

ROBERT MAKUCH

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: robma@nencki.gov.pl

RODZINA TROPOMODULIN

Dynamikę cytoszkieletu aktynowego reguluje w komórkach szereg białek wiążących aktyne, które posiadają różne właściwości. Są to białka oddziałujące z monomerami aktynowymi, wiążące się wzdłuż filamentów i indukujące tworzenie ich wiązek lub sieci, blokujące końce filamentów, fragmentujące filamenty, regulujące ich oddziaływanie z zależnymi od aktyny białkami motorycznymi — miozynami, czy wreszcie same miozyny. Przykłady funkcjonalnych grup białek wiążących aktyne można mnożyć, białek takich znamy już obecnie kilkaset, i z

wieloma z nich Czytelnik ma okazję zapoznać się w trakcie lektury tego zeszytu monograficznego. Spośród wszystkich tych białek, tylko kilka wykazuje zdolność do oddziaływania z „wolno rosnącymi” końcami polarnych filamentów aktynowych. Są one do siebie na tyle podobne, że zaliczamy je do jednej rodziny białkowej — rodziny tropomodulin. Obecnie jednak nie wiemy, czy wszystkie białka z tej rodziny cechuje taka aktywność. Artykuł ten poświęcony jest najważniejszym, zdaniem autora, informacjom dotyczącym rodziny tropomodulin.

TROPOMODULINY KRĘGOWCÓW

IZOFORMY I TKANKOWA SPECYFICZNOŚĆ ICH EKSPRESJI

Tropomoduliny kręgowców obejmują co najmniej sześć grup gatunkowych izoform białek o zbliżonych właściwościach, ale ściśle zdefiniowanym występowaniu tkankowym lub wewnątrzkomórkowym, a zatem pełniących odrębne, choć podobne funkcje. Każdą z tych izoform koduje odrębny gen. Ze względu na strukturę, białka te można podzielić na dwie grupy: tropomoduliny „właściwe”, o masach cząsteczkowych wynoszących około 40 kDa, oraz leiomoduliny, o wyższych masach cząsteczkowych, wynoszących około 60 kDa.

Tropomodulinę E (erytrocytarną; Tmod E) po raz pierwszy zidentyfikowano w erytrocytach ludzkich, czemu izoforma ta zawdzięcza swoją nazwę (FOWLER 1987). Obecnie wiemy jednak, że u ssaków występuje ona również w niektórych innych rodzajach ostatecznie zróżnicowanych komórek: w komórkach soczewki oka szczura (WOO i FOWLER 1994), neuronach i komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych, przede wszystkim mięśnia sercowego i wolnych

włóknach mięśni szkieletowych (FOWLER 1996, 1997; FOWLER i CONLEY 1999). Nazwa „tropomodulina erytrocytarna” okazała się jednak nie w pełni właściwa nie tylko z powodu szerszego występowania tej izoformy — stwierdzono, że u kury (czy też, być może, generalnie ptaków) w krwinkach czerwonych (a także w soczewkach) nie występuje izoforma E, a opisana poniżej izoforma Sk (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999). U kury obserwuje się trzy transkrypty genu kodującego Tmod E, o wielkościach 1,4 kb, 2,1 kb oraz 2,6 (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999). Podobne zróżnicowanie transkryptów obserwowano również u innych gatunków i uważa się, że prawdopodobnie powstają one w wyniku wykorzystywania różnych miejsc sygnałów poliadenylacji (BABCOCK i FOWLER 1994, SUNG i współaut. 1992).

Tropomodulina Sk (mięśni szkieletowych; Tmod Sk) również nosi nazwę nieco mylącą, gdyż wysokie poziomy jej ekspresji obserwuje się w szybkich mięśniach szkieletowych, ale nie występuje ona w mięśniach wolnych (właściwie należy tu mówić o szybkich i wolnych włóknach mięśniowych, ponieważ najczęściej oba rodzaje

komórek występują wspólnie, choć w różnych proporcjach, w tych samych mięśniach¹).

Obecności mRNA kodującego to białko, o wielkości około 1,3 kb, u kury nie stwierdza się także w mięśni sercowym oraz szeregu innych tkanek, włącznie z mózgiem i mięśniami gładkimi. W tych włóknach mięśniowych, w których współwystępuje z tropomoduliną E, subkomórka lokalizacja obu izoform jest różna — Tmod Sk zawierają miofibrille, podczas gdy Tmod E zlokalizowana jest w kostamerach. Izoforma Sk może również zastępować izoformę E podczas różnicowania tkanki mięśniowej. Stwierdzono na przykład, że w mięśni piersiowym kury białko to stopniowo zastępuje izoformę E, dominującą w okresie rozwoju zarodkowego (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999). Sytuacja ta przypomina zmiany ekspresji izoform niektórych innych białek aparatu skurczu, np. lekkich łańcuchów miozyny czy białka C — również w tych przypadkach izoformy zarodkowe dominują we włóknach wolnych, ale zastępowane są przez inne izoformy we włóknach szybkich (SCHAFFINO i REGGIANI 1996).

Tmod Sk obecna jest również w erytrocytach i komórkach soczewki kury, ale, jak wspomniano wcześniej, nie ssaków.

Obecnie znamy sekwencje Tmod Sk człowieka, myszy, kury i jednej z ryb — danio przegowanego (*Danio rerio*), popularnej rybki akwariowej, stanowiącej również obiekt badań laboratoryjnych (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999).

Trzecie białko kręgowców z rodziny tropomodulin, tropomodulinę N (tropomodulinę neuronalną, Tmod N), zidentyfikowano w neuronach zarodków i osobników dorosłych szczurów (WATAKABE i współaut. 1996).

O kolejnym białku z tej grupy, tropomodulinie U (ang. ubiquitous — powszechny), wiemy jeszcze bardzo mało — odkryto ją dopiero przed rokiem. Znany jedynie jej sekwencje u kilku gatunków ssaków i wiemy, że jej ekspresja zachodzi w wielu różnych tkankach (COX i ZOGHBI 2000).

Wszystkie powyższe izoformy o masach cząsteczkowych około 40 kDa i długości około 350 aminokwasów wykazują około 60–65% wzajemnej identyczności sekwencji i około 75–90% podobieństwa (najbardziej są do siebie oczywiście podobne izoformy z danej grupy, występujące u różnych gatunków).

Podrodzinę leiomodyn (gr. leio — gładki), obejmującą dwa znane białka, cechuje znacznie niższe podobieństwo do czterech znanych nam już tropomodulin. Białka te są większe (m. cz. około 64 kDa) i posiadają regiony ograniczonej homologii do pozostałych tropomodulin (CONLEY 2001, CONLEY i współaut. 2001). Pierwsze z nich — leiomodyna mięśni gładkich lub SM (ang. smooth muscle — mięśnie gładkie) — występuje przede wszystkim w narządach zawierających tę tkankę, drugie nazwano leiomodyną sercową lub C (ang. cardiac — sercowy), ponieważ jego występowanie ograniczone jest do mięśnia sercowego płodów i osobników dorosłych oraz mięśni szkieletowych dorosłych. Oba te białka są do siebie homologiczne na poziomie sekwencji aminokwasowej u jednego gatunku tylko w około 30%. Jednakże, posiadają one konserwatywne regiony sekwencji oraz wykazują podobną strukturę genów i układ eksonów/intronów, znacznie odbiegające od tych charakterystycznych dla tropomodulin.

WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE I BIOFIZYCZNE

Tropomoduliny są białkami wiążącymi zarówno aktyne, jak i drugie białko wchodzące zazwyczaj w skład filamentów aktynowych — tropomiozyny (patrz artykuł J. MORACZEWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). W przeciwieństwie jednak do tropomiozyny, tropomodulina nie wiąże się wzdłuż całego filamentu aktynowego, a jedynie z jednym z końców tego wykazującego polarność polimeru — końcem wolno rosnącym (FOWLER 1987, BABCOCK i FOWLER 1994, WEBER i współaut. 1994, ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999).

W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że wiązanie z aktyną w nieobecności tropomiozyny jest stosunkowo słabe, ale to ostatnie białko kilkadziesiąt-kilkaset razy wzmacnia siłę oddziaływań zarówno Tmod E (WEBER i współaut. 1994), jak i Tmod Sk (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999) z filamentami aktynowymi.

Co dla nas najbardziej istotne, wiązaniu tropomodulin z filamentami aktynowymi towarzyszy zablokowanie ich końców i uniemożliwienie dalszego wydłużania przez przyłączanie dalszych monomerów aktynowych, bądź skracania dzięki ich dysocjacji. Pełne wyjaśnienie mechanizmu blokowania końców filamentów

¹Włókna mięśniowe szybkie, zwane też białymi, zdolne są do skurczu szybkiego, ale stosunkowo krótkotrwałego, natomiast włókna wolne, czyli czerwone (wysoka zawartość mioglobiny i cytochromów), kurczą się wolniej, ale stan skurczu może utrzymywać się znacznie dłużej. Te różnice fizjologiczne stanowią odzwierciedlenie różnic w izoformach białek aparatu skurczu oraz metabolizmie energetycznym komórek.

wymaga jeszcze wielu badań, stwierdzono jednak, że wiązanie tropomoduliny z końcem filamentu zmniejsza powinowactwo monomerów aktynowych do tego końca. Aby wyjaśnić dlaczego tak się dzieje, konieczna jest krótka dygresja. Aktyna jest białkiem wiążącym nukleotydy adenylowe — ATP bądź ADP. Wolne monomery aktynowe w komórkach posiadają związane cząsteczki ATP. Po dołączeniu monomeru do polimeru aktynowego (taki monomer nazywamy protomerem), ATP ulega hydrolizie do ADP i cząsteczki fosforanu nieorganicznego (P_i). Przez pewien (krótki) czas protomery posiadają związane oba produkty hydrolizy. Przyłączanie kolejnych podjednostek aktynowych do wolno rosnącego końca filamentu jest łatwiejsze, gdy terminalny protomer posiada związane oba produkty hydrolizy ATP, niż po uwolnieniu P_i . Ponieważ Tmod E (WEBER i współaut. 1999), Tmod Sk (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999), a zapewne i inne izoformy tropomodulin przyspieszają uwalnianie P_i , tym samym utrudniają przyłączanie kolejnych monomerów do końca filamentu. Oczywiście, nie możemy obecnie wykluczyć i innych możliwości — tropomoduliny mogą zmieniać konformację terminalnych protomerów, stabilizować ich utrzymywanie w filamencie poprzez zmiany konformacji tropomiozyny itd.

O właściwościach tropomoduliny N wiemy na razie jeszcze mniej — wiąże się ona z tropomiozyną (WATAKABE i współaut. 1996), ale nie badano dotąd jej aktywności blokowania końców filamentów.

Miejsce oddziaływania z tropomiozyną (jej częścią N-końcową) zlokalizowane są w N-końcowym regionie cząsteczki tropomoduliny (BABCOCK i FOWLER 1994, VERA i współaut. 2000). Należy pamiętać, że dimery cząsteczek tropomiozyny leżące wzdłuż filamentu aktynowego oddziałują ze sobą „głowa-ogon” (czyli końcami aminowymi podjednostek jednego dimeru z końcami karboksylowymi podjednostek następnego dimeru), i zwrócone są końcami aminowymi w stronę wolno rosnącego końca filamentu. Zatem, tropomodulina współzawodniczy z wolnymi dimerami tropomiozyny, uniemożliwiając ich przyłączanie, tak jak i monomerów aktynowych, do końca wolno rosnącego. Co ciekawe, ponieważ końce aminowe różnych izoform tropomiozyny są często różne, N-końcowa domena tropomoduliny E zawiera dwa miejsca odpowiedzialne za wiązanie różnych tropomiozyn: region od 9 do 94 aminokwasu tego białka oddziałuje z tropomiozyną z mięśni szkieletowych, podczas gdy tropomiozynę z erytrocytów wiąże region położony między resztami 90 a 184

(BABCOCK i FOWLER 1994) Jest to stosunkowo rzadko spotykany w układach biologicznych sposób zapewnienia wzajemnej komplemencarności izoform dwóch oddziałujących ze sobą białek.

Chociaż właściwości biochemiczne tropomodulin poznano już stosunkowo dobrze, niewiele dotąd wiemy o przestrzennej strukturze zarówno samej tropomoduliny, jak i jej kompleksu z aktyną/tropomiozyną. Informacje takie są konieczne do pełnego zrozumienia molekularnego mechanizmu blokowania wolno rosnących końców filamentów aktynowych. Ostatnio, na podstawie badań niskokątowego rozpraszania promieni X, opracowano model cząsteczki tropomoduliny E kury uwzględniający jej kształt i wielkość. Umożliwiło to z kolei zaproponowanie modelu struktury kompleksu aktyna-tropomiozyna-tropomodulina (FUJISAWA i współaut. 2001). Cząsteczka Tmod składa się z dwóch domen o wymiarach $40 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 20\text{--}30 \text{ \AA}$ (część N-końcowa) oraz $50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 20\text{--}30 \text{ \AA}$ (część C-końcowa), przy czym ta druga domena pozostaje pod kątem około 40° w stosunku do osi pierwszej domeny. Wydłużona domena N-końcowa oddziałuje z N-końcowym regionem cząsteczki tropomiozyny, natomiast domena C-końcowa musi wystawać z wolno rosnącego końca filamentu aktynowo-tropomiozynowego, co zgodne jest z obrazami cząsteczek tropomoduliny z tropomiozyną, uzyskanymi wcześniej w mikroskopie elektronowym przy zastosowaniu techniki napyłania obrotowego (FOWLER 1990). Ponieważ cząsteczka tropomoduliny jest zgięta, przypuszczalnie w kierunku osi filamentu, a na końcu filamentu mogą występować dwie cząsteczki Tmod (z których każda oddziałuje z zakończeniem każdej z dwóch nici dimerów tropomiozynowych (patrz FOWLER i współaut. 1993), para cząsteczek Tmod może wystarczać do zablokowania końca filamentu, nawet bez bezpośrednich oddziaływań Tmod z aktyną. Z drugiej strony, ponieważ hamującą (blokującą) rolę odgrywa domena C-, a nie N-końcowa domena tropomoduliny (GREGORIO i współaut. 1995, FOWLER i współaut. 2000), ta nie oddziałująca z tropomiozyną domena musi bezpośrednio wiązać się z aktyną.

Zgodnie z tym modelem, filament aktynowy powinien ulegać wydłużeniu o około 60 \AA z powodu obecności na jego wolno rosnącym końcu C-końcowej domeny Tmod. Dzięki temu możemy, po ponad ćwierć wieku, wyjaśnić obserwację, że w sarkomerach mięśni szkieletowych filament ciągnie się jeszcze około 55 \AA za końcem ostatniej cząsteczki tropomiozynowej (OHTSUKI 1975).

Właściwości biochemiczne leiomodyn są znacznie gorzej poznane. W dużej mierze opierać się tu musimy na porównaniach ich sekwencji z regionami sekwencji tropomodulin właściwych, których funkcje znamy. I tak, dla przykładu, leiomodyna SM całkowicie pozbawiona jest sekwencji odpowiadającej regionowi wiążącemu tropomiozyny niemięśniowe tropomodulin, co pozwala przypuszczać, że nie będzie zdolna do oddziaływania z nimi. Nieliczne dane doświadczalne, którymi dysponujemy, rzeczywiście wskazują, że leiomodyna SK nie wiąże tropomiozyny mózgowej, chociaż oddziałuje z tropomiozyną z mięśni szkieletowych, aczkolwiek w mniejszym stopniu niż Tmod E (CONLEY 2001). Podobnie, w białku tym (w jego środkowej części) zachowana jest występująca w C-końcowej domenie tropomodulin sekwencja odpowiedzialna za oddziaływanie z aktyną i blokowanie końców filamentów. I chociaż oddziaływań leiomodyny SK z aktyną nie wykazano dotąd bezpośrednio, na ich występowanie wskazuje obecność tego pierwszego białka w zawierającym aktynę wyizolowanym cytoszkieletcie mięśni gładkich (CONLEY 2001).

LOKALIZACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWA I FUNKCJE BIOLOGICZNE

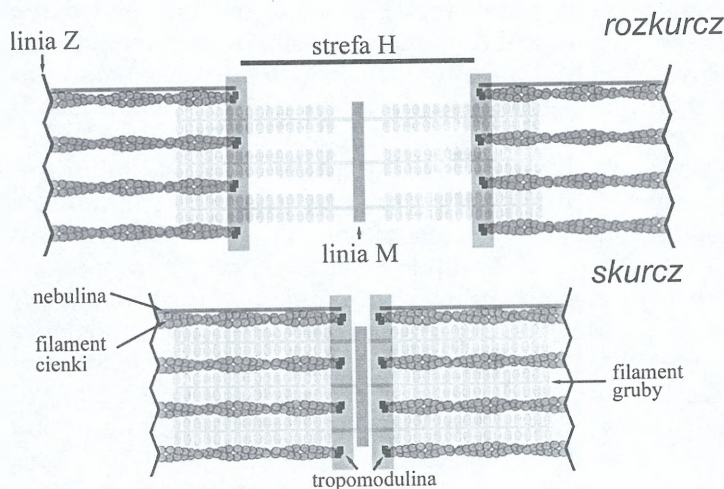
Jak już wspomniano, tropomodulinę po raz pierwszy zidentyfikowano w erytrocytach. W komórkach tych stanowi ona jeden ze składników cytoszkieletu podbłonowego (patrz artykuł B. HANUS-LORENZ i współaut. w tym numerze KOSMOSU), wchodząc w skład krótkich filamentów aktynowych kompleksów węzłowych (FOWLER 1987, SUNG i współaut. 1992). Filamenty te mają długość tylko około 67 nm i oddziałują z kilkoma białkami wiążącymi aktynę — m. in. spektryną, tropomiozyną, kaldesmonem, adducyną i tropomoduliną. Ich długość pozwala na związanie wzdłuż polimeru aktynowego zaledwie jednej dimerycznej cząsteczki tropomiozyny. Oba końce filamentu pozostają zablokowane — koniec szybko rosnący przez adducynę, natomiast koniec wolno rosnący oczywiście przez tropomodulinę. Głównie w oparciu o badania tych krótkich filamentów cytoszkieletu podbłonowego erytrocytów po raz pierwszy zasugerowano, że tropomodulina uczestniczy w regulacji długości polimerów aktynowych w różnych strukturach cytoszkieletu — ścisła kontrola względnych poziomów ekspresji tropomiozyny, tropomoduliny i adducyny w stosunku do ilości aktyny, spektryny i innych białek powinna działać w kierunku ograniczenia długości filamentów do długości

jednego dimeru tropomiozyny plus podjednostek aktynowych wymaganych do wiązania spektryny (FOWLER 1996). Podobnie może działać się w przypadku filamentów aktynowych aparatu skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych, pomimo, że są one prawie 20-krotnie dłuższe, i wiążą się z nieco innym zestawem białek (np. adducynę zastępuje w tym przypadku β -aktynina, występują inne izoformy tropomiozyny, brak jest spektryny itd.).

W różnych mięśniach poprzecznie prążkowanych albo Tmod E (FOWLER 1996, LITTLEFIELD i FOWLER 1998, FOWLER i CONLEY 1999), albo Tmod Sk (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999) zlokalizowana jest na wolno rosnących końcach filamentów aktynowych aparatu skurczu, blokując możliwość przyłączenia i odłączenia wymiany monomerów aktynowych. Analogiczna lokalizacja obu izoform we włóknach mięśni różnego typu (dla przypomnienia — Tmod E głównie w mięśniu sercowym i wolnych mięśniach szkieletowych, Tmod Sk natomiast w szybkich mięśniach szkieletowych) sugeruje, że pełnią one analogiczne funkcje. Lokalizacja taka powoduje, iż w immunofluorescencyjnych obrazach izolowanych miofibrilli wybarwianych wyznakowanymi fluoroforem przeciwciałami skierowanymi przeciw temu białku, widoczne jest ono w postaci dwóch prążków, obecnych po obu stronach pozbawionej filamentów aktynowych strefy H każdego sarkomeru (Ryc. 1).

Podobnie jak w przypadku erytrocytów, w mięśniach poprzecznie prążkowanych obecność tropomoduliny odgrywa zasadniczą rolę zarówno w organizowaniu, jak i utrzymywaniu filamentów aktynowych o jednakowej długości we właściwie zorganizowanych strukturach (sarkomerach). Długość takich filamentów wynosi w mięśniach około 1 μ m, aczkolwiek jej dokładna wartość i stopień zróżnicowania różnią się nieco dla różnych mięśni.

Mikroiniekcja przeciwciała monoklonalnego, które hamuje blokowanie aktyny przez tropomodulinę, ale nie wiązanie tropomiozyny z tropomoduliną, do zarodkowych miocytów serca kurcząt, powoduje dramatyczne wydłużanie filamentów z końca wolno rosnącego przez przerwę w środku sarkomeru (strefa H, Ryc. 2) (GREGORIO i współaut. 1995). Komórki te są niezdolne do spontanicznych skurczów. Tropomodulina pozostaje związana z terminalnymi cząsteczkami tropomiozyny, której nie obserwuje się w powstających przedłużeniach filamentów. Potwierdza to, że tropomodulina nie tylko blokuje końce filamentów, ale także blokuje końce polimerów tropomiozynowych na



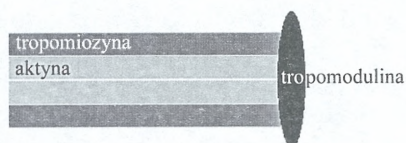
Ryc. 1. Uproszczony schemat budowy sarkomeru mięśni poprzecznie prążkowanych.

Przez zacielenie zaznaczono regiony wolno rosnących końców filamentów aktynowych, które podczas znakowania włókien mięśniowych przeciwciałami skierowanymi przeciw tropomodulinie lub N-końcowej części cząsteczek nebuliny wybarwiają się w postaci poprzecznych prążków. Położenie nebuliny zaznaczono tylko dla górnej pary filamentów aktynowych w sarkomerach.

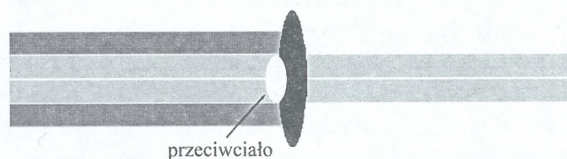
filamentach cienkich i wskazuje, że obie aktywności są niezależne.

Dalszych interesujących danych dotyczyły badania, w których zmieniano poziom ekspresji tropomoduliny w miocytach noworodków szczurów (poprzez infekcję wektorami adenowirusowymi zawierającymi albo sensowną, albo nonsensowną sekwencję tego białka) (SUSSMAN i współaut. 1998a). Obniżanie ilości tropomoduliny prowadziło do zaniku miofibrilli wykazujących prążkowanie (obecność regularnych, „dojrzałych” sarkomerów) i nagromadzenie pozabawionych prążkowania wiązek filamentów aktynowych. W przypadku nadekspresji Tmod również obserwowano znaczne zaburzenia struktury miofibrilli oraz znaczne zmniejszenie ich ilości. Podobne zmiany obserwowano także (patrz wyżej) w komórkach mięśnia sercowego

a



b



Ryc. 2. Wpływ skierowanego przeciw tropomodulinie przeciwciała monoklonalnego blokującego jej oddziaływanie z aktyną, ale nie wpływającego na wiązanie tropomiozyny na filamente aktynowe sarkomery.

a. Wolno rosnący koniec filamentu aktynowego zablokowany przez tropomodulinę. b. Filament ulegający wydłużeniu w wyniku dołączania monomerów aktynowych, ale nie dimerów tropomiozynowych.

transgenicznych myszy, w których zachodziła nadekspresja tropomoduliny (SUSSMAN i współaut. 1998b). Taki układ doświadczalny pozwolił nie tylko na analizę zaburzeń komórkowych, ale również na obserwacje ich efektów patomorfologicznych. Serca takich zwierząt, a zwłaszcza prawy przedsionek i prawa komora, były znacznie większe niż zwierząt normalnych, grubość mięśnia sercowego była niższa, a komory szersze. Objawy takie stanowią typowy obraz obserwowany w jednej z chorób serca występujących również u człowieka — kardiomiopatii rozstrzeniowej.

O ile powyższe wyniki wyraźnie wskazują na zasadnicze znaczenie poziomu ekspresji tropomoduliny dla regulacji długości filamentów aktynowych, znaczenie zaburzeń tej długości w etiologii kardiomiopatii rozstrzeniowej pozostaje niejasne. Poza zaburzeniami struktury sarkomerów, w komórkach sercowych myszy z kardiomiopatią rozstrzeniową spowodowaną nadekspresją tropomoduliny obserwuje się również zmiany struktury i składu białkowego charakterystycznych dla mięśnia sercowego miejsc kontaktów międzykomórkowych, odpowiedzialnych za przewodzenie stanu czynnego pomiędzy komórkami, tzw. wstawek (ang. intercalated discs) (EHLER i współaut. 2001). Nie wnikając tu z braku miejsca w szczególności bardzo złożonej białkowej budowy tych struktur, należy jednak wspomnieć, że na krańcach komórek błona plazmatyczna jest pofałdowana, leży równoległe do krańcowego prążka Z i do niego przylega. Wstawkę tworzą właśnie dwie takie, należące do sąsiadujących komórek, warstwy błon i prążków Z, wraz z szeregiem białek tworzących kompleksy po cytoplazmatycznej stronie błon. W wywołanej nadekspresją tropomoduliny kardiomiopatii rozstrzeniowej obserwuje się zmiany poziomów różnych białek wstawek

(wzrost jednych, obniżenie innych) i zaburzenia budowy całych struktur. Co jednak charakterystyczne, w doświadczalnej kardiomiopatii rozstrzeniowej myszy o zupełnie innej etiologii (brak ekspresji białka MLP, ang. mouse LIM protein, mysie białko zawierające domenę LIM), w której nie obserwuje się zaburzeń struktury sarkomerów miocytów sercowych, występują analogiczne zmiany w budowie wstawek. Trudno zatem w tej chwili jednoznacznie odpowiedzieć, w jaki sposób powiązane są ze sobą nadekspresja tropomoduliny, zaburzenia struktury sarkomerów, zaburzenia struktury wstawek oraz patologiczne zmiany anatomiczne i funkcjonalne serca.

W licznych pracach sugerowano, że długość filamentów aktynowych determinowana jest podczas miofibrillogenezy przez wczesne etapy ich wydłużania i skracania, podczas których białka blokujące końce są albo nieobecne, albo wykazują dużą dynamikę wiązania, a następnie ulega „utrwaleniu” dzięki silnemu wiązaniu białek blokujących końce. Niedawno jednak nieoczekiwanie okazało się, że sytuacja, przynajmniej w niektórych rodzajach włókien mięśniowych, jest inna. Wbrew nazwie „koniec wolno rosnący” i prowadzonym *in vitro* obserwacjom dotyczącym F-aktyny, stwierdzono, że *in vivo* w zarodkowych kurzych miocytach sercowych w hodowlach, właśnie ten koniec filamentu aktynowego jest głównym miejscem wbudowywania monomerów aktynowych i że to właśnie dynamika wiązania kontroluje jego zakres oraz bezpośrednio determinuje długość filamentów (LITTLEFIELD i współaut. 2001). Okazało się mianowicie, że wprowadzana do tych komórek przez mikroiniekcję aktyna wyznakowana fluoryzującymi cząsteczkami rodaminy wbudowuje się na obu końcach filamentów aktynowych aparatu skurczu — co wskazuje, iż w żyjących komórkach białka blokujące oba końce, tj. tropomodulina i β -aktynina, muszą je przejściowo odblokowywać, umożliwiając dołączanie kolejnych monomerów. Precyzyjne analizy wskazują, że aż około 60% aktyny ulega wbudowaniu do końca wolno rosnącego, a wbudowywanie to polega na wymianie z endogennymi monomerami, a nie dołączaniu i wydłużaniu filamentu. Co więcej, trwałe zablokowanie końców szybko rosnących (cytochalazyną D) nie prowadzi do zmiany długości filamentów. Natomiast nadekspresja tropomoduliny, bądź jej wstrzykiwanie do komórek razem ze znakowanymi monomerami aktynowymi, prowadzi, zgodnie z oczekiwaniami, do znacznego zmniejszenia wymiany monomerów na końcach wolno rosnących. Faktem, którego nie można było wcześniej przewidzieć

jest jednak to, że zwiększona ilość Tmod nie prowadzi do trwałego zablokowania części końców filamentów, a do przesunięcia stosunku końców zablokowanych do niezablokowanych w wyniku szybkiej dysocjacji/asocjacji Tmod. W takich warunkach obserwuje się kilkuprocentowe zmniejszenie długości filamentów aktynowych (bez zmiany długości całych sarkomerów). Wyniki te silnie sugerują, że nadmiar tropomoduliny skuteczniej hamuje repolimeryzację aktyny na końcach filamentów, niż depolimeryzację, co z kolei prowadzi do wypadkowej depolimeryzacji i skracania filamentów. Dane te wskazują raczej na występowanie „dynamicznej stabilności” końców, a nie ich trwałe blokowanie *in vivo*. A zatem, kluczowe znaczenie dla regulacji długości filamentów aktynowych w sarkomerach ma poziom ekspresji tropomoduliny. Obecnie nie znamy jeszcze mechanizmu, który decyduje o tym, że, pomimo wysokiego powinowactwa obserwowanego *in vitro*, w żywych komórkach tropomodulina nie pozostaje silnie związana z końcami filamentów. Być może, za zjawisko to odpowiadają np. zmiany w położeniu tropomiozyny na filamencie (np. podczas różnych etapów cyklu skurczowo-rozkurczowego). Podsumowując, okazuje się, że postulowane wcześniej etapy determinacji i utrzymania długości filamentów mogą być tym samym zjawiskiem — zależną od poziomu tropomoduliny regulacją dynamiki dysocjacji/asocjacji monomerów na końcu wolno rosnącym.

W zgodności z przedstawionym powyżej modelem pozostają interesujące obserwacje, że istnieje związek pomiędzy izoformą tropomoduliny wchodzącą w skład aparatu skurczu a długością filamentów aktynowych sarkomerów. I tak, stwierdzono, że u kury izoforma Sk tropomoduliny występuje w aparacie skurczu tych włókien mięśniowych, w których długość filamentów aktynowych (cienkich) jest niezmienna i wynosi około 0,9 μm (włókna szybkie), podczas gdy izoforma E obecna jest w sarkomerach z filamentami cienkimi o większej i bardziej zróżnicowanej długości — od około 0,95 do około 1,1 μm (włókna zarodkowe) (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999). Jeśli zależność taka zostanie potwierdzona w badaniach większej grupy mięśni różnych gatunków, ponownie prowadzi do wniosku, że w regulacji długości filamentów cienkich kluczową rolę odgrywa ekspresja określonej izoformy tropomoduliny. Ponieważ jednak *in vitro* aktywność blokowania końców filamentów obu izoform jest podobna, przypuszczalnie w komórkach na powinowactwo tropomoduliny do końców filamentów wy-

wierają wpływ inne białka aparatu skurczu, takie jak izoformy tropomiozyny, troponiny czy nebuliny. W poszczególnych typach włókien mięśniowych ekspresji ulegają różne izoformy także tych białek.

Nebulina jest długim białkiem wiążącym aktyne, ciągnącym się w sarkomerze od linii Z do wolno rosnących końców filamentów aktynowych. Uważa się, że działa ona jako „matryca molekularna” (Ryc. 1), współdecydująca o długości filamentów cienkich w mięśniach szkieletowych (w komórkach mięśnia sercowego białko to nie występuje) (FOWLER 1996, LITTLEFIELD i FOWLER 1998). Występowanie różnych izoform nebuliny o różnej długości (masy cząsteczkowe około 600–800 kDa) skorelowane jest z długością filamentów cienkich zarówno w różnych typach mięśni, jak i na różnych etapach rozwoju tego samego mięśnia (np. HATTORI i współaut. 1995, KRUGER i współaut. 1991, LABEIT i współaut. 1991).

Do niedawna jednak nie było jasne, w jaki sposób białka należące do obu rodzin — nebulin i tropomodulin — współdziałają ze sobą na poziomie molekularnym, współdecydując o długości filamentów aktynowych w sarkomerach. Nieco światła na to zagadnienie rzuciło stwierdzenie, że dystalna (N-końcowa) część nebuliny nie tylko występuje w tym samym miejscu w sarkomerze, co tropomodulina, ale również, przynajmniej *in vitro*, może z nią bezpośrednio oddziaływać (MCELHINNY i współaut. 2001). W przeciwieństwie do oddziaływań Tmod z aktyną, tropomiozyna nie wywiera wpływu na jej wiązanie z nebuliną. Szczególnie interesująca jest obserwacja, że Tmod Sk wiąże się z tym regionem nebuliny z wyższym powinowactwem, niż Tmod E. Być może, różne izoformy nebuliny oddziałują z różnymi izoformami tropomoduliny w nieco inny sposób, co decyduje o „ściśłości” blokowania wolno rosnących końców filamentów w mięśniach o różnych właściwościach fizjologicznych — w efekcie w różnych mięśniach długość filamentów jest różna, ale w każdym przypadku precyzyjnie regulowana. Ponieważ w mięśniu sercowym nebulina nie występuje, ale jego komórki zawierają tropomodulinę E, oddziaływania obu białek nie są konieczne do regulacji długości filamentów cienkich. Pamiętać jednak należy, że właśnie w komórkach mięśnia sercowego filanty te wykazują największe zróżnicowanie (0,6–1,1 μm).

Sytuację komplikuje dodatkowo fakt, że przypuszczalnie na aktywność tropomoduliny może również wywierać wpływ troponina — kompleks białkowy występujący we wszystkich mięśniach poprzecznie prążkowanych i regulu-

jący aktywność mięśni (nadający aparatowi skurczu wrażliwość na jony wapnia, których podwyższony poziom jest pierwotnym sygnałem wyzwalającym skurcz włókna mięśniowego). Stwierdzono, że tylko w obecności tropomiozyny i tropomoduliny troponina hamuje zdolność monomerów aktynowych do polimeryzacji *in vitro* (KIMURA i współaut. 1999). Nie wiemy jeszcze, czy obserwacja ta ma znaczenie fizjologiczne. Jeśli tak, nasuwają się tu dwie uwagi — po pierwsze, oba białka (troponina i tropomodulina), ze względu na różną lokalizację na filamentach aktynowych, nie mogą oddziaływać ze sobą bezpośrednio — a zatem wpływ troponiny na aktywność Tmod może być przekazywany wzdłuż filamentu jedynie albo przez zmiany konformacji tropomiozyny, albo samej aktyny. Po drugie, ponieważ podjednostki troponiny również występują w postaci licznych izoform o ekspresji ściśle ograniczonej do danego typu mięśnia, różnice pomiędzy nimi być może zapewniają dodatkowy mechanizm specyficznej tkankowo modulacji aktywności tropomoduliny.

W niektórych szybkich włóknach mięśniowych ptaków, poza tropomoduliną Sk, występuje również izoforma E tego białka. Jednakże, nie jest ona w nich związana z filamentami aktynowymi miofibrilli (jak Tmod Sk), a występuje w subdomenach pod sarkolemmą (tak nazywamy błonę plazmatyczną komórek mięśniowych) noszących nazwę kostamerów i leżących w odległościach około 2 μm od siebie (ALMENAR-QUERALT i współaut. 1999). Funkcje tych struktur nie zostały jeszcze w pełni poznane, proponowano jednak, że z jednej strony uczestniczą one w zakotwiczeniu aparatu skurczu w sarkolemmie, z drugiej zaś w uczestniczą w przekazywaniu przez nią sygnałów. W strukturach tych występuje również spektryna (PORTER i współaut. 1997). Sytuacja ta wydaje się zatem przypominać nieco sytuację w opisanym wcześniej cytoszkieletie podbłonowym erytrocytów, gdzie również obserwujemy kolokalizację spektryny i tropomoduliny. W kostamerach występuje również szereg innych białek spektrynowego cytoszkieletu podbłonowego oraz innych białek cytoszkieletalnych, takich jak desmina, dystrofina i integryny (ANASTASI i współaut. 1989), ale bardzo mało wiemy o ich organizacji molekularnej. Można jednak przypuszczać, że, podobnie jak w erytrocytach, cytoszkielet podbłonowy kostamerów zbudowany jest z krótkich filamentów aktynowych, o wolno rosnącym końcu zablokowanym przez Tmod E, powiązanych ze sobą poprzez spektrynę.

Obecnie nie wiemy, jakie różnice w sekwencji obu izoform Tmod decydują o ich kierowaniu do różnych regionów komórki.

Nie wiemy również nic o czynnikach powodujących, że u różnych grup kręgowców w komórkach soczewki (i erytrocytach) analogiczne funkcje pełnią różne izoformy tropomodulin (Tmod E u ssaków, Tmod Sk u ptaków). Funkcje tropomodulin w komórkach soczewki, szczególnie ich rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego podczas różnicowania i dojrzewania tych wysoce wyspecjalizowanych komórek analizowano w wielu pracach (SUSSMAN i współaut. 1996, FISCHER i współaut. 2000, LEE i współaut. 2000, Woo i współaut. 2000). Niestety, ponieważ zagadnienia te są dość złożone, a nie stanowią „typowego przykładu” funkcjonowania cytoszkieletu, nie możemy im tu poświęcić należytej uwagi, gdyż wymagałoby to osobnego artykułu.

Podobnie jak w przypadku właściwości biochemicznych i biofizycznych, lokalizacja we-

wnątrzkomórkowa i funkcje biologiczne leiomodyn są znacznie gorzej poznane, niż lokalizacja i funkcje podrodziny tropomodulin o masach cząsteczkowych wynoszących około 40 kDa. W chwili obecnej dysponujemy jedynie częściowymi danymi dotyczącymi występowania leiomodyny SM w komórkach mięśni gładkich (CONLEY 2001). Jednakże, ich interpretację utrudnia, jeśli nie uniemożliwia, fakt, że bardzo mało wiemy jeszcze o budowie aparatu skurczu włókien mięśni gładkich, zmianach w nim zachodzących podczas skurczu oraz nie potrafimy w pełni wyodrębnić go z spośród wszystkich innych struktur cytoszkieletu. Nie chcąc zatem zmuszać Czytelnika do wglębiania się w hipotezy, którym wkrótce mogą zaprzeczyć wyniki kolejnych badań, wspomnę tu jedynie, że obecnie nie można wykluczyć możliwości, iż leiomodyny, na wzór tropomiozyn i niektórych innych białek wiążących aktynę, oddziałują nie z końcami filamentów aktynowych, a wiążą się wzdłuż ich boków.

HOMOLOGI TROPOMODULIN U BEZKRĘGOWCÓW

Obecnie znamy dwie grupy homologów tropomodulin u bezkręgowców. Pierwszą z nich stanowią noszące nazwę sanpodo białka o masach cząsteczkowych około 40 kDa, zidentyfikowane dotąd u muszki owocowej, wywilżny karłowki *Drosophila melanogaster* i nicienia *Caenorhabditis elegans* (DYE i współaut. 1988). Druga grupa obejmuje tylko jednego znanego przedstawiciela — jest to białko *C. elegans*, o masie cząsteczkowej około 60 kDa, którego sekwencję aminokwasową znamy jedynie z przewidywań na podstawie sekwencji wyizolowanego kwasu nukleinowego (DYE i współaut. 1998).

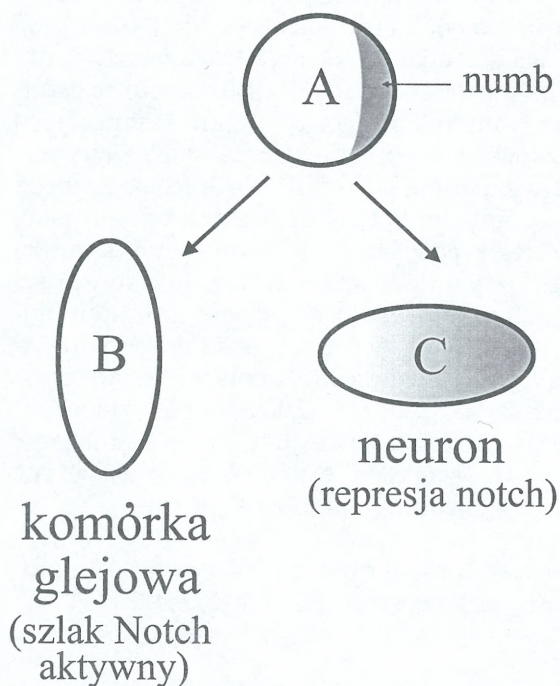
Gen *sanpodo* (*spodo*) (koreańskie słowo *sanpodo* oznacza winne grono — komórki wybarwiane przeciwciałami skierowanymi przeciw temu białku tworzą w układzie nerwowym *Drosophila* charakterystyczne grona) zidentyfikowano w wyniku poszukiwań mutacji wpływających na rozwój zarodkowego obwodowego układu nerwowego (SALZBERG i współaut. 1994, 1997; KANIA i współaut. 1995). Produktem tego genu jest białko o długości 367 aminokwasów, których sekwencja wykazuje znaczącą homologię do tropomodulin kręgowców, oraz niższą, ale znaczącą homologię do białka obecnego u *C. elegans* (DYE i współaut. 1998).

Bardzo mało jeszcze wiemy o właściwościach biochemicznych i molekularnych mechanizmach działania tego białka. Wiemy natomiast, że współuczestniczy ono w jednym z

najważniejszych zjawisk biologii rozwoju — determinacji przyszłych losów komórek. Za determinację taką częściowo odpowiadają asymetryczne podziały komórkowe, w wyniku których powstają dwie siostrzane komórki potomne o różnych przyszłych losach.

Wszystkie znane dotąd mutacje genu *sanpodo* prowadzą do śmierci dotkniętych nimi osobników na stosunkowo wczesnych etapach rozwoju, choć nie obserwuje się wyraźnych zmian morfologicznych. Mutacje te uniemożliwiają jednak asymetryczne podziały różnych komórek, w różnych tkankach (układzie nerwowym, mięśniach i innych tkankach pochodzenia mezodermalnego) (DYE i współaut. 1998, PARK i współaut. 1998, SKEATH i DOE, 1998, WARD i SKEATH 2000). Obecnie wiemy, że białko *sanpodo* współdziała w decydowaniu o przyszłych losach komórek ze szlakiem przekazywania sygnałów Notch, noszącym taką samą nazwę, jak kluczowe białko tego szlaku. Aby w pełni zrozumieć funkcje białka *sanpodo*, musimy zatem poświęcić nieco uwagi szlakowi Notch.

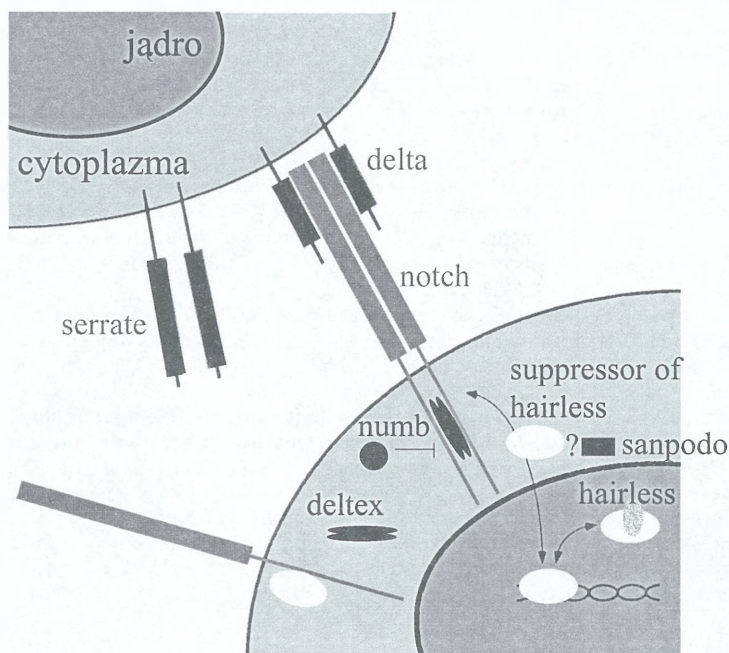
Wyobraźmy sobie zatem prekursorową komórkę A, np. występującą w układzie nerwowym, z której w wyniku asymetrycznego podziału normalnie powstaje komórka B (np. glejowa) oraz komórka C (np. neuron) (Ryc. 3). Jeśli w komórce A białko, w naszym przykładzie białko nazwane *numb*, zlokalizowane jest asymetrycz-



Ryc. 3. Asymetryczny podział komórki prekursorowej w wyniku asymetrycznej segregacji białka numb do komórek potomnych.

Objaśnienia w tekście.

nie przy powierzchni komórki (RHYU i współaut. 1994), po podziale występować będzie ono tylko w jednej z komórek potomnych (w przyszłym neuronie). W komórce tej wiąże się ono z wewnątrzkomórkową domeną wspomnianego już białka notch (Ryc. 4). Białko notch jest transbłonowym receptorem liganda delta (np. WHARTON i współaut. 1985, HEITZLER i SIMPSON 1991),



Ryc. 4. Uproszczony schemat szlaku przekazywania sygnałów Notch u *Drosophila*.

Receptorowe białko notch, po związaniu liganda (np. białka delta lub serrate) tworzy multimery stabilizowane przez białko deltex, co prowadzi do przemieszczania się do jądra białka suppressor of hairless, będącego czynnikiem transkrypcyjnym i kierującego ekspresją genów decydujących o różnicowaniu się komórki. Aktywność tego białka regulowana jest przez jądrowy czynnik hairless. W obecności białka numb zachodzi represja szlaku poprzez jego wiązanie z wewnątrzkomórkową domeną receptora notch. Znakiem zapytania zaznaczono nieznanany mechanizm działania białka sanpodo.

a jego domena wewnątrzkomórkowa wiąże kilka białek uczestniczących w regulacji funkcji komórkowych, np. jeden z czynników transkrypcyjnych (LECOURTOIS i SCHWEISGUTH 1995, SCHWEISGUTH i POSAKONY 1992). W wyniku związania białka numb następuje jednak represja funkcji białka notch (GUO i współaut. 1996, SPANA i DOE 1996) i cały szlak nie może funkcjonować. Ponieważ po podziale białko numb obecne jest tylko w komórce C, w komórce B szlak Notch funkcjonował będzie normalnie — losy obu komórek potomnych potoczą się od tej chwili odmiennie. Oczywiście, komórka C nie musi, ale w wielu przypadkach ulega kolejnemu asymetrycznemu podziałowi i powstające z niej komórki siostrzane ponownie mogą ulegać odmiennemu różnicowaniu podczas realizacji programu rozwojowego organizmu. (ARTAVANIS-TSAKONAS i współaut. 1995).

Powodujące utratę funkcji mutacje liganda delta, białka notch i białek regulowanych przez wiązanie z wewnątrzkomórkową domenę notch, prowadzą do inaktywacji całego szlaku — obie potomne komórki zachowują się tak, jakby podlegały represji białka numb, a zatem powstaną dwa neurony, nie powstanie natomiast komórka glejowa. W przypadku mutacji inaktywujących białko numb z komórki A powstaną natomiast dwie komórki glejowe. Przypomnieć należy, że neuron i komórka glejowa są tylko przykładami, regulacja taka może dotyczyć asymetrycznych podziałów wielu innych komórek prekursorowych, np. komórek serca.

Wracając do białka sanpodo, mutacje kodującego je genu prowadzą do takich efektów, jak mutacje genów białek delta, notch i białek pod-

legających regulacji notch, a przeciwnych do mutacji genu *numb*. Tak więc, u mutantów *sanpodo* powstaną dwie komórki C. Rzeczywiście, u takich mutantów obserwowano podwojenie liczby neuronów w zarodkach. Nie wiemy jednak jeszcze, jakie jest molekularne podłoże udziału *sanpodo* w zachowywaniu asymetrii podziałów. Na podstawie homologii produktu genu *sanpodo* do tropomodulin kręgowców możemy jedynie przypuszczać, że w determinacji losów komórek uczestniczą procesy zależne od aktywności. Wniosek ten potwierdza fakt, że białko *sanpodo* wymagane jest również do utrzymywania właściwej morfologii i rozmieszczenia F-aktywności w przynajmniej niektórych strukturach obwodowego układu nerwowego i w mięśniach *Drosophila* (DYE i współaut. 1998).

Pomimo, że powyżej opisano udział szlaku Notch w determinacji losów komórek tylko w odniesieniu do *Drosophila*, szlak ten pełni również analogiczną rolę u wielu innych organi-

zmów, włącznie z kręgowcami. Tylko w ciągu ostatnich dwóch lat ukazało się zbyt wiele prac dotyczących udziału tego szlaku przekazywania sygnałów w rozwoju i różnicowaniu różnych typów komórek kręgowców, jak również jego związków z różnymi stanami patologicznymi, by je tu wymieniać — nawet ograniczając się do prac przeglądowych. Należy jednak podkreślić, że u kręgowców nie stwierdzono, przynajmniej dotąd, aktywności analogicznej do aktywności *sanpodo* u *Drosophila*. W przyszłości zatem dopiero okaże się, czy funkcję taką może pełnić w pewnych sytuacjach którakolwiek ze znanych już tropomodulin, czy u kręgowców zidentyfikujemy w przyszłości kolejną grupę homologów, czy też ze szlakiem Notch u kręgowców nie współdziała żadne białko z tej grupy.

Praca finansowana przez grant Komitetu Badań Naukowych nr 0757/P04/1999/17.

TROPOMODULIN FAMILY

Summary

The tropomodulin family consists of two groups of monomeric proteins, tropomodulins (with a molecular weight of about 40 kDa) and leiomodins (with a molecular weight of about 60 kDa). Tropomodulins are known to bind to pointed (slowly growing) ends of actin filaments. There are several isoforms of tropomodulins that are expressed in various tissues of vertebrates. For example, in humans, tropomodulin E is expressed in erythrocytes, neurons and in slow types of skeletal muscles as well as in cardiac muscle while tropomodulin Sk is expressed in fast types of skeletal muscles. Tropomodulins bind to actin and tropo-

myosin and it is generally believed that in certain cytoskeletal structures they are responsible for the maintenance of the suitable lengths of actin filaments. These proteins can also interact with nebulin, another thin filament component that participates in the maintenance of filaments length. Leiomodins, that have been studied less extensively, are expressed in smooth muscle (leiomodulin SM) or in cardiac and skeletal muscle (leiomodulin C). Tropomodulin-like proteins have also been found in *Drosophila* and in *Caenorhabditis elegans* and shown to participate in the determination of cell fate.

LITERATURA

- ALMENAR-QUERALT A., LEE A., CONLEY C. A., RIBAS DE POULPANA, L., FOWLER, V. M., 1999. *Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle*. J. Biol. Chem. 274, 28466–28475.
- ANASTASI G., CUTRONEO G., SANTORO G., TRIMARCHI F., 1998. *The non-junctional sarcolemmal cytoskeleton: the costameres*. Ital. J. Anat. Embryol. 103, 1–11.
- ARTAVANIS-TSAKONAS S., MATSUNO K., FORTINI M. E., 1995. *Notch signaling*. Nature 268, 225–232.
- BABCOCK G. G., FOWLER V. M., 1994. *Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins*. J. Biol. Chem. 269, 27510–27518.
- CONLEY C. A., 2001. *Leiomodulin and tropomodulin in smooth muscle*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 280, C1645–C1656.
- CONLEY C. A., FRITZ-SIX K. L., ALMENAR-QUERALT A., FOWLER V. M., 2001. *Leiomodins: larger members of the tropomodulin (tmod) gene family*. Genomics 73, 127–139.
- COX P. R., ZOGHEBI H. Y., 2000. *Sequencing, expression analysis, and mapping of the three unique human tropomodulin genes and their mouse orthologs*. Genomics 63, 97–107.
- DYE C. A., LEE J. K., ATKINSON R. C., BREWSTER R., HAN P. L., BELLEN H. J., 1988. *The Drosophila sanpodo gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin/tropomyosin-associated protein*. Development 125, 1845–1856.
- EHLER E., HOROWITS R., ZUPPINGER C., PRICE R. L., PERRIARD E., LEU M., CARONI P., SUSSMAN M., EPPENBERGER H. M., PERRIARD J.-C., 2001. *Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein*. J. Cell Biol. 154, 763–772.
- FISCHER R. S., LEE A., FOWLER V. M., 2000. *Tropomodulin and tropomyosin mediate lens cell actin cytoskeleton reorganization in vitro*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 166–174.
- FOWLER V. M., 1987. *Identification and purification of novel Mr 43,000 tropomyosin binding protein from human erythrocyte membranes*. J. Biol. Chem. 262, 12792–12800.
- FOWLER V. M., 1990. *Tropomodulin: a cytoskeletal protein that binds to the end of erythrocyte tropomyosin and inhibits tropomyosin binding to actin*. J. Cell Biol. 111, 471–481.

- FOWLER V. M., 1996. Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 86–96.
- FOWLER V. M., 1997. Capping filament growth: Tropomodulin in muscle and nonmuscle cells. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52, 79–89.
- FOWLER V. M., CONLEY C. A., 1999. Tropomodulin. [W:] *Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins*. KREIS T. E., VAALE R. D. (red.), Oxford University Press, Oxford str. 154–159.
- FOWLER V. M., SUSSMAN M. A., MILLER, P. G., FLUCHER, B. E., DANIELS M. P., 1993. Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 120, 411–420.
- FOWLER V. M., MOYER J., ALMENAR-QUERALT A., FRITZ-SIX K., 2000. Identification of a novel conserved actin capping domain in the pointed end capping protein, tropomodulin. *Mol. Biol. Cell* 11 (Suppl.), 557a.
- FUJISAWA T., KOSTYUKOVA A., MAEDA Y., 2001. The shapes and sizes of two domains of tropomodulin, the P-end-capping protein of actin-tropomyosin. *FEBS Lett.* 498, 67–71.
- GREGORIO C. C., WEBER A., BONDAD M., PENNISE, C. R., FOWLER V. M., 1995. Requirement of pointed end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. *Nature* 377, 83–86.
- GUO M., JAN L. Y., JAN Y. N., 1996. Control of daughter fates during asymmetric division: interaction of the cell intrinsic determinant Numb and Notch receptor for cell-cell communication. *Neuron* 17, 27–41.
- HATTORI A., ISHII T., TATSUMI R., TAKAHASHI K., 1995. Changes in the molecular types of connectin and nebulin during development of chicken skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1244, 179–184. HEITZLER P., SIMPSON P., 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083–1092.
- KANIA A., SALZBERG A., BHAT M., D'EVELYN D., HE Y., KISS I., BELLEN H. J., 1995. P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 1663–1678.
- KIMURA S., ICHIKAWA A., ISHIZUKA J., OHKOUCHI S., KAKE T., MARUYAMA K., 1999. Tropomodulin isolated from rabbit skeletal muscle inhibits filament formation of actin in the presence of tropomyosin and troponin. *Eur. J. Biochem.* 263, 396–401.
- KRUGER M., WRIGHT J., WANG K., 1991. Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J. Cell. Biol.* 115, 97–107.
- LABET S., GIBSON T., LAKEY A., LEONARD K., ZEWIANI M., KNIGHT P., WARDALE J., TRINICK J., 1991. Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett.* 282, 313–316.
- LECOURTOIS M., SCHWEISGUTH F., 1995. The neurogenic Suppressor of Hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the Enhancer of Split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Devel.* 9, 2598–2608.
- LEE A., FISCHER R. S., FOWLER V. M., 2000. Stabilisation and remodeling of the membrane skeleton during lens fiber cell differentiation and maturation. *Dev. Dyn.* 217, 257–270.
- LITTLEFIELD R., FOWLER, V. M., 1998. Defining actin filaments length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14, 487–525.
- LITTLEFIELD R., ALMENAR-QUERALT A., FOWLER, V. M., 2001. Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nature Cell Biol.* 3, 544–551.
- MCLEHINNY A. S., KOLMERER B., FOWLER V. M., LABET S., GREGORIO C. C., 2001. The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *J. Biol. Chem.* 276, 583–582.
- OHTSUKI I., 1975. Distribution of troponin components in the thin filament studied by immunoelectron microscopy. *J. Biochem. Tokyo* 77, 633–639.
- PARK M., YAICH L. E., BODMER L., 1998. Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of lineage genes numb, Notch and sanpodo. *Mech. Dev.* 75, 117–126.
- PORTER G. A., SCHER M. G., RESNECK W. G., PORTER N. C., FOWLER V. M., BLOCH R. J., 1997. Two populations of beta-spectrin in rat skeletal muscle. *Cell Motil. Cytoskel.* 37, 7–19.
- RHYU M. S., JAN L. Y., JAN Y. N., 1994. Assymetric distribution of numb protein during division of the sensory organ progenitor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477–499.
- SALZBERG A., DEVELYN D., SCHULZE K. L., LEE J.-K., STRUMPF D., TSAI L., BELLEN H. J., 1994. Mutations affecting the pattern of the PNS in *Drosophila* reveal novel aspects of neuronal development. *Neuron* 13, 269–287.
- SALZBERG A., PROKOPENKO S. N., HE Y., TSAI P., PÁL M., MARÓY P., GLOVER D. M., DEÁK P., BELLEN H. J., 1997. P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: Mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics* 147, 1723–1741.
- SCHAFFINO S., REGGIANI C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76, 371–423.
- SCHWEISGUTH F., POSAKONY J. W., 1992. Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* 69, 1199–1212.
- SKEATH J. B., DOE C. Q., 1998. Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development* 125, 1857–1865.
- SPANAN E. P., DOE C. Q., 1996. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21–26.
- SUNG L. A., FOWLER V. M., LAMBERT, K., SUSSMAN, M. A., KARR, D., CHIEN, S., 1992. Molecular cloning and characterization of human fetal liver tropomodulin. A tropomyosin binding protein. *J. Biol. Chem.* 267, 2616–2621.
- SUSSMAN M. A., MCAVOY J. W., RUDISILL M., SWANSON B., LYONS G. E., KEDES L., BLANKS J., 1996. Lens tropomodulin: developmental expression during differentiation. *Exp. Eye Res.* 63, 223–232.
- SUSSMAN M. A., BAQUE S., UHM C. S., DANIELS, M. P., PRICE, R. L., SIMPSON D., TERRACIO L., KEDES L., 1998a. Altered expression of tropomodulin in cardiomyocytes disrupts the sarcomeric structure of myofibrils. *Circ. Res.* 82, 94–105.
- SUSSMAN M. A., WELCH S., CAMBON N., KLEVITSKY R., HEWETT T. E., PRICE R., WITT S. A., KIMBALL T. R., 1998b. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to diluted cardiomyopathy in juvenile mice. *J. Clin. Invest.* 101, 51–51.
- VERA C., SOOD A., GAO K. M., YEE L. J., LIN J. J., SUNG L. A., 2000. Tropomodulin-binding site mapped to residues 7-14 at the N-terminal heptad repeats of tropomyosin isoform 5. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 16–24.
- WARD E. J., SKEATH J. B., 2000. Characterization of novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 4959–4969.
- WATAKABE A., KOBAYASHI R., HELFMAN, D. M., 1996. N-tropomodulin: a novel isoform of tropomodulin identified as the major binding protein to brain tropomodulin. *J. Cell Sci.* 109, 2299–2310.
- WEBER A., PENNISE C. R., BABCOCK G. G., FOWLER V. M., 1994. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 127, 1627–1635.

- WEBER A., PENNISE C. R., FOWLER V. M., 1999. *Tropomodulin increases the critical concentration of barbed-end capped actin filaments by converting ADP-P_i-actin to ADP-actin at all pointed filament ends.* J. Biol. Chem. 274, 34637-34645.
- WHARTON K. A., JOHANSEN K. M., XU T., ARTAVANIS-TSAKONAS S., 1985. *Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats.* Cell 43, 567-581.
- WOO M. K., FOWLER, V. M., 1994. *Identification and characterization of tropomodulin and tropomyosin in the adult rat lens.* J. Cell Sc. 107, 1359-1367.
- WOO M. K., LEE A., FISCHER R. S., MOYER J, FOWLER V. M., 2000. *The lens membrane skeleton contains structures preferentially enriched in spectrin-actin or tropomodulin-actin complexes.* Cell Motil. Cytoskeleton 46, 257-268.