

JOANNA MORACZEWSKA

*Akademia Bydgoska im. K. Wielkiego, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska
Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz*

e-mail: moraczjo@ab-byd.edu.pl

*Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

TROPOMIOZYNA — BIAŁKO REGULATOROWE FILAMENTÓW AKTYNOWYCH

Cykliczne oddziaływania aktyny z miozyną oraz dynamiczna polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych leżą u podstaw tak różnych procesów, jak skurcz komórek mięśniowych, cytokineza, przemieszczanie się komórek ameboidalnych, fagocytoza czy transport pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Procesy

te podlegają precyzyjnej regulacji przy udziale licznych białek wiążących aktynę. Tropomiozyna (TM) należy do grupy białek regulujących, ściśle związanych z filamentami aktynowymi (zwanymi też filamentami cienkimi w komórkach mięśniowych, mikrofilamentami w pozostałych komórkach, lub F-aktyna).

STRUKTURA TROPOMIOZYNY

TM została odkryta w 1948 r. przez Bailey'a w komórkach mięśni szkieletowych (BAILEY 1948). Do dziś zidentyfikowano kilkanaście izoform tego białka, występujących nie tylko w mięśniach, ale praktycznie we wszystkich badanych pod tym kątem komórkach eukariotycznych (LEES-MILLER i HELFMAN 1991). Izoformy TM są do siebie bardzo zbliżone pod względem budowy. Są to dimery utworzone z α -helikalnych łańcuchów, które na prawie całej swej długości spletają się w strukturę superhelisy (HITCHCOCK-DeGREGORI 1994). Do niedawna sądzono, że N- i C-końcowe części cząsteczki TM są nieustrukturyzowane, jednak — jak wykazały badania z zastosowaniem spektroskopii NMR nad syntetycznym peptydem odpowiadającym dziewięciu N-końcowym resztom aminokwasowym TM α — również ten odcinek cząsteczki tworzy typową superhelisę (GREENFIELD i współaut. 1998). Cechą charakterystyczną TM są powtórzenia odcinków siedmiu reszt aminokwasowych, z których pierwsza i czwarta są silnie hydrofobowe. W α -helikalnie zwiniętym

łańcuchu polipeptydowym hydrofobowe reszty tworzą płaszczyznę oddziaływań pomiędzy dwoma łańcuchami tropomiozyny i silnie stabilizują superhelisę (GREENFIELD i HITCHCOCK-DEGREGORI 1995).

Cząsteczki TM układają się jako dwa sznury wzdłuż filamentu aktynowego (Ryc. 1). Powtórzenia sekwencji wzdłuż cząsteczki TM odpowiadają periodycznie rozmieszczonym miejscom wiązania TM z aktyną. Zależnie od długości, każda cząsteczka TM oddziałuje z sześcioma lub siedmioma podjednostkami aktyny, a w komórkach drożdży występują izoformy tropomiozyny, których długość odpowiada czterem lub pięciu podjednostkom aktyny (HITCHCOCK-DeGREGORI 1994). Pomiędzy sąsiadującymi cząsteczkami TM zachodzi kontakt typu „głowa-ogon”, przy czym C-końcowy fragment jednej cząsteczki tworzy „zakładkę” z N-końcowym odcinkiem następczej. Z analiz strukturalnych wynika, że zakładkę tworzą odcinki dziewięciu reszt aminokwasowych z każdego końca (PHILIPS i współaut. 1979).

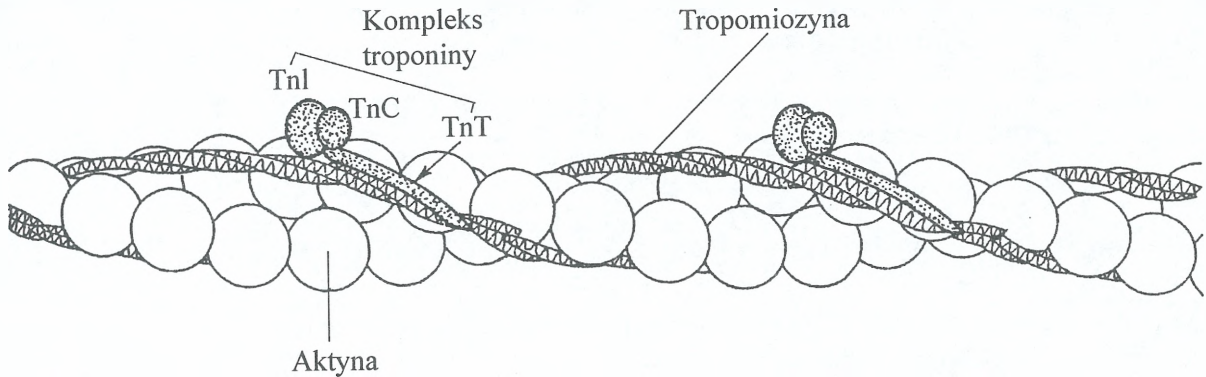
GENETYCZNE PODSTAWY RÓŻNORODNOŚCI TROPOMIOZYN

Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych łańcucha polipeptydowego TM oraz se-

kwencji nukleotydów genów TM z mięśni szkieletowych, gładkich, mięśni serca i wielu komó-

rek niemięśniowych wykazuje, że białka te są silnie konserwatywne. Zróżnicowanie wśród tropomiozyn jest pochodną istnienia kilku genów kodujących to białko, alternatywnego składowania eksonów oraz wyboru alternatywnego promotora. U zwierząt kręgowych tropomiozyny są kodowane przez cztery geny: α , β , *TPM3* (zwany też γ lub *hTMnm*) oraz *TPM4* (zwany

dla TM z mięśni gładkich, podczas gdy *2b* występuje we wszystkich pozostałych izoformach TM. Ekson *6a* jest rzadszy niż *6b* i ulega ekspresji tylko w dwóch formach TM niemięśniowej — TM-3 i TM-5b z fibroblastów. Największa zmienność sekwencji występuje na końcu C, który jest kodowany przez cztery alternatywne eksony. Ekson *9a* jest specyficzny dla komórek



Ryc. 1. Schemat budowy filamentu cienkiego z mięśni poprzecznie prążkowanych.

również genem δ (Ryc. 2A). Nie wyjaśniono do końca, czy wszystkie zwierzęta posiadają pełen zestaw genów (LEES-MILLER i HELFMAN 1991). Największa liczba izoform, co najmniej dziewięć, jest generowana przez gen α (Ryc. 2B). Istnienie dwóch alternatywnych promotorów w obrębie tego genu prowadzi do powstania (np. w fibroblastach, w komórkach nabłonka i mózgu) izoform ciężkich, zawierających 284 reszty aminokwasowych, bądź lekkich — o długości 248 reszt. W izoformach ciężkich koniec N cząsteczki jest kodowany przez ekson *1a*. W izoformach lekkich N-końcowy rejon kodowany przez eksony *1a* i *2* jest zastępowany sekwencją kodowaną przez ekson *1b*. Alternatywne składowanie eksonów prowadzi do dalszego zróżnicowania izoform, które oprócz zmiennych końców N, różnią się między sobą sekwencjami C-końcowymi kodowanymi przez ekson *9* oraz dwoma sekwencjami wewnętrznymi kodowanymi przez eksony *2* i *6*. Zarówno ekson *2*, jak i *6* występują w dwóch wariantach. Ekson *2a* jest specyficzny

mięśni. Podobna specyficzność dotyczy eksonów *9b* i *9c*, które ulegają ekspresji tylko w mózgu. Natomiast ekson *9d* koduje sekwencję konstytutywną typową dla izoformy TM z mięśni gładkich i dla wielu izoform niemięśniowych (PITTENGER i współaut. 1994).

W porównaniu z genem α pozostałe trzy geny są mniej skomplikowane. Gen β koduje dwie izoformy ciężkiej TM, które ulegają ekspresji w mięśniach szkieletowych oraz gładkich i w komórkach niemięśniowych (PITTENGER i współaut. 1994).

Produktami genu *TPM3* są następujące izoformy: ciężka, z tzw. wolnych mięśni szkieletowych, która u człowieka ulega też ekspresji w mięśniu sercowym, lekka, wytwarzana w fibroblastach (LIN i współaut. 1997), oraz wykryte niedawno izoformy specyficzne dla komórek nerwowych (GUNNING i współaut. 1998).

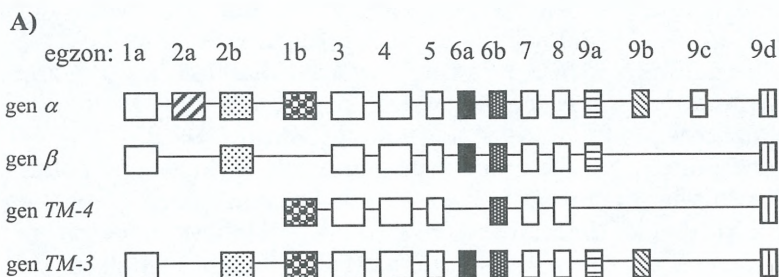
Gen *TPM4* koduje jedną izoformę lekkiej tropomiozyny niemięśniowej (LEES-MILLER i HELFMAN 1991, PITTENGER i współaut. 1994).

POWINOWACTWO IZOFORM TM DO AKTYNY

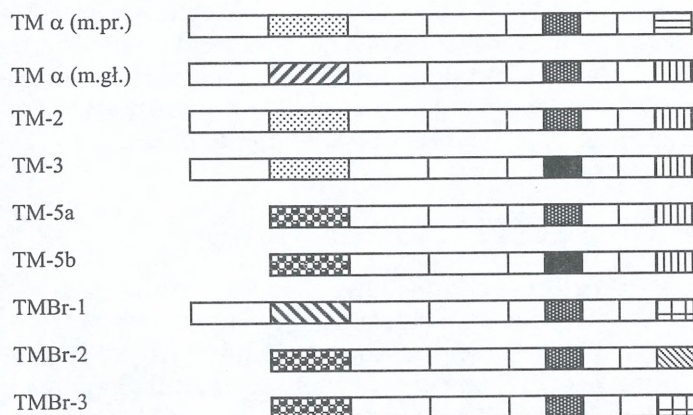
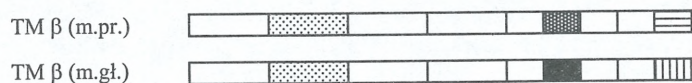
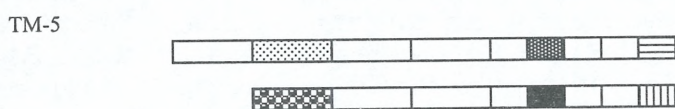
Wspólną cechą tropomiozyn jest kooperatywne wiązanie z aktyną, choć izoformy izolowane z różnych źródeł różnią się znacznie powinowactwem do aktyny. Wielu informacji na ten temat dostarczyły badania poszczególnych izoform TM wytwarzanych w bakterii przy użyciu techniki rekombinacji DNA. To podejście pozwoliło na otrzymanie czystych izoform TM,

co w przypadku tropomiozyn izolowanych z tkanek nie zawsze jest możliwe ze względu na trudności w rozdzielaniu licznych naturalnie występujących izoform, często tworzących trudne do rozdzielania heterodimery.

Jak wynika z tych badań, główną rolę w definiowaniu powinowactwa TM do aktyny ma struktura końców N i C tropomiozyny. Bardzo



B)

tropomiozyny kodowane przez gen α :tropomiozyny kodowane przez gen β :tropomiozyny kodowane przez gen *TPM-3*:TM-4 tropomiozyna kodowana przez gen *TPM-4*:

Ryc. 2. A) Schemat budowy genów kodujących tropomiozynę u kręgowców. Eksony przedstawiono jako prostokąty, a introny jako linie łączące prostokąty. Prostokąty wypełnione odmiennymi wzorami reprezentują alternatywne eksony. B) Schemat budowy izoform tropomiozyny. Prostokąty reprezentują rejony cząsteczki kodowane przez alternatywne eksony. Wzór wypełniający prostokąt odpowiada rodzajowi kodującego eksonu. (Wg PITTENGERA i współaut. 1994).

istotna dla wiązania aktyny jest acetylacja N-końcowej reszty metioniny (HITCHCOCK-DEGGREGORI 1994). Tropomiozyny wytwarzane w komórkach bakteryjnych nie ulegają acetylacji. Otrzymywana w bakteriach TM mięśni szkieletowych, w porównaniu z jej odpowiednikiem izolowanym z mięśni, wiąże się z aktyną około 50 razy słabiej (MORACZEWSKA i współaut. 1999). Acetylacja końca N znacząco zwiększa asocjacje z aktyną niemięśniowej TM-1, która

jest produktem genu β , ale ma niewielki wpływ na drugi produkt tego genu — szkieletową formę TM β . Sekwencja końców N obu tych izoform jest taka sama, ale różnią się one sekwencją końca C i wewnętrznego rejonu cząsteczki (PITTENGER i współaut. 1995). Sugeruje to, że dla osiągnięcia wysokiego powinowactwa do aktyny konieczne jest współdziałanie obu końców sąsiadujących cząsteczek.

O kluczowej roli N-końcowego regionu TM α w wiązaniu tego białka z aktyną świadczy fakt, że delecja dziewięciu pierwszych reszt aminokwasowych powoduje całkowitą utratę zdolności TM do wiązania aktyny. Silny wpływ ma również usunięcie C-końcowej części cząsteczki, jednak, w przeciwieństwie do delekcji końca N, dodanie troponiny (Tn) częściowo przywraca wiązanie tak zmutowanej cząsteczki z aktyną. Wśród tropomiozyn kodowanych przez gen α wyższym powinowactwem do aktyny charakteryzują się te formy, których C-końcowa część cząsteczki jest kodowana przez ekson 9d (TM mięśni gładkich, liczne TM niemięśniowe), niż TM mięśni szkieletowych o końcu C kodowanym przez ekson 9a. Tropomiozyny krótkie, w których N-końcowa sekwencja jest kodowana przez ekson 1b, wiążą się silniej z aktyną niż ich

długie odpowiedniki. Wyjątkiem są tropomiozyny mózgowe, w których C-końcowa sekwencja kodowana jest przez ekson 9c. Zamiana sekwencji 1a na 1b w tych białkach nie ma znaczącego wpływu na powinowactwo TM do aktyny (MORACZEWSKA i współaut. 1999).

Różnice w powinowactwie do aktyny pomiędzy izoformami kodowanymi przez geny β są definiowane przez sekwencje C-końcowego regionu cząsteczki. TM β z mięśni szkieletowych wiąże się około cztery razy silniej z aktyną, niż TM-1 z fibroblastów. Chimera skonstruowana przez zamianę końcowego eksonu 11 w cDNA dla TM-1 na ekson 10, specyficzny dla TM β mięśni szkieletowych, prowadzi do powstania cząsteczki, która wiąże się z aktyną z powinowactwem zbliżonym do TM β mięśni szkieletowych (PITTINGER i współaut. 1995).

TKANKOWA SPECYFICZNOŚĆ EKSPRESJI IZOFORM TM

Różne typy komórek charakteryzują się specyficznym wzorem ekspresji izoform TM. W mięśniach poprzecznie prążkowanych i gładkich występują ciężkie izoformy tropomiozyny tworzące homo- i heterodimery. W mięśniach szkieletowych szybkich, odpowiedzialnych między innymi za ruchy kończyn, wytwarzane są TM α i TM β , w stosunku 2,5:1 (PIEPLES i WIECZOREK 2000), zatem w komórkach tego typu TM występuje w postaci homodimeru α/α i heterodimeru α/β . W mięśniach gładkich heterodimery również powstają z jednego polipeptydu typu α i jednego typu β , specyficznych dla tych mięśni. Funkcjonalne znaczenie takich połączeń sugerują wyniki badań nad właściwościami TM α i β z mięśni gładkich, według których heterodimery α/β wiążą się silniej z aktyną, niż homodimery α/α i β/β (JANSKO i GRACEFFA 1991). W mięśniach szkieletowych typu wolnego, odpowiedzialnych za utrzymywanie postawy ciała, oprócz izoform α i β wytwarzana jest izoforma TPM3, która stanowi około 1/3 całkowitej ilości tropomiozyny (PIEPLES i WIECZOREK 2000). Jej funkcja nie została dokładnie poznana, ale o istotnym znaczeniu tej izoformy świadczy fakt, że u człowieka punktowa mutacja w N-końcowej części cząsteczki TPM3 jest odpowiedzialna za powstanie miopatii nemalinowej, dziedzicznej choroby objawiającej się m.in. osłabieniem zdolności motorycznych osób dotkniętych tym schorzeniem.

W mięśniu sercowym dużych ssaków formą dominującą jest TM α (LEWIS i SMILLIE 1980),

podczas gdy u małych ssaków formy α i β występują w przybliżeniu w równych ilościach (TOBACMAN 1996). Badania na myszach transgenicznych dały pewne pojęcie o funkcjonalnych różnicach pomiędzy tymi formami TM. Nadprodukcja TM β u tych zwierząt powodowała zwiększoną wrażliwość mięśnia sercowego na stężenie jonów wapnia i zmniejszony stopień skurczu i relaksacji (WOLSKA i współaut. 1999).

W komórkach fibroblastów wytwarzanych jest co najmniej 8 izoform TM, które u małych ssaków tworzą w większości homodimery. *In vitro* wiązanie niemięśniowej TM-1 (produktu genu β) z aktyną zwiększało się w obecności TM-2 i TM-3, które są produktami genu α (PITTINGER i współaut. 1995). Doświadczenia *in vivo* na kardiomiocytach szczurów poddanych transfekcji wektorem zawierającym cDNA tropomiozyny wykazały, że izoforma lekka TM-4, która jest produktem genu γ jest zdolna do wiązania z sarkomerami tylko wspólnie z innymi lekkimi izoformami TM. Efektu tego nie obserwowano, gdy komórki poddawano kotransfekcji DNA TM-4 i ciężkiej izoformy α szkieletowej (HELPMAN i współaut. 1999). Powyższe dane wskazują na synergiczne działanie niektórych izoform TM, polegające prawdopodobnie na tworzeniu heterodimerów lub na oddziaływaniach „głowa-ogon” pomiędzy różnymi izoformami wzdłuż tego samego filamentu aktynowego.

FUNKCJE TROPOMIOZYNY

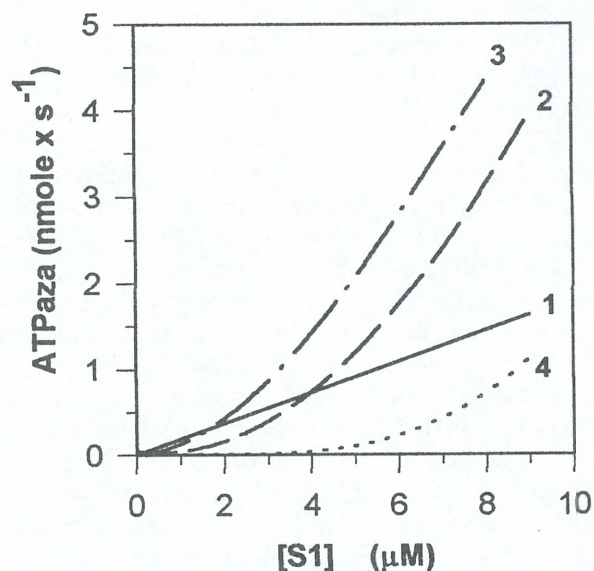
REGULACJA ODDZIAŁYWAŃ AKTYNA-MIOZYNA

Funkcje TM najlepiej poznano w komórkach mięśniowych, w których TM reguluje oddziaływanie pomiędzy aktyną i miozyną. W mięśniach poprzecznie prążkowanych każda cząsteczka TM jest związana z kompleksem troponiny (Tn), na który składają się: wiążąca wapń Tn-C, inhibitorowa podjednostka Tn-I oraz wiążąca tropomiozynę podjednostka Tn-T (Ryc. 1). Wydłużona cząsteczka Tn-T tworzy rodzaj mostka pomiędzy tropomiozynami, wiążąc się z C- i N-końcowymi fragmentami sąsiadujących cząsteczek. Obecność Tn nadaje układowi regulacji filamentu cienkiego wrażliwość na jony wapnia (ZOT i POTTER 1987). Wiązanie jonów wapnia do Tn-C powoduje przesunięcie TM na filamencie aktynowym i częściowe odsłonięcie miejsc wiązania główek miozyny do aktyny. W pozbawionych Tn mięśniach gładkich i komórkach niemięśniowych funkcjonują dwa zależne od wapnia białka kontrolujące oddziaływanie aktyny z miozyną — kaldesmon, związany z filamentem aktynowym, i kinaza lekkich łańcuchów miozyny (ADELSTEIN i EISENBERG 1980, YAMASHIRO-MATSUMURA i MATSUMURA 1988).

Jedną z metod analizy cyklicznych oddziaływań aktyny z miozyną *in vitro* jest pomiar aktywności ATPazy aktomiozynowej. W obecności TM interakcje aktyna-miozyna przybierają charakter kooperatywny. TM wyizolowana z mięśni szkieletowych reguluje aktywność ATPazy aktomiozynowej w dwojaki sposób: aktywność ATPazy jest hamowana przy niskim stosunku molowym miozyny do aktyny, a zwiększana przy wysokich stężeniach miozyny w stosunku do aktyny (LEHRER i MORRIS 1982). Obecność Tn wzmaga podwójną regulatorową właściwość TM. W nieobecności jonów wapnia zaznacza się silniejszy wpływ hamujący, podczas gdy wiązanie Ca^{2+} przez Tn powoduje silniejszą, w porównaniu z samą TM, aktywację ATPazy aktomiozynowej (Ryc. 3). Nieco odmiennie zachowuje się TM z mięśni gładkich, która nawet przy niskich stężeniach miozyny aktywuje ATPazę powyżej wartości osiąganej dla nieuregulowanej aktyny w tych samych warunkach (MARSTON i REDWOOD 1992). Różnicę w regulacji aktywności aktomiozyny zaobserwowano też dla dwóch tropomiozyn niemięśniowych, TM lekkiej (TM-5) i ciężkiej (TM-3). TM-5 aktywowała ATPazę 5-krotnie silniej (NOVY i współaut. 1993). Podobną stymulację aktywności ATPazy

przez lekką TM obserwowano przy porównaniu właściwości tropomiozyny lekkiej, pochodzącej z *Xenopus*, i ciężkich izoform kurzej TM mięśniowej i niemięśniowej (FANNING i współaut. 1994).

Dodatkowe zróżnicowanie właściwości izoform TM polega na tym, że o rodzaju regulacji decyduje nie tylko typ TM, ale również rodzaj miozyny. TM mięśni szkieletowych stymuluje



Ryc. 3. Regulacja aktywności ATPazy aktomiozynowej przez tropomiozynę.

Przy stałym stężeniu aktyny (1) aktywność ATPazy jest liniową funkcją stężenia miozyny. W obecności TM na filamencie aktynowym (2) proces ten staje się kooperatywny. Tn w obecności Ca^{2+} (3) zwiększa aktywację, a w nieobecności Ca^{2+} (4) hamowanie ATPazy (LEHRER i MORRIS 1982).

aktywność ATPazy miozyny wyizolowanej z mięśni gładkich w warunkach, w których hamuje aktywność miozyny szkieletowej (BREMEL i współaut. 1973, EATON i współaut. 1975). Wspomniana TM *Xenopus* hamuje aktywność jednogłówkowej miozyny wyizolowanej z kosmków jelitowych, ale działa przeciwnie w stosunku do jednogłówkowego fragmentu proteolitycznego miozyny szkieletowej (FANNING i współaut. 1994). Fakt, że w komórkach eukariotycznych ulegają ekspresji liczne izoformy TM oraz białek motorycznych z rodziny miozyn, skłania do przypuszczenia, że w toku ewolucji niektóre izoformy TM zostały przystosowane do wybiórczej regulacji aktywności różnych izoform miozyny.

STABILIZACJA FILAMENTÓW AKTYNOWYCH PRZEZ
TROPOMIOZYNE

Obserwacje mikroskopowe wykazują, że TM zwiększa sztywność filamentów aktynowych (KAWAMURA i MARUYAMA 1970). Stabilizacja F-aktyny przejawia się też w zmniejszonej szybkości oddysocjowywania podjednostek aktyny z końców filamentu (LIN i współaut. 1997). Wiążąc się z filamentami aktynowymi, TM modyfikuje działanie białek wiążących aktyne, które regulują polimeryzację i depolimeryzację, tworzenie wiązek i sieci aktyny w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, przez co wpływają na dynamikę aktyny istotną dla strukturalnej integralności i ruchliwości komórkowej (LIN i współaut. 1997).

TM chroni F-aktynę przed działaniem żelzolini, wiliny, kofiliny, czynnika depolimeryzującego aktynę (ang. actin depolymerizing factor, ADF) i filaminy (LIN i współaut. 1997). Żelzolina i wilina należą do rodziny białek, które w sposób zależny od Ca^{2+} i fosforanów fosfatydyloinozytoli przecinają filaminy aktynowe i zakrywają ich szybko rosnące końce, przez co generują dużą ilość krótkich filamentów i zapobiegają ich elonacji. Wilina dodatkowo wykazuje zdolność tworzenia wiązek F-aktyny, która pojawia się przy niskim stężeniu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (FRIEDERICH i LOUARD 1999, YIN 1999). Izoformy TM różnią się stopniem ochrony aktyny przed działaniem wspomnianych białek. TM niemięśniowa wyizolowana z płytek krwi nie różni się pod tym względem od TM z mięśni, podczas gdy izoforma mózgowa wykazuje zdecydowanie słabsze działanie ochronne (LIN i współaut. 1997).

Białka należące do rodziny filaminy organizują filaminy aktynowe w ortogonalne sieci lub, przy wyższym stosunku molowym do aktyny, w wiązki (HOCK 1999). Tropomiozyny z mięśni szkieletowych i gładkich współzawodniczą z filaminą i ABP-120, innym białkiem tej rodziny, o miejsca wiązania do aktyny. TM mózgowa słabiej niż TM z mięśni szkieletowych zapobiega wiązaniu z aktyną białek sieciujących — filaminy i ABP (LIN i współaut. 1997). Słaby wpływ TM mózgowej na oddziaływanie aktyny z białkami wiążącymi przypisuje się niskiej stałej powinowactwa tej izoformy TM do aktyny. Ekspresja TM o takich właściwościach w komórkach mózgu może być przejawem adaptacji do specyficznych funkcji mózgu, dla których istotna jest plastyczność tkanki nerwowej.

Siec filamentów aktynowych odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu kształtu komórek i tworzeniu struktur cytoplazmatycznych, bez

których komórki nie mogłyby realizować swoich funkcji życiowych. Badania na komórkach nowotworowych ujawniły, że poziom ekspresji długich izoform TM jest w nich znacznie obniżony. Wprowadzenie do tych komórek oczyszczonej TM, bądź przywrócenie ekspresji TM, zmniejsza inwazyjność i częściowo przywraca kształt właściwy zdrowym komórkom (LIN i współaut. 1997). Doświadczenia te pośrednio wskazują na udział TM w regulacji kształtu komórki, jej przylegania do podłoża i ruchliwości.

UDZIAŁ TROPOMIOZYNY W CYTOKINEZIE

Tropomiozyna jest jednym z białek uczestniczącym w procesie cytokinezy (ROBINSON i SPUDICH 2000). TM drożdżowa bierze udział w tworzeniu pierścienia podziałowego. W komórkach kręgowców w pierścieniu podziałowym zlokalizowano izoformy TM-4 i TM-5 (LIN i współaut. 1997). Na istotną rolę specyficznych izoform w procesie podziału komórkowego wskazują doświadczenia na fibroblastach poddanych transfekcji genem kodującym chimeryczne TM5/2 i TM5/3, w których koniec C cząsteczki pochodził od izoform odpowiednio TM-2 i TM-3. Tak zmienione komórki wykazywały zwiększony poziom błędów w podziałach, mimo że TM chimeryczne wiążą się silnie z aktyną (WARREN i współaut. 1995). Specyficzny wpływ TM-5 na cytokinezę może polegać na precyzyjnej regulacji oddziaływań aktyny z miozyna II, bądź innymi białkami biorącymi udział w podziałach komórkowych.

ROLA TM W TRANSPORCIE PĘCHERZYKÓW
WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Transport organelli wewnątrzkomórkowych odbywa się przy udziale mikrotubul i filamentów cienkich. Uważa się, że transport na dalsze odległości odbywa się wzdłuż mikrotubul, natomiast filaminy aktynowe służą jako lokalne szlaki transportowe organelli (LANGFORD 1995). Mikroiniekcja oczyszczonych izoform, ciężkiej TM-3 i lekkiej TM-5, do komórek nabłonkowych nerki szczura pozwoliła zaobserwować, że mają one różny wpływ na dystrybucję mitochondriów i lizosomów. TM-5 nie wpływała na rozmieszczenie organelli, zaś nadmiar TM-3 w komórce stymulował transport wsteczny, w wyniku którego organelle gromadziły się w okolicy okolicy drowej. Jednocześnie z ruchem organelli obserwowano przemieszczenie miozyny I i dyneiny w pobliżu jądra, co sugeruje, że organelle przesuwają się zarówno wzdłuż filamentów aktyno-

wych, jak i mikrotubul (PELHAM i współaut. 1996).

Specyficzny udział izoform TM w transporcie obserwowano również u drożdży. Delecja genu kodującego ciężką TPM1 sprawiała, że pęcherzyki wydzielnicze ulegały akumulacji w komórce. Podobny fenotyp uzyskano mutując gen MYO2 (niekonwencjonalnej miozyny V). Po-

łączenie obu mutacji było letalne, co wskazuje na czynny udział obu białek w mechanizmie transportu wewnątrzkomórkowego. Specyficzną rolę TPM1 w tym procesie podkreśla fakt, że mutacje w genie lekkiej izoformy TPM2 nie wpływały na transport pęcherzyków (LIN i współaut. 1997).

TROPOMYOSIN — A REGULATORY PROTEIN OF ACTIN FILAMENTS

Summary

Interactions between actin and myosin as well as dynamic polymerization-depolymerization of actin filaments are the mechanisms of contraction and several motility functions of various cells. Tropomyosin (TM) is a regulatory protein associated with actin filaments and is involved in regulation of the above mentioned processes. Elongated TM molecules polymerize head-to-tail along both grooves of the actin filament. The diversity among TM isoforms is a consequence of the presence of different genes (four in vertebrates), alternative promoter selection, and alternative splicing of gene transcripts. Tropomyosins can be divided into two classes: of high and low molecular weight isoforms. The former are 284-amino acid long and the latter are

248-amino acid long. Although different in sequence, all TM molecules exist as homo- or heterodimers forming a coiled-coil. Most of the characterized TMs bind cooperatively to actin, however the isoforms differ in their actin affinity. These differences can be ascribed to differing sequences of specific regions, mostly of TM's ends. The affinity with which TM binds to actin is thought to be one of the mechanisms of actin filament stabilization and regulation of actin interactions with other proteins. TM is involved in regulation of such cellular functions as muscle contraction, cytokinesis, intracellular vesicle transport, fagocytosis, maintaining of cell shape, and ameboidal cell movement.

LITERATURA

- ADELSTEIN R. S., EISENBERG G., 1980. *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction*. Annu. Rev. Biochem. 49, 921-956.
- BAILEY K., 1948. *Tropomyosin: A new symmetric protein component of the muscle fibril*. Biochem. J. 43, 271-279.
- BREMEL R. D., MURRAY J. M., WEBER A., 1973. *Manifestations of cooperative behaviour in the regulated actin filament during actin-activated ATP hydrolysis in the presence of calcium*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 267-275.
- EATON B. L., KOMMINZ D. R., EISENBERG E., 1975. *Correlation between the inhibition of the acto-heavy meromyosin ATPase and the binding of tropomyosin to F-actin: effects of Mg⁺⁺, KCl, troponin I, and troponin C*. Biochemistry 14, 2718-2724.
- MANNING A. S., WOLENSKI J. S., MOOSEKER M. S., IZANT J. G., 1994. *Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanohemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms*. Cell Motil. Cytoskeleton 29, 29-45.
- FRIEDERICH E., LOUARD D., 1999. *Villin*. [W:] KREIS T., VALE R. (red.). *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. Oxford University Press, Oxford, 175-179.
- GREENFIELD N. J., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 1995. *The stability of tropomyosin, a two-stranded coiled-coil protein, is primarily a function of the hydrophobicity of residues at the helix-helix interface*. Biochemistry 34, 16797-16805.
- GREENFIELD N. J., MONTELIONE G. T., FARID R. S., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 1998. *The structure of the N-terminus of striated muscle alpha-tropomyosin in a chimeric peptide: nuclear magnetic resonance structure and circular dichroism studies*. Biochemistry 37, 7834-7843.
- GUNNING P., HARDEMAN E., JEFFREY P., WEINBERGER R., 1998. *Creating intracellular structural domains: spatial segregation of actin and tropomyosin isoforms in neurons*. Bioassays 20, 892-900.
- HELDFMAN D. M., BERTHIER C., GROSSMAN J., LEU M., EHLEH E., E. P., PERRIARD J.-C., 1999. *Nonmuscle tropomyosin-4 requires coexpression with other low molecular weight isoforms binding to thin filaments in cardiomyocytes*. J. Cell Sci. 112, 371-380.
- HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 1994. *Structural requirements of tropomyosin for binding to filamentous actin*. Adv. Exp. Med. Biol. 358, 85-96.
- HOCK R., 1999. *Filamin*. [W:] *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. KREIS T., VALE R. (red.). Oxford University Press, Oxford, 94-97.
- JANSCO A., GRACEFFA P., 1991. *Smooth muscle tropomyosin coiled-coil dimers. Subunit composition, assembly and end-to-end interaction*. J. Biol. Chem. 266, 5891-5897.
- KAWAMURA M., MARUYAMA K., 1970. *Electron microscopic particle length of F-actin polymerized in Vitro*. J. Biochem. (Tokyo) 67, 437-457.
- LANGFORD G. M., 1995. *Actin- and microtubule-dependent organelle motors: Interrelationships between the two motility systems*. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 82-88.
- LEES-MILLER J. P., HELDFMAN D. M., 1991. *The molecular basis for tropomyosin isoform diversity*. Bioessays 13, 429-37.
- LEHRER S. S., MORRIS E. P., 1982. *Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase*. J. Biol. Chem. 257, 8073-8080.
- LEWIS W. G., SMILLIE L. B., 1980. *The amino acid sequence of rabbit cardiac tropomyosin*. J. Biol. Chem. 255, 6854-6859.
- LIN J. J.-C., WARREN K. S., WAMBOLDT D. D., WANG T., LIN J. L. -C., 1997. *Tropomyosin isoforms in nonmuscle cells*. Int. Rev. Cytol. 170, 1-38.
- MARSTON S. B., REDWOOD C. S., 1992. *Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin ATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon*. J. Biol. Chem. 261, 16796-16800.
- MORACZEWSKA J., NICHOLSON-FLITNN K., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., 1999. *The ends of tropomyosin are major determinants of actin affinity and myosin subfragment1-in-*

- duced binding to F-actin in the open state. *Biochemistry* 38, 15885-15892.
- NOVY R. E., SELLERS J.R., LIU L. F., LIN J. J., 1993. *In vitro* functional characterization of bacterially expressed human fibroblast tropomyosin isoforms and their chimeric mutants. *Cell Motil. Cytoskeleton* 26, 248-61.
- PELHAM R. J. J., LIN J., J. -C., WANG Y. -L., 1996. A high molecular mass non-muscle tropomyosin isoform stimulates retrograde organelle transport. *J. Cell Sci.* 109, 981-989.
- PHILLIPS G. N., JR., LATTMAN E.E., CUMMINS P., LEE K.Y., COHEN C., 1979. Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin. *Nature* 278, 413-417.
- PIEPLES K., WIECZOREK D. F., 2000. Tropomyosin 3 increases striated muscle isoform diversity. *Biochemistry* 39, 8291-8297.
- PITTINGER M. F., KAZZAZ J. A., HELFMAN D. M., 1994. Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 96-104.
- PITTINGER M. F., KISTLER A., HELFMAN D. M., 1995. Alternatively spliced exons of the β tropomyosin gene exhibit different affinities for F-actin and effects with nonmuscle caldesmon. *J. Cell Sci.* 108, 3253-3265.
- ROBINSON D. N., SPUDICH J. A., 2000. Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell. Biol.* 10, 228-236.
- TOBACMAN L.S., 1996. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 447-81.
- WARREN K. S., LIN J.L. -C., MCDERMOTT J. P., LIN J. J. -C., 1995. Forced expression of chimeric human fibroblast tropomyosin mutants affects cytokinesis. *J. Cell Biol.* 38, 245-253.
- WOLSKA B. M., KELLER R. S., EVANS C. C., PALMITER K.A., PHILLIPS R. M., MATHUCHAMY M., OEHLenschLAGER J., WIECZOREK D.F., DE TOMBE P.P., SOLARO R. J., 1999. Correlation between myofilament response to Ca^{2+} and altered dynamics of contraction and relaxation in transgenic cardiac cells that express beta-tropomyosin. *Circ. Res.* 84, 745-751.
- YAMASHIRO-MATSUMURA S., MATSUMURA F., 1988. Characterisation of 83-kilodalton nonmuscle caldesmon from cultured rat cells: stimulation of actin binding of non-muscle tropomyosin and periodic localization along microfilaments like tropomyosins. *J. Cell Biol.* 106, 1973-1983.
- YIN H., 1999. Gelsolin. [W:] KREIS T., VALE R. (red.). *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. Oxford University Press, Oxford, 99-102.
- ZOT A.S., POTTER J.D., 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16, 535-559.