

HANNA BRZESKA

Laboratory of Cell Biology

National Heart, Lung and Blood Institute

Bethesda, MD 20892-0301, USA

e-mail: brzeska@helix.nih.gov

## PRZYGODA Z AMEBĄ: DZIWAZNE MIOZYNY I KINAZA

### WSTĘP

Ameby, jak wiedzą nawet osoby nie będące biologami, są organizmami jednokomórkowymi i na pierwszy rzut oka nie wydają się mieć wiele wspólnego z formami życia dużo dla nas ciekawszymi, takimi jak np. my sami. A jednak badania ameb, podobnie jak wielu innych organizmów niższych (w tym wielce dla nauki zasłużonych drożdży), pozwoliły na odkrycie szeregu faktów biologicznych związanych z ruchem komórki, co doprowadziło do zmiany niektórych wcześniejszych poglądów obowiązujących w tej dziedzinie.

Celem tego artykułu nie jest gruntowny przegląd olbrzymiej dziedziny nauki dotyczącej różnych aspektów ruchu komórkowego. Raczej, na przykładzie jednego laboratorium oraz głów-

nej bohaterki, *Acanthamoeba castellanii* (w dalszej części artykułu nazywanej po prostu amebą), chcę opisać, jak w ciągu ostatnich dwudziestu paru lat stosunkowo mała grupa ludzi pracująca nad tym organizmem i badająca, jak się wówczas wydawało, zjawiska dla niego unikalne, w rezultacie przyczyniła się do odkrycia prawd dużo bardziej uniwersalnych.

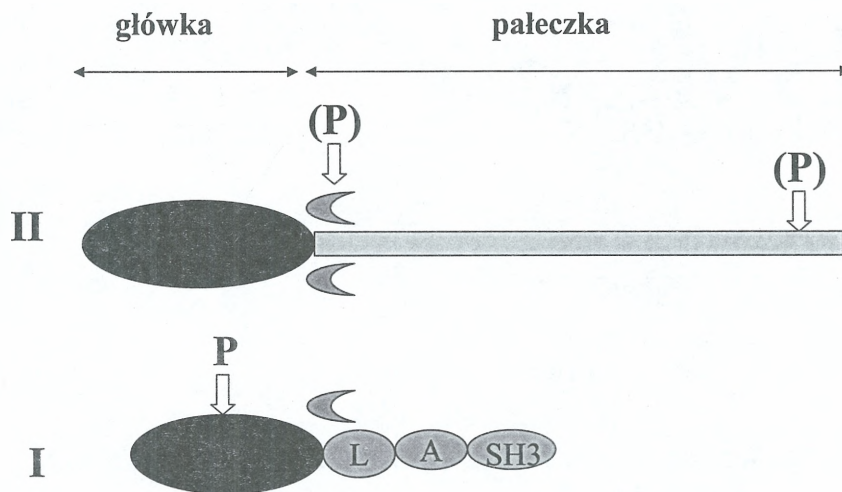
Dlatego też (a także, aby uniknąć listy odnośników o długości wielokrotnie przekraczającej długość tego krótkiego artykułu), poniżej cytować będę jedynie niektóre oryginalne prace pochodzące głównie z jednego laboratorium, podczas gdy odnośnikami do większości wyników będą prace przeglądowe.

### MIOZYNA

Białka zaangażowane w ruch komórkowy pierwotnie odkryto i scharakteryzowano w mięśniach. Dwa główne białka odpowiedzialne za skurcz mięśni to aktyna i miozyna. W mięśniach oba te białka występują jako gęsto upakowane, równoległe do siebie polimery zwane filamentami. Ruch filamentów aktynowych względem filamentów miozynowych powoduje skurcz mięśnia. W komórkach niemięśniowych aktyna i miozyna także występują, ale w strukturach znacznie mniej uporządkowanych. Przede wszystkim, zarówno aktyna, jak i miozyna, oprócz postaci filamentowej, występują też w postaci monomerycznej. Monomer aktyny stanowi jeden łańcuch polipeptydowy. Monomer miozyny jest bardziej skomplikowany. Składa się on z dwóch łańcuchów ciężkich i czterech łańcuchów lekkich. Ciężkie łańcuchy miozyny zawierają dwie domeny o różnych funkcjach — główkę i pałeczkę (Ryc. 1). N-końcowa

główka (nazywana też domeną motoryczną miozyny) wiąże aktynę i hydrolizuje ATP. Energia chemiczna uwalniana w wyniku hydrolizy zamieniana jest na energię mechaniczną, powodując zmianę konformacyjną miozyny i w konsekwencji jej ruch względem filamentu aktynowego. Często używaną ilustracją tego ruchu jest parowóz jadący po torach — torami są filamenty aktynowe, a parowozem miozyna, napędzana, zamiast węgla, ATP.

Pałeczka miozyny nie jest do ruchu potrzebna; sama główka pozbawiona pałeczki (poprzez trawienie proteolityczne lub manipulacje genetyczne) *in vitro* przemieszcza się doskonale wzdłuż filamentów aktynowych. Rolą pałeczki ciężkiego łańcucha miozyny jest tworzenie dimeru z drugim ciężkim łańcuchem. Część łańcucha polipeptydowego odpowiadająca pałeczce ma strukturę — helisy, która, spleciona z drugim łańcuchem, tworzy superhelisę. Sple-



Ryc. 1. Schematyczne porównanie struktury konwencjonalnej miozyny II i amebowej miozyny I.

Ciężkie łańcuchy obu miozyn tworzą N-końcowe globularne główki i C-końcowe pałeczki. Dwa lekkie łańcuchy miozyny II i pojedynczy lekki łańcuch miozyny I przedstawiono jako półksiężyce. Wiążą się one z ciężkimi łańcuchami w regionie pomiędzy główką a pałeczką. Główki obu miozyn odpowiedzialne są za wiązanie aktyny, aktywność ATP-azową i motoryczną oraz wykazują wysoki stopień homologii (główka miozyny I jest nieco mniejsza). Pałeczka miozyny II ma strukturę  $\alpha$ -helisy i odpowiedzialna jest za dimeryzację miozyny i jej dalszą polimeryzację. Kompleks składający się z dwóch ciężkich łańcuchów połączonych pałeczkami (oraz z czterech lekkich łańcuchów) stanowi monomer miozyny II. Pałeczka miozyny I nie jest homologiczna do pałeczki miozyny II i zawiera trzy domeny charakterystyczne dla izoform miozyny I. Jedną z nich jest domena SH3, wiążąca się z sekwencjami białkowymi bogatymi w reszty proliny. Pałeczka miozyny I wiąże też lipidy (L) oraz aktynę (A). Monomer miozyny I składa się z jednego lekkiego i jednego ciężkiego łańcucha, posiada zatem jedną główkę. Aktywność niektórych miozyn II regulowana jest przez fosforylację lekkich łańcuchów lub C-końcowego rejonu pałeczki miozyn. Aktywność miozyn I regulowana jest poprzez fosforylację miejsca zlokalizowanego w główce miozyny. Obecność ujemnego ładunku w tym miejscu jest warunkiem aktywności większości miozyn.

cionie pałeczki dimeru miozyny oddziałują z kolei z następnym dimerem, tworząc w efekcie długie filamenty. Lekkie łańcuchy miozyny wiążą się w regionie ciężkiego łańcucha nazwanym szyjką, znajdującym się pomiędzy główką i pałeczką. Ich najważniejszą rolą jest regulacja aktywności niektórych miozyn.

Miozyny opisane powyżej nazywane są często miozynami konwencjonalnymi, a oficjalnie, mimo że odkryto je jako pierwsze, miozynami II. A dlaczego, o tym poniżej.

#### MIOZYNA I

We wczesnych latach 70., gdy miozyny mięśniowe były jeszcze stosunkowo mało poznane, Thomas Pollard, odbywający staż podyktorski w laboratorium Edwarda Korna w Narodowych Instytutach Zdrowia (NIH) w Bethesda, USA, postanowił sprawdzić, czy jednokomórkowa ameba, która przecież potrafi przemieszczać się pełzając, posiada miozynę podobną do mięśniowej. *Acanthamoeba castellanii*, którą zainteresował się Pollard, żyje w zbiornikach słodkowodnych i na terenach podmokłych. W warunkach laboratoryjnych, dobrze karmiona, nie jest wymagająca i szybko się rozmnaża. Można ją hodować w 15-litrowych zbiornikach, bardzo podobnych do używanych do domowej produkcji wina. Po czterech dniach hodowli i po odwirowaniu zawartości kilku zbiorników otrzymuje się około kilograma osa-

du komórkowego, czyli, inaczej mówiąc, kilogram komórek ameby. Ekstrakt z tego kilograma zawiera olbrzymią ilość białek. Aby je rozdzielić, Pollard, po wstępnym frakcjonowaniu, poddał ekstrakt chromatografii kolumnowej. Białka związane do kolumny wymywał gradientem soli i sprawdzał, które z wymytych frakcji posiadają charakterystyczną dla miozyn aktywność ATPazową. Otrzymał dwa piki aktywności i nazwał je, wg kolejności wymywania z kolumny, I i II. Białka zawarte w tych frakcjach okazały się miozynami, więc Pollard konsekwentnie nazwał je miozyną I i II. Po dalszym scharakteryzowaniu okazało się, że miozyna II, wyglądająca podobnie do swojego mięśniowego odpowiednika (dwa łańcuchy ciężkie, cztery łańcuchy lekkie, główka, pałeczka), była zdolna do tworzenia filamentów. Miozyna I stwarzała na-

tomiast same problemy. Po pierwsze, aby zmusić ją do zachowania się jak miozyna, tzn. do wykazywania stymulowanej przez aktywną hydrolizy ATP (aktywności Mg-ATPazowej), Pollard musiał inkubować ją z innymi frakcjami z oryginalnej kolumny. Pollard nazwał zawarty w tych frakcjach czynnik „czynnikiem aktywującym”. Po drugie, miozyna I była dużo mniejsza od innych, znanych wtedy, miozyn. Po trzecie, nie chciała tworzyć filamentów. Po czwarte, jej aktywność Mg-ATPazowa, zamiast wzrastać wraz ze wzrostem stężenia aktywy, najpierw zwiększała się bardzo szybko, potem obniżała się, a potem znów wzrastała.

Pollard i Korn opublikowali swoje wyniki dotyczące miozyny I w 1973 r. (POLLARD i KORN 1973). Nietypowe właściwości tej amebowej miozyny nie tylko nie spowodowały rewolucji wśród „miozynowców”, ale wręcz spotkały się z lekkim niedowierzaniem. Byli nawet tacy, którzy nieoficjalnie mówili, że Pollard wyizolował odtrawiony fragment miozyny, samą główkę bez pałeczki. Fragment taki można otrzymać w sposób kontrolowany trawiąc miozynę proteazami. Ekstrakt z ameby wykazuje, niestety, bardzo wysoki poziom aktywności proteaz, co bardzo utrudnia życie naukowcom usiłującym oczyścić natywne białka, a nie ich fragmenty. Stąd też powyższe podejrzenia.

Następne lata przyniosły dalszą charakterystykę dziwnej miozyny I z ameby, którą zajmowały się już dwa laboratoria: stare — Korna i nowe — Pollarda (KORN i współaut. 1987, KORN i HAMMER 1990). Wykazano, że w amebie występują aż trzy izoformy miozyny I, nazwane też według kolejności wymywania ich z kolumny: A i B, oraz C (miozyna C wymywa się co prawda pomiędzy miozynami A i B ale odkryto ją później niż jej poprzedniczki). J. Albanesi ze współpracownikami udowodnił, że miozyna I może wiązać jednocześnie dwa filamenty aktynowe, powodując sieciowanie aktywy (ALBANESI i współaut. 1986), a T. Lynch i koledzy wykazali, że miozyna I posiada drugie miejsce wiązania aktywy, znajdujące się w pałeczce (LYNCH i współaut. 1986). Miejsce to okazało się odpowiedzialne za zaobserwowaną przez Pollarda nietypową zależność aktywności ATPazowej od stężenia aktywy. Co więcej, miozyna I, testowana *in vitro*, była w stanie przemieszczać nie tylko filamenty aktynowe (ALBANESI i współaut. 1985), ale także organelle i pęcherzyki lipidowe wzdłuż filamentów aktynowych (ADAMS i POLLARD 1989). Badania mikroskopowe wykazały, że miozyna I zlokalizowana jest w miejscach wzmożonej aktywności ruchowej na obrzeżach komórki w miejscach tworzenia wypustek (FUKUI i współaut. 1989). Na podstawie powyższych

wyników oba laboratoria, Korna i Pollarda, zaproponowały, że rola miozyny w komórce polega nie tylko na przemieszczaniu filamentów aktynowych wobec siebie i ich sieciowaniu, ale także na transportowaniu organelli wzdłuż filamentów aktynowych oraz przemieszczaniu filamentów aktynowych wobec błony komórkowej. O ile sieciowanie i przemieszczanie filamentów aktynowych było znaną funkcją izoform miozyny II, o tyle przemieszczanie struktur lipidowych było nową i, jak się wtedy wydawało, unikalną funkcją miozyny I. W międzyczasie w laboratorium Korna J. Hammer i współpracownicy wyizolowali gen miozyny I, udowadniając tym ponad wszelką wątpliwość, że białko odkryte przez Pollarda nie jest produktem proteolizy klasycznej miozyny II (HAMMER i współaut. 1986). Pełna sekwencja aminokwasowa miozyny I była w pełni zgodna z wnioskami wyciągniętymi z badań biochemicznych. Miozyna I posiada typową główkę miozynową (nieco mniejszą niż miozyna II) i krótką, bardzo „niemiozynową” pałeczkę, która nie posiada struktury  $\alpha$ -helisy i nie tworzy typowej dla miozyny II superhelisy z pałeczką drugiej cząsteczki. Zamiast tego, pałeczka miozyny I wiąże lipidy i aktynę. Ponadto, analiza sekwencji wykazała, że w pałeczce miozyny I znajduje się tzw. domena SH3. Domeny tego typu uczestniczą w przekazywaniu sygnałów komórkowych poprzez wiązanie się z bogatymi w reszty proliny regionami innych białek (Ryc. 1).

Informacje te zostały uznane przez naukowców zajmujących się aktomiozyną za anomalie miozynowe ameby. Opinii tej nie zmieniło oczyszczenie miozyny I ze śluzowca *Dictyostelium discoideum* (COTE i współaut. 1985) — cóż, następna ameba. *Dictyostelium* jest wprawdzie organizmem bardziej skomplikowanym, niż *Acanthamoeba castellanii*, ale w trakcie swego rozwoju przechodzi przez fazę ameby.

Dopiero odkrycie miozyny I w komórkach kręgowców (COLLINS i BORYSENKO 1984), a zwłaszcza w komórkach ssaczy (BARYŁKO i współaut. 1992), skłoniło zainteresowanych do rozważenia możliwości, że miozyny I mogą być czymś więcej, niż tylko anomaliami amebowymi. Przez krótki okres doszukiwano się pewnej logiki w nazewnictwie. Klasyczna miozyna, nazwana przez Pollarda drugą, ma dwie główki, podczas gdy monomeryczna miozyna I ma tylko jedną główkę. Szybko jednak zarzucono tę interpretację, gdyż rozwój metod biologii molekularnej, a także zsekwencjonowanie szeregu genomów, w tym ludzkiego, bardzo przyspieszyło odkrywanie następnych klas miozyn, które oznaczano numerami odpowiadającymi kolejności ich odkrywania.

## RODZINA MIOZYN

Obecnie znane są sekwencje aminokwasowe 150 miozyn, które należą do 18 klas. Spośród nich najbardziej zróżnicowana jest klasa miozyn I, występujących zarówno w organizmach jednokomórkowych, jak i u kręgowców, z ludźmi włącznie. Niekonwencjonalne miozyny, oprócz domeny motorycznej, czyli główki będącej czynnikiem określającym przynależność do rodziny miozyn, i domen opisanych już dla amebowej miozyny I, posiadają szereg innych domen. Jako bardziej „egzotyczne” przykłady można tu wymienić miozynę III, która posiada w N-końcowej części domenę kinazową, oraz miozynę IX, która posiada w pałeczce domenę GAP, aktywującą białka G. Niektóre z niekonwencjonalnych miozyn (np. miozyna V) zawierają też domeny umożliwiające ich dime-ryzację. Analiza genomu ludzkiego wykazuje obecność 39 izoform miozyn, przedstawiciele 12 różnych klas. W pojedynczej komórce ssaczki zachodzi ekspresja co najmniej 11 izoform miozyny, należących do 6 klas. Są to dość imponujące liczby, nie pozostawiające wątpliwości co do ważności roli, jaką miozyny odgrywają w komórkach mięśniowych. Ważność tę wykazano bezpośrednio dla niższych organizmów (*A. castellanii*, *D. discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*), u których to organizmów mutacje miozynowe miały duży wpływ zarówno na zachowanie organelli, jak i na aktywność błony komórkowej. Najbardziej dramatycznym przypadkiem jest prawdopodobnie *Aspergillus*, w przypadku którego usunięcie miozyny I prowadzi do zahamowania rozwoju i śmierci tego grzyba (OSHEROV i May 2000). Ponadto, mutacje miozyn II, V, VI, VII i XV są przyczyną wielu chorób genetycznych u ludzi i innych ssaków.

Tak jak zróżnicowana jest struktura miozyn należących do licznych klas, tak samo zróżnicowane są postulowane specyficzne funkcje pełnione przez nie w różnych organizmach. Czy-

telników zainteresowanych rodziną miozyn i rolą jaką pełnią polecam prace przeglądowe (SELLERS 1999, SOKAC i BEMENT 2000). Choroby spowodowane mutacjami w genach kodujących izoformy miozyny opisano też w artykule REDOWICZ w tym numerze KOSMOSU.

Podsumowując, obecnie uważa się, że główną funkcją niekonwencjonalnych miozyn, wraz z systemem opartym na białkach motorycznych poruszających się wzdłuż mikrotubuli, jest kontrola lokalizacji i kształtu struktur lipidowych w komórce. W modelu tym cząsteczki miozyn przemieszczają się wzdłuż filamentów aktynowych, z którymi związane są poprzez główki, podczas gdy zróżnicowane domeny pałeczek miozyn odpowiedzialne są za wiązanie lipidów lub białek (które mogą, lecz nie muszą być białkami błonowymi). Funkcja ta wymaga od miozyny aktywności motorycznej. Sugeruje się też, że główną rolą, przynajmniej niektórych miozyn, jest sieciowanie (a nie przemieszczanie) struktur lipidowych z aktyną, lub też sieciowanie aktyny z innymi białkami. Funkcja ta nie wymaga od miozyny wykazywania aktywności motorycznej.

Pomimo, że grupa poznanych miozyn niekonwencjonalnych rozrasta się w szybkim tempie i nikt już nie wątpi w ich ważność i uniwersalność, tylko nieliczne miozyny scharakteryzowano na poziomie biochemicznym, a o większości ciągle jeszcze nie wiadomo, czy rzeczywiście pełnią rolę zależnych od aktyny motorów komórkowych. Miozyna I wraz z miozyną V (która, jak już wiemy, bynajmniej nie ma pięciu główek) i, oczywiście, klasyczną miozyną II pozostają ciągle w ścisłej czołówce pod względem charakterystyki biochemicznej. Ponadto, bardzo niewiele wiadomo o regulacji aktywności miozyn należących do klas innych, niż I i II (BRZESKA i KORN 1996, SELLERS 1999, BARYŁKO i współaut. 2000).

## FOSFORYLACJA MIOZINY I, REGUŁA TEDS

Regulacja aktywności klasycznych mięśniowych miozyn II przebiega albo z udziałem białek związanych z filamentami aktynowymi, albo poprzez fosforylację lekkiego łańcucha regulującego miozyny. Niektóre izoformy miozyny II (w tym amebowa) regulowane są też poprzez fosforylację reszt w C-końcowym regionie pałeczki (Ryc. 1). W 1977 r. H. Maruta udowodnił, że „czynnik aktywujący” amebową miozynę I sta-

nowi kinaza serynowo-treoninowa, fosforylująca ciężki łańcuch tej miozyny (MARUTA i KORN 1977). Jednakże dużym zaskoczeniem było późniejsze zlokalizowanie miejsca fosforylacji w środku główki miozyny, a nie na końcu C pałeczki (BRZESKA i współaut. 1989). Po raz kolejny wydawało się, że jest to cecha dziwna, unikalna dla amebowej miozyny I. Ponieważ jednak był to okres nie tylko szybkiego klonowania nowych

klas miozyn, ale także rozwoju metod komputerowych, pozwalających na szybką analizę sekwencji białkowych, okazało się, że tak nie jest.

Miejsce fosforylacji trzech amebowych izoform miozyny I charakteryzuje się obecnością zasadowych aminokwasów poprzedzających fosforylowaną resztę treoniny (T) lub seryny (S) oraz reszty tyrozynowej po C-końcowej stronie miejsca fosforylacji. Podobne miejsca fosforylacji znaleziono m. in. w izoformach miozyny I z *Dictyostelium*, *Aspergillus* i drożdży, miozynie XII z *Dictyostelium*, miozynie XIV z *Plasmodium falciparum*, a także w ssaczej miozynie VI. O ile w przypadku ameby, *Dictyostelium* i *Aspergillus* wykazano metodami biochemicznymi, że miejsca te rzeczywiście ulegają fosforylacji, i że fosforylacja powoduje aktywację miozyny, o tyle dla pozostałych miozyn jeszcze tego ostatecznie nie ustalono. Niemal wszystkie pozostałe miozyny posiadają w miejscu odpowiadającym miejscu fosforylacji amebowych izoform miozy-

ny I aminokwas kwaśny: kwas glutaminowy (E) lub asparaginowy (D). Dotyczy to także ssaczych izoform miozyny I. Uważa się więc, że obecność ujemnego ładunku (w postaci reszty fosforanowej lub kwaśnego aminokwasu) w tym rejonie jest kluczowa dla aktywności miozyny. Reguła ta znana jest obecnie jako reguła TEDS (SOKAC i BEMENT 2000). Co więcej, analizy kryształów główki miozynowej wykazały, że miejsce TEDS usytuowane jest w regionie, stanowi część miejsca kontaktu między miozyną i aktywną, a mutacje w tymże rejonie wykryto u pacjentów z hipertroficzną miopatią sercową (izoforma „sercowa” miozyny II) oraz z zaburzeniami słuchu (miozyna VIIA). Istotną rolę ładunku ujemnego w miejscu TEDS potwierdzono też dla niektórych miozyn biochemicznie. Po raz kolejny okazało się zatem, że nie tylko istnienie, ale także właściwości „dziwnej” miozyny amebowej są dużo bardziej uniwersalne, niż początkowo sądzono.

#### KINAZA MIOZINY I

Ustalenie, że aktywacja amebowych izoform miozyny I odbywa się poprzez fosforylację ciężkiego łańcucha, stanowiło tylko część odpowiedzi na pytanie dotyczące mechanizmów regulacji aktywności tej miozyny. Następnym krokiem było ustalenie, w jaki sposób regulowana jest aktywność kinazy miozyny I. Kinaza miozyny I izolowana w tym czasie w laboratorium Korna była w pełni aktywna, a w dodatku w żelu poliakryloamidowym widoczna była w postaci trzech prążków o różnych masach cząsteczkowych. Postanowiono więc wyizolować kinazę nieaktywną, a potem ją aktywować. Wyeleminowanie ATP z procedury oczyszczania, zmiany w chromatografii kolumnowej i zacięta walka z proteolizą doprowadziły w efekcie do otrzymania enzymu podlegającego regulacji (BRZESKA i współaut. 1990).

Kinaza miozyny I, po oczyszczeniu, okazała się być regulowana przez autofosforylację. Jednakże, w przeciwieństwie do znanych wówczas kinaz, które wprowadzają pojedynczą resztę fosforanową, kinaza miozyny I wprowadzała ich kilkanaście. Ponadto, jej aktywność aktywowały kwaśne lipidy, podobnie jak aktywność bardzo w tamtych czasach sławnej kinazy C. Kinazę C aktywują jednak także jony wapnia, podczas gdy nie wywierały one żadnego wpływu na aktywność kinazy miozyny I, a w połączeniu z kalmoduliną powodowały wręcz hamowanie

aktywności (BRZESKA i współaut. 1992). Kalmodulina jest białkiem, które po związaniu jonów wapnia wiąże się z wieloma enzymami, w tym z kinazą lekkich łańcuchów miozyny II, ale w tym przypadku powoduje aktywację kinazy, a w konsekwencji aktywację miozyny. Wapń powoduje też aktywację aktomiozyny z mięśni poprzecznie prążkowanych. Tak więc, hamujący wpływ wapnia na kinazę amebową (a więc i na aktywność miozyny I) był przeciwny do oczekiwanego. Jednakże, i w tym przypadku okazało się, że nie jest to efekt unikalny dla ameby. Jony wapnia hamują także aktywność motoryczną izoform miozyny I kręgowców, aczkolwiek w tym przypadku wiążą się one bezpośrednio z lekkimi łańcuchami miozyny, którymi jest właśnie kalmodulina (BARYŁKO i współaut. 2000, SOKAC i BEMENT 2000). Pomimo tego, kinaza miozyny I ciągle nie wydawała się mieć wiele wspólnego z żadną ze znanych wówczas kinaz.

Dopiero odkrycie w latach 90. nowej rodziny kinaz i sklonowanie kinazy miozyny I (BRZESKA i współaut. 1996) wykazało, że kinaza amebowa nie jest białkiem występującym jedynie w amebie. Kinaza ta okazała się być jednym z pierwszych dobrze scharakteryzowanych na poziomie biochemicznym przedstawicieli nowej rodziny kinaz, nazwanych PAK. Aktywność wielu kinaz należących do tej rodziny stymulują małe białka G.

## MAŁE BIAŁKA G I RODZINA KINAZ PAK

Białka G (czyli białka wiążące GTP) są białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału z receptorów błonowych w głąb komórki poprzez wiązanie się z innymi białkami. Do rodziny małych białek G, znanych także jako białka p21, należą Rho, Rac i Cdc42. Aktywacja białek p21 powoduje dramatyczne zmiany cytoszkieletu aktomiozynowego komórki i przyczepności komórek do podłoża. Zmiany te są różne dla każdego z tych białek, a także zależą często od rodzaju komórki i stanu w jakim się komórka znajduje. Przykładowo, w głodzonych fibroblastach aktywacja Rac powoduje akumulację aktywny pod błoną komórkową i pofałdowanie błony (ang. membrane ruffling), zaś aktywacja Rho — akumulację filamentów aktynowych w postaci, zawierających również miozynę, włókien naprężeniowych (ang. stress fibers) w cytoplazmie komórki (HALL 1998).

Poszukiwanie białek wiążących Rac doprowadziło do sklonowania pierwszej ssaczej kinazy PAK, obecnie nazywanej PAK $\alpha$ . Okazała się ona być bardzo podobna do drożdżowej kinazy STE-20, która została oryginalnie odkryta jako białko, którego mutacja powoduje sterility drożdży. Wkrótce potem znaleziono kolejne kinazy należące do tej rodziny, która, podobnie jak rodzina miozyn, ma obecnie wielu członków o zróżnicowanych właściwościach. Jest to również rodzina uniwersalna, tzn. kinazy do niej należące występują we wszystkich organizmach, poczynając od drożdży, a kończąc na ssakach. Podobnie jak przynależność do rodziny miozyn określona jest homologią sekwencji aminokwasowej główki, tak przynależność do rodziny PAK zdefiniowana jest poprzez homologię sekwencji ich domen katalitycznych (czyli kinazowych). Prowadzi to, jak często bywa, do

pewnej niekonsekwencji w nazewnictwie. PAK jest skrótem od „p21-activated kinase”, czyli kinazy aktywowanej przez białka p21 (w tym przypadku Rac i Cdc42, ale nie Rho), które wiążą się w rejonie kinazy zwanym PBD (od „p21-binding domain”) lub CRIB (od „Cdc42-and Rac-interacting domain”). Jednakże, wielu znanych przedstawicieli rodziny PAK nie ulega aktywacji białkami p21, ani też białek tych nie wiąże, a jedynie zawiera domenę kinazową, która jest homologiczna do domen katalitycznych innych kinaz z rodziny PAK. Przykładem takiej kinazy jest kinaza mst. Z drugiej zaś strony, posiadanie przez kinazę z rodziny PAK domeny PBD wiążącej Rac nie oznacza automatycznie, że aktywność kinazy jest stymulowana przez Rac. Przykładem jest ssacza kinaza PAK4, dla której dotychczas nie udało się wykazać aktywacji w obecności Rac, mimo że z sekwencji aminokwasowej nie wynika w sposób oczywisty, dlaczego tak nie jest. Rodzinę kinaz PAK opisano w artykułach przeglądowych (SELLS i CHERNOFF 1997, DANIELS i BOKOCH 1999, MANSER i LIM 1999).

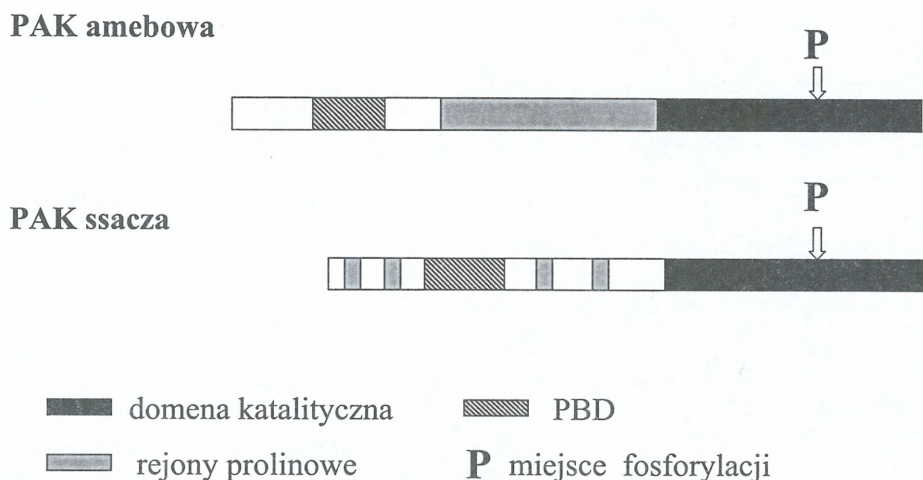
Podobnie jak w przypadku miozyn, ze względu na szybki postęp metod klonowania, rodzina PAK rośnie szybko, ale stosunkowo niewiele należących do niej kinaz zostało scharakteryzowanych na poziomie biochemicznym. Kinazy stanowią niewielki procent białek komórkowych, toteż oczyszczanie ich jest procesem żmudnym i nie zawsze uwieńczonym sukcesem, a ekspresja w układach bakteryjnych często kończy się otrzymaniem nieaktywnego lub nieregulowanego enzymu. Amebowa kinaza PAK jest dotychczas jedyną PAK, której ekspresja (w układzie bakulowirusowym) prowadzi do otrzymania w pełni regulowanego enzymu.

## UNIWERSALNE I UNIKALNE WŁAŚCIWOŚCI AMEBOWEJ PAK

Najlepiej biochemicznie scharakteryzowanymi, nieamebowymi PAK, są, bardzo podobne do siebie, ssacze kinazy PAK $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Posiadają one C-końcową domenę kinazową oraz, położoną bliżej końca N, domenę PBD odpowiedzialną za wiązanie Rac i Cdc42. Dodatkowo, ssacze PAK posiadają bardzo krótkie sekwencje bogate w proliny (Ryc. 2). Poprzez te sekwencje kinazy mogą wiązać domeny SH3 innych białek (Ryc. 2).

Porównanie sekwencji aminokwasowej PAK ameby z sekwencjami PAK ssaków wykazuje homologię domen kinazowych oraz domeny

PBD wiążącej małe białka G. Na tym podobieństwo się kończy. Pozostała część łańcucha polipeptydowego amebowej PAK nie wykazuje żadnej homologii, nie tylko ze ssaczymi PAK, ale także z żadną inną kinazą z tej rodziny. Podobnie wygląda porównanie sekwencji ssaczej PAK z izoformą PAK z *Dictyostelium*, którą, podobnie jak PAK ameby, oryginalnie wyizolowano jako kinazę fosforylującą miozyny I. Jednakże, wbrew oczekiwaniom, homologia sekwencji izoform PAK z ameby i *Dictyostelium* jest również zaskakująco niska i nie obejmuje żadnych innych rejonów poza domeną katalityczną i do-



Ryc. 2. Schematyczne porównanie PAK amebowej z PAK ssacza.

Obie kinazy posiadają homologiczne domeny katalityczne oraz domeny PBD wiążące małe białka G, będące także domenami autoinhibitorowymi. Pozostałe regiony amebowej PAK nie wykazują homologii z żadnymi znanymi białkami. Ssacza PAK posiada krótkie sekwencje prolinowe, podczas gdy cały środkowy region amebowej PAK jest bogaty w proliny. Mimo to, amebowa PAK nie posiada specyficznych sekwencji prolinowych, uważanych za istotne dla wiązania ssaczej PAK z domenami SH3 innych białek. Obie kinazy posiadają homologiczne miejsca w domenie katalitycznej, których fosforylacja (P) jest konieczna dla aktywacji. Dodatkowe (nie zaznaczone na rycinie) miejsca fosforylacji znajdują się poza domeną katalityczną. Aktywność obu PAK stymulują małe białka G, lipidy i fosforylacja.

meną PBD. Pomimo tego, specyficzność substratowa i regulacja aktywności są w wielu aspektach bardzo podobne dla wszystkich wyżej wymienionych PAK, choć różnią się w szczegółach.

Wszystkie powyższe kinazy aktywowane są przez Rac i Cdc42 oraz autofosforylację, ale aktywację amebowej PAK poprzez małe białka G odkryto dopiero po jej sklonowaniu i zauważeniu homologii do ssaczych i drożdżowych PAK. Jednym z powodów był fakt, że w przeciwieństwie do innych PAK, Rac i Cdc42 aktywują kinazę amebę jedynie w obecności kwaśnych lipidów (BRZESKA i współaut. 1999). Aktywacja amebowej PAK przez kwaśne lipidy spowodowała z kolei dokładne badania nad rolą lipidów w aktywacji ssaczej PAK. Okazało się, że, podobnie jak PAK z amebę, ssaczą PAK mogą aktywować lipidy w nieobecności białek G. Jednakże, aktywujące lipidy są różne dla obu tych kinaz. Z drugiej strony, kalmodulina i jony wapnia, które hamują aktywność kinazy amebowej (a także PAK z *Dictyostelium*), nie mają żadnego wpływu na aktywność innych enzymów z tej rodziny.

Także inne właściwości amebowej PAK okazały się być uniwersalne dla całej rodziny. Między innymi wspólny jest generalny model wewnątrzcząsteczkowej regulacji aktywności kinazowej, np. takie jego elementy, jak autoinhibicja poprzez domenę PDB i drogi prowadzące do jej zniesienia. Obecnie wiadomo też, że nie tylko amebowa, ale także inne PAK mogą być aktywowane w trwały sposób (tzn. bez pozostawania w kompleksie z innymi komponentami) poprzez autofosforylację zachodzącą w wielu miejscach. Jedno z tych miejsc zlokalizowano w domenie katalitycznej PAK amebę. Homologicznie położone, aktywujące miejsca fosforylacji znajdują się w innych PAK. Ponadto, mutacje punktowe, analiza sekwencji i modelowanie struktury trzeciorzędowej pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że obecność niefosforylowalnej treoniny położonej po N-końcowej stronie miejsca fosforylacji jest kluczowa dla aktywności nie tylko amebowej i innych PAK, ale także prawie wszystkich kinaz serynowo-treoninowych (SZCZEPANOWSKA i współaut. 1998). Hipoteza ta ciągle czeka na doświadczalne potwierdzenie dla kinaz innych, niż amebowa.

#### ROLA KINAZ PAK

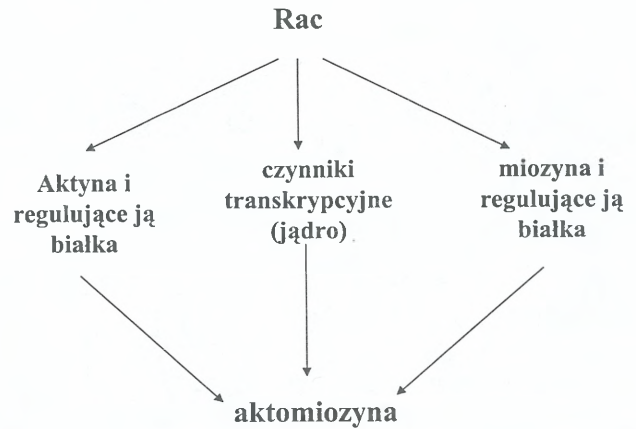
PAK z amebę i *Dictyostelium* odkryto jako kinazy fosforylujące izoformy miozyny I, PAK (STE-20) z drożdży jako białko, którego mutacja powoduje sterylność drożdży, zaś PAK ssaczę, jako białko wiążące Rac. Dopiero porównanie

pełnych sekwencji aminokwasowych pozwoliło na stwierdzenie, że wszystkie te kinazy należą do jednej rodziny i posiadają, mimo czasem stosunkowo niskiej homologii, zaskakująco zbliżone właściwości. Kinazy PAK zaangażowa-

ne są w tak różne procesy, jak apoptoza, rakowacenie komórek, wzrost komórek nerwowych, odpowiedź na stres czy podatność na infekcję HIV (DANIELS i BOKOCH 1999, MANSER i LIM 1999). Jednakże, nie oznacza to wcale, że pełnią one tę samą funkcję w różnych organizmach lub nawet w różnych tkankach tego samego organizmu. Prawdopodobnie jednak, na obecnym etapie wiedzy, można pokusić się o generalne stwierdzenie, że jedną z głównych funkcji PAK jest przekazywanie sygnałów pomiędzy małymi białkami G i cytoszkieletem aktomiozynomym.

Poszukiwanie powiązań pomiędzy komórkowym przekazywaniem sygnałów, a zmianami cytoszkieletu, jest obecnie jedną z najgorętszych dziedzin biologii komórki. Między innymi doprowadziło ono do odkrycia zupełnie nowego mechanizmu polimeryzacji aktyny podobnej, w którym białko to polimeryzowane jest w formie rozwidlających się filamentów, a proces ten regulują małe białka G (Rac i Cdc42) (patrz art. KWIATKOWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). W chwili obecnej nie ma żadnych danych doświadczalnych wskazujących na udział PAK w tym procesie, aczkolwiek miozyna I (przynajmniej w przypadku drożdży) prawdopodobnie odgrywa w nim istotną rolę. Czytelnikom zainteresowanym bogatą literaturą na temat powiązań między komórkowym przekazywaniem sygnałów, a polimeryzacją aktyny, polecam artykuły przeglądowe (HIGGS i POLLARD 1999, KAIBUCHI i współaut. 1999, OSHEROV i MAY 2000), gdyż poniżej skoncentruję się jedynie na wybranych aspektach tego zagadnienia, w których zaangażowana może być PAK.

Najogólniej rzecz biorąc, przekazywanie sygnałów pomiędzy małymi białkami G (Rac, Rho i Cdc42), których aktywacja powoduje reorganizację cytoszkieletu, może odbywać się trzema drogami (Ryc. 3). Pierwszą drogą stanowi aktywacja kaskad kinazowych, prowadząca w efekcie do aktywacji czynników transkrypcyjnych w jądrze komórkowym i syntezy białek. PAK jest prawdopodobnie zaangażowana w ten proces, gdyż fosforyluje i aktywuje kinazy będące częściami składowymi kaskady, w tym bardzo istotną kinazę Raf. Drugą drogą jest modulacja polimeryzacji aktyny. PAK może regulować polimeryzację aktyny poprzez fosforylację i aktywację kinazy LIM, która z kolei fosforyluje kofilinę, białko bezpośrednio oddziałujące z aktyną. Trzecią możliwą, i w kontekście tego artykułu najbardziej interesującą, drogą jest modulacja polimeryzacji i aktywności miozyny. O ile od paru lat wiadomo, że aktywacja Rho prowadzi do fosforylacji lekkiego łańcucha, a więc aktywacji miozyny II i mechanizm tego zjawiska jest zrozumiały, o tyle wpływ, jaki aktywacja Rac i



Ryc. 3. Trzy możliwe szlaki łączące aktywację Rac ze zmianami cytoszkieletu aktomiozynomym.

Rac należy do rodziny małych białek G i wiążąc się z PAK aktywuje tę kinazę. Szlak środkowy przedstawia aktywację przez Rac kaskady kinaz prowadzących do aktywacji czynników transkrypcyjnych i ekspresji białek. Szlak po lewej stronie przedstawia pośrednie lub bezpośrednie oddziaływanie Rac z białkami regulującymi polimeryzację aktyny, a szlak po prawej stronie oddziaływanie z białkami regulującymi aktywność lub zdolność do tworzenia filamentów miozyny. Kinaza PAK może odgrywać istotną rolę we wszystkich trzech szlakach.

Cdc42 wywiera na aktywność miozyny jest ciągle jeszcze kontrowersyjny.

W latach 80. J. Hammer ze współpracownikami ustalili, że amebowa PAK, zwana wtedy kinazą miozyny I, fosforyluje *in vitro* lekki łańcuch miozyny II z mięśni gładkich, powodując aktywację miozyny (HAMMER i współaut. 1984). Obserwacja ta była wówczas ciekawostką biochemiczną bez fizjologicznych konsekwencji, gdyż aktywność amebowej miozyny II nie jest regulowana przez fosforylację lekkiego łańcucha. Jak jednak wykazano później, aktywność niemięśniowych izoform miozyny II podlega takiej regulacji. Ponieważ w międzyczasie ustalono, że specyficzności substratowe amebowej i ssaczej PAK są bardzo zbliżone, grupa „amebowców” nie była specjalnie zdziwiona, gdy w latach 90. okazało się, że ssacza PAK fosforyluje lekki łańcuch miozyny niemięśniowych. Obserwacja ta wzmacnia hipotezę, że jedną z głównych funkcji PAK jest przekazywanie sygnałów od Rac do cytoszkieletu, poprzez modulację aktywności miozyny. Rola ta byłaby wspólna dla komórek ssaczych i ameby, choć zaangażowane miozyny są różne — miozyna I w amebie (a także *Dictyostelium* i drożdżach) i miozyna II w komórkach ssaczych. W obu przypadkach aktywacja miozyny przez PAK nie jest natomiast zależna od jonów wapnia.

Podobną ciekawostką, chwilowo bez reperkusji fizjologicznych, jest fakt, że ssacza PAK fosforyluje *in vitro* amebowe izoformy miozyny I. Ssacze miozyny I nie posiadają regulatorowe-



go miejsca fosforylacji, natomiast homologiczne miejsce ma ssacza miozyna VI. Chwilowo jednak brak jest danych doświadczalnych wskazujących na to, że miozyna VI jest substratem PAK *in vivo*, aczkolwiek jest nim *in vitro*.

Funkcja, jaką pełni PAK i mechanizm jej działania są w chwili obecnej dalekie od zrozumienia, co w dużej mierze wynika z faktu, że wyniki otrzymywane w różnych laboratoriach są często na pozór sprzeczne ze sobą, a długa lista substratów PAK daleka jest od zamknięcia. Nawet aktywacja niemięśniowej miozyny przez

PAK stoi ciągle pod znakiem zapytania, gdyż istnieją doświadczenia wskazujące na to, że aktywacja PAK prowadzi do inhibicji aktywności miozyny (poprzez oddziaływanie PAK z łańcuchem lekkiego łańcucha miozyny). Na zakończenie należy jeszcze dodać, że wiele z postulowanych funkcji PAK jest niezależnych od jej aktywności kinazowej. Oparte są one raczej na fakcie wiązania białek posiadających domeny SH3 (często występujące w białkach uczestniczących w przekazywaniu sygnałów) z bogatymi w reszty prolinowe regionami PAK.

#### PODSUMOWANIE

Zarówno badania nad rodziną niekonwencjonalnych miozyn, jak i rodziną kinaz PAK dalekie są od zakończenia. Głównym dotychczasowym wkładem grupy „amebowej” w dziedzinie wiedzy była izolacja i biochemiczna charakterystyka, a potem sklonowanie i ekspresja powyższych białek. Ameba była też jednym z pierwszych organizmów, u którego zdemontowano zaangażowanie miozyny I w transporcie organelli komórkowych (DOBERSTEIN i współaut. 1993). Ameba stanowi dobry układ do badań biochemicznych ze względu na stosunkową łatwość hodowli komórek na dużą skalę, niewyobrażalną dla np. ssaczy linii komórkowych. Pomimo tego, izolacja amebowych miozyn i kinazy to procedury wymagające spędzenia ponad tydzień czasu w chłodni w towarzystwie licznych kolumn, z których pierwsza ma objętość jednego litra, a ostatnia (trzy-nasta) jednego mililitra. Obecnie ekspresję zarówno amebowej miozyny I, jak i kinazy, prowadzi się w komórkach owadów i oczyszcza z dużo mniejszym wysiłkiem. Jednakże, charakterystyka natywnych białek jest wciąż ważnym

elementem poznawczym, pomimo możliwości ich ekspresji np. w bakteriach. Ekspresja taka bowiem często kończy się otrzymaniem białka o zmienionych właściwościach, co łatwo może pozostać niezauważone, gdyż właściwości te nie zawsze można przewidzieć na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych. Niestety, ameba jest też układem niewdzięcznym pod innymi względami; w przeciwieństwie do komórek ssaczy trudno ją bowiem transfekować w celu otrzymania kontrolowanej ekspresji, a także stosunkowo niewiele wiadomo o jej wielu komponentach, takich jak na przykład receptory błonowe czy też białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów. Dużo lepszym układem pod tym względem jest *Dictyostelium*. Ponieważ jednak nie ma układów idealnych i przeważnie dopiero kompilacja informacji pochodzących z różnych źródeł pozwala na szeroką charakterystykę zjawisk biologicznych, autorka i jej współpracownicy nie tracą nadziei, że zasłużona ameba dostarczy nam jeszcze paru niespodzianek, a w szczególności, że przyczyni się do lepszego zrozumienia dynamiki cytoskieletu.

#### AN ADVENTURE WITH AMOEBA: STRANGE MYOSINS AND KINASE

##### Summary

This paper describes myosins I and their specific kinase from *Acanthamoeba castellanii* with special emphasis on the aspects which are universal for whole families of these proteins. Myosins I from *A. castellanii* were the first unconventional myosins to be discovered and were viewed for some time as being unique to amoebae. Presently 18 classes of myosins are known among them class I is probably the most abundant, most diverse, and the best characterized on the biochemical level. Amoeba myosins I are activated by phosphorylation by myosin I heavy chain kinase. The site of phosphorylation was localized within the motor domain of three amoeba myosin I isoforms. The homology sequence analysis has shown that almost all other myosins have either phosphorylatable Ser, or Thr, or acidic residue at the homologous position. This led to a hypothesis, known as TEDS rule, which says that the presence of acidic charge at this position is required for the myosin activity. Myosin

I heavy chain kinase belongs to the family of PAK kinases and was probably the first PAK to be purified to homogeneity. Like myosins I, PAKs are found in mammals as well as in lower organisms. Despite relatively low sequence homology, amoeba PAK and mammalian PAK show striking similarities in the regulation of activity and in the substrate specificity. In both cases kinase activity is enhanced by small GTP-binding proteins, Rac and Cdc42, as well as by lipids and phosphorylation, although several differences also exist. PAKs phosphorylate and activate not only amoeba myosins I but also nonskeletal mammalian myosins II. Activation of Rac and Cdc42 leads to a dramatic rearrangement of the cell cytoskeleton by a mechanism which is not fully understood. PAK can possibly mediate these changes by multiple ways including direct and indirect activation of myosin.

## LITERATURA

- ADAMS R. J., POLLARD T. D., 1989. *Binding of myosin I to membrane lipids*. *Nature* 340, 565–568.
- ALBANESI J. P., FUJISAKI H., HAMMER J. A. III, KORN E. D., JONES R., SHEETZ M. P., 1985. *Monomeric Acanthamoeba myosins I support movement in vitro*. *J. Biol. Chem.* 260, 8649–8652.
- ALBANESI J. P., LYNCH T. J., FUJISAKI H., KORN E. D., 1986. *Regulation of the actin-activated ATPase activity of Acanthamoeba myosin I by cross-linking actin filaments*. *J. Biol. Chem.* 261, 10445–10449.
- BARYLKO B., WAGNER M. C., REIZES O., ALBANESI J. P., 1992. *Purification and characterization of a mammalian myosin I*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 490–494.
- BARYLKO B., BINNS D. D., ALBANESI J. P., 2000. *Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I*. *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 23–35.
- BRZESKA H., KORN E. D., 1996. *Regulation of Class I and Class II myosins by heavy chain phosphorylation*. (Minireview). *J. Biol. Chem.* 271, 16983–16986.
- BRZESKA H., LYNCH T. J., MARTIN B. M., KORN E. D., 1989. *The localization and sequence of the phosphorylation sites of Acanthamoeba myosins I*. *J. Biol. Chem.* 264, 19340–19348.
- BRZESKA H., LYNCH T. J., KORN E. D., 1990. *Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase is activated by phosphatidylserine-enhanced phosphorylation*. *J. Biol. Chem.* 265, 3591–3594.
- BRZESKA H., KULESZA-LIPKA D., KORN E. D. 1992. *Inhibition of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin*. *J. Biol. Chem.* 267, 23870–23875.
- BRZESKA H., SZCZEPANOWSKA J., KORN E. D., 1996. *The catalytic domain of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase: II. Expression of active catalytic domain and sequence homology to p21-activated kinase (PAK)*. *J. Biol. Chem.* 271, 27056–27062.
- BRZESKA H., YOUNG R., KNAUS U., KORN E. D., 1999. *Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full-length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 394–399.
- COLLINS J. H., BORYSENKO C. W., 1984. *The 110,000-dalton actin- and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase*. *J. Biol. Chem.* 259, 14128–14135.
- COTE G. P., ALBANESI J. P., UENO T., HAMMER J. A. III, KORN E. D., 1985. *Purification from Dictyostelium discoideum of a low-molecular-weight myosin that resembles myosin I from Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 260, 4543–4546.
- DANIELS R. H., BOKOCH G. M., 1999. *p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling?* *Trends Biochem Sci* 24, 350–355.
- DOBERSTEIN S. K., BAINES I. C., WIEGAND G., KORN E. D., POLLARD T. D., 1993. *Inhibition of contractile vacuole function in vivo by antibodies against myosin-I*. *Nature* 365, 841–843.
- FUKUI Y., LYNCH T. J., BRZESKA H., KORN E. D., 1989. *Differential localization of Dictyostelium myosin isozymes*. *Nature* 341, 328–331.
- HALL A., 1998. *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. *Science* 279, 509–514.
- HAMMER J. A. III, SELLERS J. R., KORN E. D., 1984. *Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin by Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase*. *J. Biol. Chem.* 259, 3224–3229.
- HAMMER J. A. III, JUNG G., KORN E. D., 1986. *Genetic evidence that Acanthamoeba myosin I is a true myosin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4655–4659.
- HIGGS H. N., POLLARD T. D., 1999. *Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins*. *J. Biol. Chem.* 274, 32531–32534.
- KAIBUCHI K., KURODA S., AMANO M. 1999. *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the rho family GTPases in mammalian cells*. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 459–486.
- KORN E. D., ATKINSON M. A. L., BRZESKA H., HAMMER J. A. III, JUNG G., LYNCH T. J., 1987. *Structure-function studies on Acanthamoeba myosins IA, IB, and II*. *J. Biol. Chem.* 36, 37–50.
- KORN E. D., HAMMER J. A. III, 1990. *Myosin I*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 57–61.
- LYNCH T. J., ALBANESI J. P., KORN E. D., ROBINSON E. A., BOWERS B., FUJISAKI H., 1986. *ATPase activities and actin-binding properties of subfragments of Acanthamoeba myosin IA*. *J. Biol. Chem.* 261, 17156–17162.
- MANSER E., LIM L., 1999. *Roles of PAK family kinases*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 22, 115–133.
- MARUTA H., KORN E. D., 1977. *Acanthamoeba cofactor protein is a heavy chain kinase required for actin activation of the Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of Acanthamoeba myosin I*. *J. Biol. Chem.* 252, 8329–8332.
- OSHEROV N., MAY G. S., 2000. *In vivo function of class I myosins*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 163–173.
- POLLARD T. D., KORN E. D., 1973. *Acanthamoeba myosin I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin*. *J. Biol. Chem.* 248, 4682–4690.
- SELLERS J. R., 1999. *Myosins*. Oxford University Press, Oxford.
- SELLS M. A., CHERNOFF J., 1997. *Emerging from the PAK: the p21-activated protein kinase family*. *Trends Cell Biol.* 7, 162–167.
- SOKAC A. M., BEMENT W. M., 2000. *Regulation and expression of metazoan unconventional myosins*. *Int. Rev. Cytol.* 200, 197–304.
- SZCZEPANOWSKA J., RAMAACHANDRAN U., HERRING C. J., GRUSCHUS J. M., QIN J., KORN E. D., BRZESKA H., 1998. *Effect of mutating the regulatory phosphoserine and conserved threonine on the activity of the expressed catalytic domain of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4146–4151.