňky s nefunkčním Exp6 vykazovaly stejnou morfologii jako při špatné regulaci. Tím bylo potvrzeno, že pro profilaktin je Exp6 nezbytně nutný.

O exportu dalších aktin-vazebných proteinů zatím více známo není, i když byl sestaven funkční komplex VASP-PFN-aktin-Exp6-RanGTP, kde je využito vazebné schopnosti PFN přes PLP motiv na proteinu VASP. PFN zde nejspíše tvoří spojovací článek a zprostředkovatele pro vazbu dalších aktin-vazebných proteinů. Možná se touto vysoce konzervovanou exportní dráhou Exp6 odstraňují i další proteiny. (*Stüven et al., 2003*)

3.4.4. Profilin I jako možný regulátor pre-mRNA sestřihu

Skare se spolupracovníky potvrdili dřívější studii Giesemannova týmu kolokalizace PFN I se SMN. Narazili na úzkou kolokalizaci PFN I v jádře se snRNP proteiny, které zde

tvoří jaderné tečky (speckles), a Cajalovými tělíska (Cajal bodies; CB - místy aktivní transkripce), které též obsahují právě zmíněný SMN.

Inhibice transkripce aktinomycinem D vedla k rozdílnému chování PFN I v obou strukturách. Kolokalizace PFN I s tečkami nebyla nijak narušena, což vedlo k závěru, že je PFN těsně funkčně vázán na oblasti obsahující snRNP, potřebné pro správnou funkci spliceosomu (*Will a Lührmann, 2001*).

CB se během vystavení aktinomycinu D přesunuly do blízkosti, či dokonce do samotného vnitřního prostoru jadérka. To ovšem nevedlo k současnému přesunutí PFN. Takto ovlivněná CB nikdy nevykazovala jeho přítomnost. PFN byl nalezen vždy pouze v blízkosti jaderných teček, což znamená, že aktinomycin D zřejmě naruší složení CB, a tím přeruší vazby s PFN.

Díky pokusům s protilátkami bylo dokázáno, že správně fungující PFN je nutný pro stavbu spliceosomu. Při zakrytí jeho povrchu se sníží splicing, další volný PFN ji zcela obnoví. Povrch PFN je potřebný pro spojení spliceosomu se substrátem. Pokud je volně přístupný (např. pouze zakrytý C-konce, vazba G-aktinu), splicing není ovlivněn.

Tato skupina objevila, že konstrukt GFP-PFN s vazbou na N-konci není schopen importu do jádra přes to, že vykazoval normální cytoplazmatické rozložení. Zřejmě tak objevili jednu z podob jaderné lokalizační sekvence NLS (nuclear localizing sequence) na N-konci molekuly. Možná došlo pouze k omezení difuze díky přívažku. (*Skare et al., 2003*)

3.4.5. Profilin jako možný regulátor transkripce

V roce 2004 byl objeven nový protein p42^{POP} vážící PFN v myší tkáni. Je tvořen 393 AMK, má 41,890 kDa a ve své struktuře skrývá dvě NLS a C-koncovou NES. Zařadili ho do rodiny Myb transkripčních faktorů přes to, že obsahuje pouze jednu DNA-Myb vazebnou doménu následovanou aktivační kyselou doménou (ostatní Myb proteiny mají dvě).

Tento protein má poměrně silnou represorovou schopnost celkové transkripce buňky. Jedním z regulátorů této represe je jeho schopnost tvořit dimery, protože DNA váže především ve formě monomeru.

Přítomnost 3 poly-prolin bohatých úseků (z nichž jeden patří do skupiny SH3 - vazebných modulů) z něj dělá dalšího jaderného vazebného partnera PFNI a IIa. Komplex PFN-p42^{POP} znemožňuje vazbu tohoto transkripčního faktoru k DNA a jeho stavba je druhým regulačním krokem represorových vlastností p42^{POP}. (*Lederer et al., 2004*)

3.4.6. Profilin reverzibilně vstupuje do jádra jako odpověď na signál

Dynamika aktinového cytoskeletu ovlivněná pomocí PFN má zásadní dopad na všechny buňky, včetně nervových, jejichž základní pochody jsou s velmi rychlou reorganizací mikrofilamentárního cytoskeletu spojeny. Mezi jedny z nejdůležitějších reakcí, spojených se schopností učit se a s pamětí, patří odpověď na signál N-methyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru. Dochází k redistribuci aktinu do synaptických dendritických výběžků, kde je zároveň celá struktura zesílena a stabilizována. Tato stabilizace je spojena se zvýšenou přítomností PFN v těchto místech (*Ackermann a Matus, 2003*).

Redistribuce PFN není po stimulaci soustředěna pouze do dendritických výběžků (*Fischer et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999; Ackermann a Matus, 2003*), ale společně s ní dochází k jeho akumulaci do jádra hypokampálních neuronů myší. Jednalo se předně o neurální izoforamu PFN II.

PFN (alespoň PFN II) je komplexním spojovacím článkem mezi reakcí cytoskeletu a přenosem signálu do jádra po stimulaci NMDA receptoru, přesto akumulace cytoplazmatického PFN II do jádra není nijak spojena s redistribucí aktinu, který se při této reakci do jádra nepřesunuje, ale je nutný pro zpětný export PFN ven do cytoplazmy.

Pomocí GFP-značených molekul na C-konci bylo zjištěno, že se po stimulaci NMDA receptoru nejedná o náhodnou kumulaci PFN v jádru pouhou difuzí. Spíše ho do jader cíleně importuje neznámý mechanizmus. Tato reakce je velmi rychlá, reverzibilní a závislá na přítomnosti Ca^{2+} . Po odeznění signálu PFN selektivně exportuje Exp6. (*Birbach et al., 2006*)

4. β -Thymosin

4.1. Základní informace

Do rodiny β -Thymosinů (β T) patří nejmenší (5 kDa; 41 - 43 AMK) a nejhojnější proteiny vážící aktinové monomery v nesvalových buňkách (*Pantaloni a Carlier, 1993; Nachmias VT, 1993; Safer a Nachmias, 1994*), které se vyskytují ve všech obratlovcích i bezobratlých (*Low et al., 1981; Huff et al., 2001*), nikdy nebyly zaznamenány u nižších eukaryot.

Thymosiny byly izolovány jako frakce hormonů brzlíku (*Goldstein et al., 1972*) a následně rozdeleny podle izoelektrického bodu na rodiny α -thymosinů (pH<5), β -thymosinů (pH 5 - 7) a γ -thymosinů (pH>7). První objevený zástupce rodiny β T, thymosin- β 1, byl klasifikován jako zbytkový fragment ubiquitinu bez glicinů na C-konci (*Schlesinger et al., 1975*). Další objevené izofory, thymosin- β 2 a β 3, nebyly zatím studovány. Nejhojnější zástupce rodiny β T, thymosin- β 4 (T β 4) (*Low a Goldstein, 1982*), je hlavním proteinem

vážícím G-aktin v poměru 1:1 v krevních destičkách, čímž inhibuje jeho polymeraci (*Safer et al., 1990; Safer et al., 1991*).

Tento polypeptid aktivuje diferenciaci T-lymfocytů (*Low et al., 1981*), má fyziologický vliv na hypotalamus a hypofýzu (*Rebar et al., 1981*) a dokáže inhibovat migraci makrofágů (*Weller et al., 1988*). Homology T β 4 z jiných organizmů mají schopnost vázat G-aktin a mimo jiné dokáží stimulovat migraci lidských endoteliálních buněk v pupeční šňůře (*Grant et al., 1995; Malinda et al., 1997*).

Další časté tkáňově a vývojově specifické izoformy, jako například thymosin- β 10 a thymosin- β 9, jsou homologní dominantní formě (*Border et al., 1993*). Spolu s dalšími vykazují schopnost vazby G-aktinu a mají podobné funkce jako T β 4 (*Yamamoto et al., 1992; Hannappel a Wartenberg, 1993; Yu et al., 1993; Heintz et al., 1993; Jean et al., 1994*). Samozřejmě některé drobné rozdíly zjištěné *in vitro* mohou mít za následek rozdíly *in vivo* (*Jean et al., 1994*). Nejzásadnější je bodová mutace serinu ve vazebném místě za alanin, což vede k pětinásobnému zesílení afinity ke G-aktinu (*Huff et al., 1995*).

4.2. Struktura β -thymosinu

Přes první problémy zjistit správnou strukturu proteinu pomocí rentgenové krystalografie byla pomocí jiných metod (NMR, mutageneze) objevena aktin-vazebná sekvence LKKTETQEK společná všem β -thymosinům (*Safer et al., 1991; Safer a Nachmias, 1994*). Tato sekvence je homologní velmi dobře známé aktin-vazebné sekvenci actobindinu z *Acanthamoeba* (*Vancompernolle et al., 1992; Huff et al., 1995; Huff et al., 1997; Van Troys et al., 1996*).

Pro správnou sílu vazby tento společný motiv nestačí a je nutný ještě správný „upstream“ segment polárních AMK (*Jean et al., 1994; Vancompernolle et al., 1992; Hannappel a Wartenberg, 1993*). NMR studie odhalily, že T β 4 není schopný ve vodných roztocích zaujmout správnou konformaci při teplotě 37 °C i přes to, že N-koncový úsek mezi AMK 5 - 16 je schopen zaujmout strukturu α -helixu již při teplotách pod 14 °C (*Czisch et al., 1993*). Vznikla proto hypotéza, že vazba aktinu na T β 4 stabilizuje celou strukturu α -helixu na N-konci při 37 °C, kdy je interakce nejsilnější. Tato stabilizace byla potvrzena přes mutace v α -helixovém úseku, které ztratily schopnost vazby G-aktinu (*Simenel et al., 2000*). T β 4 váže N a C-koncové sekvence G-aktinu (*Heintz et al., 1993; Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Safer a Nachmias, 1994*). Potvrzují to všechny studie, přesto se stále čeká na úplné prozkoumání celého komplexu T β 4-aktin pomocí rentgenové krystalografie.

4.3. Funkce β -thymosinu v cytoplazmě

β -thymosiny váží G-aktin, čímž znemožňují výměnu nukleotidu a polymeraci do vláken. Fungují především jako aktin monomerové „pufry.“ Ovlivňují dynamiku mikrofilamentárních struktur a účastní se několika fyziologických reakcí organizmu (léčení ran, krvetvorba a rakovina).

4.3.1. Thymosiny jako aktinové pufry

Afinita $T\beta 4$ k molekule ATP-aktinu odpovídá kritické koncentraci polymerace ATP-aktinu na mínu konci aktinového vlákna a je $50\times$ vyšší než k ADP-aktinu, což z něj dělá ideální „monomerový puf“ (*Yu et al., 1993; Weber et al., 1992; Carlier et al., 1993*). Na stimulaci růstu vlákna a na vyvolanou změnu koncentrace ATP-aktinu dokáže reagovat dostatečně rychle (2 s^{-1}) na to, aby dokázal uvolnit postačující množství nabitého G-aktinu (*Jean et al., 1994*). Jeho funkce není přímo závislá na druhých poslech jako je například Ca^{2+} a polyfosfoinositidy. Jde tedy spíše o pasivní reakci na odkrytí plus konce vlákna regulovaného druhým poslem (*Yu et al., 1993*).

Pufrovací funkce βT je kontrolována, protože ani jejich mírně zvýšená produkce nevede k zesílení depolymerace aktinových vláken (*Safer a Nachmias, 1994*). Všechno ukazuje na to, že přítomnost βT je regulována i prostorově, jelikož je tento protein ve zvýšené míře zastoupen především v místech, kde je nutná vysoká koncentrace G-aktinu (*Yu et al., 1994*). V roce 1996 bylo zjištěno, že se tento protein při vysoké koncentraci dokáže vázat na aktinové vlákno z boku, nebo může být dokonce v komplexu s aktinem do vlákna zabudován (*Carlier et al., 1996; Sun et al., 1996*).

4.3.2. Thymosiny a aktinová dynamika

Základní regulační funkce dynamiky aktinového cytoskeletu βT je založena především na kompetenci o tutéž molekulu G-aktinu s PFN, která udržuje jeho celkový pool. Komplex βT -aktin vede k inhibici výměny nukleotidu na molekule monomeru (*Goldschmidt-Clermont et al., 1992*). Oba proteiny spolu přesto dokáží spolupracovat (viz přílohy Obrázek 2), což mnohonásobně zvyšuje rychlosť aktinové polymerace (*Carlier a Pantaloni, 1994; Pantaloni a Carlier, 1993*).

Zvýšená koncentrace aktinových monomerů je udržená též preferencí ATP-aktinu oproti ADP-aktinu (*Carlier et al., 1993*). Komplex $T\beta 4$ -aktin nepolymeruje na rostoucím konci aktinových filament (*Weber et al., 1992; Yu et al., 1993*). Oproti PFN nemá $T\beta 4$ schopnost vázat komplex DNAse I-aktin (*Safer a Nachmias, 1994*), což je nejspíše způsobeno velikostí molekuly $T\beta 4$, která se díky tomu může vázat na G-aktin z obou stran. Nebo

komplex T β 4-aktin způsobuje takovou konformační změnu, která znemožní vazbu DNAsy I (*Czisch et al., 1993; Yu et al., 1993*).

Vliv T β 4 se méně projevuje u stabilnějších mikrofilamentárních struktur (např. kortikální mikrofilamenta) než u stresových vláken, která jsou připravena na rychlou odpověď po stimulaci. Kortikální vlákna musí být ještě stabilizována proteiny na svém povrchu, či přídavným stabilizujícím prvkem, který tato vlákna udržuje. K jejich depolymeraci také dochází, i když méně. Buňka má totiž potřebu neustále udržovat pool G-aktinu (především na úkor snížené stability stresových vláken) pro možné budoucí použití.

4.3.3. Vliv oxidativních modifikací na schopnosti thymosinů

Na funkci T β 4 mají zásadní vliv i různé modifikace, mezi něž patří sulfonace metioninu na pozici 6, která dokáže během polymerace aktinu zvýšit disociační konstantu komplexu T β 4-aktin asi 20× (*Jean et al., 1994; Huff et al., 1995; Huff et al., 1997*). Za normálních podmínek bez indukce polymerace nemá modifikace žádný vliv (*Heintz et al., 1994*). T β 4 ve formě sulfoxidu inhibuje vznik zánětu a funguje při chemotaxi neutrofilů (*Young et al., 1999*).

Tato modifikace je velmi častá, protože většina buněk během svého metabolismu produkuje reaktivní H₂O₂, který T β 4 velmi rychle oxiduje, čímž celkově klesá afinita ke G-aktinu (*Huff et al., 1997*). Vznikají spekulace, že je proces oxidace a zpětné redukce T β 4 metionin sulfid reduktasou jedním z mechanizmů udržujících správný poměr mezi buněčným F a G-aktinem.

4.3.4. Proteolytické modifikace thymosinů

Níže zmíněné informace dokazující vysokou labilitu thymosinů se dají svým obsahem rovněž zařadit do kapitoly o jejich struktuře, přesto jsem se rozhodl zařadit je sem, pro jejich úzkou spojitost s jejich funkcí.

Odštěpení prvních 6 - 12 AMK má za následek zvýšení disociace komplexu stejně jako sulfonace metioninu zmíněná výše. Oproti tomu odštěpení prvních 23 - 26 AMK vede k absolutní ztrátě schopnosti vázat G-aktin (*Huff et al., 1995; Vancompernolle et al., 1992*). Z toho vyplývá, že důležité pro vazbu G-aktinu jsou především AMK mezi 13. - 23. pozicí. AMK do pozice 7 jsou zodpovědné za inhibici polymerace vyvolané vysokou koncentrací solí (*Huff et al., 1995; Vancompernolle et al., 1992*).

Další proteolytické pokusy dokonce ukázaly, že thymosin-β8 byl pouze artefaktem vzniklým během preparace z extraktu a jednalo se o částečně degradovaný thymosin-β9 (*Hannappel et al., 1982*). Na jiné artefakty vznikající během studia poukázaly pokusy s myší slezinou. Jedná se především o T β 4^{Ala} a thymosin-β10 (*Ruggieri et al., 1983*), které jsou

v původních pracích degradovány na menší zbytky (*Huff et al., 1997*). Nepatrná změna Lys16 za Ala má sice malý vliv na afinitu ke G-aktinu, přesto se jedná o signifikantní destabilizaci komplexu (*Huff et al., 1997*).

Další poznatky prezentoval Eadie se svým kolektivem. Proteolytické změny na C-konci β T měly za následek ovlivnění vazebnosti G-aktinu (*Eadie et al., 2000*). Potvrdilo to přítomnost vazebného místa pro aktin ležícího přes oba konce molekuly.

4.3.5. Thymosiny a rakovina

V roce 1991 bylo zjištěno, že některé druhy rakovinných bujení se mimo jiné vyznačují změnou exprese β -thymosinů. Ve všech prozkoumaných rakovinných buňkách byla zvýšená produkce β T, která signifikantně ovlivňovala jejich metastatické schopnosti. Nalezené metastáze měly produkci $2,5\times$ vyšší oproti normálnu (*Clark et al., 2000*).

$T\beta 10$ byl objeven ve zvýšené míře v karcinomu ledvin (*Hall AK, 1991*), melanomových buňkách (*Weterman et al., 1993; van-Groningen et al., 1996*) a buňkách lidské rakoviny prsu (*Verghese-Nikolakaki et al., 1996*). Později byl potvrzen zvýšený výskyt $T\beta 10$ v mnohých lidských karcinomech (např. rakovina tlustého střeva, vaječníků, dělohy) (*Santelli et al., 1999*). Změna exprese $T\beta 4$ byla dána do souvislosti se schopností nádoru tvořit metastáze (zvýšená exprese vedla k metastázím, snížená naopak) (*Yamamoto et al., 1993*).

Studium vazby exprese thymosinů a rakoviny vedlo k objevu nového zástupce rodiny, thymosinu- $\beta 15$, který se vyskytuje v karcinomu prostaty u krys (*Bao et al., 1996*) a jeví se jako dobrý ukazatel metastatických schopností rakoviny prostaty i u člověka (*Chakravatri et al., 2000*).

4.3.6. Thymosiny jako fyziologický regulátor

Během posledních let bylo zjištěno, že se $T\beta 4$ zapojuje do mnoha fyziologicky důležitých pochodů jako angiogeneze (*Grant et al., 1995; Malinda et al., 1997*), léčení ran a apoptóza (*Huff et al., 2000*).

Přidání $T\beta 4$ má za následek vznik formace podobné kapiláram v buněčné kultuře endoteliálních buněk (*Grant et al., 1995*). Později to potvrdila práce studující $T\beta 4$ jako chemoatraktant vzniku nových cév v místech zranění (*Malinda et al., 1997*). Toto by souhlasilo s tím, že $T\beta 4$ je substrátem pro transglutaminasu a tedy glutaminovým prekurzorem pro vznik faktoru XIIIa, který je produkován aktivovanými krevními destičkami (*Hannappel a van Kampen, 1987*).

Mimo to $T\beta 4$ zpracovává prolyl endopeptidasa, která z něj produkuje tetrapeptid acSDKP (*Grillon et al., 1990*) inhibující vstup hematopoetických pluripotentních buněk do

S-fáze buněčného cyklu (*Lenfant et al., 1989; Aidoudi, 1996*). AcSDKP je tedy regulátorem hematopoézy (krvětvorby).

4.4. Funkce β -thymosinu v buněčném jádře

Stejně jako PFN byly β -thymosiny postupně objevovány v jádře. Jako první v roce 1990 s nálezem T β 4 v jádře přišli Watts se svým týmem, kteří studovali jadernou lokalizaci prothymosin- α a parathymosinu. Zjistili, že při použití radioaktivně značeného T β 4 dochází k jeho samovolné akumulaci v jádře oocytů *Xenopus laevis*, ale kvůli jeho velikosti 5 kDa a nedokázané přítomnosti NLS byl tento jev připisován prosté difuzi (*Watts et al., 1990*).

4.4.1. Thymosin- β 4 v jádře při depleci polyaminů

V roce 1999 prezentovala Shirley A. McCormack se svým týmem nové objevy jaderné lokalizace T β 4. Pro studium využili migrující buňky, u kterých studovali vliv α -difluoromethylornithinu (DFMO), jakožto inhibitory ornitin dekarboxylasy nutné pro udržení správné koncentrace polyaminů, a epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor; EGF). Reakce na tento faktor je závislá právě na koncentraci polyaminů.

Vystavení DFMO mělo za následek rozpad vnitřních stresových vláken a nahromadění G-aktinu do prostoru lamelopodií spojených se vznikem velmi silných F-aktinových formací pod membránou a kolem jaderného prostoru. Během reakce na EGF došlo ke snížení G-aktinu v místech lamelopodií a vzniklé struktury ještě zesílily. Pokud byl přidán náhradní zdroj polyaminů putrescin (PUT; 1,4-diaminobutan), došlo k částečné obnově celého systému.

Zajímavější byl vliv deplece prolaminů na rozložení T β 4 sloužícího jako pufr vypotřebovaného G-aktinu. Původně byl T β 4 lokalizován v celé cytoplazmě, kde tvořil tečkovité útvary kolem F-aktinu v blízkosti jádra. Jaderná lokalizace však nebyla pozorována.

Po působení DFMO a vypotřebování polyaminů došlo k husté lokalizaci T β 4 do jaderného prostoru a jeho minimálnímu výskytu v cytoplazmě. Jakmile byly buňky vystaveny EGF, nedostavila se téměř žádná změna. Po obnovení hladiny polyaminů pomocí PUT došlo opět k návratu T β 4 do cytoplazmatického prostoru.

Toto podivné chování T β 4 v reakci na sníženou koncentraci buněčných polyaminů není dosud objasněné, naznačuje existenci systému ochranné či signální reakce na změnu koncentrace polyaminů v cytoplazmě. (*McCormack et al., 1999*)

4.4.2. Overexprse thymosinu- β 4 vede k jaderné lokalizaci

Jak již bylo zmíněno, zvýšená produkce β T často doprovází rakovinné bujení některých buněk. V roce 2003 přišel Cha se svým týmem s novými poznatkami. Pro svou práci používali buňky B16-F10, které byly získány z metastazujících plicních nádorů.

Do těchto buněk aplikovali virovou nákažou vektor produkující T β 4 ve zvýšené koncentraci. Jak očekávali, metastáze se tvořily častěji. Rovněž byla objevena lokalizace T β 4 v jaderném kompartmentu.

Pokud buňky produkovaly T β 4 v normálních hladinách, vyskytoval se především v cytoplazmě, nikoli v jádře. Jakmile začaly produkovat vyšší koncentrace tohoto proteinu, začal se velmi rychle hromadit v buněčném jádře, což bylo následováno zvýšenou schopností tvořit metastáze.

Potvrdili předchozí objevy ohledně zvýšené produkce T β 4, který, jak se zdá, dokáže ovlivnit jadernou transkripci. Ta potom zvýší schopnost rakovinných buněk tvořit metastáze. (*Cha et al., 2003*)

4.4.3. Thymosin- β 4 v jádru rakovinných buněk MCF-7

V roce 2004 zveřejnil Huff se svými spolupracovníky objev jaderné lokalizace u linie rakovinných buněk MCF-7 z lidského karcinomu prsu. Vycházeli z dřívějších poznatků, že vazba značky na dva jeho glutaminové zbytky ze tří nemá vliv na sekvestrační aktivitu T β 4 (*Huff et al., 1999*).

T β 4 označený fluorescenční sondou zavedli mikroinjektáží do buněk. Po krátké době začal T β 4 zaujmout své cytoplazmatické rozložení s akumulovanými tečkami v těsné blízkosti mikrofilamentárních struktur. Po hodině se však začal T β 4 hromadit v jádřech buněk. Tyto výsledky potvrdili i na dalších buněčných liniích, které nebyly pouze rakovinného původu.

Vliv mělo i okolí dané buňky. Hromadění T β 4 do jader bylo mnohem výraznější u buněk, které se vyskytovaly osamoceně. Zároveň nepozorovali zvýšenou koncentraci T β 4 v místech styku mezi buňkami v buněčných konglomerátech.

Pro vyvrácení dosud stávajícího názoru šíření proteinu pouhou difuzí použili buňky ošetřené digitoninem. Ten permeabilizuje cytoplazmatické membrány bez narušení jaderných membrán. Vylití solubilních proteinů vedlo k zastavení akumulace T β 4 v jádřech, což naznačuje existenci aktivního importu do jader spojeného se solubilním importním mechanizmem. To bylo pro tak malý protein velmi překvapivé zjištění.

Potvrdoval to i objev sekvence bohaté na lysiny ($^{14}\text{KSKLKK}$ ¹⁹) podobné NLS, překrývající vazebné místo pro aktin na N-konci molekuly. Její nutnost k transportu potvrdili

proteolytickým štěpením, kdy do jádra vstupovala pouze N-koncová část s touto doménou. Dokázali též, že do jádra nemůže díky nedostupnosti této sekvence vstupovat komplex T β 4-aktin. (*Huff et al., 2004*)

4.4.4. Ku80 jako receptor pro thymosin- β 4

V roce 2007 Bednarek se svým týmem objevili vazbu T β 4 s Ku80 podjednotkou ATP dependentní helikasy II. Vzhledem k tomu, že se jedná o nový objev, kdy T β 4 nabývá nových schopností, není tento mechanizmus ještě prostudován do detailů.

Pro svou práci tentokrát použili konstrukt T β 4-GFP v lidských endoteliálních buňkách. Vazba GFP byla zvolena na C-konci, kde nebyly dosud zjištěny žádné stěžejní fyziologické funkce T β 4.

T β 4 byl přítomen v celém prostoru cytoplazmy s typickým tečkovaným rastrem v blízkosti mikrofilament. Toto kumulování bylo zesíleno především v místech kontaktu dvou buněk, kde byla i vyšší koncentrace filamentárních struktur.

Značení cytoplazmy bylo doprovázeno bodovým značením celého prostoru jádra, kromě těsné blízkosti a vnitřního prostoru jadérek. Bodové mutace v NLS sekvenci způsobily rapidní pokles koncentrace T β 4 v jaderném prostoru, což vedlo ke zvýšení exprese proteinu PAI-1 (plasminogen activator inhibitor).

Při hledání příčiny zvýšené exprese našli v jaderném extraktu vazebného partnera T β 4, protein o velikosti 80 kDa. Jedná se o Ku80 podjednotku ATP-dependentní DNA-helikasy II, která je motorovým proteinem rozmotávajícím DNA.

Pomocí mutageneze zjistili kontakt T β 4 s C-koncovou doménou této podjednotky. Přítomnost komplexu T β 4-Ku80 vede ke snížení exprese proteinu PAI-1, či jejímu udržení na standardní hladině. Samotná podjednotka Ku80 zvýší jeho expresi. Toto dohromady vedlo k závěru, že komplex T β 4-Ku80 má represorovou funkci exprese proteinu PAI-1.

5. Závěr

Lokalizace aktinu v jádře je dodnes velmi diskutabilním tématem. Nové objevy ovšem stále více jeho jadernou lokalizaci dokazují spolu s jeho potřebou v mnoha fyziologických procesech jako například transkripce, mRNA processing, transport molekul a účast na dosud neúplně prokázaném nukleoskeletu. Přítomnost aktinu v jádře směruje zájem studia i na jeho vazebné partnery, tzv. aktin-vazebné proteiny - speciální skupinou jsou sekvestrační proteiny profilin a β -thymosin. Cytoplazmatické funkce obou jsou docela detailně probádané a mají spojitost s regulací aktinové dynamiky. Právě proto se nynější výzkum soustředí na jadernou lokalizaci profilinu a β -thymosinu. Jak se ukazuje, nemají pouze schopnost ovlivňovat dynamiku mikrofilamentárního cytoskeletu. Jejich funkce je zároveň nenahraditelná co se celkového metabolismu a životaschopnosti buňky týče. Studování profilinu a β -thymosinu v jaderném prostoru vedlo k objevu nových proteinů, které mají zásadní vliv na transkripci, sestřih pre-mRNA, buněčný cyklus a proteinový transport mezi jádrem a cytoplazmou. Rovněž se ukázaly nové schopnosti známých typicky jaderných proteinů jako SMN či ATP-dependentní DNA-helikasa II. Lokalizace β -thymosinu a profilinu v jádře není náhodná, jak by se dalo u takto malých proteinů předpokládat. Je důsledkem dosud neznámých importních mechanizmů, které jsou buňkou striktně kontrolovány v odpovědi na podněty (např. změna koncentrace cytoplazmatických polyaminů či aktivace NMDA receptoru). Zatím nic nenaznačuje využití jejich cytoplazmatických funkcí v jádře. Čím detailnější poznatky o jaderných funkcích profilinu a β -thymosinu máme, tím zřejmější je, že neznáme všechny jejich funkce cytoplazmatické.

6. Perspektivy

Vzhledem k tomu, že přítomnost aktin sekvestračních proteinů v jádře je novou tématikou, jsou objevy v tomto ohledu velmi sporadické a spíše se jednalo o náhodně nalezenou funkci při studiu patologických změn organizmu, jako jsou geneticky přenosné nemoci či rakovina. Jasným úkolem je plošný průzkum aktinu a všech aktin-vazebných proteinů, a to především jejich jaderné lokalizace. Dosud se pro práci využívala světelná mikroskopie, která stačí, i přes užití konfokálních mikroskopů, pouze pro nástin jaderné lokalizace těchto proteinů. Nejvíce limitujícím faktorem celé práce jsou značící protilátky. Proto se při studiu užívá různých konstruktů, které ovšem kvůli své velikosti často značně ovlivňují jejich fyziologické funkce proteinů. Je proto důležité nejprve vyprodukovať specifické monoklonální protilátky, které budou pro tyto účely přijatelnější. Při jejich produkci mohou být nápomocny konstrukty. Vytváření specifických monoklonálních protilátek bohužel kolikrát vede k objevu nových izoforem hledaných proteinů, které již tak specificky značené nejsou. Je to ovšem jedna z dalších cest, jak proteiny zkoumat. Možností je také nahradit velké fluorescenční konstrukty nějakou menší značkou, která by neměla takový vliv na funkce malých proteinů. Po získání dostatečných informací o jaderné lokalizaci je možné jít se studiem více do detailu za použití elektronové mikroskopie, která je díky své rozlišovací schopnosti vhodnější pro získání přesných informací o kolokalizaci těchto proteinů se známými jadernými proteiny. Samozřejmě bude následovat vyhodnocení získaných dat pomocí statistických programů (např. Ellipse). Informace lze ověřit imunoprecipitací či další proteinovou metodou, jako například nadměrná exprese, či umlčení exprese pomocí siRNA. Jak se ale ukazuje, mají tyto zásahy právě u rodin profilinů a β -thymosinů často fatálními následky neslučitelné se životaschopností již na úrovni buňky. Ovšem i takto získané poznatky mají svou důležitost, protože stále více dokazují jejich absolutně nezastupitelnou funkci a někdy ukážou i na novou roli v buněčném životě. Přes všechny problémy čím dál tím rychleji přibývá nových zpráv o funkci a lokalizaci těchto dvou a mnoha dalších aktin-vazebných proteinů v buněčném jádře.

7. Seznam literatury

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002):** Molecular biology of the cell (4th edition). Garland Science
- Alberts AS (2002):** Diaphanous-related Formin homology proteins. *Cur Biol.* 12(23):R796
- Ackermann M, Matus A (2003):** Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci.* 6(11):1194-1200
- Aidoudi S, Guigon M, Lebeurier I, Caen JP, Han ZC (1996):** In vivo effect of platelet factor 4 (PF4) and tetrapeptide AcSDKP on haemopoiesis of mice treated with 5-fluorouracil. *Br J Haematol.* 94(3):443-448
- Arasada R, Gloss A, Tunggal B, Joseph JM, Rieger D, Mondal S, Faix J, Schleicher M, Noegel AA (2007):** Profilin isoforms in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta.* 1773(5):631-641
- Balasubramanian MK, Hirani BR, Burke JD, Gould KL (1994):** The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol.* 125(6):1289-1301
- Bao L, Loda M, Janmey PA, Stewart R, Anand-Apte B, Zetter BR (1996):** Thymosin- β 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 2(12):1322-1328
- Bednarek R, Boncela J, Smolarczyk K, Cierniewska-Cieslak A, Wyroba E, Cierniewski CS (2008):** Ku80 as a novel receptor for thymosin- β 4 that mediates its intracellular activity different from G-actin sequestering. *J Biol Chem.* 283(3):1534-1544
- Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC (2004):** Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(5):410-415
- Birbach A, Verkuyl JM, Matus A (2006):** Reversible, activity-dependent targeting of profilin to neuronal nuclei. *Exp Cell Res.* 312(12):2279-2287
- Björkegren C, Rozycki M, Schutt CE, Lindberg U, Karlsson R (1993):** Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS Lett.* 333(1-2):123-126
- Border BG, Lin SC, Griffin WS, Pardue S, Morrison-Bogorad M (1993):** Alterations in actin-binding β -thymosin expression accompany neuronal differentiation and migration in rat cerebellum. *Neurochem.* 61(6):2104-2114
- Bremer JW, Busch H, Yeoman LC (1981):** Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins. *Biochemistry.* 20(7):2013-2017
- Cao LG, Babcock GG, Rubenstein PA, Wang YL (1992):** Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J Cell Biol.* 117(5):1023-1029
- Carlier MF, Didry D, Erk I, Lepault J, Van Troys ML, Vandekerckhove J, Perelroizen I, Yin H, Doi Y, Pantaloni D (1996):** Thymosin- β 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration. *J Biol Chem.* 271(16):9231-9239
- Carlier MF, Jean C, Rieger KJ, Lenfant M, Pantaloni D (1993):** Modulation of the interaction between G-actin and thymosin- β 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(11):5034-5038
- Carlier MF, Pantaloni D (1994):** Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin- β 4 and profilin. *Semin Cell Biol.* 5:183-191
- Carlier MF, Pantaloni D (1997):** Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol.* 269(4):459-467
- Carlsson L, Nyström LE, Lindberg U, Kannan KK, Cid-Dresdner H, Lövgren S, Jornvall H (1976):** Crystallization of a non-muscle actin. *J Mol Biol.* 105(3):353-366

- Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U (1977):** Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 115(3):465–483
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO (2000):** Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 406(6795):532-535
- Clark TG and Merriam RW (1977):** Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell.* 12(4):883-891
- Cooley L, Verheyen E, Ayers K (1992):** Chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell.* 69(1):173-184
- Czisch M, Schleicher M, Hörger S, Voelter W, Holak TA (1993):** Conformation of thymosin- β 4 in water determined by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.* 218(2):335-344
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG (2003):** RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol.* 162(7):1267-1279
- Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W (2000):** Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci.* 113(Pt 21):3795-3803
- Dong J, Radau B, Otto A, Müller E, Lindschau C, Westermann P (2000):** Profilin I attached to the Golgi is required for the formation of constitutive transport vesicles at the *trans*-Golgi network. *Biochim Biophys Acta.* 1497(2):253-260
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999):** Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(23):13438-13443
- Eadie JS, Kim SW, Allen PG, Hutchinson LM, Kantor JD, Zetter BR (2000):** C-terminal variations in β -thymosin family members specify functional differences in actin-binding properties. *J Cell Biochem.* 77(2):277-287
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW (2002):** Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature.* 418(6899):790-793
- Fedorov AA, Magnus KA, Graupe MH, Lattman EE, Pollard TD, Almo SC (1994):** X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(18):8636-8640
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998):** Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20(5):847-854
- Gieselmann R, Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Witke W (1995):** Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur J Biochem.* 229(3):621-628
- Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H (1999):** A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem.* 274(53):37908-37914
- Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhörsten K, Rothkegel M, Schlüter K, Schrader N, Schindelin H, Mendel RR, Kirsch J, Jockusch BM (2003):** Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci.* 23(23):8330-8339
- Giuliano KA, Taylor DL (1994):** Fluorescent actin analogs with a high affinity for profilin *in vitro* exhibit an enhanced gradient of assembly in living cells. *J Cell Biol.* 124(6):971-983
- Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG, Pollard TD (1991):** Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science.* 251(4998):1231-1233

- Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD (1992):** The control of actin nucleotide exchange by thymosin- β 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell.* 3(9):1015-1024
- Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA, White A (1972):** Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69(7):1800-1803
- Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL, Kleinman HK (1995):** Matrigel induces thymosin- β 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci.* 108(Pt 12):3685-3694
- Grillon C, Rieger K, Bakala J, Schott D, Morgat JL, Hannappel E, Voelter W, Lenfant M (1990):** Involvement of thymosin- β 4 and endoproteinase Asp-N in the biosynthesis of the tetrapeptide AcSerAspLysPro a regulator of the hematopoietic system. *FEBS Lett.* 274(1-2):30-34
- Haarer BK, Lillie SH, Adams AE, Magdolen V, Bandlow W, Brown SS (1990):** Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol.* 110(1):105-114
- Haarer BK, Petzold AS, Brown SS (1993):** Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol.* 13(12):7864-7873
- Hall AK (1991):** Differential expression of thymosin genes in human tumors and in the developing human kidney. *Int J Cancer.* 48(5):672-677
- Hannappel E, Davoust S, Horecker BL (1982):** Isolation of peptides from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun.* 104(1):266-271
- Hannappel E, van Kampen M (1987):** Determination of thymosin- β 4 in human blood cells and serum. *J Chromatogr.* 397:279-285
- Hannappel E, Wartenberg F (1993):** Actin-sequestering ability of thymosin- β 4, thymosin- β 4 fragments, and thymosin- β 4-like peptides as assessed by the DNase I inhibition assay. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 374(2):117-122
- Heintz D, Reichert A, Mihelic M, Voelter W, Faulstich H (1993):** Use of bimanyl actin derivative (TMB-actin) for studying complexation of β -thymosins. Inhibition of actin polymerization by thymosin- β 9. *FEBS Lett.* 329(1-2):9-12
- Heintz D, Reichert A, Mihelic-Rapp M, Stoeva S, Voelter W, Faulstich H (1994):** The sulfoxide of thymosin- β 4 almost lacks the polymerization-inhibiting capacity for actin. *Eur J Biochem.* 223(2):345-350
- Holt MR, Koffer A (2001):** Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol.* 11(1):38-46
- Honoré B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H (1993):** Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett.* 330(2):151-155
- Huff T, Zerzawy D, Hannappel E (1995):** Interactions of β -thymosins, thymosin- β 4-sulfoxide, and N-terminally truncated thymosin- β 4 with actin studied by equilibrium centrifugation, chemical cross-linking and viscometry. *Eur J Biochem.* 230(2):650-657
- Huff T, Müller CS, Hannappel E (1997):** C-terminal truncation of thymosin- β 10 by an intracellular protease and its influence on the interaction with G-actin studied by ultrafiltration. *FEBS Lett.* 414(1):39-44
- Huff T, Ballweber E, Humeny A, Bonk T, Becker C, Müller CS, Mannherz HG, Hannappel E (1999):** Thymosin- β 4 serves as a glutaminyl substrate of transglutaminase. Labeling with fluorescent dansylcadaverine does not abolish interaction with G-actin. *FEBS Lett.* 464(1-2):14-20

- Huff T, Rosorius O, Otto AM, Müller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG (2004):** Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin- β 4. *J Cell Sci.* 117(Pt 22): 5333-5341
- Cha HJ, Jeong MJ, Kleinman HK (2003):** Role of thymosin- β 4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 95(22): 1674-1680
- Chakravatri A, Zehr EM, Zietman AL, Shipley WU, Goggins WB, Finkelstein DM, Young RH, Chang EL, Wu CL (2000):** Thymosin- β 15 predicts for distant failure in patients with clinically localized prostate cancer-results from a pilot study. *Urology.* 55(5): 635-638
- Chaudhary A, Chen J, Gu QM, Witke W, Kwiatkowski DJ, Prestwich GD (1998):** Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem Biol.* 5(5): 273-281
- Jean C, Rieger K, Blanchoin L, Carlier MF, Lefebvre M, Pantaloni D (1994):** Interaction of G-actin with thymosin- β 4 and its variants thymosin- β 9 and thymosin- β 9met. *J Muscle Res Cell Motil.* 15(3): 278-286
- Kneussel M, Betz H (2000):** Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci.* 23(9): 429-435
- Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003):** Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19: 541-564
- Lambrechts A, van Damme J, Goethals M, Vandekerckhove J, Ampe C (1995):** Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding. *Eur J Biochem.* 230(1): 281-286
- Lambrechts A, Verschelde JL, Jockheere V, Goethals M, Vandekerckhove J, Ampe C (1997):** The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *EMBO J.* 16(3): 484-494
- Lambrechts A, Braun A, Jockheere V, Aszodi A, Lanier LM, Robbens J, Van Colen I, Vandekerckhove J, Fässler R, Ampe C (2000):** Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol.* 20(21): 8203-8219
- Lassing I, Lindberg U (1985):** Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.* 314(6010): 472-474
- Lederer M, Jockusch BM, Rothkegel M (2005):** Profilin regulates the activity of p42POP, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci.* 118(Pt 2): 331-341
- Lenfant M, Wdzieczak-Bakala J, Guittet E, Prome JC, Soty D, Frindel E (1989):** Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(3): 776-782
- Li F, Higgs HN (2003):** The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol.* 13(15): 1335-1340
- Low TL, Hu SK, Goldstein AL (1981):** Complete amino acid sequence of bovine thymosin- β 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(2): 1162-1166
- Low TL, Goldstein AL (1982):** Chemical characterization of thymosin- β 4. *J Biol Chem.* 257(2): 1000-1006
- Lu J, Pollard TD (2001):** Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell.* 12(4): 1161-1175
- Magdolen V, Drubin DG, Mages G, Bandlow W (1993):** High levels of profilin suppress the lethality caused by overproduction of actin in yeast cells. *FEBS Lett.* 316(1): 41-47
- Mahoney NM, Janmey PA, Almo SC (1997):** Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol.* 4(11): 953-960

- Mahoney NM, Rozwarski DA, Fedorov E, Fedorov AA, Almo SC (1999):** Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat Struct Biol.* 6(7):666-671
- Machesky LM, Goldesmidt-Clemont PJ, Pollard TD (1990):** The affinities of human platelet and Acanthamoeba profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul.* 1(12):937-950
- Machesky LM, Cole NB, Moss B and Pollard TD (1994):** Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry.* 33(35):10815-10824
- Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK (1997):** Thymosin- β 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 11(6):474-481
- Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y (1998):** Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(1):86-89
- McCormack SA, Ray RM, Blanner PM, Johnson LR (1999):** Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin- β 4 in migrating IEC-6 cells. *Am J Physiol.* 276(2 Pt 1):C459-468
- Meagher RB (1991):** Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int Rev Cytol.* 125:139-163
- Metzler WJ, Constantine KL, Friedrichs MS, Bell AJ, Ernst EG, Lavoie TB, Mueller L (1993):** Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: 1H, 13C, and 15N NMR assignments and global folding pattern. *Biochemistry.* 32(50):13818-13829
- Metzler WJ, Bell AJ, Ernst E, Lavoie TB, Mueller L (1994):** Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J Biol Chem.* 269(6):4620-4625
- Mockrin SC, Korn ED (1980):** Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry.* 19(23):5359-5362
- Nachmias VT (1993):** Small actin-binding proteins: the β -thymosin family. *Curr Opin Cell Biol.* 5(1):56-62
- Nachmias VT, Cassimeris L, Golla R, Safer D (1993):** Thymosin- β 4 (T β -4) in activated platelets. *Eur J Cell Biol.* 61(2):314-320
- Nakayasu H, Ueda K (1983):** Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. *Exp Cell Res.* 143(1):55-62
- Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt CE (1999):** X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol.* 294(5):1271-1285
- Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR (2002):** Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem.* 71:755-781
- Osborn M, Weber K (1980):** Dimethylsulfoxide and the ionophore A23187 affect the arrangement of actin and induce nuclear actin paracrystals in PtK2 cells. *Exp Cell Res.* 129(1):103-114
- Pantalone D, Carlier M-F (1993):** How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin- β 4. *Cell.* 75(5):1007-1014
- Pearson AM, Baksa K, Rämet M, Protas M, McKee M, Brown D, Ezekowitz RA (2003):** Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* 5(10):815-824
- Pederson T, Aebi U (2002):** Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol.* 140(1 - 3):3-9

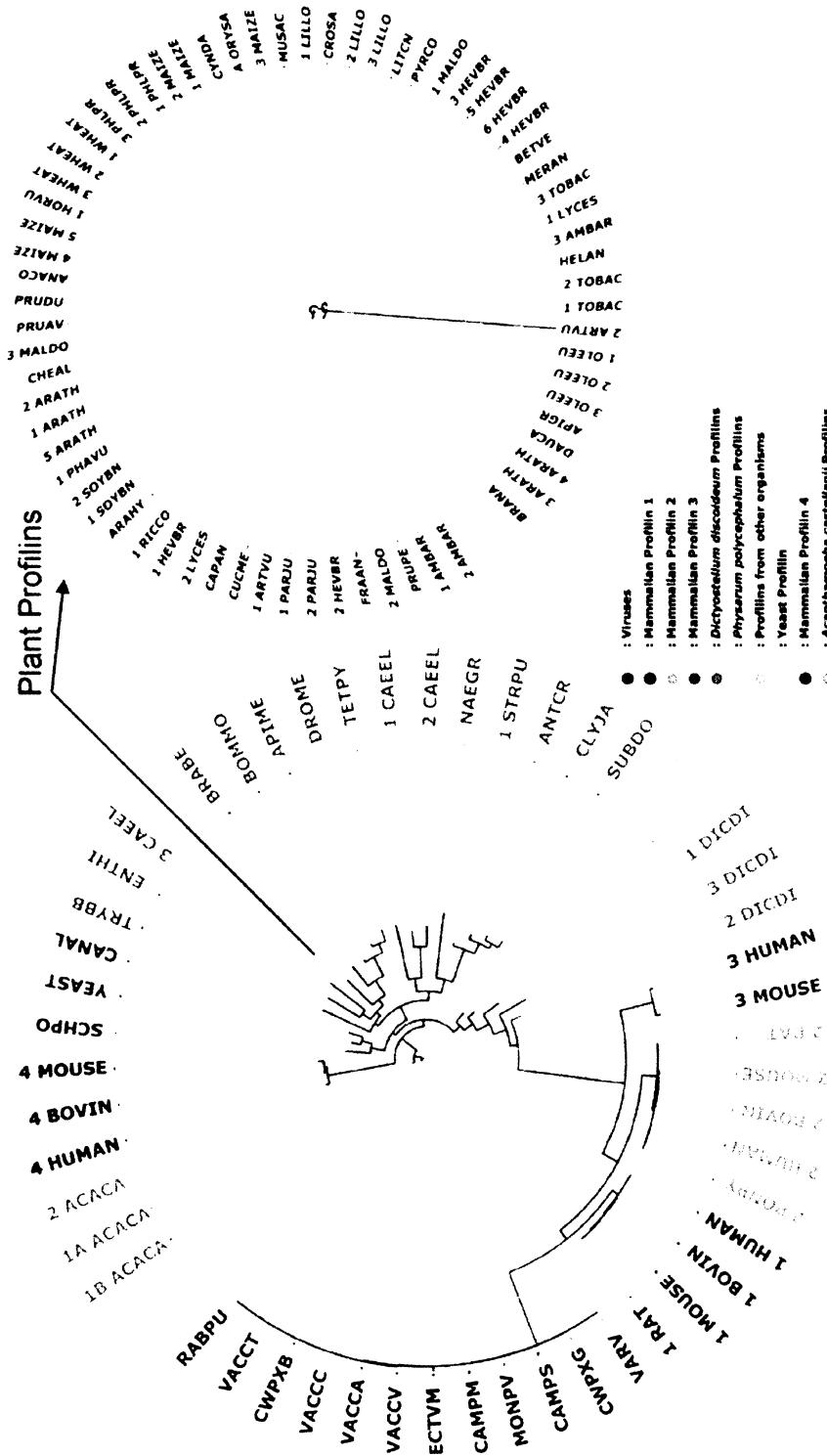
- Perelroizen I, Didry D, Christensen H, Chua NH, Carlier MF (1996):** Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. *J Biol Chem.* 271(21):12302-12309
- Peters KE, Okada TA, Comings DE (1982):** Chinese hamster nuclear proteins. An electrophoretic analysis of interphase, metaphase and nuclear matrix preparations. *Eur J Biochem.* 129(1):221-232
- Pring M, Weber A, Bubb MR (1992):** Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry.* 31(6):1827-1836
- Rebar RW, Miyake A, Low TL, Goldstein AL (1981):** Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science.* 214(4521):669-671
- Reichstein E, Korn ED (1979):** *Acanthamoeba* profilin. A protein of low molecular weight from *Acanthamoeba castellanii* that inhibits actin nucleation. *J Biol Chem.* 254(13):6174-6179
- Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U (1995):** The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14(8):1583-1589
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D (1993):** Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* 259(5098):1157-1161
- Rothkegel M, Mayboroda O, Rhode M, Wucherpfennig C, Valenta R, Jokusch BM (1996):** Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci.* 109(Pt 1):83-90
- Rozycki MD, Myslik JC, Shutt CE, Lindberg U (1994):** Structural aspects of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 6(1):87-95
- Ruggieri S, Erickson-Viitanen S, Horecker BL (1983):** Thymosin- β 10arg, a major variant of thymosin- β 10 in rabbit tissues. *Arch Biochem Biophys.* 226(1):388-392
- Safer D, Golla R, Nachmias VT (1990):** Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(7):2536-2540
- Safer D, Elzinga M, Nachmias VT (1991):** Thymosin- β 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem.* 266(7):4029-4032
- Safer D, Nachmias VT (1994):** B-thymosins as actin binding peptides. *Bioessays.* 16(7):473-479
- Sanger JW, Sanger JM, Kreis TE, Jockusch BM (1980):** Reversible translocation of cytoplasmic actin into the nucleus caused by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77(9):5268-5272
- Santelli G, Califano D, Chiappetta G, Vento MT, Bartoli PC, Zullo F, Trapasso F, Viglietto G, Fusco A (1999):** Thymosin- β 10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J Pathol.* 155(3):799-804
- Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD (1975):** The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry.* 14(10):2214-2218
- Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NCW, Lindberg U (1993):** The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature.* 365(6449):810-816
- Simenel C, Van Troys M, Vandekerckhove J, Ampe C, Delepierre M (2000):** Structural requirements for thymosin- β 4 in its contact with actin. An NMR-analysis of thymosin- β 4 mutants in solution and correlation with their biological activity. *Eur J Biochem.* 267(12):3530-3538
- Skare P, Kreivi JP, Bergström A, Karlsson R (2003):** Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res.* 286(1):12-21
- Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994):** Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays.* 16(7):465-472

- Southwick FS, Young CL (1990):** The actin released from profilin-actin complex is insufficient to account for the increase in F-actin in chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 110(6):1965-1973
- Staiger CJ, Gibbon BC, Kovar DR and Zonia LE (1997):** Profilin and actin depolymerizing factor: Modulators of actin organization in plants. *Trends Plant Sci.* 2:275-281
- Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW (1994):** Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr Biol.* 4(3):215-219
- Stüven T, Hartmann E, Görlich D (2003):** Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* 22(21):5928-5940
- Sun HQ, Kwiatkowska K, Yin HL (1995):** Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 7(1):102-110
- Sun HQ, Kwiatkowska K, Yin HL (1996):** B-thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. Insights from overexpression studies. *J Biol Chem.* 271(16):9223-9230
- Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O (1991):** Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science.* 253(5019):557-560
- Valster AH, Pierson ES, Valenta R, Hepler PK, Emons A (1997):** Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection. *Plant Cell.* 9(10):1815-1824
- Valster AH, Vidali L, Hepler PK (2003):** Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. *Protoplasma.* 222(1-2):85-95
- van Groningen JJ, Cornelissen IM, van Muijen GN, Bloemers HP, Swart GW (1996):** Simultaneous suppression of progression marker genes in the highly malignant human melanoma cell line BLM after transfection with the adenovirus-5 E1A gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(3):808-816
- Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C (1996):** The actin binding site of thymosin- β 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* 15(2):201-210
- Vancompernolle K, Goethals M, Huet C, Louvard D, Vandekerckhove J (1992):** G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin- β 4. *EMBO J.* 11(13):4739-4746
- Verghese-Nikolakaki S, Apostolikas N, Livaniou E, Ithakissios DS, Evangelatos GP (1996):** Preliminary findings on the expression of thymosin- β 10 in human breast cancer. *Br J Cancer.* 74(9):1441-1444
- Verheyen EM, Cooley L (1994):** Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development.* 120(4):717-728
- Vinson VK, Archer SJ, Lattman EE, Pollard TD, Torchia DA (1993):** Three-dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin-I. *J Cell Biol.* 122(6):1277-1283
- Vojtek A, Haarer B, Field J, Gerst J, Pollard TD, Brown S, Wigler M (1991):** Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell.* 66(3):497-505
- Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E (1998):** Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* 17(6):1635-1641
- Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, Illenberger S (2002):** The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* 529(2-3):275-280
- Wallard BJ, Alberts AS (2003):** The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13(8):435-446

- Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S (1997):** p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16(11):3044-3056
- Watts JD, Cary PD, Sautiere P, Crane-Robinson C (1990):** Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins. *Eur J Biochem.* 192(3):643-351
- Weber A, Nachmias VT, Pennise CR, Pring M, Safer D (1992):** Interaction of thymosin- β 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry.* 31(27):6179-6185
- Weller FE, Mutchnick MG, Goldstein AL, Naylor PH (1988):** Enzyme immunoassay measurement of thymosin- β 4 in human serum. *J Biol Response Mod.* 7(1):91-96
- Weterman MA, van Muijen GN, Ruiter DJ, Bloemers HP (1993):** Thymosin- β 10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions: a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 53(2):278-284
- Will CL, Lührmann R (2001):** Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 13(3):290-301
- Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M (1998):** In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.* 17(4):967-976
- Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ (2001):** Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(7):3832-3836
- Witke W (2004):** The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14(8):461-469
- Wolven AK, Belmont LD, Mahoney NM, Almo SC, Drubin DG (2000):** *In vivo* importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J Cell Biol.* 150(4):895-904
- Yamamoto M, Shoda A, Minamino N, Matsuo H, Nishimatsu S, Ueno N, Murakami K (1992):** Expression of thymosin- β 4 gene during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 184(1):93-99
- Yamamoto T, Gotoh M, Kitajima M, Hirohashi S (1993):** Thymosin- β 4 expression is correlated with metastatic capacity of colorectal carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 193(2):706-710
- Young JD, Lawrence AJ, MacLean AG, Leung BP, McInnes IB, Canas B, Pappin DJ, Stevenson RD (1999):** Thymosin- β 4-sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med.* 5(12):1424-1427
- Yu FX, Lin SC, Morrison-Bogorad M, Atkinson MA, Yin HL (1993):** Thymosin- β 10 and thymosin- β 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J Biol Chem.* 268(1):502-509
- Yu FX, Lin SC, Morrison-Bogorad M, Yin HL (1994):** Effects of thymosin- β 4 and thymosin- β 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 27(1):13-25

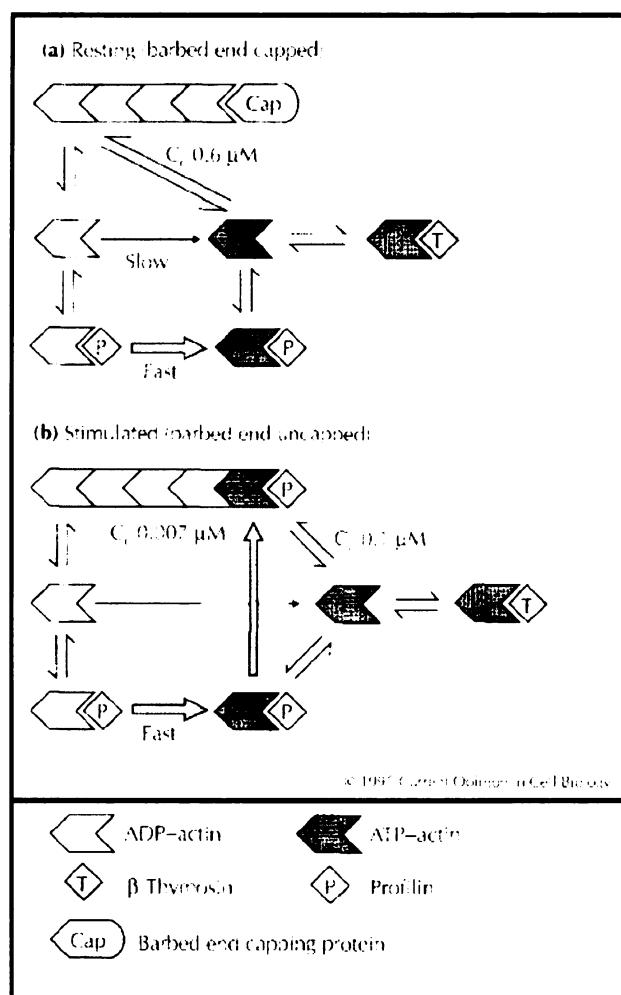
8. Obrazové přílohy

Obrázek 1



Evoluční vztah profilinů: Dvě sady dat 52 nerostlinných (vlevo) a 69 rostlinných profilinů (vpravo) byly analyzovány a zobrazeny jako dvě nezávislé a separované vývojové větve. Rodina rostlinných profilinů tvoří jasně separovanou a těsněji uzavřenou skupinu. Skupina virových profilinů spolu se savčími dohromady tvoří evolučně separovanou větev, stejně jako ostatní „nesavčí“ rodina profilinů. Savčí profiliň IV zřetelně tvoří další společnou větev. Oproti tomu jsou 3 izoformy profilinu z *Dicytostelium discoideum* a dvě izoformy z *Physarum polycephalum* evolučně blíže savčím a virovým izoformám, nežli k menšině izoformám, které jsou v rámci profilinů výjimkou.

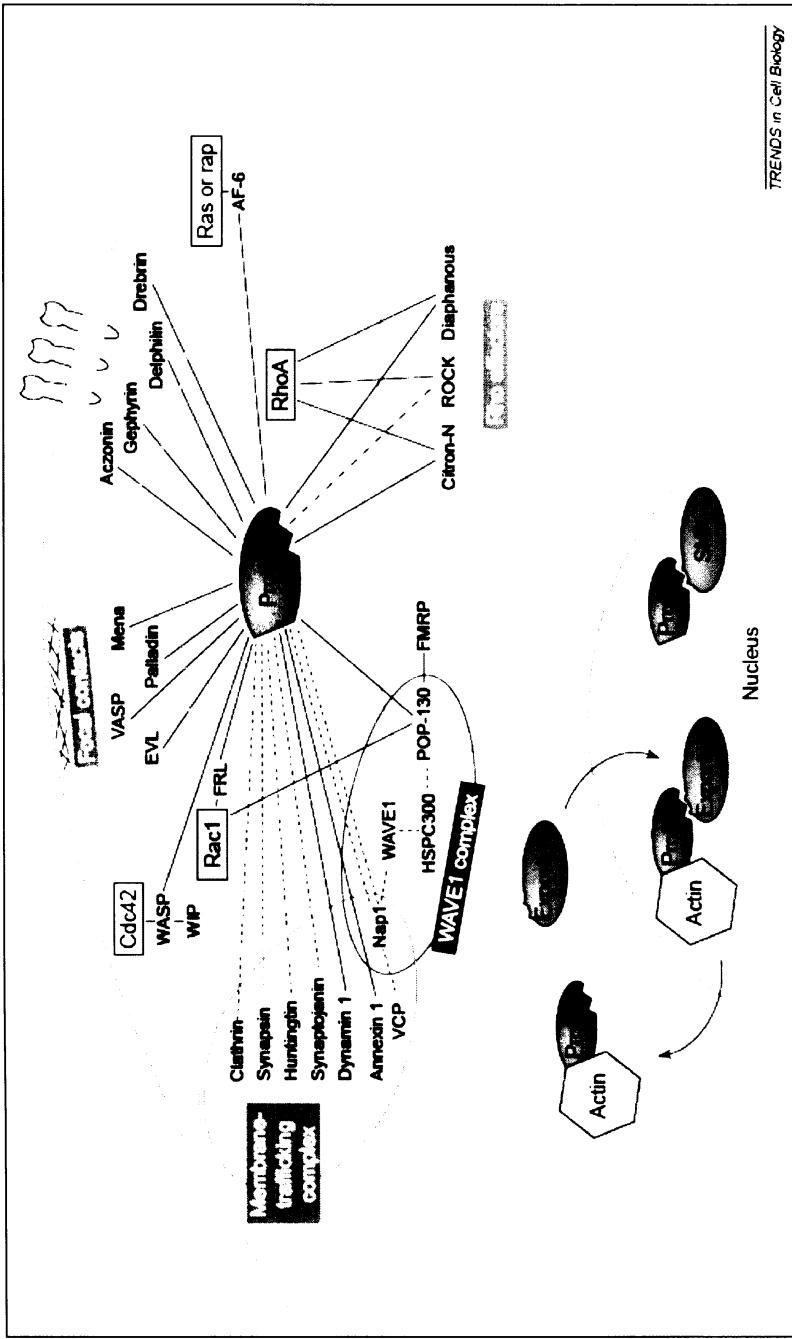
Obrázek 2



Vliv profilinu a β -thymosinu na polymeraci aktinového vlákna. (a) klidový stav se zakrytým vláknem na rostoucím (+) konci vlákna. Profilin a β -thymosin vážící aktinové monomery. Profilin pomáhá při změně ADP-aktin na ATP-aktin, který je β -thymosinem vázán s větší afinitou. Za ustáleného stavu se díky tomu většina monomerního aktinu vyskytuje v ATP-vážící formě. Monomer se tak může přikládat na ubývajícím konci (pointed end; - konec) při dosažení kritické koncentrace 0,6 μM (pro ATP-aktin). Většina aktinových jednotek ve vláknu se vyskytuje v ADP-stavu. (b) stimulovaný stav, kdy je + konec nezakrytý. Komplex PFN-ATP-aktin je směrován přímo na + konec vlákna i za nízké koncentrace 0,007 μM . Připojování samotných monomerů je minoritní, protože jejich nutná koncentrace na + konci vlákna je 0,1 μM .

(Prevzato ze Sun et al., 1995)

Obrázek 3



Síť molekulových interakcí PFN. Proteiny, které jsou dosud známé díky interakci s PFN jsou sloučeny do skupin odpovídajících jejich buněčné lokalizaci, či komplexům, které tvoří. Některé ligandy PFN jsou spoletné několika různým komplexům (znázorněné propojenými poli), které odpovídají propojení skrz několik signálních dráh, ve kterých se PFN vyskytuje jako spojovací článek. Některá spojení existují i s malými GTPasami, jako jsou Rac1, RhoA, cdc42, Ras a Rsp, které jsou součástí drah ovlivňující cytoskelet. Pro jednoduchost pojmenování profilin odpovídá PFN I i II. Průměrná spojení mezi PFN a ligandem jsou znázorněna phou čarou, potenciální přímé vazby jsou znázorněny píerušovanými čarami. Vysvětlivky k jednotlivým proteinům v originále: **EVL**, Ena VASP like; **FMRP**, fragile X mental retardation protein; **FRL**, formin-related gene in leukocytes; **HSP**, heat-shock protein; **Mena**, mouse homolog of *Drosophila enabled*; **POP**, partner of profilin; **SMN**, survival of motor neuron; **VASP**, vasodilator-stimulated protein; **VCP**, valosine-containing protein; **WASP**, Wiskott-Aldrich syndrome protein; **WIP**, WASP family verprolin-homologous protein; **WAVE**, WASP family interacting protein (Prevzato z Witke W., 2004)

Tabulka 1

Profilin ligand	Specificity ^b	Cellular pathway
Focal contacts		
VASP	Pro ^f 1<pro ^f 2	Platelet activation
Mena	Pro ^f 1<pro ^f 2	Axon pathfinding
EVL	Pro ^f 1, pro ^f 2	Focal contacts
Palladin	(Pro ^f 1, pro ^f 2)	Focal contacts
Synaptic scaffold		
Gephyrin	(Pro ^f 1, pro ^f 2)	Receptor clustering
Drebrin	(Pro ^f 1, pro ^f 2)	Dendritic spines
Aczonin	Pro ^f 1<pro ^f 2	Vesicle trafficking
Delphinin	Pro ^f 1, pro ^f 2	Glutamate receptor
Membrane trafficking		
Dynamin 1	Pro ^f 2	Endocytosis
VCP	Pro ^f 1	Endocytosis
Clathrin	Pro ^f 1	Endocytosis
Synapsin	Pro ^f 2	Vesicle trafficking
Huntingtin	Pro ^f 2	Vesicle trafficking
Synaptotagmin	Pro ^f 2	Endocytosis
Annexin 1	(Pro ^f 1, pro ^f 2)	Membrane trafficking
Rac/rho or cdc42 signaling		
POP 130 or CYFIP	Pro ^f 2	Rac1, fragile X syndrome
ROCK	Pro ^f 2	RhoA, neurite outgrowth
mDiaphanous	Pro ^f 1, pro ^f 2	RhoA, neurite outgrowth
FRL	Pro ^f 1>pro ^f 2	Rac1, lymphocyte function
WASP	Pro ^f 1>pro ^f 2	Cdc42, platelet activation
WIP	Pro ^f 1	WASP ligand
WAVE	Pro ^f 1>pro ^f 2	Rac1, actin organization
Citron N	Pro ^f 2	RhoA, Golgi organization
AF 6	Pro ^f 1>pro ^f 2	Ras and Rap1A, membrane
Hem2 or Nap1	Pro ^f 2	Membrane trafficking
Nuclear		
Exportin 6	Pro ^f 1, pro ^f 2	Nuclear export
SMN	Pro ^f 1<pro ^f 2	Splicing, muscular atrophy

Přehled několika vazebných partnerů v savčích buňkách.

^a Vysvětlivky vzhledem k možným matoucím překladům udávám v originále: **CYFIP**, cytoplasmic FMRP-interacting protein; **EVL**, Ena VASP like; **FMRP**, fragile X mental retardation protein; **FRL**, formin-related gene in leukocytes; **Mena**, mouse homolog of *Drosophila enabled*; **Nap**, nck-associated protein; **POP**, partner of profilin; **prof**, profilin; **ROCK**, rho-dependent coiled-coil kinase; **SMN**, survival of motor neuron; **VASP**, vasodilator-stimulated phosphoprotein; **WASP**, Wiskott-Aldrich syndrome protein; **WAVE**, WASP family verprolin-homologous protein; **WIP**, WASP-interacting protein; **VCP**, valosine-containing protein

^b Preference pro vazbu PFN I nebo PFN II. Závorky jsou na místech, kde specificita pro PFN I a/nebo PFN II do doby vydání nebyla testována.

(Převzato z Witke W., 2004)