

MARIA JOLANTA RĘDOWICZ

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: jolanta@nencki.gov.pl

MIOZYNY A PATOLOGIA

Miozyny, białka motoryczne obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, występują w postaci wielu różnorodnych izoform (patrz art. BRZESKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Na podstawie różnic w sekwencji aminokwasowej domeny motorycznej, poznane miozyny podzielono na 18 klas (YAMASHITA i współaut. 2000). Ostatnio wykazano, że podobnego podziału można dokonać analizując sekwencje aminokwasowe C-końcowych domen ciężkiego łańcucha miozyny, domeny IQ, zwanej też szyjką, oraz pałeczki (KORN 2000).

Poszczególne organizmy zawierają określoną liczbę różnych izoform miozyny. Wykazano, na przykład, że u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* występuje pięć genów kodujących przedstawicieli trzech klas miozyn (I, II i V), natomiast u nicienia *Caenorhabditis elegans* stwierdzono obecność siedemnastu genów kodujących przedstawicieli siedmiu rodzin (I, II, V, VI, VII, IX i XII). U człowieka znaleziono dotychczas dwadzieścia genów kodujących przedstawicieli 9 rodzin miozyny (I, II, III, V, VI, VII, IX, XV i XVIII) (YAMASHITA i współaut. 2000).

Obecność różnorodnych izoform miozyny w jednym organizmie wskazuje na możliwość specyficznej kompartmentalizacji tych białek, na poziomie zarówno narządów, tkanek, jak i subkomórkowym. Wykazano na przykład, że u ssaków miozyna III jest obecna wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych, zaś tzw. szkieletowa izoforma miozyny II występuje tylko w mięśniach szkieletowych. W zmysłowej komórce włoskowatej ucha wewnętrznego miozyna I β

zlokalizowana jest w strukturach łączących ze sobą rzęski, zwane też stereocyliami, miozyna VI obecna jest w rąbku oskórkowym (ang. cuticular plate), będącym podstawą stereocyliów, a także w cytoplazmie, miozynę VII zlokalizowano w stereocyliach, rąbku oskórkowym oraz w cytoplazmie komórki włoskowatej, natomiast miozyna XV występuje w stereocyliach i w rąbku oskórkowym (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

Różnorodność izoform miozyny sugeruje też, że białka te mogą pełnić w komórce i organizmie określone funkcje. Badania prowadzone m. in. nad izoformami miozyny śluzowca *Dictyostelium discoideum* wykazały, że miozyna II jest niezbędna w procesie cytokinezy oraz rozwoju i migracji komórek — pięć izoform miozyny I, współdziałając ze sobą, bierze udział w lokomocji komórek, wewnątrzkomórkowym transporcie organelli, a także procesach endo- i egzocytozy, miozyna VII jest zaangażowana w procesie fagocytozy, zaś miozyna XIV (MyoM) uczestniczy w makropinocytozie (SELLERS 1999, OISHI i współaut. 2000).

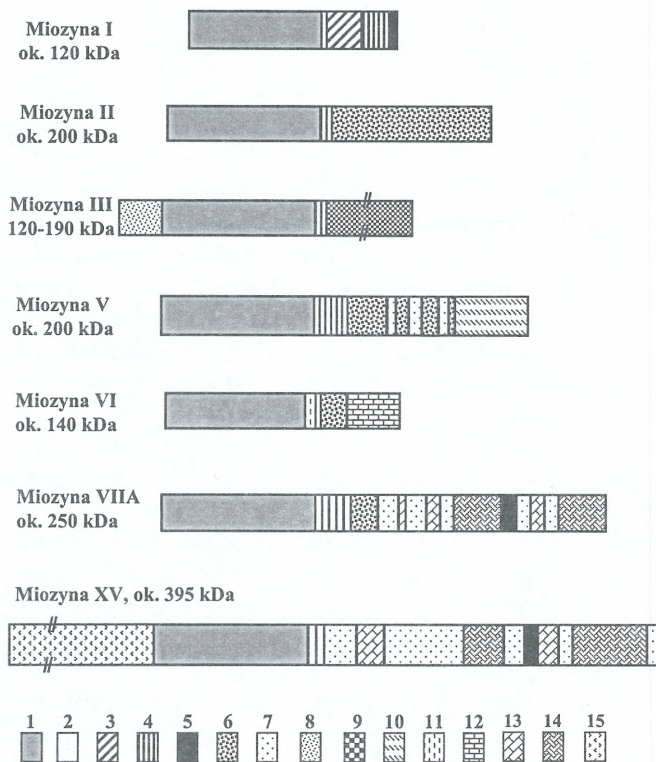
Rozwój metod genetycznych, biologii molekularnej oraz technik biochemicznych i immunologicznych, jaki nastąpił w ostatniej dekadzie, przyczynił się do poznania molekularnego podłoża wielu chorób i zaburzeń. Okazało się także, że mutacje w genach kodujących izoformy miozyn mogą być odpowiedzialne za patologię wielu chorób i zaburzeń u człowieka i zwierząt. Temu właśnie problemowi poświęcony będzie niniejszy artykuł.

UDZIAŁ MIOZYNY III W PROCESIE WIDZENIA

Dotychczas poznano przedstawicieli miozyny z rodziny III u trzech organizmów: muszki owocowej (wywilżna karłowata, *Drosophila melanogaster*) (produkty genu *ninaC*, białka p174 i

p132, będące wariantami powstającymi w wyniku odmiennego składania eksonów) (MONTEL i RUBIN 1988), skrzypłocza (*Limulus polyphemus*) (białko o masie ok. 122 kDa) (BATELLE i

współaut. 1998) oraz u człowieka (białko o masie ok. 186 kDa) (DOSE i BURNSIDE 2000). Miozyny te zlokalizowane są wyłącznie w fotoreceptorach. Łańcuch ciężki tych białek, obok domen charakterystycznych dla innych izoform miozyny (tzn. domeny motorycznej, domeny IQ oraz pałeczki), zawiera unikalną domenę, która wykazuje homologię do niektórych kinaz, i która znajduje się na jego końcu N (Ryc. 1) (SELLERS



1999). Najbardziej zaawansowane są badania nad wariantami miozyny III *Drosophila*. Oba te warianty różnią się między sobą C-końcową częścią pałeczki, co z kolei determinuje różnice w ich lokalizacji w komórce; p174 występuje w rabdomerach fotoreceptorów oka, natomiast p132 zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek fotoreceptorowych (HICKS i WILLIAMS 1992, PORTER i współaut. 1992). Badania z zastosowaniem owadów transgenicznych umożliwiły poznanie roli miozyny III w procesie widzenia *Drosophila*. Usunięcie całej cząsteczki p174 prowadzi do gwałtownej, indukowanej światłem, degeneracji siatkówki, a co się z tym wiąże, do zmian w elektroretinogramie (ERG). Delecja do-

meny kinazowej powoduje zmiany w ERG, nie prowadząc jednak do degeneracji siatkówki, natomiast delecja domeny motorycznej wywołuje zmiany w ERG i prowadzi do zaniku siatkówki. Tak zmutowane białko nie jest zdolne do wiązania ze strukturami aktynowymi (PORTER i MONTEL 1993).

Wykazano również, że reszty serynowe 1316 i 1320, zlokalizowane w C-końcowej części pa-

Ryc. 1. Schematy budowy łańcuchów ciężkich izoform miozyny omawianych w niniejszym artykule.

1, domena motoryczna; 2, motyw IQ; 3, sekwencja w pałeczce miozyny I odpowiadająca za wiązanie lipidów; 4, sekwencja w pałeczce miozyny I bogata w reszty alaninowe i prolinowe, stanowiąca drugie, niezależne od nukleotydu, miejsce wiązania aktyny; 5, sekwencja SH3; 6, sekwencja umożliwiająca tworzenie superhelisy; 7, sekwencje nieustrukturyzowane w pałeczce różnych izoform miozyny; 8, domena kinazowa miozyny III; 9, pałeczka miozyny III; 10, C-końcowa część pałeczki miozyny V; 11, unikalna sekwencja w domenie motorycznej miozyny VI; 12, globularna część pałeczki miozyny VI; 13, domena MyTH4; 14, domena FERM; 15, N-końcowa część miozyny XV.

łeczki, mogą ulegać fosforylacji przez kinazę białkową C (PKC). Zamiana obu lub jednej z tych reszt na resztę alaninową powoduje charakterystyczne, nie obserwowane wcześniej dla innych mutacji, zmiany w ERG, wskazujące na defekt w dezaktywacji fotoreceptora po ustaniu bodźca świetlnego (Li i współaut. 1998). Sugeruje to, że pałeczka p174 uczestniczy w stabilnej terminacji kaskady wzrokowej.

Pomimo, iż nie udało się dotychczas skorelować mutacji w ludzkim genie miozyny III z rozpoznanymi przypadkami utraty wzroku, badania nad jej izoformą z *Drosophila* wydają się jednoznacznie wskazywać na udział miozyny III w procesie widzenia.

MIOZYNA V A ZABURZENIA NEUROLOGICZNE I CHOROBA GRISCELLIEGO

Miozyna V składa się z łańcuchów ciężkich o masie cząsteczkowej ok. 212 kDa (Ryc. 1), zdolnych do tworzenia homodimerów. Łańcu-

chy te charakteryzują się obecnością w każdym z nich nietypowej domeny IQ, z którą może wiązać się sześć cząsteczek kalmoduliny. C-

końcowa część ciężkiego łańcucha miozyny V tworzy charakterystyczną dla niej pałeczkę, odpowiedzialną za specyficzne funkcje tego białka, z którą wiąże się lekki łańcuch (m. cz. 8 kDa) innego białka motorycznego, dyneiny cytoplazmatycznej (odpowiedzialnej za transport wzdłuż mikrotubul). Miozyna ta występuje we wszystkich organizmach, począwszy od drożdży, i lokalizowana jest w pęcherzykach synaptycznych, melanosomach oraz innych organelach, m. in. komórek nerwowych, melanocytów czy drożdży. Badania prowadzone w wielu laboratoriach wykazały, że miozyna V odgrywa istotną rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym (SELLERS 1999). Nie było więc niespodzianką, że zaburzenia związane z defektami transportu wewnątrzkomórkowego są efektami mutacji białka motorycznego.

Miozynę V odkryto jako produkt mysiego locus „*dilute*”, którego mutacje powodowały rozjaśnienie koloru sierści myszy oraz zaburzenia neurologiczne, charakteryzujące się m. in. ciągłymi drgawkami. Takie myszy umierały po ok. 2–3 tygodniach od urodzenia (MERCER i współaut. 1991). Obserwacje te świadczyły o niezwykle istotnej roli tej izoformy miozyny we właściwej organizacji i funkcjonowaniu transportu wewnątrzkomórkowego w melanocytach i neuronach. Ostatnio znaleziono genetyczne podłoże spontanicznej mutacji *flailer* u myszy, również związanej z zaburzeniami neurologicznymi, i okazało się, że także i ta mutacja związana jest z miozyną V (JONES i współaut. 2000). Myszy *flailer* mają kłopoty z utrzymaniem pozycji stojącej — często upadają i przy próbach wstawania wykonują konwulsyjne ruchy bioder, aczkolwiek są w stanie normalnie pływać. Posiadają one prawidłową pigmentację owłosienia oraz przeżywają, zachowując przy tym płodność, okres podobny do myszy typu dzikiego. Analiza genetyczna mutantów *flailer* wykazała, że skutek spontanicznego przetasowania eksonów genu miozyny V oraz genu kodującego Gnb5, białka wiążącego GTP typu beta 5, dochodzi do ekspresji białka hybrydowego. Hybryda taka składa się w N-końcowej części z pierwszych 83 reszt aminokwasowych Gnb5, a pozostałą część cząsteczki stanowi 711 C-końcowych reszt aminokwasowych miozyny V, obejmujących m. in. domenę globularną, odpowiedzialną, jak się uważa, za wiązanie z organelami. Badania genetyczne i biochemiczne wskazują, że białko to, nazwane białkiem *flailer*, współzawodniczy z endogenną miozyną V, zaburzając jej prawidłową lokalizację, a więc i funkcjonowanie w komórce (JONES i współaut. 2000).

Choroba Griscelliego to rzadkie autosomalne schorzenie recesywne, charakteryzujące się „rozrzedzeniem” pigmentu w skórze i włosach, obecnością olbrzymich, nieupostaciowanych skupisk pigmentu u podstawy włosów oraz akumulacją melanosomów w melanocytach. U większości pacjentów obserwuje się również niekontrolowaną aktywację limfocytów T i makrofagów, co w łagodnym przebiegu choroby prowadzi do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej, natomiast w ciężkim może prowadzić do śmierci, o ile nie uda się przeprowadzić przeszczepu szpiku kostnego. W niektórych przypadkach obserwuje się zaburzenia neurologiczne. Locus choroby Griscelliego zmapowano w chromosomie 15q21. Okazało się, że miejsce to pokrywa się z genem kodującym białko motoryczne, miozynę V (PASTURAL i współaut. 1997).

Analiza DNA pobranego od trzech nie spokrewnionych ze sobą pacjentów z chorobą Griscelliego i od zdrowych członków ich rodzin wykazała obecność u dwóch chorych dwóch niezależnych mutacji punktowych w genie kodującym miozynę V. Jedna z nich, zamiana C→T, prowadzi do zamiany reszty argininowej na resztę cysteinową w kodonie 1246, znajdującym się w środkowej części sekwencji aminokwasowej pałeczki. Druga mutacja, zamiana C→T, prowadzi do powstania w pozycji 779 kodonu terminacji, co teoretycznie powoduje ekspresję skróconego białka, składającego się jedynie z części domeny motorycznej. Brak RNA od tego pacjenta uniemożliwił jednak potwierdzenie obecności transkryptu takiego białka (PASTURAL i współaut. 1997). Wkrótce okazało się jednak, iż jedna z tych mutacji, Arg1246Cys, stanowi w rzeczywistości odmianę polimorficzną, gdyż znajdowano ją również u zdrowych osobników (LAMBERT i współaut. 2000).

W 2000 r. wykazano również, że locus choroby Griscelliego w chromosomie 15q21 pokrywa się także z genem kodującym białko Rab27a, należące do GTPaz z nadrodziny Ras, o masie cząsteczkowej ok. 27 kDa (PASTURAL i współaut. 2000). Co więcej, we wszystkich próbkach DNA pobranych od kilkunastu pacjentów cierpiących na chorobę Griscelliego znaleziono szereg mutacji w genie Rab27a. Obecnie uważa się, że mutacje w obrębie genu kodującego właśnie to białko są odpowiedzialne za tę chorobę. Jednakże, postuluje się również, że oba białka, miozyna V i Rab27a, oddziałują ze sobą *in vivo*, i zaburzenia ich wzajemnej relacji mogą prowadzić do defektu w wewnątrzkomórkowym transporcie organeli (MENASCHE i współaut. 2000, WILSON i współaut. 2000).

UDZIAŁ MIOZYN W PATOLOGII SŁUCHU

Szacuje się, że w procesie słyszenia uczestniczy około 100 produktów różnych genów, co wynika ze złożonej budowy ucha wewnętrznego, w którym m. in. znajduje się narząd spiralny Cortiego (Ryc. 2a). Narząd ten odbiera drgania akustyczne i przetwarza je na impulsy nerwowe, przekazywane następnie do mózgu. Podstawową jego częścią są zmysłowe komórki włoskowate (Ryc. 2b), posiadające na swojej górnej powierzchni około 20 rzęsek (stereocyliów) ułożonych w charakterystyczny kształt litery V i

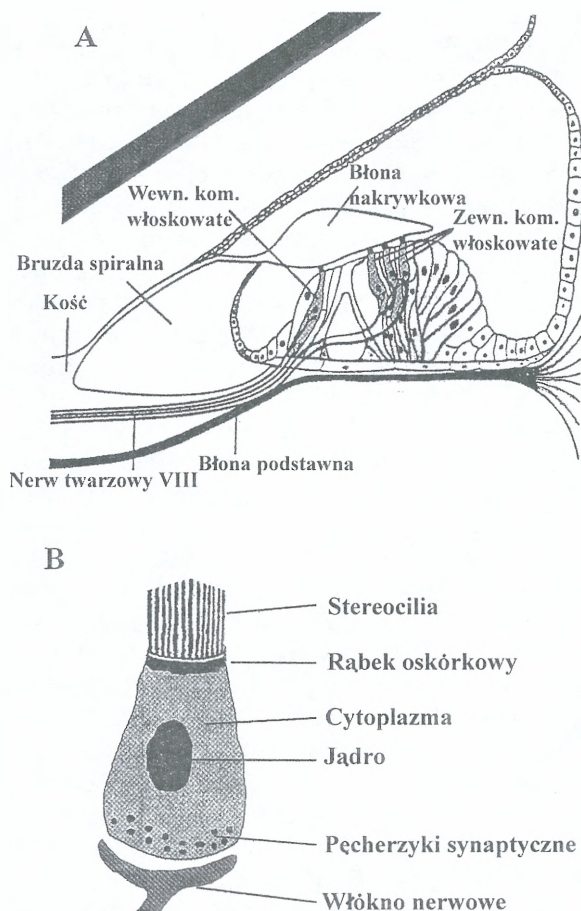
przekazuje sygnał do mózgu. Już w latach 80. stwierdzono, że stereocilia i rąbek oskórkowy są tworami bogatymi w uporządkowane struktury aktywne, nie było więc zaskoczeniem odkrycie, iż w procesie słyszenia zaangażowanych jest szereg białek motorycznych (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

MIOZYNA I

W 1993 r. odkryto, że miozyna I β , tworzona przez monomeryczny łańcuch ciężki o masie cząsteczkowej ok. 120 kDa (Ryc. 1), zlokalizowana jest w strukturach łączących wolne końce stereocyliów (ang. tip-links) w komórkach włoskowatych aparatu słuchowego żaby (GILLESPIE i współaut. 1993). Miozynę tę udało się też zlokalizować w końcach stereocyliów komórek włoskowatych ucha wewnętrznego szczura (HASSON i współaut. 1997). Przypuszcza się, że miozyna I pełni rolę motoru adaptacyjnego, który wzmacnia niewielkie zmiany wywołane przez drgania akustyczne do możliwie maksymalnego otwarcia lub zamknięcia kanału błonowego poprzez utrzymywanie optymalnego naprężenia błony.

MIOZYNA VI

Mapowanie genetyczne głuchych myszy z zespołem Snell's waltzer, które wykazywały wynikającą z uszkodzenia błędniaka typową dlań hiperaktywność, potrząsanie głową i bieganie w kółko, wykazało, że recesywne mutacje autosomalne w tym locus na mysim chromosomie 9 są odpowiedzialne za upośledzenie słuchu. Miejsce to zawiera gen kodujący białko motoryczne, miozynę VI (AVRAHAM i współaut. 1995). Miozyny VI znaleziono również u *Drosophila*, świni i człowieka. Miozyny te są do siebie bardzo podobne, zarówno pod względem struktury, jak i funkcji pełnionych w komórce (SELLERS 1999). Izoformy te składają się z łańcuchów ciężkich o masie cząsteczkowej ok. 140 kDa. Zawierają one typową domenę motoryczną, w której C-końcowej części znajduje się sekwencja unikalna dla miozyny VI (przypuszczalnie odpowiedzialna za zdolność do poruszania przez tę miozynę filamentów aktynowych w przeciwnym niż inne miozyny kierunku), domenę IQ oraz charakterystyczną pałeczkę zawierającą, obok rejonu superhelikalnego (wskazującego na możliwość tworzenia homodimerów), unikalną domenę globularną (Ryc. 1). Badania miozyny VI z *Dro-*



Ryc. 2. Budowa aparatu Cortiego (A) oraz zmysłowej komórki włoskowatej ucha wewnętrznego (B).

zakotwiczonych w strukturze zwanej rąbkem oskórkowym. Drgania akustyczne uginają stereocilia powodując przesuwanie ich względem siebie, co z kolei powoduje otwieranie lub zamykanie kanałów jonowych, wywołujących depolaryzację lub hiperpolaryzację błony komórek włoskowatych. Prowadzi to do uwalniania się przekaźników synaptycznych z zakończeń synaptycznych nerwu twarzowego VIII, który

sophila wykazały, że uczestniczy ona w wewnątrzkomórkowym transporcie drobnych organelli (SELLERS 1999).

U myszy miozyna VI ulega ekspresji w uchu wewnętrznym, nerkach, wątrobie i jądrach. W komórkach włoskowatych ucha wewnętrznego można ją znaleźć w rąbku oskórkowym i w cytoplazmie (HASSON i współaut. 1997). Wykryto dwie mutacje genu miozyny VI prowadzące do zespołu Snell's waltzer. Jedna z nich (sv) to spontaniczna delecja ok. 130 par zasad w rejonie kodującym szyjkę miozyny, powodująca powstanie kodonu terminacji. Druga, (se^{sv}), wywołana promieniowaniem jonizującym, jest inwersją rejonu zawierającego około 30000-220000 par zasad, poprzedzającego ramkę odczytu tego genu. Obie mutacje prowadzą do znacznego obniżenia ilości mRNA i białka, co powoduje zmiany w morfologii komórek włoskowatych. Komórki te są bardzo zaokrąglone, nie zawierają stereocyliów i degenerują po około 6 tygodniach od urodzenia myszy. Wskazuje to na udział miozyny VI w utrzymywaniu integralności struktury komórek włoskowatych. Dotychczas nie udało się zidentyfikować żadnej mutacji w obrębie genu kodującego miozynę VI u człowieka.

Pisząc o roli miozyny VI nie można pominąć doniesień omawiających udział tej izoformy w morfogenezie *Drosophila*. HICKS i współaut. (1999) utworzyli mutację w genie kodującym miozynę VI, która spowodowała defekty w różnicowaniu się spermatydów u męskich osobników muszki, prowadzące do ich bezpłodności. Dane te wskazują na udział miozyny VI w procesie spermatogenezy. Z kolei DENG i współaut. (1999) wykazali, że izoforma ta jest niezbędna w procesie tworzenia osłonki jaja muszki oraz w procesie kształtowania się dysku imaginalnego, który jest kluczowym etapem w morfogenezie *Drosophila*.

MIOZYNA VII

Miozyna VIIA jest następnym białkiem motorycznym, które łączone jest z głuchotą, zarówno u ludzi, jak i u myszy. Mutacje w ludzkim genie miozyny VIIA odpowiedzialne są za występowanie zespołu USHER 1B, autosomalnego recesywnego upośledzenia słuchu połączonego z zapaleniem siatkówki (WEIL i współaut. 1996). Zespół ten jest najczęstszą przyczyną głuchoty połączonej z utratą wzroku; ujawnia się z reguły już przy narodzinach i może doprowadzić do całkowitej głuchoty i ślepoty w okresie dojrzewania. U myszy, natomiast, mutacje w genie miozyny VIIA odpowiedzialne są za zespół shaker-1, który, podobnie jak w przypadku zespołu

Snell's waltzer, obejmuje charakterystyczne zmiany w zachowaniu głuchych zwierząt. U myszy nie zaobserwowano objawów zaniku siatkówki. Locus USHER 1B zmapowano w 11q13.5, zaś shaker-1 w mysim chromosomie 9 (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

Ludzka miozyna VIIA występuje w postaci dwóch izoform, powstających w wyniku odmiennego składowania eksonów, tworzonych przez łańcuchy ciężkie o masach cząsteczkowych ok. 250 kDa i ok. 138 kDa. Łańcuchy te zawierają typową N-końcową domenę motoryczną, szyjkę obejmującą 5 motywów IQ, oraz pałeczki, która, poza regionem odpowiedzialnym za tworzenie homodimerów, posiada szereg sekwencji aminokwasowych obecnych także w innych białkach cytoskieletu. Są to domeny MyTH4 (ang. myosin tail homology 4), obecne także w miozynie IV, X, XII i XV, sekwencja SH3 (stanowiąca region oddziaływania z białkami zawierającymi sekwencje bogate w reszty prolinowe) i domena FERM (wskazująca na zdolność do oddziaływania z lipidami) (Ryc. 1). Obie izoformy miozyny VIIA różnią się C-końcową częścią pałeczki (SELLERS 1999). Dłuższe białko występuje w jądrach, nerkach, komórkach fotoreceptorowych siatkówki oraz w zmysłowych komórkach włoskowatych ucha wewnętrznego, natomiast krótsze wydaje się występować jedynie w jądrach. U pacjentów z zespołem USHER 1B nie zaobserwowano zmian w jądrach, aczkolwiek u niektórych z nich wykryto obniżoną ruchliwość plemników (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999). W komórkach włoskowatych myszy miozynę VIIA zlokalizowano w stereocyliach, rąbku oskórkowymi i cytoplazmie.

Podczas gdy u myszy w genie kodującym miozynę VIIA (w ok. 95% identyczną z dłuższą izoformą ludzką) zidentyfikowano dotychczas trzy mutacje, ilość takich mutacji wykryta u ludzi na całym świecie przekroczyła liczbę czterdziestu (Tabela 1). U myszy dwie spontaniczne mutacje to Sh1, charakteryzująca się zamianą jednej z niekonserwatywnych reszt argininowych na resztę prolinową w domenie motorycznej, oraz 6J, prowadząca do zamiany konserwatywnej reszty argininowej w pozycji 214 na resztę prolinową w pobliżu miejsca wiązania nukleotydu w domenie motorycznej. Mutacja 816SB jest indukowaną nitrozomocznikiem delecją 10 aminokwasów (646-655) położonych w miejscu wiązania aktywności w domenie motorycznej. O ile mutacja Sh1 powoduje tylko niewielkie zmiany w morfologii komórek włoskowatych, o tyle pozostałe mutacje prowadzą do całkowitej dezorganizacji ich struktury (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

Tabela 1. Mutacje wykryte w genie kodującym miozynę VIIA

| Lokalizacja w genie ^a | Zamiana w sekwencji aminokwasowej ^a | Lokalizacja w białku |
|----------------------------------|--|--|
| DOMENA MOTORYCZNA | | |
| ekson 2, G → A | Gly25Arg | Rejon niekonserwatywny |
| <i>intron 3, IVS3nt-2a → g</i> | <i>pominięcie 3' eksonu lub zmiana ramki odczytu prowadząca do kodonu terminacji</i> | |
| ekson 3, C → A | Cys31Stop | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 4, 75delC(FS) | Asp75FS → Stop | Rejon niekonserwatywny |
| <i>intron 4, IVS5 + 1 → a</i> | <i>pominięcie 3' eksonu lub zmiana ramki odczytu prowadząca do kodonu terminacji</i> | |
| ekson 5, 120delC(FS) | Arg120Stop | W pobliżu miejsca wiązania ATP |
| ekson 5, C → T | Arg150Stop | W pobliżu miejsca wiązania ATP |
| ekson 6, G → A | Arg212His | Koniec C kieszeni wiążącej ATP |
| ekson 6, C → A | Arg 212Cys | Koniec C kieszeni wiążącej ATP |
| ekson 6, G → A | Gly214Arg | Koniec C kieszeni wiążącej ATP |
| ekson 6, Δ6bp | ΔAsp218Ile219 | Koniec C kieszeni wiążącej ATP |
| ekson 6, C → T | Gln234Stop | W obrębie konserwatywnej petli tworzącej kieszeń wiążącą ATP |
| ekson 7, C → A | Arg241Ser | W obrębie konserwatywnej petli tworzącej kieszeń wiążącą ATP |
| ekson 7, A → G | Arg244Pro ^b | W obrębie konserwatywnej petli tworzącej kieszeń wiążącą ATP |
| ekson 8, G → A | Arg302His | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 8, G → T | Glu314Stop | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 8, T → G | Tyr333Stop | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 10, C → A | Ala397Asp | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 12, G → C | Glu450Gln | Konserwatywny α-heliks |
| ekson 12, + GCA | His468+Gln | Konserwatywny α-heliks |
| ekson 12, C → T | Pro503Leu ^b | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 13 delC | Asp521 → Stop | Rejon niekonserwatywny |
| ekson 13, delA | His532 → Stop | Rejon niekonserwatywny |
| <i>intron 13, IVS13nt-8c →</i> | <i>pominięcie 3' eksonu i niestabilność mRNA</i> | |
| ekson 14, G → A | Met599Ile | W pobliżu miejsca wiązania aktywny |
| ekson 15, C → A | Cys628Stop Leu51Pro | W pobliżu miejsca wiązania aktywny |
| CZEŚĆ C-KOŃCOWA | | |
| <i>intron 18, IVS18+1a → g</i> | <i>pominięcie 3' eksonu kodującego motywy IQ</i> | |
| ekson 20, G → A | Ala826Thr | Domena IQ |
| ekson 21, Δ9bp | Δ886-888 | Region superhelisy |
| ekson 22, G → A | Gly955Ser | Region superhelisy |
| ekson 23, G → T | Glu960Stop | Region superhelisy |
| <i>intron 28, IV3750+2T → A</i> | <i>pominięcie 5' eksonu kodującego motywy MyTH4</i> | |
| ekson 38, C → T | Glu1798Stop | Domena FERM |
| ekson 39, C → T | Arg1861Stop | Domena MyTH4 |
| ekson 44, ΔC | Pro2065DC → Stop | Domena FERM |
| eksyony 46-48, Δ2kbp | Δ2119-2215 | C-koniec domeny FERM |
| ekson 46, C → A | Gly2137Glu | Domena FERM |
| ekson 48, G → A | Gly2163Ser | Domena FERM |

a — kolejność eksonów i kodonów dostosowano do sekwencji przedstawionej przez WEILA i współaut. 1996. ^b — mutacje wykryte również u myszy z zespołem *shaker-1*; STOP — kodon terminacji; Δ lub del — delecja; FS — zmiana ramki odczytu; bp — pary zasad; IVS — mutacje w intronach powstałe wskutek błędów w składaniu genu; *kursywa* — mutacje wykryte w intronach: małe litery — miejsca 3' składania akceptora, zaś duże litery — miejsca 5' składania donora.

Jak przedstawiono w Tabeli 1, mutacje w ludzkim genie miozyny VIIA występują zarówno w domenie motorycznej, szyjce, jak i w pałeczce. Mutacje w obrębie domeny motorycznej są najczęstsze i prowadzą z reguły do najszybszego wystąpienia objawów klinicznych. Dotyczą one głównie rejonów wiążących aktywną i ATP. Mogą to być mutacje powodujące pojawianie się kodonów stop (terminacji), co prowadzi do powstawania skróconego i niefunkcjonalnego białka, lub też mutacje punktowe powodujące zastąpienia reszt aminokwasowych lub zmian fazy w ramce odczytu, prowadzące również do ekspresji niefunkcjonalnej miozyny VIIA. Podobne efekty wywołują mutacje w rejonie szyjki i pałeczki, w domenach IQ, MyTH4, FERM czy też w odcinku umożliwiającym tworzenie superhelisy. Udało się zidentyfikować pacjentów, u których wykryto więcej niż jedną mutację w genie miozyny VIIA. Pacjenci ci z reguły wykazywali objawy głuchoty i ślepoty już przy narodzinach (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

Badania nad udziałem miozyny VIIA w procesie słyszenia wydają się wskazywać na rolę tego białka w utrzymaniu prawidłowej organizacji stereocyliów, prawdopodobnie poprzez łączenie ich ze sobą czy też zakotwiczeniu ich w rąbku oskórkowym. Wydaje się też, że miozyna ta uczestniczy w wewnątrzkomórkowym transporcie błon fotoreceptorowych siatkówki. Sugestie te zdają się potwierdzać badania wykazujące udział miozyny VIIA w dystrybucji melanosomów w komórkach barwnikowych nabłonka siatkówki (LIU i współaut. 1998) czy też w procesie fagocytozy u śluzowca (OISHI i współaut. 2000).

MIOZYNA XV

Kolejną miozyną zaangażowaną w procesie słyszenia u ludzi i myszy jest miozyna XV. Stwierdzono, że mutacja w mysim genie kodującym miozynę XV odpowiedzialna jest za objawy zespołu głuchoty *shaker-2* u myszy, zaś trzy mutacje u ludzi skorelowano z utratą słuchu typu DFNB3. U ludzi locus *DFNB3* znajduje się w chromosomie 17p11.2, zaś u myszy locus *shaker-2* mapuje się w chromosomie 11. Nie zaobserwowano u ludzi innych objawów niż utrata słuchu, natomiast myszy poza głuchotą wykazują typowe zmiany związane z uszkodzeniem błędnika, obserwowane także u zwierząt z zespołem Snell's waltzer lub *shaker-1* (patrz literatura: RĘDOWICZ 1999).

Miozyna XV posiada najdłuższy poznany dotąd łańcuch ciężki, o masie cząsteczkowej ok.

395 kDa, nie posiadający sekwencji wskazujących na możliwość tworzenia homodimerów. Zawiera on unikalną N-końcową domenę utworzoną przez około 1200 reszt aminokwasowych, która poprzedza typową domenę motoryczną i szyjkę z dwoma motywami IQ. C-końcowa pałeczka zawiera domeny MyTH4, SH3 oraz FERM (Ryc. 1). Mysia i ludzka izoforma miozyny XV wykazują około 90% identyczności (LIANG i współaut. 1999). U obu gatunków miozyna XV obecna jest w przysadce mózgowej, a także w komórkach włoskowatych ucha wewnętrznego. W komórkach włoskowatych miozyna XV zlokalizowana jest w stereocyliach i rąbku oskórkowym.

U myszy z zespołem *shaker-2* stwierdzono jedną recesywną mutację w genie miozyny XV. Powoduje ona zamianę reszty cysteinowej na resztę tyrozynową w pozycji 1779, znajdującej się w konserwatywnym regionie domeny motorycznej (PROBST i współaut. 1998). Mutacja ta powoduje znaczne skrócenie stereocyliów, przy zachowaniu ich prawidłowego ułożenia na powierzchni komórki włoskowatej, oraz pojawienie się nietypowych struktur zawierających aktywną, o długości ok. 50 m, skierowanych od rąbka oskórkowego w głąb komórki. Co ciekawe, udało się przeprowadzić udaną próbę odwrócenia fenotypu *shaker-2*. Do zapłodnionych komórek jajowych pochodzących z głuchych myszy wstrzyknięto fragment cDNA miozyny XV typu dzikiego, odpowiadający zmutowanemu regionowi genu. Z takich komórek jajowych urodziły się zdrowe, słyszące zwierzęta (PROBST i współaut. 1998).

W ludzkim genie kodującym miozynę XV udało się znaleźć trzy mutacje związane z zespołem DFNB3, w rejonie kodującym pałeczkę. Dwie z nich znajdują się w domenie MyTH4 i są zamianami reszty asparaginianowej na tyrozynową w pozycji 2111 oraz reszty izoleucynowej na fenyloalaninową w pozycji 2113. Trzecia mutacja to powstanie w pozycji 2601 (w pobliżu domeny FERM) kodonu terminacji (WANG i współaut. 1998).

Dotychczasowe badania nad udziałem miozyny XV w procesie słyszenia wskazują na istotną rolę tej izoformy w organizacji cytoszkieletu aktynowego w komórkach włoskowatych, aczkolwiek brak jeszcze danych umożliwiających na wskazanie mechanizmu działania. Obecność domen FERM, MyTH4 i SH3, podobnie jak w miozynie VIIA, sugerują możliwość wiązania lipidów i oddziaływania z innymi białkami cytoszkieletu.

MIOZYNY A HIPERTROFIA MIĘŚNIA SERCOWEGO

Szacuje się, że około 15–30% rodzin dotkniętych genetycznie uwarunkowaną hipertrofią mięśnia sercowego zawiera mutacje w genie kodującym ciężki łańcuch miozyny z mięśnia sercowego typu β . Miozyna z mięśnia sercowego jest przedstawicielem klasy II w rodzinie miozyn, zwanej również klasą miozyn konwencjonalnych. Należy do niej szereg izoform miozyn mięśniowych (z mięśni szkieletowych, gładkich czy serca) oraz niemięśniowych, obecnych we wszystkich komórkach eukariotycznych, także i w mięśniach. Są to heksamery utworzone przez dwa łańcuchy ciężkie o masach cząsteczkowych z reguły ok. 200 kDa oraz dwie pary łańcuchów lekkich o masach cząsteczkowych od 16 do 25 kDa, wśród których wyróżnia się tzw. łańcuchy istotne (niezbędne) oraz łańcuchy regulujące. Łańcuchy ciężkie zawierają typową domenę motoryczną, szyjkę z dwoma motywami IQ oraz pałeczkę, która tworzy superhelisę, uczestniczącą w formowaniu filamentów miozynowych (Ryc. 1).

Rodzinna hipertrofia mięśnia sercowego charakteryzuje się przerostem zwykle lewej komory i przegrody serca. W takim mięśniu następuje zanik prawidłowego uporządkowania sarkomerów oraz pojawiają się liczne zwłóknienia. Objawami tej choroby, przebiegającej w zróżnicowanej postaci są m. in. arytmia, dusznica bolesna oraz nagła śmierć. U pacjentów z tym rodzajem hipertrofii mięśniowej zidentyfikowano dotychczas ponad 50 różnych mutacji punktowych dotyczących reszt aminokwasowych znajdujących się w domenie motorycznej i szyjce (obie te domeny nazywane są łącznie główką miozyny) oraz w N-końcowej części pałeczki, zwanej subfragmentem 2 (S2)*. Nie udało się wykryć mutacji w C-końcowej części pałeczki, co może wynikać z kilku zasadniczych przyczyn. Być może mutacje w tym rejonie cząsteczki w ogóle nie zachodzą, co jest mało prawdopodobne. Istnieje też możliwość, że występujące mutacje nie powodują drastycznych zmian w mięśniu sercowym, w związku z tym nie wywołują objawów hipertrofii. Mutacje takie mogą też być letalne już we wczesnych etapach życia (patrz literatura: SELLERS 1999). Mutacje wykryte w łańcuchu typu β miozyny z mięśnia sercowego zgrupowane są w czterech głównych regionach główki miozyny. Mogą być one zlokalizowane w miejscu wiążącym aktynę i jego sąsiedztwie (4 mutacje), w pobliżu i w miejscu

wiązania nukleotydu (12 mutacji), w rejonie zawierającym tzw. reaktywne cysteiny (9 mutacji), a także w rejonie szyjki oddziaływującym z istotnym łańcuchem lekkim (10 mutacji). W rejonie S2 zidentyfikowano 7 mutacji, które, jak się okazało w badaniach *in vitro*, nie powodują utraty zdolności do tworzenia superhelisy. Zidentyfikowano również szereg mutacji w genach kodujących lekkie łańcuchy miozyny. W łańcuchu istotnym wykryto 2 mutacje, zaś w łańcuchu regulującym znaleziono 5 mutacji. Mutacje w łańcuchach lekkich łączone są z rzadką odmianą hipertrofii mięśniowej, zwanej zatorem zastawki, gdzie przerostowi ulegają jedynie mięśnie brodawkowate i mięśnie z nimi sąsiadujące.

Niektóre z mutacji w łańcuchu ciężkim typu, jak np. zamiana reszty argininowej w pozycji 403 na resztę glutaminową, wykryto u trzech niespokrewnionych ze sobą rodzin, zaś zamianę reszty argininowej w pozycji 663 na resztę histydynową zidentyfikowano u dziesięciu rodzin. Badania biochemiczne przeprowadzane na miozynach wyizolowanych z biopsji mięśniowych pobranych od pacjentów lub na rekombinowanych fragmentach miozyny potwierdziły sugestie, że zmutowane białka wykazują defekty funkcjonalne. Ich zdolność do poruszania filamentów aktynowych, mierzona w teście ruchliwości, czy też stymulowana aktywność ATPazy, są znacznie zredukowane (SELLERS 1999).

Pisząc o roli miozyny w sercu należy wspomnieć o badaniach myszy transgenicznych, u których wyeliminowano gen kodujący miozynę niemięśniową typu IIB. Okazało się, że ok. 65% zarodków obumierało, a te myszy, które przyszyły na świat, ginęły z reguły w ciągu 24 godzin wskutek zaburzeń pracy serca wynikających z jego przekrwienia. Badania histologiczne wykazały defekt w strukturze przegrody międzykomorowej i zator mięśniowy w górnej części prawej komory, uniemożliwiający prawidłowe krążenie krwi. Mięsień sercowy wykazywał typowe objawy hipertrofii, występowały liczne zwłóknienia i zaburzenia w prawidłowej organizacji sarkomerów. Wyniki te wskazują, że miozyna niemięśniowa typu IIB jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju miocytów sercowych i właściwej organizacji serca (TULLIO i współaut. 1997).

*W najbliższym numerze KOSMOSU Anna Moczarska szczegółowo opisze genetyczne podłoże hipertrofii mięśniowej.

MYOSINS AND PATHOLOGY

Summary

Myosins, the actin-based motors ubiquitously expressed in all eukaryotes as multiple isoforms, form a diverse superfamily consisting of at least 18 different classes (families). Myosins are involved in various cellular functions such as cell motility, intracellular transport of vesicles and organelles, cytokinesis, endo- and exocytosis. It has been demonstrated that representatives of myosin III family localize specifically to photoreceptor cells and are engaged in the vision process in *Drosophila*. Mutations within the human myosin V gene seem to be associated with

the Griscelli syndrome, a disease that results from the defect in transport of organelles. Several myosin isoforms have been found to be involved in the hearing process. Myosin I is postulated to play a role as an adaptive motor in the tip links of stereocilia in the inner ear hair cells. Numerous mutations within the human and mouse genes encoding myosin VI, VIIA or XV have been linked to hereditary deafness. About 15–30% of patients with familial hypertrophic myopathy have mutations within the genes encoding the β -cardiac myosin heavy and the light chains.

LITERATURA

- AVRAHAM K. B., HASSON T., STEEL K. P., KINGSLEY D. M., RUSSEL L. B., MOOSEKER M. S., COPELAND N. G., JENKINS N. A., 1995. *The mouse Snells waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells.* Nature Genet. 11, 369–375.
- BATELLE B. A., ANDREWS A. W., CALMAN B. G., SELLERS, J. R., GREENBERG R. M., SMITH W. C., 1998. *A myosin III from Limulus is a clock regulated phosphoprotein.* J. Neurosci. 18, 4548–4559.
- DENG W. M., LEAPER K., BOWNES M., 1999. *A targeted gene silencing technique shows that Drosophila myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis.* J. Cell Sci. 112, 3677–3690.
- DOSE A. C., BURNSIDE B., 2000. *Cloning and chromosomal characterization of a human class III myosin.* Genomics 67, 333–342.
- GILLESPIE P. G., WAGNER M. C., HUDSPETH A. J., 1993. *Identification of a 120 kd hair bundle myosin located near stereociliary tips.* Neuron 11, 581–594.
- HASSON T., GILLESPIE P. G., GARCIA J. A., MACDONALD R. B., ZHAO Y., YEE A. G., MOOSEKER M. S., COREY, P. D., 1997. *Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia.* J. Cell Biol. 137, 1287–1307.
- HICKS J. L., WILLIAMS D. S., 1992. *Distribution of the myosin I-like ninaC proteins in Drosophila retina and ultrastructural analysis of mutant phenotypes.* J. Cell Sci. 101, 247–254.
- HICKS J. L., DENG W. M., ROGAT A. D., MILLER K.G., BOWNES M., 1999. *Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in Drosophila.* Mol. Biol. Cell 10, 4341–4353.
- JONES J. M., HUANG J. A., MERMALL V., HAMILTON B. A., MOOSEKER M., ESCAYG A., COPELAND N. G., JENKINS N. A., MEISLER M. H., 2000. *The mouse neurological mutant flailer expresses a novel hybrid gene derived by exon shuffling between Gnb5 and Myo5a.* Hum. Mol. Genet. 9, 821–828.
- KORN E. D., 2000. *Co-evolution of head, neck and tail domains of myosin heavy chains.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12559–12564.
- LAMBERT J., NAËYAERT J. M., DE PAEPE A., VAN COSTER R., FERSTER A., SONG M., MESSIAEN L., 2000. *Arg-Cys substitution at codon 1246 is not associated with Griscelli syndrome.* J. Invest. Dermatol. 114, 731–733.
- LI H. S., PORTER J. A., MONTEL C., 1998. *Requirements for the NINAC kinase/myosin for stable termination of the visual cascade.* J. Neurosci. 18, 9601–9606.
- LIANG Y., WANG A., BELYANTSEVA I. A., ANDERSON D. W., PROBST F. J., BARBER T. D., MILLER W., TOCHMAN J. W., JIN L., SULLIVAN S. L., SELLERS J. R., CAMPER S. A., LLOYD R. V., KACHAR B., FRIEDMAN T. B., FRIDELL R. A., 1999. *Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2.* Genomics 61, 243–258.
- LIU X., ONDEK, B., WILLIAMS, D. S., 1998. *Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice.* Nature Genet. 19, 117–118.
- MENASCHE G., PASTURAL E., FELDMAN J., CERTAIN S., ERSOY F., DUPUIS S., WULFFRAAT N., BIANCHI D., FISCHER A., LE DEIST F., DE SAINT BASILE G., 2000. *Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemaphagocytic syndrome.* Nature Genet. 25, 173–176.
- MERCER J. A., SEPERACK P. K., STROBEL M. C., COPELAND N. G., JENKINS N. A., 1991. *Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus.* Nature 349, 709–713.
- MONTEL C., RUBIN G. M., 1988. *The Drosophila ninaC locus encodes two photoreceptor specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head.* Cell 52, 757–772.
- OISHI N., ADACHI H., SUTOCH K., 2000. *Novel Dictyostelium myosin, MyoM, has a putative RhoGEF domain.* FEBS Lett. 474, 16–22.
- PASTURAL E., BARRAT F. J., DUFOURCQ-LAGELOUSE R., CERTAIN S., SANAL O., JABADO N., SEGER R., GRISCELLI C., FISCHER A., DE SAINT BASILE G., 1997. *Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin Va gene.* Nature Genet. 16, 289–292.
- PASTURAL E., ERSOY F., YALMAN N., WULFFRAAT N., GRILLO E., OZKINAY F., TEZCAN I., GEDIKOGLU G., PHILIPPE N., FISCHER A., DE SAINT BASILE G., 2000. *Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus.* Genomics 63, 299–306.
- PORTER J. A., MONTEL C., 1993. *Distinct roles of the Drosophila ninaC kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis.* J. Cell Biol. 1222, 601–612.
- PORTER J. A., HICKS J.L., WILLIAMS D. S., MONTEL C., 1992. *Differential localizations of and requirements for the two Drosophila ninaC kinase/myosins in photoreceptor cells.* J. Cell Biol. 116, 683–693.
- PROBST F. J., FRIDELL R. A., RAPHAEL Y., SAUNDERS T. L., WANG A., LIANG Y., MORELL R. J., TOCHMAN J. W., LYONS R. H., NOBEN-TRAUTH K., FRIEDMAN T. B., CAMPER S. A., 1998. *Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene.* Science 280, 1444–1447.
- REDOWICZ M. J., 1999. *Myosins and deafness.* J. Muscle Res. Cell Motil. 20, 241–248.
- SELLERS J. R., 1999. *Myosin. Protein Profile.* Wyd. 2. Oxford University Press, Oxford.
- TULLIO N. A., ACCILI D., FERRANS V. J., YU Z. X., TAKEDA K., GRINBERG A., WESTPHAL H., PRESTON Y. A., ADELSTEIN R.S., 1997. *Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12407–12412.

- WANG A., LIANG Y., FRIDEL R. A., PROBST F. J., WILCOX E. R., TOUCHMAN J. W., MORTON C. C., MORELL R. J., NOBEN-TRAUTH K., CAMPER S. A., FRIEDMAN T. B., 1998. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280, 1447-1451.
- WEIL D., LEVY G., SAHLY I., LEVI-ACOBAS F., BLANCHARD S., EL-AMRAOUI A., CROZET F., PHILIPPE H., ABITBOL M., PETIT C., 1996. Human myosin VIIA responsible for the USHER 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3232-3237.
- WILSON S. M., RICHARD Y., SWIND D. A., OSULLIVAN T. N., ZHANG Y., NOWAK E. K., SWANK R. T., RUSSELL L. B., COPELAND N. G., JENKINS N. A., 2000. A mutation in Rab 27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7933-7938.
- YAMASHITA R. A., SELLERS J. R., ANDERSON, J. B., 2000. Identification and analysis of the myosin superfamily in *Drosophila*: a database approach. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 491-505.