

## 사람에 존재하는 phosphatase인 chronophin의 환원된 상태에서의 구조

조효제 · 강범식\*

경북대학교 자연과학대학 생명공학부

Received March 31, 2008 / Accepted April 24, 2008

**Closed Conformation of a Human Phosphatase, Chronophin under the Reduced Condition.** Hyo Je Cho and Beom Sik Kang\*. *School of Life Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* - Chronophin is a phosphatase responsible for the dephosphorylation of cofilin, which regulates the rearrangement of actin cytoskeleton. It is also known as a phosphatase for pyridoxal 5'-phosphate (PLP), an active form of vitamin B<sub>6</sub>, and maintains the level of PLP in the cytoplasm. Since this phosphatase belongs to a HAD subfamily containing a cap domain, it is expected to undergo a conformational change for the binding of a substrate. However, the crystal structure of chronophin has a disulfide bridge between the cap and core domains preventing a movement of the cap domain against the core domain. It is possible that the disulfide bond between C91 and C221 was formed by an oxidation during the crystallization. Here, we obtained chronophin crystals under a reduced condition and determined the crystal structure. This reduced chronophin does not contain a disulfide bridge and shows a closed conformation like the oxidized form. It implies that an active chronophin binds its substrate under the closed conformation without the disulfide bond and shows a high substrate specificity in the cell.

**Key words :** Chronophin, phosphatase, disulfide bond, crystal structure

### 서 론

진핵세포의 움직임과 형태전환은 많은 양의 세포골격단백질인 actin의 운동성에 의한다. Actin은 구형의 단량체 형태와 중합체인 filament 형태로 세포 내에 존재하는데 원형질막에서 actin 단량체가 filament로 중합되는 과정이 세포가 움직이는 기본적인 힘이 된다[2,16]. F-actin cytoskeleton의 절단과 단위체화는 세포 내에서 높은 actin-filament의 재편성 속도를 나타내게 만드는데 이런 활성은 actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin에 의해 조절된다[4,10]. ADF/cofilin은 F-actin에 결합함으로써 actin filament의 꼬인 형태를 유지시키며 조각나는 것을 유도하고 말단에서 소단위체가 떨어져 나가는 것을 촉진시킨다[4,6,12]. ADP-actin monomer에 결합하여 ATP로 치환되는 것을 막는 cofilin은 두 가지의 인산화효소, LIM-kinase와 testis-specific protein kinases (TESKS)의 해서 N-말단의 3번째 serine 잔기가 인산화됨으로서 그 활성을 억제받는다[20,22]. 이 인산화된 부분이 제거되면서 cofilin은 활성을 나타내는데 2005년 Gohla 등은 세포주기 동안 cofilin의 활성을 조절하는 chronophin이라 명명한 독특한 cofilin phosphatase를 보고하였다[7]. Cofilin의 활성화를 통해 actin cytoskeleton dynamic을 조절하는 cofilin phosphatase 작용기작은 세포의 분열과 이동능

력 등 세포 내의 절대적인 과정이며 손상된 chronophin을 갖는 세포의 경우 cytokinesis에 결함이 생기고 세포의 생존능력도 손상된다[21]. Chronophin은 아미노산 서열분석을 통해 pyridoxal phosphatase (PLPP)로 알려진 단백질과 동일함이 밝혀졌다[7]. PLPP는 vitamin B<sub>6</sub>의 한 형태로 다양한 세포 내 대사과정에서 여러 가지 효소의 활성에 필수적인 pyridoxal 5'-phosphate (PLP)의 농도를 조절하는 기능을 담당한다[5,19].

Chronophin은 32 kDa 크기의 단백질로 Mg 이온을 co-factor로 필요하는 haloacid dehalogenase (HAD) superfamily에 속하는 것으로 알려져 있는데 HAD family phosphatase는 세균에서부터 사람에 이르기까지 광범위하게 발견되며 다른 종류의 phosphatase와는 다르게 효소의 aspartate와 함께 anhydride를 갖는 중간체를 형성하면서 phosphoryl-group을 전달하는 메카니즘을 가지고 있다[1]. HAD superfamily는 잘 보존된 aspartate를 갖는 활성부위를 포함하는 core 도메인과 기질결합에 관여하는 cap 도메인을 가지고 있다[9]. HAD 그룹에 속하는 phosphatase는 cap 도메인의 형태에 따라 세 종류로 나누어지는데 cap 도메인이  $\alpha$ -helices로 구성된 subclass I과  $\alpha/\beta$  구조인 subclass II 그리고 cap 도메인이 없이 긴 loop로 대체된 subclass III이 있다(Fig. 1). HAD family phosphatase는 활성부위가 cap 도메인과 core 도메인 사이에 있으며 cap 도메인이 기질특이성을 부여해주는 것으로 알려져 있다. 따라서 subclass III의 phosphatase는 넓은 범위의 기질을 이용하는 반면, subclass I과 II의 경우는 기질특이성이 비교적 높다[17]. 또한 subclass I과 II

\*Corresponding author

Tel : +82-53-950-6357, Fax : +82-53-943-2762

E-mail : bskang2@knu.ac.kr

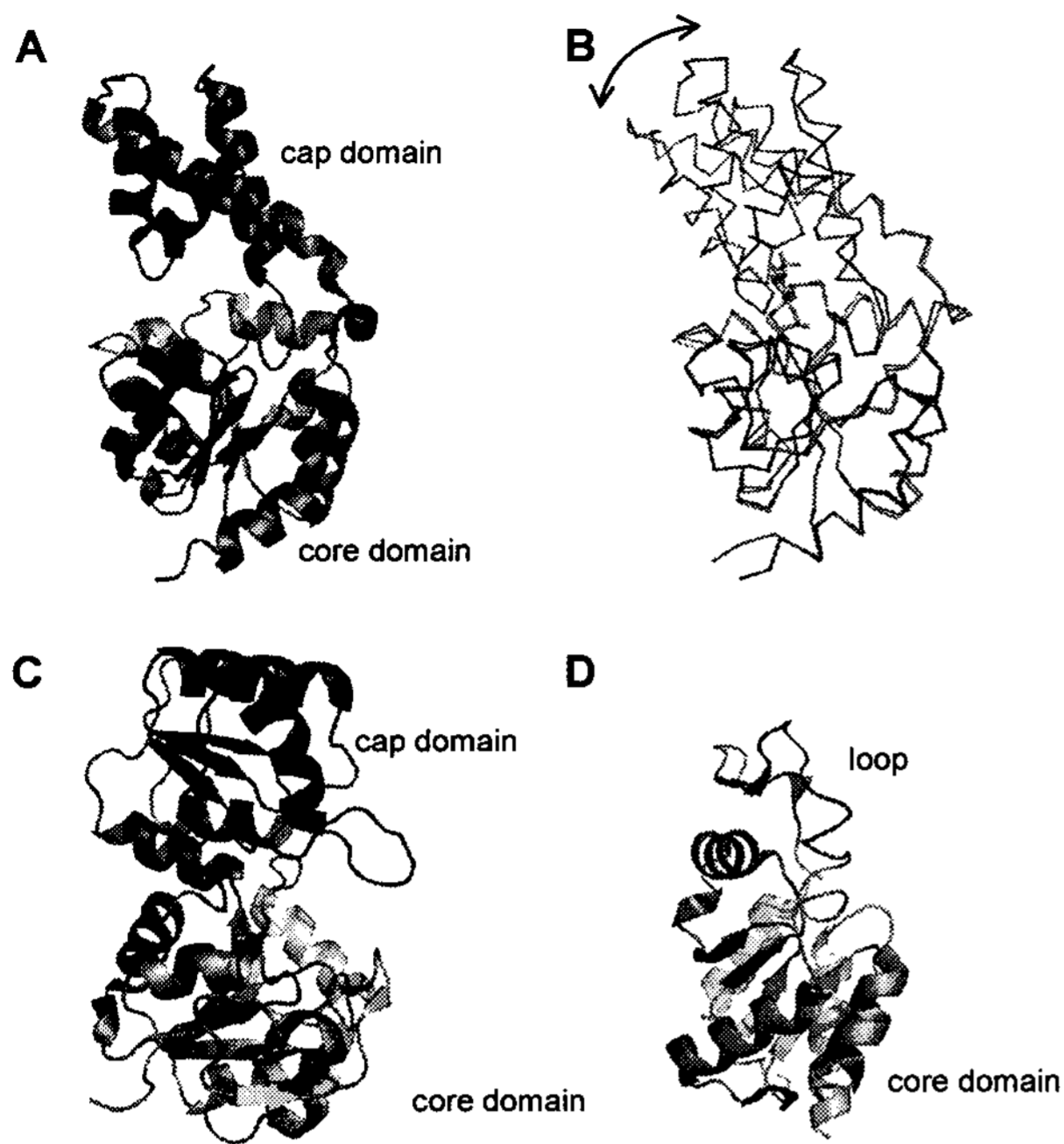


Fig. 1. Representative structures of three subfamilies in HAD family phosphatase. (A) subclass I;  $\beta$ -phosphoglucomutase (PBD entry 1LVH) of *Lactococcus lactis*. (B) superimposition of the substrate-bound closed conformation (PDB entry 1O03) of  $\beta$ -phosphoglucomutase on the open conformation (PBD entry 1LVH). A movement of the cap domain indicates by an arrow. (C) subclass II; *Escherichia coli* protein NagD (PDB entry 2C4N). (D) subclass III; mouse magnesium-dependent phosphatase-1 (PDB entry 1U7O).

에 속하는 phosphatase는 기질의 결합이 cap 도메인에 의해 조절이 되는데 core 도메인의 활성부위를 덮고 있던 cap 도메인이 기질과의 결합을 위해 젖혀져 열리는 형태의 전환이 일어난다[9,11](Fig. 1B). 즉, core 도메인과 cap 도메인을 연결하는 hinge 부분의 움직임에 의해 기질이 없을 때의 열린 상태에서 기질이 결합된 닫힌 형태로의 전환이 일어난다. 따라서  $\alpha/\beta$  구조의 cap 도메인을 가지고 있어 subclass II에 속하는 chronophin도 cap 도메인이 열리는 형태의 전환이 수반될 것으로 기대되었다. 그러나 알려진 chronophin/PLPP의 구조를 보면 기질인 PLP가 결합된 구조(PDB [3] ID 2CFT)가 닫힌 형태일 뿐만 아니라 기질이 없는 구조(PDB ID 2CFS)도 닫힌 형태이다. 이들의 결정구조에는 cap 도메인의  $\alpha 4$  helix에 위치한 C91과 core 도메인의  $\alpha 8$  helix에 있는 C221 사이에 disulfide bridge가 있다. 이 disulfide bridge는 core 도메인과 cap 도메인을 연결하는 hinge의 바깥쪽 부위에 위치하여 두 도메인간의 움직임을 막는 지지대의 역할을 하고 있다. 따라서 chronophin의 경우는 cap 도메인의 움직임이 억제되었기에 열린 형태로의 전환이 없이 효소활성을 가질 것으로 생각된다. 그러나 이 disulfide bridge는 단백질

이 산화된 조건에서 형성되는 것으로 효소를 정제하고 결정화하는 과정에서 만들어진 것일 수 있으며 이로 인해 기질이 결합되지 않은 chronophin의 구조가 왜곡되었을 가능성을 배제할 수 없다. 즉, chronophin이 세포 내에서 환원된 환경에 있을 경우 C91과 C221 사이의 disulfide bond가 없으며 cap 도메인과 core 도메인 사이의 움직임이 억제되지 않아 열린 구조로의 전환이 가능할 수도 있다. 이에 본 연구에서는 환원된 상태에서의 chronophin의 결정구조를 밝히고 두 cysteine간에 결합이 없는 상태에서의 chronophin의 구조를 산화된 상태의 구조와 비교하여 열린 형태로의 전환이 가능한지 알아 보았다.

### 재료 및 방법

#### Chronophin의 정제 및 결정화

단백질분해효소, TEV의 인식부위를 포함한 hexa-His를 갖는 pHis parallel 벡터[18]에 사람의 chronophin/PLPP 유전자가 클로닝된 pHis-hPLPP 플라스미드를 대장균 B834 strain에 도입하여 재조합 chronophin을 과발현시켰다. pHis-hPLPP를 갖는 대장균을 M9 배지에서 3시간 진탕배양한 후 재조합단백질의 발현을 유도하기 위해 1 mM IPTG를 첨가하고 단백질이 수용성인 형태로 발현되도록 배양온도를 25°C로 낮춘 다음 24시간 더 배양하였다. 배양액을 7,000 $\times$  g에서 20분간 원심분리하여 균체를 얻은 후 150 mM NaCl과 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함한 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (buffer A)에 재현탁하고 초음파를 이용하여 파쇄한 다음, 26,000 $\times$  g에서 45분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. 이를 buffer A로 평형화시킨 Ni-NTA (Qiagen) 컬럼을 통과시키고 300 mM NaCl과 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 mM의 imidazole을 함유한 50 mM Tris-HCl, pH 8.5로 컬럼을 씻은 다음, hexa-his tag를 갖는 재조합 chronophin을 250 mM의 imidazole이 함유된 완충용액으로 용출시켰다. 용출된 단백질은 21°C에서 rTEV (Invitrogen)를 이용하여 자른 후 Ni-NTA column을 다시 통과시켜 hexa-His tag를 제거하였다. Tag가 제거된 단백질은 5 mM의 dithiothreitol (DTT)을 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 7.5로 미리 평형화시킨 Bio-Silect SEC 125 컬럼(Bio-Rad)을 통과시켜 순도를 높였다. 정제된 단백질은 Centriprep YM10 (Amicon)을 이용하여 10 mg/ml의 농도로 농축한 후 hanging drop vapor diffusion 방법으로 21°C에서 chronophin의 결정을 만들었다. Chronophin의 결정화조건으로 16%의 PEG 4,000을 침전제로 20 mM MgCl<sub>2</sub>을 함유한 0.1 M HEPES, pH 7.0의 완충용액을 사용하였다.

**Chronophin 결정체에 대한 X-선 회절 및 결정구조의 규명**  
길이가 200  $\mu$ m의 정도로 자란 결정체를 이용하여 포항

속기연구소의 6B 빔라인에서 회절실험을 하였다. 단백질 결정체를 결정화에 사용된 완충용액에 15% (v/v)의 글리세롤을 cryoprotectant로 첨가한 용액에 잠시 담군 후 사용하였으며 X-선은 1.127 Å의 파장을 사용하였다. 한 frame에 1°씩 결정체를 회전시켜 총 180°에 대한 회절 데이터를 수집하였다. 수집된 데이터는 HKL2000 프로그램[15]을 이용하여 indexing과 integration, scaling을 수행하였다. 총 10,643개의 reflection을 얻었으며 redundancy가 13.3에 unique reflection은 10,643으로 2.6 Å 해상도에서 completeness는 100%이다(Table 1). Chronophin의 분자구조는 PLPP의 분자구조 (PDB ID 2CFR)를 주형으로 하여 AMORE 프로그램 [14]을 사용하여 molecular replacement 방법으로 찾았으며 프로그램 'O' [8]를 이용하여 입체구조 모형을 수정하였으며 CCP4 suite에 있는 refmac4 프로그램[13]으로 refinement 과정을 수행하였다.

Table 1. Data collection and refinement statistics

Experimental Data	
X-ray source	PAL 6B
Wavelength (Å)	0.9792
Space group	$P4_32_12$
Unit cell parameters (Å)	$54.4 \times 54.4 \times 213.3$
Resolution limit (Å)	30 - 2.6 (2.69 - 2.60) <sup>a</sup>
Total reflections	141,522
Unique reflections	10,643 (1,025)
Redundancy	13.3 (12.5)
Completeness (%)	100 (100)
$R_{\text{sym}}^b$	0.111 (0.636)
Average I/s (I)	33.3 (5.7)
Refinement Details	
Space group	$P4_32_12$
Resolutions (Å)	30 - 2.6
Reflections (working)	10,065
Reflections (test)	503
$R_{\text{work}}^c$	0.231
$R_{\text{free}}^c$	0.279
Number of water molecules	26
RMS deviation from ideal geometry	
bond length (Å)	0.010
bond angle (°)	1.263
Average B factors (Å <sup>2</sup> )	
molecule A (main/side chain)	33.6 (33.1/34.2)
waters	26.1

<sup>a</sup>The numbers in parentheses describe the relevant value for the last resolution shell.

<sup>b</sup> $R_{\text{sym}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$  where  $I_i$  is the intensity of the  $i$ -th observation and  $\langle I \rangle$  is the mean intensity of the reflections.

<sup>c</sup> $R_{\text{work}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$ , crystallographic R factor, and  $R_{\text{free}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$  when all reflections belong to a test set of randomly selected data.

## 결과 및 고찰

환원된 상태의 chronophin의 결정체는 공간그룹  $P4_32_12$ 에 속하며 단위체의 크기는  $54.4 \text{ Å} \times 54.4 \text{ Å} \times 213.4 \text{ Å}$ 이었다. 하나의 비대칭 단위체에 한 개의 chronophin 분자가 들어 있는 크기로 Matthew's coefficient ( $V_m$ )은  $2.48 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ 이고 solvent content는 50%이다. 최종적인 chronophin의 모델은 한 개의 Mg 이온이 활성부위에 결합된 형태로 2.6 Å 해상도에 규명되었다. 이 모델의  $R_{\text{work}}$ 와  $R_{\text{free}}$  값은 각각 0.231와 0.279이다(Table 1). 전체적인 형태는 이전에 알려진 PLPP의 구조와 동일하게 두 개의 도메인, core 도메인과 cap 도메인으로 구성되어 있다(Fig. 2A). Core 도메인은 아미노산 M1에서 S87까지의 부위와 G212에서 D296까지의 부위로 구성된  $\alpha/\beta$  구조의 도메인이며 7개의 helix와 9개의 strand로 이루어져 있다. Core 도메인의 활성부위에서 Mg 이온이 발견되었는데 Mg 이온은 세 개의 아미노산 잔기, D25와 D27 그리고 D238에 의해 결합되어 있으며 세 개의 물분자와 더불어 배위결합을 하고 있다. 4개의 helix와 7개의 strand로 구성되어 있는 cap도메인은 S88에서 V211까지이며  $\alpha/\beta$  구조의 도메인이다. Cap 도메인( $\alpha 4$  helix에서  $\beta 13$  strand)은 core 도메인의  $\beta 6$  strand와  $\alpha 8$  helix사이에 삽입된 형태이며 core 도메인의 활성부위를 덮고 있다. 두 도메인을 연결하는 연결부위는 S87-S88과 V211-G212로 근접한 두 개의 짧은 linker로 이루어져 있다. Linker에 연결된 두 helix, core 도메인의  $\alpha 8$  helix와 cap 도메인의  $\alpha 4$  helix는 경첩의 역할을 하는 linker를 기준으로 활성부위의 반대쪽에 위치한다(Fig. 2A).

산화된 상태의 chronophin의 경우 linker에 연결된 core 도메인의  $\alpha 4$  helix의 C91과 cap 도메인의  $\alpha 8$  helix의 C211간에 disulfide bond가 있어 두 도메인사이의 움직임이 억제되었다(PDB entry 2CFR). 그러나 환원된 상태의 chronophin의 구조에서는 두 개의 cysteine, C91와 C211사이에는 disulfide bond가 없는 상태이다(Fig. 2A와 2B). 산화된 상태의 PLPP의 구조의 경우 두 유황원자사이의 거리가 SeMet을 함유한 구조(PDB entry 2CFR)에서는  $2.04 \text{ Å}$ 이며 Mg 이온이 결합된 native 구조(PDB entry 2CFS)에서는  $2.07 \text{ Å}$  그리고 Ca 이온과 기질인 PLP가 결합된 구조(PDB entry 2CFT)에서는  $2.06 \text{ Å}$ 으로 측정된다. 환원된 chronophin의 구조에서는 두 cysteine의 유황원자사이의 거리가  $3.01 \text{ Å}$ 으로 이는 산화된 상태에서의 PLPP 구조에서 보여주는 공유결합이 있을 때의 두 원자의 거리보다 멀다. 또한 전자밀도지도를 보면 두 cysteine 사이의 electron density가 산화된 상태의 chronophin에서는 연결되어 있으나(Fig. 2C) 환원된 상태의 chronophin에서는 끊어져 있음을 볼 수 있다(Fig. 2B). 이는 두 cysteine사이에 disulfide bond 결합이 없는 것을 의미한다. Disulfide bond가 없는 환원된 상태에서의 chronophin의 구조가 산화된 상태의 구조(PDB entry 2CFR)와 다른 지 비

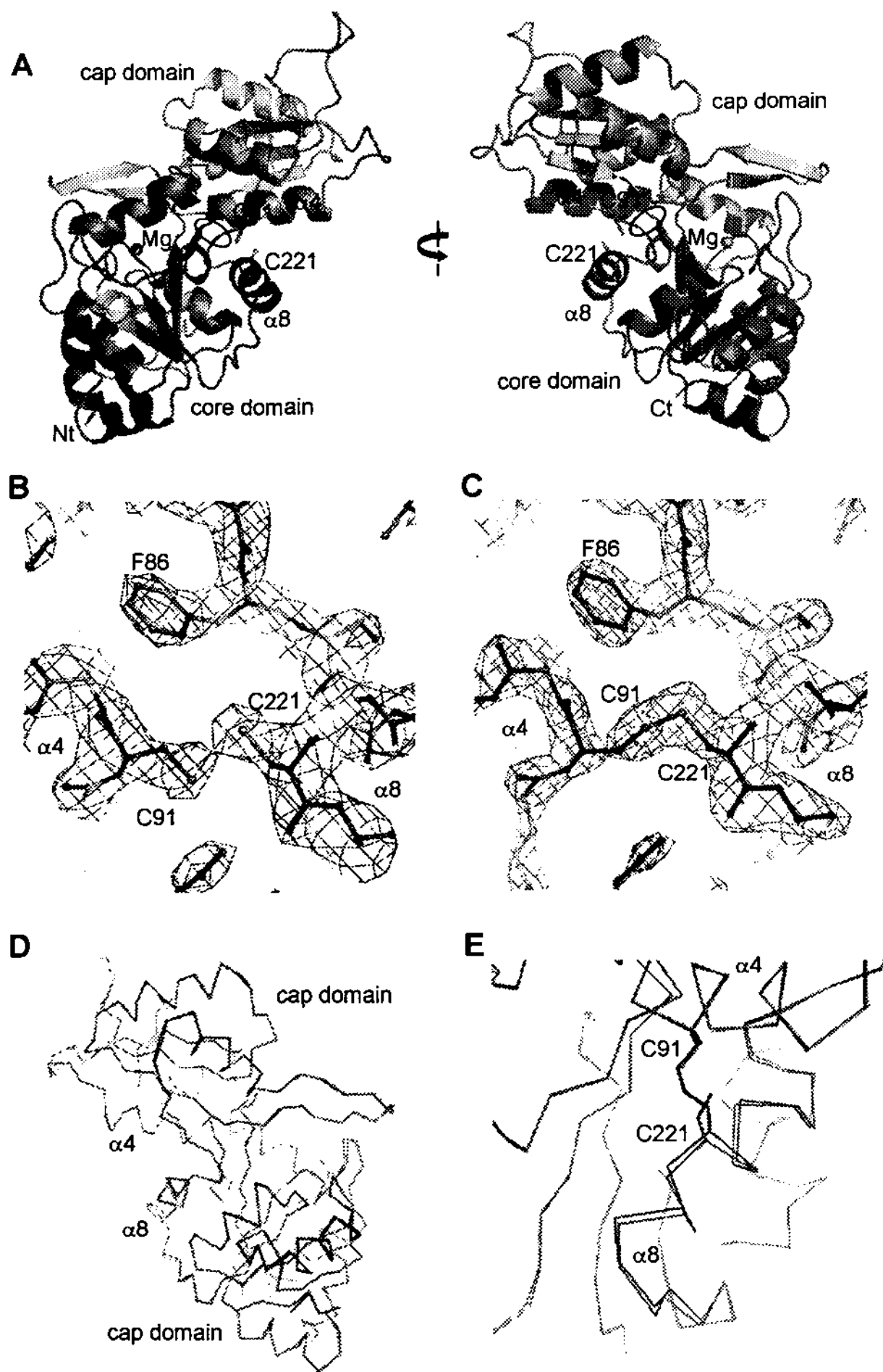


Fig. 2. Crystal structure of human PLPP at a reduced condition. (A) ribbon diagram of PLPP at a reduced condition. Linker regions between cap domain (blue) and core domain (green) are circled. A Mg ion and two cysteine residues are presented as a sphere and sticks, respectively. Right diagram is rotated for 180° against y-axis. (B) Electron density map for the disulfide bond in the PLPP (PDB 2cfr) at contour of 1.5  $\sigma$ . (C) Electron density map for two cysteines, C91 and C221 at an reduced condition at the contour of 1.5  $\sigma$ . (D) superimposition of the PLPP structure at reduced condition on that at oxidized condition. (E) The disulfide bond between C91 and C221 leads a movement of  $\alpha 8$  helix in the cap domain.

교하기 위해 두 구조를 포개 보았다(Fig. 2D). Cap 도메인과 core 도메인 부분 모두에서 환원된 구조와 산화된 구조는 거의 동일하게 나타났으며 두 도메인의 상대적인 위치에도 변화가 없는 것으로 나타났다. 즉, chronophin은 disulfide bond가 있을 때와 없을 때 모두 닫힌 형태의 구조를 형성한다. 이는 chronophin이 기질이 없을 때도 닫힌 형태를 유지하는 것이 결정구조를 규명하는 과정에 발생한 단백질의 산화에 의한 C91과 C211간의 disulfide bond에 의한 것이 아님

을 의미한다. 산화된 구조와 환원된 구조를 비교하였을 때 전체적인 형태는 산화된 상태에 비해 환원된 상태가 동일하였으나 두 cysteine, C91과 C211 간의 disulfide bond가 끊어짐으로서 두 유황원자 사이의 거리가 멀어졌을 뿐만 아니라 두 아미노산 잔기사이의 거리도 멀어졌다(Fig. 2E). C91과 C211의 두 C $\alpha$  원자 사이의 거리는 6.50 Å으로 산화된 상태에서 보여주는 거리, 5.96Å 또는 5.93Å 보다 멀다. 이는 disulfide bond의 형성을 위하여 cysteine의 유황원자를 함유한 side chain의 방향이 움직였을 뿐만 아니라 cysteine의 C $\alpha$  원자를 포함하는 main chain도 움직였음을 의미한다. 주목할 점은 disulfide bond를 형성하기 위해 두 cysteine 중 C211만 움직였으며 이로 인해 C221이 위치한  $\alpha 8$  helix가  $\alpha 4$  helix가 있는 cap 도메인 쪽으로 이동하였다. 그러나  $\alpha 8$  helix의 움직임이 전체 core 도메인의 이동을 유발하지는 않았다. 즉, 전체 core 도메인의 위치는 변하지 않았지만 국부적인  $\alpha 8$ 의 움직임으로 disulfide bond의 형성에 의한 변화를 수용하였다. Cap 도메인 쪽의 구조도 변하지 않았으며 따라서 전체적인 구조도 유지되었다.

Chronophin은 산화된 상태뿐만 아니라 환원된 상태에서도 cap 도메인이 core 도메인의 활성부위를 덮고 있는 닫힌 형태이며 기질이 없을 때에도 chronophin은 기질이 결합되었을 때와 같은 닫힌 형태를 계속 유지한다. 따라서 chronophin은 cap 도메인을 갖는 다른 HAD family phosphatase와는 달리 닫힌 형태에서 기질이 결합할 것으로 여겨진다. Chronophin이 기질이 없을 때에 열린 형태로 전환되기 못하는 이유는 C91과 C221간의 disulfide bond가 형성될 수 있기 때문인 것보다는 cap 도메인과 core 도메인을 연결하는 두개의 연결부위가 상당히 짧음으로 cap 도메인의 움직임이 자유스럽지 못하고 고정된 형태를 유지하기 때문인 것으로 추측된다. Chronophin에 대한 연구에서 밝혀진 특징 중 하나는 이 효소가 아주 좁은 범위의 기질특이성을 갖는 것인데 이는 cap 도메인이 젓혀져 활성부위가 노출되는 구조인 열린 형태로의 전환이 되지 않기에 다양한 모양의 기질이 활성부위로 접근하는 것이 용이하지 않기 때문일 것이다. 따라서 chronophin이 세포 내에서 환원된 상태가 유지되는 부위에 존재할 때에도 기질에 대한 높은 특이성을 보여줄 것으로 추측된다.

### 요 약

Actin cytoskeleton rearrangement를 조절하는 cofilin은 인산기가 제거되면서 활성화되는데 이를 담당하는 효소가 chronophin이다. 이 효소는 비타민 B<sub>6</sub>의 활성형태인 pyridoxal 5'-phosphate (PLP)의 세포 내 농도를 조절하는 PLP phosphatase로도 알려져 있다. Chronophin은 cap 도메인과 core 도메인을 갖는 HAD family에 속하는 phosphatase이며

다른 HAD phosphatase와 같이 기질결합을 위해 cap 도메인과 core 도메인 사이의 활성부위가 노출되는 열린 형태의 전환이 있을 것으로 추정되었다. 이전의 밝혀진 chronophin/PLPP의 결정구조에서는 단백질의 결정화과정이 산화된 상태에 이루어졌기에 cap 도메인의 C91과 core 도메인의 C221 사이에 disulfide bond가 있었으며 이것이 cap 도메인과 core 도메인사이의 움직임을 막고 있었다. 본 연구에서는 환원된 상태의 chronophin의 결정체를 얻어 chronophin의 구조를 규명하였다. 환원된 상태의 chronophin의 구조에는 C91과 C221간의 disulfide 결합은 없었으나 산화된 상태와 동일한 닫힌 형태이었으며 국부적인 core 도메인의 움직임이외에는 core 도메인과 cap 도메인의 구조에는 변화가 없었다. 이는 chronophin이 기질이 없는 상태에서 닫힌 형태로 유지되는 것이 disulfide bond에 의한 것이 아님을 의미하며 세포 내의 환원된 상태에서도 닫힌 구조를 유지함으로써 높은 기질 특이성을 보여줄 것임을 암시한다.

### 감사의 글

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2005-003-C00108).

### References

- Allen, K. N. and D. Dunaway-Mariano. 2004. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trend Biochem. Sci.* **29**, 495-503.
- Bamburg, J. R. 1999. Proteins of the ADF/Cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 185-230.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.
- Carrier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implications for actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307-1322.
- Fonda, M. L. 1992. Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 15978-15983.
- Galkin, V. E., A. Orlova, N. Lukyanova, W. Wriggers, and E. H. Egelman. 2001. Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J. Cell Biol.* **153**, 75-86.
- Gohla, A., J. Birkenfeld, and G. M. Bokoch. 2005. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* **7**, 21-29.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan, and M. Kjeldgaard. 1991. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta. Crystallogr. A* **47**, 110-119.
- Lahiri, S. D., G. Zhang, J. Dai, D. Dunaway-Mariano, and K. N. Allen. 2004. Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry* **43**, 2812-2820.
- Lappalainen P and D. G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover *in vivo*. *Nature* **388**, 78-82.
- Lu, Z., D. Dunaway-Mariano, and K. N. Allen. 2005. HAD superfamily phosphotransferase substrate diversification: structure and function analysis of HAD subclass IIB sugar phosphatase BT4131. *Biochemistry* **44**, 8684-8696.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu and A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* **138**, 771-781.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240-255.
- Navaza, J. 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta. Crystallogr.* **50**, 157-163.
- Otwinowski, Z. and W. Minor. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Plastino, J. and C. Sykes. 2005. The actin slingshot. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 62-66.
- Selengut, J. D. and R. L. Levine. 2000. MDP-1: a novel eukaryotic magnesium-dependent phosphatase. *Biochemistry* **39**, 8315-8324.
- Sheffield, P., S. Garrard, and Z. Derewenda. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "Parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34-39.
- Snell, E. E. 1990. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **585**, 1-12.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, and K. Mizuno. 2001. Cofilin phosphorylation by testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1131-1145.
- Wiggan, O., B. W. Bernstein, and J. R. Bamburg. 2005. A phosphatase for cofilin to be HAD. *Nature Cell Biol.* **7**, 8-9.
- Yang, N., O. Hiquchi, K. Ohashi, K. Naqata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, and K. Mizuno. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812.