

BARBARA PLISZKA

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: basiap@nencki.gov.pl

## MOLEKULARNY MECHANIZM GENERACJI RUCHU PRZEZ MIOZYNE

### WSTĘP

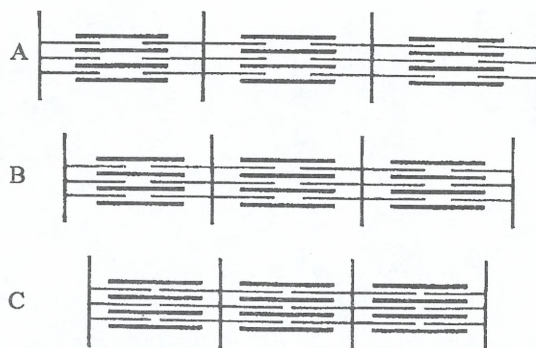
Nieodłączną cechą istot żywych jest ruch, a wyspecjalizowanym narządem ruchu w świecie zwierzęcym jest mięsień. Od dawna próbowano dociec, skąd mięsień bierze paliwo potrzebne do wykonania pracy i w jaki sposób to paliwo jest przekształcane w energię mechaniczną ruchu. Poszukiwanie odpowiedzi na to ostatnie pytanie wymaga badań na poziomie molekularnym.

W badaniach procesu skurczu powszechnie stosowanym materiałem są mięśnie szkieletowe kręgowców. Ich działanie, w przeciwieństwie do działania mięśni gładkich i mięśnia sercowego, jest zależne od woli właściciela. Zbudowane są z wrzecionowatych komórek zwanych włóknami. Włókna są z kolei wypełnione włóknienkami noszącymi nazwę miofibryli, ułożonymi równolegle do długiej osi komórki. Poprzeczne prążkowanie widoczne w mikroskopie jest wynikiem regularnej struktury wypełniających miofibryle filamentów grubych i cienkich, leżących równolegle i częściowo zachodzących na siebie. W ten sposób powstają strefy zawierające filamenty tylko grube lub cienkie oraz strefy gdzie występują oba rodzaje filamentów (Ryc. 1). Głównymi składnikami filamentów są dwa białka: grubych filamentów — miozyna, a cienkich — aktyna. Miozyna w filamencie występuje w postaci wysocze zorganizowanych agregatów, a aktyna w formie polimerów (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 1997).

Przełomowe znaczenie dla badań mechanizmu skurczu miało odkrycie dokonane przez ENGELHARDTA i LUBIMOWĄ (1939) którzy stwierdzili, że energia potrzebna do pracy mięśnia jest uwalniana podczas hydrolizy wysokoenergetycznego związku należącego do nukleoty-

dów, adenosynotryfosforanu (ATP), i że reakcja ta jest katalizowana przez miozynę, która jest jednocześnie enzymem i białkiem strukturalnym.

Twórcami potwierdzonej później doświadczalnie ślizgowej teorii skurczu mięśnia byli A.F. HUXLEY i NIEDERGERKE (1954) oraz H.E. HUXLEY i HANSON (1954). Podczas skurczu mięśnia filamenty grube i cienkie przesuwają się względem siebie, przy czym ich długość nie ulega zmianie, natomiast wydłużają się strefy ich zachodzenia na siebie (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat przesuwania się filamentów podczas skurczu mięśnia.

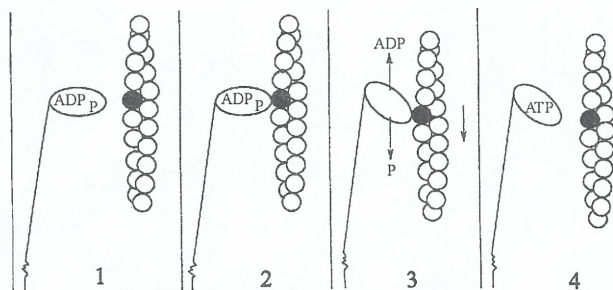
Grubszymi liniami zaznaczono filamenty miozynowe, cieńszymi — aktynowe. A,B,C — kolejne fazy skurczu.

Niedługo potem, za pomocą mikroskopii elektronowej, wykazano istnienie połączeń między dwoma rodzajami filamentów, tzw. mostków poprzecznych (HUXLEY 1957), które okazały się być częścią filamentów miozynowych, a ściślej — globularnymi fragmentami cząsteczek miozyny.

## MIOZYNA I JEJ ROLA W SKURCZU MIĘŚNIA

Miozyna jest białkiem o masie cząsteczkowej 480 kDa, składającym się z dwóch łańcuchów ciężkich (po 200 kDa) i dwóch par łańcuchów lekkich (po ok. 20 kDa). N-końcowe części każdego z dwóch ciężkich łańcuchów zwinięte są w globularne „główki”, u podstawy których, w zwężonych odcinkach główek, zlokalizowane są po dwa lekkie łańcuchy; dalej ciężkie łańcuchy owijają się wokół siebie tworząc długą superhelisę, nazywaną „pałeczką” miozyny. Właśnie za pośrednictwem pałeczek cząsteczki miozyny agregują tworząc grube filamenty. Po proteolitycznym odtrawieniu główek od reszty cząsteczki okazało się, że w nich zlokalizowana jest zdolność wiązania i hydrolizy ATP, a także miejsce wiązania głównego białka cienkich filamentów, aktyny (SZENT-GYORGYI 1953, LOWEY i WSPÓŁAUT. 1969, MUELLER i PERRY 1962). Otrzymana w wyniku proteolizy główka nazywana jest „subfragmentem 1” (S1) miozyny.

Na podstawie obserwacji mostków poprzecznych w mikroskopie elektronowym oraz badań kinetyki reakcji hydrolizy ATP przez miozynę, zaproponowano mechanizm generacji siły (ruchu) w komórce mięśniowej, schematycznie przedstawiony na Ryc. 2 (HUXLEY 1969, LYMN I



główek do aktywnej (reakcja 2) przyspieszałyby uwolnienie produktów hydrolizy, ortofosforanu ( $P_i$ ) i ADP. Uwalnianie produktów byłoby związane z powrotem połączonych z aktywną główek do poprzedniego stanu przez ponowną zmianę kąta ich nachylenia, wskutek czego następowałoby przesunięcie filamentu aktynowego przez główkę miozynową (reakcja 3). Schemat ten uwzględnia tylko główne stany konformacyjne cząsteczki miozyny sprzężone z cyklem hydrolizy ATP, pomijając etapy pośrednie.

Dla zjawiska ruchu istotne jest, że filament aktynowy wykazuje polarność, co powoduje, że wędrówka główek miozynowych po tym filamencie może odbywać się tylko w jednym kierunku. Innym warunkiem ruchu jest asynchroniczne działanie mostków poprzecznych, zapewniające istnienie kontaktu pewnej frakcji główek miozyny z filamentem aktynowym w każdym momencie skurczu.

Z badań kinetyki reakcji hydrolizy ATP przez miozynę wiadomo, że proces uwalniania produktów hydrolizy z centrum katalitycznego jest najwolniejszą reakcją cyklu i że wiązanie aktyny powoduje wielokrotny wzrost jego szybkości. Ta czynna rola aktyny w cyklu hydrolizy ATP musi

Ryc. 2. Schemat sprzężenia zmian konformacji mostków miozynowych ze stadiami cyklu hydrolizy ATP (wg HUXLEYA 1969, LYMNA I TAYLORA 1971, zmodyfikowany). Opis w tekście.

TAYLOR 1971). Mechanizm ten polegałby na cyklicznych zmianach konformacji mostków, zachodzących w powiązaniu z kolejnymi etapami hydrolizy ATP. Wiązanie ATP przez miozynę powodowałoby odłączenie główek od filamentu aktynowego (reakcja 4). Zachodzącej następnie hydrolizie nukleotydu towarzyszyłaby zmiana kąta nachylenia główki w stosunku do długiej osi filamentu (reakcja 1). Ponowne przyłączenie

być związana ze zmianami konformacji łańcuchów polipeptydowych miozyny. Z kolei wiązanie ATP wywołuje inny stan konformacyjny, charakteryzujący się obniżonym powinowactwem do aktyny, co powoduje odłączenie główki od filamentu aktynowego. Jest więc oczywiste, że klucza do wyjaśnienia zmian zachodzących podczas skurczu mięśnia należy szukać w strukturze główki miozynowej.

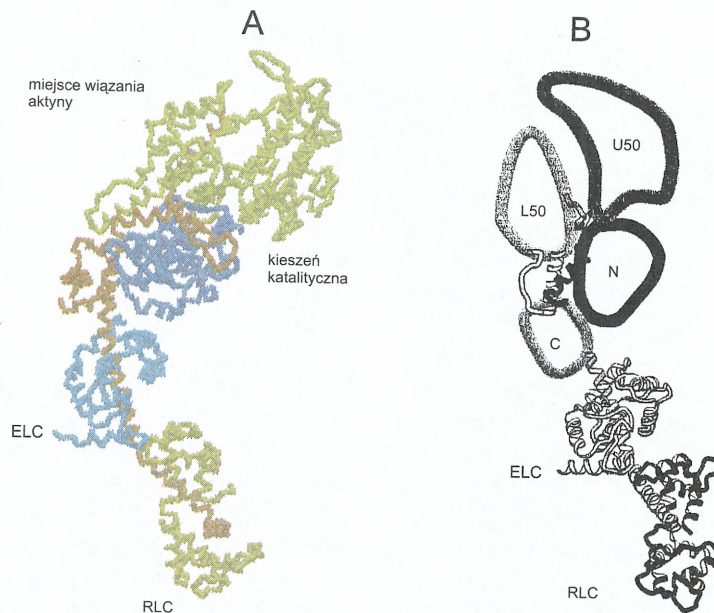
## STRUKTURA GŁÓWKI MIOZYNY

Znanych jest kilkanaście typów miozyny. Typ wyizolowany z mięśni, ale występujący również w komórkach niemięśniowych, nazwany „miozyną konwencjonalną” albo „miozyną II”,

ma, niezależnie od pochodzenia, takie same zasadnicze cechy budowy. Mimo licznych różnic w strukturze pierwszorzędowej łańcuchów miozyny konwencjonalnej otrzymanej z różnych

źródeł, w rejonach istotnych dla funkcji tego białka zachowane są obszary o nie zmienionej sekwencji aminokwasów. Dlatego też badania struktury główki mogą być prowadzone na preparatach S1 pochodzących z różnych organizmów. Stosowana dalej w artykule numeracja reszt aminokwasów istotnych dla funkcji opisywanego białka odnosi się do sekwencji miozyny z mięśni szkieletowych kury.

głości między charakterystycznymi resztami w łańcuchach polipeptydowych, a także wykrywać zmiany położenia tych reszt. Dopiero jednak w ostatnim dziesięcioleciu sukces prac RAYMENTA i współaut. (1993a) nad krystalizacją S1 miozyny z mięśni szkieletowych kury pozwolił „zobaczyć” ułożenie łańcuchów polipeptydowych w główce (Ryc. 3). Znany już wcześniej kształt kijanki zawdzięcza główka miozyny



Ryc. 3. Struktura subfragmentu 1 miozyny.

(A) Schemat przebiegu łańcuchów polipeptydowych w subfragmencie 1. Fragmenty ciężkiego łańcucha: N-końcowy (25 kDa), centralny (50 kDa) i C-końcowy (20 kDa) oznaczono odpowiednio kolorami granatowym, żółtym i czerwonym. Lekki łańcuch istotny oznaczono kolorem niebieskim, a regulujący — pomarańczowym. ELC — lekki łańcuch regulujący. (B) Schematyczne przedstawienie rozmieszczenia subdomen w główce miozyny. U50 i L50 — górna i dolna subdomena 50 kDa, N — subdomena N-końcowa, C — konwerter. (A, model uzyskano zgodnie z RAYMENT i współaut. 1993a, stosując program RasMol; B, Houdusse i współaut. 2000, za zgodę Proc. Natl. Acad. Sci. USA).

W badaniach strukturalnych pomocna była fragmentacja łańcuchów polipeptydowych miozyny enzymami proteolitycznymi, zwłaszcza trypsyną. Ograniczone trawienie tym enzymem prowadzi do podziału ciężkiego łańcucha S1 miozyny z mięśni szkieletowych, zbudowanego z ok. 840 aminokwasów (TONG i ELZINGA 1990), na trzy fragmenty: N-końcowy o masie cząsteczkowej 25 kDa (reszty 1-204), centralny o masie 50 kDa (reszty 214-636) i C-końcowy o masie ok. 20 kDa (reszty 643-843) (BALINT i współaut. 1978, MORNET i współaut. 1979). Fragmenty te połączone są krótkimi pętlami. Zachowanie podstawowych funkcji miozyny po proteolitycznym podziale łańcucha pozwoliło na zlokalizowanie rejonów wiązania nukleotydu i aktyny, a zastosowanie metod rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji (FRET) i chemicznego sieciowania pozwoliło mierzyć odle-

strukturze przestrzennej ciężkiego łańcucha, którego C-końcowy odcinek stanowi długa  $\alpha$ -helisa z niekowalencyjnie związanymi dwoma lekkimi łańcuchami — „istotnym” (ELC) i „regulującym” (RLC). Ta węższa część główki o długości ok. 85 Å, zwana „domeną regulatorową”, „domeną lekkich łańcuchów” lub szyjką, przechodzi w szerszą „domenę motoryczną”, inaczej nazywaną „domeną katalityczną”, o wymiarach 90 x 45 x 60 Å. W domenie motorycznej wyróżniono cztery subdomeny: „N-końcową”, odpowiadającą w przybliżeniu N-końcowemu fragmentowi powstającemu w wyniku trawienia ciężkiego łańcucha trypsyną, następnie dwie tzw. subdomeny 50 kDa, „górną” i „dolną” (50 kDa to łączna masa obu tych subdomen), odpowiadające rejonom zajętem przez fragment centralny, wreszcie subdomenę nazwaną „konwerterem”, obejmującą niewielki, wyodrębniony

strukturalnie odcinek (reszty 712–781) C-końcowego fragmentu ciężkiego łańcucha sąsiadującej z długą  $\alpha$ -helisą, stanowiącą trzon szyjki.

Uderzającą cechą domeny motorycznej jest obecność głębokiej szczeliny oddzielającej od siebie dwie subdomeny 50 kDa. W pobliżu jej

„ujścia” znajdują się miejsca wiązania aktyny, a jej podstawa jest jednocześnie podstawą leżącej po przeciwnej stronie główki kieszeni katalitycznej, w której wiązany jest ATP lub produkty jego hydrolizy.

## GENERACJA SIŁY W GŁÓWCE MIOZYNY

### HIPOTEZA DŹWIGNI

Wyniki wcześniejszych badań z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych i paramagnetycznych sugerowały, że podczas cyklu hydrolizy ATP domena motoryczna główki miozynowej nie zmienia zasadniczo swojego położenia w stosunku do filamentu aktynowego. Do teorii generacji siły wprowadzono więc modyfikację zakładającą istnienie rodzaju zawiasu w obrębie główki, który umożliwiałby rotację domeny lekkich łańcuchów w stosunku do domeny motorycznej (patrz: COOKE 1986). Obecność długiej  $\alpha$ -helisy w C-końcowej części ciężkiego łańcucha główki, tworzącej wraz z lekkimi łańcuchami sztywną strukturę uwidocznioną w wyniku krystalizacji, bardzo pasowała do tej koncepcji. Strukturę tę, z racji jej hipotetycznej funkcji, nazwano później „ramieniem dźwigni”. Założono, że stosunkowo niewielkie zmiany konformacji w domenie motorycznej powodują zmiany kąta ramienia dźwigni w stosunku do reszty główki, w wyniku czego, jak obliczono, mogłoby następować znaczne (ok. 10 nm) przemieszczenie końca dźwigni (czyli końca główki miozynowej w miejscu jej przejścia w pałeczkę) wobec filamentu aktynowego, a w efekcie ruch obu rodzajów filamentów względem siebie. W procesie tym, wskutek oddziaływania miozyny z ATP i aktyną, zmianie ulegać miałyby szerokość szczeliny dzielącej centralny fragment główki (RAYMENT i współaut. 1993b).

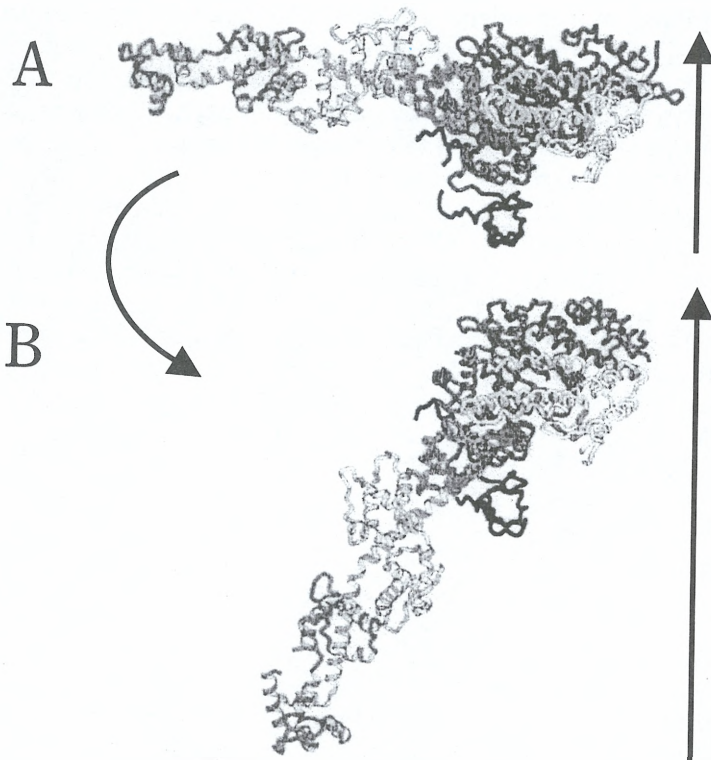
### STANY GŁÓWKI MIOZYNY UTRWALONE PRZEZ KRYSZTAŁIZACJĘ

O ile zmiany struktury główki miozynowej zachodzące pod wpływem aktyny pozostają w sferze przypuszczeń, o tyle dane uzyskane z analizy rentgenostrukturalnej kolejnych kryształów S1 są zadziwiająco zgodne z przedstawioną hipotezą. Z uwagi na nietrwałość kompleksu S1-ADP-P<sub>i</sub>, chcąc uzyskać obraz struktury główki ze związanymi produktami hydrolizy ATP, krystalizację S1 przeprowadzano w obecności związków uważanych za analogi zhydrolizowanego nukleotydu, tworzących stabilne kompleksy z miozyną. W analogach tych obok

ADP, zamiast ortofosforanu występował fluorek glinu lub wanadan. Otrzymany metodą klonowania S1 miozyny z mięśni gładkich kury, składający się z domeny motorycznej i fragmentu domeny regulatorowej, krystalizowano w połączeniu z ADP i fluorkiem glinu (DOMINGUEZ i współaut. 1998). Porównanie tak uzyskanych kryształów ze strukturą S1 bez nukleotydu, otrzymaną uprzednio przy badaniu miozyny z mięśni szkieletowych kury (RAYMENT i współaut. 1993a), wskazywało na zachodzącą w obecności analogów ADP-P<sub>i</sub> niewielką, kilkustopniową rotację dolnej subdomeny 50 kDa, powodującą zwężenie szczeliny w centralnym fragmencie główki. Podobne obrazy uzyskano nieco wcześniej w wyniku krystalizacji samej domeny motorycznej miozyny śluzowca *Dictyostelium discoideum* w kompleksie z ADP i fluorkiem glinu (FISHER i współaut. 1995) lub z ADP i wanadatem (SMITH i RAYMENT 1996). Ten stan główki został nazwany „zamkniętym”, w przeciwieństwie do stanu „otwartego” główki nie związanej z nukleotydem. Ruchy w domenie motorycznej przy przejściu z jednego stanu w drugi są niewielkie, rzędu kilku Å. Uderzająco duża jest natomiast zmiana pozycji ramienia dźwigni, potwierdzona później przez porównanie analogicznych dwóch stanów główki miozyny pochodzącej z jednego źródła — mięśni mięczaków (HODUSSE i współaut. 2000) (Ryc. 4). Stanowi zamkniętemu odpowiadałoby położenie ramienia dźwigni bezpośrednio przed generacją siły (A na Ryc. 4), a stanowi otwartemu — po zakończeniu tego procesu (B na Ryc. 4) (patrz: GEEVES i HOLMES 1999). Porównanie obu form wskazywało, że obrót ramienia następuje głównie wokół glicyny 710, znajdującej się przy końcu krótkiego helikalnego odcinka, tzw. „helisy SH1”, zawierającego reaktywną resztę tiolową cysteiny 707 (SH1). Stosunkowo niewielka rotacja ma miejsce również wokół glicyny 699.

### GIĘTKIE ŁĄCZNIKI W DOMENIE MOTORYCZNEJ

Odzwierciedleniem naprężeń, jakie powstają w domenie motorycznej główki miozyny w wyniku zmagazynowania energii pochodzącej z hydrolizy ATP są odkształcenia widoczne głów-



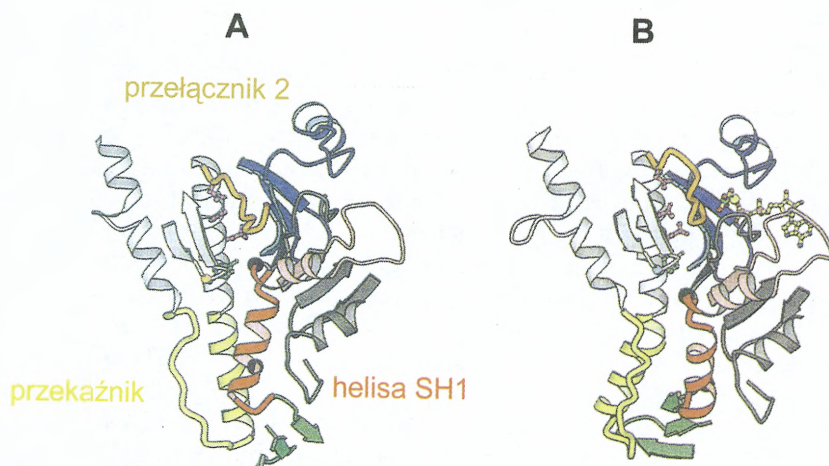
Ryc. 4. Zależność położenia ramienia dźwigni od stanu główki miozyny.

Modele uzyskane z analizy kryształów S1: (A) w kompleksie z ADP i wanadanem (analogiem ADP-Pi) i (B) bez nukleotydu. Pionowymi strzałkami zaznaczono kierunek ruchu filamentu aktynowego, strzałka z lewej strony symbolizuje rotację ramienia dźwigni (Houdusse i współaut. 2000, za zgodę Proc. Natl. Acad. Sci. USA)

nie w trzech giętkich fragmentach ciężkiego łańcucha, łączących znajdujące się tam subdomeny. Oprócz wymienionych wyżej rotacji łańcucha w rejonie obejmującym reszty 697–711, w tym „helisę SH1”, są to przemieszczenia „przełącznika 2” (ang. switch 2, reszty 464–473), leżącego u podstawy szczeliny fragmentu centralnego, oraz wygięcie i jednocześnie skręcenie innej helisy nazywanej wraz z sąsiadującą pętlą „przełącznikiem” (ang. relay, reszty 492–518) (Ryc. 5).

Podczas generacji siły zachodziłaby likwidacja wytworzonych naprężeń. Hipotetyczna rola aktyny w tym procesie polegałaby na przemieszczaniu dolnej subdomeny 50 kDa w stosunku do subdomeny górnej, co powodowałoby zwiększenie szerokości szczeliny i umożliwiłoby

uwolnienie reszty ortofosforanowej z główki, być może właśnie przez rozszerzoną szczelinę – ta droga została nazwana „tylnymi drzwiami” (YOUNT i współaut. 1995), ponieważ znajduje się po stronie główki przeciwnej do kieszeni w której wiązany jest nukleotyd. Uwolnienie ortofosforanu byłoby ułatwione przez spowodowaną rotacją dolnej subdomeny 50 kDa powrót przełącznika 2 do pozycji, jaką zajmował przed związaniem ATP. Jednocześnie zachodzące przemieszczenia i likwidacja naprężeń w pozostałych łącznikach – helisie SH1 i przełączniku, obu połączonych z leżącym u podstawy ramienia dźwigni konwerterem, powodowałyby rotację tego ostatniego o kąt ok.  $60^\circ$ . Uwolnienie drugiego produktu hydrolizy – ADP – zachodziło-



Ryc. 5. Zmiany konformacyjne giętkich odcinków łączących subdomeny w obrębie domeny motorycznej główki miozyny.

(A) stan główki bez nukleotydu (B) stan główki związanej z ADP i fluorkiem glinu (analog ADP-Pi). Przedstawiono część domeny motorycznej, w tym trzy giętkie łączniki: „przełącznik” (kolor pomarańczowy), „przełącznik” (żółty) i rejon „helisy SH1” (czerwony), oraz fragmenty czterech subdomen, w tym zaznaczony kolorem zielonym fragment konwertera. Czarnymi kulkami zaznaczono reszty cysteiny 697 i cysteiny 707 (Houdusse i współaut. 1999, za zgodę Elsevier Science).

by wskutek zmian strukturalnych w rejonie kieszeni nukleotydowej.

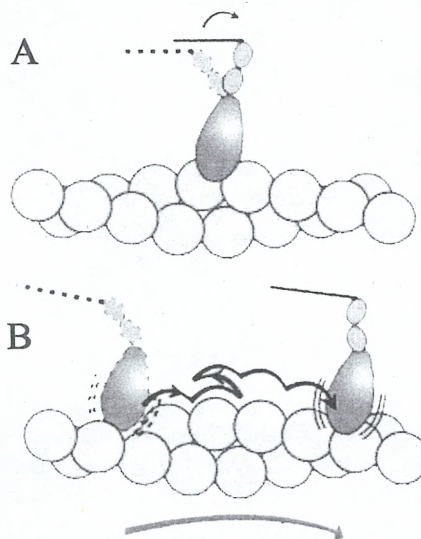
Zmienność konformacji trzech giętkich fragmentów łączących cztery bardziej stabilne subdomeny w części motorycznej główki potwierdza dodatkowo inny typ kryształów, otrzymany z preparatów S1 miozyny z mięśni mięczaków w obecności ADP i reprezentujący trzeci stan konformacyjny główki, różniący się od dwóch pozostałych m.in. położeniem ramienia dźwigni i rozkładaniem struktury helikalnej w rejonie reaktywnych grup tiolowych, SH1 (w cysteinie 707) i SH2 (w cysteinie 697) (HOUDUSSE i współaut. 1999). Ten trzeci rodzaj konformacji nie miałby wpływu na wielkość przesunięcia filamentów podczas cyklu hydrolizy ATP, ponieważ dodatkowa zmiana położenia ramienia dźwigni zachodziłaby w miozynie już po jej odłączeniu od aktyny.

#### NIE TYLKO JEDEN MODEL GENERACJI SIŁY

Alternatywna, choć znacznie mniej popularna i zawierająca stosunkowo wiele niejasności, hipoteza generacji siły powstała w pracowni badaczy japońskich (YANAGIDA i współaut. 1985, YANAGIDA i IWANE 2000). Była ona wynikiem pomiarów tzw. „kroku roboczego” miozyny, czyli wielkości przesunięcia filamentu aktynowego przez główkę miozyny, przypadającego na cykl hydrolizy jednej cząsteczki ATP. Otrzymana przez autorów wartość była kilkakrotnie wyższa niż pozwala na to długość ramienia dźwigni i zmiana jego kąta, co sugerowało, że na jeden cykl hydrolizy ATP przypada szereg przemieszczeń główek miozyny po filamencie aktynowym. Według założeń przedstawianej hipotezy, energia pochodząca z hydrolizy ATP jest albo stopniowo podczas tego procesu uwalniana, albo też potrzebna jest tylko do zmiany kształtu cząsteczki białka pozwalającej rozpocząć ruch; w tym drugim przypadku znaczna część energii niezbędna do przemieszczania główek pochodziłaby z ruchów Browna. Ruchy te, z natury swojej chaotyczne, byłyby wykorzystane do przesuwania filamentów w odpowiednim kierunku określonym przez strukturę białek kurczliwych (Ryc. 6). Inaczej mówiąc, tylko w jednym z możliwych położenia główka miozyny byłaby „złapana” przez filament aktynowy. W omawianej hipotezie podważana jest też sztywność C-końcowej helisy.

Chociaż w świetle pomiarów wykonanych w innych laboratoriach (FINER i współaut. 1994, MOLLOY i współaut. 1995) większość badaczy obecnie przyjmuje, że podczas hydrolizy jednej cząsteczki ATP miozyna wykonuje krok roboczy zgodny z modelem dźwigni, postulowany

wyżej udział ruchów Browna i mechanizmu „zapadkowego” jest interesującą propozycją sposobu, w jaki zachodzi przekształcenie słabych oddziaływań między miozyną i aktyną w wiązanie o wysokim powinowactwie. Włączenie tego mechanizmu w hipotezę dźwigni (KASPRZAK 1997, SMYCZYŃSKI i KASPRZAK 1997) może być ciekawym, jakkolwiek ze względu na możliwość wielu położenia C-końcowej helisy w kompleksie S1-ADP-P<sub>i</sub>, trudnym do udokumentowania uzupełnieniem modelu generacji siły przez mio-



Ryc. 6. Porównanie dwóch modeli generacji siły.

(A) model dźwigni. (B) model stopniowego przemieszczania główek miozyny podczas cyklu hydrolizy ATP. Strzałki w górnej i dolnej części rysunku obrazują różne odległości, jakie wg autorów modeli przebywa główka miozyny w czasie jednego cyklu hydrolizy ATP (YANAGIDA i IWANE 2000, za zgodę Proc. Natl. Acad. Sci. USA).

zynę. Być może problem ten rozwiążą dalsze prace nad krystalizacją S1, w wyniku których otrzyma się nie jedno, ale kilka możliwych położenia ramienia dźwigni dla stanu główki związanej z produktami hydrolizy ATP.

#### INNE METODY BADANIA STANÓW KONFORMACJI GŁÓWKI MIOZINY

Zmiany konformacji główki miozyny wywołane obecnością nukleotydu obserwowano stosując szereg metod biochemicznych i biofizycznych. Poddając S1 ograniczonej proteolizie stwierdzono odsłanianie dodatkowych miejsc podatnych na trawienie w N- i C-końcowych fragmentach ciężkiego łańcucha (HOZUMI 1983). Pod wpływem nukleotydu obserwowano również zmiany chemicznej reaktywności grup tiolowych SH1 i SH2 (YAMAGUCHI i SEKINE 1966, SEIDEL i współaut. 1970). Stosując dwufunkcyjne odczynniki sieciujące stwierdzono, że dystans 14 Å, jaki dzieli od siebie grupy SH1 i SH2

w główce pozbawionej nukleotydu, po przyłączeniu ADP do miozyny może się zmniejszać nawet do 2 Å (BURKE i REISLER 1977, WELLS i YOUNT 1980). Usieciowanie zbliżonych grup prowadzi do jednoczesnego uwięzienia nukleotydu w centrum aktywnym (WELLS i YOUNT 1979, 1980). Jak już wspomniano wcześniej, zmiany odległości między reaktywnymi grupami tiolowymi znalazły ostatnio potwierdzenie w strukturze kryształu S1 miozyny z mięśni mięczaków otrzymanego w obecności ADP (HODUSSE i współaut. 1999). Z kolei zmiany wewnętrznej fluorescencji, najobszerniej udokumentowane dla miozyny z mięśni szkieletowych i związane najprawdopodobniej z resztą tryptofanu Trp 510 (patrz: TRENTHAM i współaut. 1976, RAYMENT i współaut. 1996) były podstawą do stwierdzenia, że proces hydrolizy ATP katalizowany przez miozynę jest wieloetapowy i wiąże się ze zmianami konformacji białka. W świetle znanego z krystalicznej struktury S1 umiejscowienia tej reszty tryptofanu w pętli giętkiego przekaznika, zmiany jej otoczenia w procesie generacji siły wydają się być oczywiste.

Mniej wiadomo o wpływie aktyny na strukturę główki miozynowej. Stwierdzono, że aktyna nie tylko osłania ciężki łańcuch miozyny przed działaniem proteaz w odcinku łączącym fragment centralny i C-końcowy, czyli w rejonie wiązania aktyny przez miozynę (MORNET i współaut. 1979), ale też utrudnia ich dostęp do odległego od tego rejonu połączenia fragmentu centralnego z N-końcowym (APLEGATE i REISLER 1983), co musi być związane ze zmianami konformacyjnymi ciężkiego łańcucha. Wyniki chemicznego sieciowania wskazują, że pod wpływem aktyny rzeczywiście zachodzi przemieszczanie subdomen w obrębie główki miozynowej (BERTRAND i współaut. 1992). Zaobserwowano również, że wiązanie aktyny obniża reaktywność grupy tiolowej SH1 (DUKE i współaut. 1976).

Opisane zmiany strukturalne, wywołane obecnością nukleotydu lub aktyny, dotyczą domeny motorycznej główki. Uzyskanie danych o ruchach C-końcowej helisy podczas hydrolizy ATP jest trudniejsze ze względu na brak reaktywnych reszt aminokwasów w tej części miozyny. Na zmiany położenia C-końcowej helisy w stosunku do pozostałej części główki może wskazywać zachodzące pod wpływem ATP zahamowanie chemicznego sieciowania lekkich łańcuchów miozyny do jej N-końcowej subdomeny (PLISZKA 1990). Tą samą metodą wykazano wywołane przez nukleotyd zbliżenie znajdującego się na początku ramienia dźwigni konwertera do N-końcowej subdomeny na dystans umożliwiający oddziaływania jonowe między

tymi dwoma rejonami (PLISZKA i współaut. 2000).

Niezwykle ważne były doświadczenia, w których przy zastosowaniu inżynierii genetycznej konstruowano główki miozyny z wydłużonymi lub skróconymi domenami lekkich łańcuchów i wykorzystywano je w testach ruchliwości, polegających na pomiarze szybkości przesuwania filamentów aktynowych przez przytwierdzone do stałego podłoża główki miozyny. Stwierdzono, że szybkość ta była proporcjonalna do długości ramienia dźwigni (UYEDA i współaut. 1996).

Stale ulepszaną techniką rentgenografii, wykorzystującą zjawisko ugięcia promieni X do badania zmian strukturalnych zachodzących w żywym mięśniu (patrz: STRZELECKA-GOŁASZEWSKA 1997), uzyskano wyniki (DOBBIE i współaut. 1998), których interpretacja wskazuje na przemieszczanie się końca ramienia dźwigni podczas generacji siły o wartość bliską teoretycznej, ocenianej na podstawie krystalicznej struktury S1 na ok. 10 nm.

Ciekawe obrazy filamentów aktynowych „dekorowanych” główkami miozyny otrzymano ostatnio metodą krio-elektronomikroskopii. Oprócz dawno znanych struktur, tzw. „grotów strzał” obserwowanych w nieobecności nukleotydu, uzyskano inne, z położeniem lekkich łańcuchów w główkach różniącym się o 20°–30° wówczas, kiedy w środowisku był ADP (JONTES i współaut. 1995, WHITTAKER i współaut. 1995). Było to możliwe tylko dla niektórych rodzajów miozyny, tam gdzie powinowactwo kompleksu aktomiozynowego do ADP jest stosunkowo wysokie i reakcja uwolnienia ADP następująca po odłączeniu ortofosforanu zachodzi na tyle wolno, że odpowiednią strukturę można w pewnych warunkach utrwalić. Ukazanie struktury odpowiadającej połączeniu miozyny z aktyną przed uwolnieniem obu produktów hydrolizy jest trudne ze względu na nietrwałość tego kompleksu. Jednakże w wyniku szybkiego zamrażania mięśni owadów, cechujących się wysoce uporządkowaną strukturą, uzyskano przy użyciu mikroskopii elektronowej obrazy, których interpretacja wskazuje na kątową rotację domeny lekkich łańcuchów zgodnie z modelem dźwigni (TAYLOR i współaut. 1999). Jednocześnie jednak pewna liczba główek miozyny związanych z aktyną wykazuje również rotację domeny motorycznej w stosunku do długiej osi filamentów, co według autorów miałoby obrazować stan słabego wiązania aktyny z miozyną i przemawiałoby na korzyść „zapadkowego” mechanizmu zmiany słabych oddziaływań obu białek w silne.

Pomiary polaryzacji fluorescencji znaczników umieszczonych w łańcuchach regulujących świadczą, według ich autorów, o znacznych zmianach położenia domeny łańcuchów lekkich w kurczących się włóknach mięśniowych, przy założeniu, że tylko niewielka liczba mostków poprzecznych jednocześnie bierze aktywny udział w skurczu (IRVING i współaut. 1995, CORRIE i współaut. 1999). Na znaczną rotację C-końcowej helisy wskazują również przeprowadzone na oczyszczonych białkach pomiary FRET, pozwalające oceniać zmiany odległości między dwoma fluoroforami (SHIH i współaut. 2000). Tą samą metodą uzyskano jednak wcześniej dane przemawiające za niewielkimi zmianami pozycji helisy (SMYCZYŃSKI i KASPRZAK 1997), co według autorów może wynikać ze zgodnego z mechanizmem zapadkowym istnienia wielu stanów jej wychylenia w fazie słabego wiązania aktyny z miozyną.

W badaniach zjawiska ruchu wiele nadziei wiąże się z możliwością wywoływania punktowych mutacji określonych aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych. Znany jest fakt, że spontaniczne mutacje miozyny odpowiedzialne

za kardiomiopatię mięśnia sercowego grupują się zarówno w obszarach odpowiedzialnych za wiązanie aktyny i nukleotydu, jak i w pobliżu reaktywnych grup tiolowych oraz na styku domeny motorycznej i regulatorowej (RAYMENT i współaut. 1995, patrz art. MOCZARSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Celowo wywołane mutacje polegające na zastąpieniu reszt glicyny w rejonie hipotetycznej osi obrotu ramienia dźwigni przez inne aminokwasy powodowały niemal całkowite zahamowanie przesuwania filamentów aktynowych przez główki miozyny (KINOSE i współaut. 1996, PATTERSON i współaut. 1997). Z kolei stosowane już wprowadzanie reszt cysteiny do wybranych miejsc w lekkich łańcuchach miozyny pozwala na umieszczanie fluoroforów w miejscach dogodnych do badania rotacji domeny regulatorowej główki (SHIH i współaut. 2000).

Wszystkie te metody badań, w połączeniu z coraz szerzej stosowaną krystalizacją S1 w różnych stanach konformacyjnych powinny dostarczyć nowych danych o mechanizmie generacji siły i wyjaśnić istniejące obecnie wątpliwości.

#### UWAGI KOŃCOWE

Wyniki prac nad generacją ruchu przez miozynę wskazują, że najwięcej danych przemawia za mechanizmem zakładającym istnienie zawiasu i ruchomego, sztywnego „ramienia dźwigni” w główce miozyny. Według postulowanego mechanizmu, ruch tego ramienia powoduje przemieszczanie główek miozynowych wzdłuż filamentu aktynowego na koszt energii uwalnianej w cyklu hydrolizy ATP przez miozynę. Zasadnicze zmiany strukturalne zachodzące w domenie motorycznej przy generacji ruchu

uważane są za wspólne dla wszystkich typów miozyny. Nie wiadomo do tej pory, na jakiej drodze zachodzi wzrost powinowactwa aktyny do miozyny i jakie zmiany struktury główki towarzyszą temu etapowi cyklu. W wielu laboratoriach prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie tych zagadnień. Ponadto, wobec nie zawsze jednoznacznych wyników, opisany tu molekularny model generacji ruchu przez miozynę wymaga dalszej weryfikacji.

#### MOLECULAR MECHANISM OF FORCE GENERATION BY MYOSIN

##### Summary

The article reviews the current knowledge on the molecular mechanism of force generation in contractile systems. Special attention has been paid to recent crystallographic studies which allowed to construct atomic-level models of contractile proteins — myosin and actin. Many types of cellular motility, including muscle contraction, result from the active movement of the myosin heads along actin filaments. This movement is coupled to the hydrolysis of ATP. The head portion of myosin, subfragment 1, is a key component of the machinery of muscle cells that converts the chemical energy of ATP into directed movement. Understanding of the molecular mechanism of this conversion is of fundamental importance in studies on muscle contraction and cell motility. It has been postulated that during

force (motion) generation, the elongated part of the myosin head, called a “lever arm”, changes its orientation with respect to the actin filament. This hypothesis has been confirmed by recent crystallographic data that have visualized nucleotide-induced conformational changes within the myosin head. The small rearrangements within the „motor domain” of the myosin head result in a large movement of the lever arm. Most other biophysical and biochemical studies agree with the main points of the lever arm hypothesis. Although considerable progress in this field has recently been made, it is still unelucidated how interaction with actin changes the conformation of the myosin head during the force generation process.



## LITERATURA

- APPLEGATE D., REISLER E., 1983. *Protease-sensitive regions in myosin subfragment I*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7109–7112.
- BALINT M., WOLF I., TARCSAFAVI A., GERGELY J., SRETER F.A., 1978. *Location of SH1 and SH2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin*. Arch. Biochem. Biophys. 190, 793–799.
- BERTRAND P., DERANCOURT J., KASSAB R., 1992. *Molecular movements in the actomyosin complex: F-actin promotes internal cross-linking of the 25- and 20-kDa heavy chain fragments of skeletal myosin subfragment I*. Biochemistry 31, 12219–12226.
- BURKE M., REISLER E., 1977. *Effect of nucleotide binding on the proximity of the essential transitions sulfhydryl groups of myosin. Chemical probing of movement of residues during conformational transitions*. Biochemistry 16, 5559–5563.
- COOKE R., 1986. *The mechanism of muscle contraction*. CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 53–118.
- CORRIE J.E., BRANDMEIER B.D., FERGUSON R.E., TRENTAM D.R., KENDRICK-JONES J., HOPKINS S.C., van der HEIDE U.A., GOLDMAN Y.E., SABIDO-DAVID C., DALE R.E., CRIDDLE S., IRVING M., 1999. *Dynamic measurement of myosin light-chain-domain tilt and twist in muscle contraction*. Nature 400, 425–430.
- DOBBIE I., LINARI M., PIAZZESI G., RECONDITI R., KOUBASSOVA N., FERENCZI M.A., LOMBARDI V., IRVING M., 1998. *Elastic bending and active tilting of myosin heads during muscle contraction*. Nature 396, 383–387.
- DOMINGUEZ R., FREYSON Y., TRYBUS K.M., COHEN C., 1998. *Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state*. Cell 94, 559–571.
- DUKE J., TAKASHI R., UE K., MORALES M.F., 1976. *Reciprocal reactivities of specific thiols when actin binds to myosin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 302–306.
- ENGELHARDT W.A., LUBIMOVA M.N., 1939. *Myosin and adenosine triphosphatase*. Nature 144, 668–669.
- FINER J.T., SIMMONS R.M., SPUDICH J.A., 1994. *Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps*. Nature 368, 113–119.
- FISHER A.J., SMITH C.A., THODEN J.B., SMITH R., SUTOH K., HOLDEN A.M., RAYMENT I., 1995. *X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP·x BeF<sub>3</sub> and MgADP·x AlF<sub>4</sub>*. Biochemistry 34, 8960–8972.
- GEEVES M.A., HOLMES K.C., 1999. *Structural mechanism of muscle contraction*. Annu. Rev. Biochem. 68, 687–728.
- HOUDUSSE A., KALABOKIS V.N., HIMMEL D., SZENT-GYORGYI A.G., COHEN C., 1999. *Atomic structure of scallop myosin subfragment I complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head*. Cell 97, 459–470.
- HOUDUSSE A., SZENT-GYORGYI A.G., COHEN C., 2000. *Three conformational states of scallop myosin S1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11238–11243.
- HOZUMI T., 1983. *Structure and function of myosin subfragment I as studied by tryptic digestion*. Biochemistry 22, 799–804.
- HUXLEY A.F., NIEDERGERKE R.M., 1954. *Structural changes in muscle during contraction*. Nature 173, 971–973.
- HUXLEY H.E., HANSON J., 1954. *Changes in the cross-striation of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation*. Nature 173, 973–976.
- HUXLEY H.E., 1957. *The double array of filaments in cross-striated muscle*. Biophysic. Biochemic. Cytol. 3, 631–648.
- HUXLEY H.E., 1969. *The mechanism of muscular contraction*. Science 164, 1356–1366.
- IRVING M., St CLAIR ALLEN T., SABIDO-DAVID C., CRAIK J.S., BRANDMEIER B., KENDRICK-JONES J., CORRIE J.E., TRENTAM D.R., GOLDMAN Y.E., 1995. *Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle*. Nature 375, 688–691.
- JONTES J.D., WILSON-KUBALEK E.M., MILLIGAN R.A., 1995. *A 32° tail swing in brush border myosin I on ADP release*. Nature 378, 751–753.
- KASPRZAK A.A., 1997. *Jak funkcjonuje miozyna*. Post. Bioch. 43, 134–142.
- KINOSE F., WANG S.X., KIDAMBI U.S., MONCMAN C.L., WINKELMANN D.A., 1996. *Glycine 699 is pivotal for the motor activity of skeletal muscle myosin*. J. Cell Biol. 134, 895–909.
- LOWEY S., SLAYTER H.S., WEEDS A.G., BAKER H., 1969. *The substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation*. J. Mol. Biol. 42, 1–29.
- LYMN R.W., TAYLOR E.W., 1971. *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis of actomyosin*. Biochemistry 10, 4617–4624.
- MOLLOY J.E., BURNS J.E., KENDRICK-JONES J., TREGEAR R.T., WHITE D.C.S., 1995. *Movement and force produced by a single myosin head*. Nature 378, 209–212.
- MORNET D., PANTEL E., AUDEMARD E., KASSAB R., 1979. *The limited tryptic cleavage of chymotryptic S1: an approach to the characterization of the actin site in myosin heads*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 925–932.
- MUELLER H., PERRY S.V., 1962. *The degradation of heavy meromyosin by trypsin*. Biochem. J. 85, 431–439.
- PATTERSON B., RUPPEL K.M., WU Y., SPUDICH J.A., 1997. *Cold-sensitive mutants G680V and G691C of Dictyostelium myosin II confer dramatically different biochemical effects*. J. Biol. Chem. 272, 27612–27617.
- PLISZKA B., 1990. *Influence of nucleotide on chemical cross-linking between alkali light chains and the heavy chain of myosin subfragment I*. Biochim. Biophys. Acta 1040, 89–94.
- PLISZKA B., KARCEWSKA E., WAWRO B., 2000. *Nucleotide-induced movements in the myosin head near the converter region*. Biochim. Biophys. Acta 1481, 55–62.
- RAYMENT I., RYPIEWSKI W.R., SCHMIDT-BASE K., SMITH R., TOMCHICK D.R., BENNING M.M., WINKELMANN D.A., WESENBERG G., HOLDEN H.M., 1993a. *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor*. Science 261, 50–58.
- RAYMENT I., HOLDEN H.M., WHITTAKER M., YOHN C.B., LORENZ M., HOLMES K.C., MILLIGAN R.A., 1993b. *Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction*. Science 261, 58–65.
- RAYMENT I., HOLDEN H.M., SELLERS J.R., FANANAPAZIR L., EPSTEIN N.D., 1995. *Structural interpretation of the mutations in the β-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3864–3868.
- RAYMENT I., SMITH C., YOUNT R., 1996. *The active site of myosin*. Annu. Rev. Physiol. 58, 671–702.
- SEIDEL J., CHOPEK M., GERGELY J., 1970. *Effect of nucleotides and pyrophosphate on spin labels bound to S1 thiol groups of myosin*. Biochemistry 9, 3265–3272.
- SHIH W.M., GRZYCZYNSKI Z., LAKOWICZ J.R., SPUDICH J.A., 2000. *A FRET-based sensor reveals large ATP hydrolysis-induced conformational changes and three distinct states of the molecular motor myosin*. Cell 102, 683–694.
- SMITH C.A., RAYMENT I., 1996. *X-ray structure of the magnesium(ii)ADPvanadate complex of the Dictyostelium dis-*

- coideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution*. Biochemistry 35, 5404-5417.
- SMYCZYŃSKI C., KASPRZAK A.A., 1997. *Effect of nucleotides and actin on the orientation of the light chain-binding domain in myosin subfragment 1*. Biochemistry 36, 13201-13207.
- STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., 1997. *Molekularny mechanizm skurczu mięśniowego*. [W:] *Biofizyka dla Biologów*. By-szevska M., LEYKO W. (red.), PWN, Warszawa, 244-280.
- SZENT GYORGYI A.G., 1953. *Meromyosins, the subunits of myosin*. Arch. Biochem. Biophys. 42, 305-320.
- TAYLOR K.A., SCHMITZ H., REEDY M.C., GOLDMAN Y.E., FRANZINI-ARMSTRONG C., SASAKI H., TREGAR R.T., POOLE K., LUCAVECHE C., EDWARDS R.J., CHEN L.F., WINKLER H., REEDY M.K., 1999. *Tomographic 3D reconstruction of quick-frozen, Ca<sup>2+</sup>-activated contracting insect flight muscle*. Cell 99, 421-431.
- TONG S.W., ELZINGA M., 1990. *Amino acid sequence of rabbit skeletal muscle myosin*. J. Biol. Chem. 265, 4893-4901.
- TRENTHAM D.R., ECCLESTON J.F., BAGSHAW C.R., 1976. *Kinetic analysis of ATPase mechanisms*. Q. Rev. Biophys. 9, 217-281.
- UYEDA T.Q., ABRAMSON P.D., SPUDICH J.A., 1996. *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 93, 4459-4464.
- WELLS J.A., YOUNT R.G., 1979. *Active site trapping of nucleotides by crosslinking two sulfhydryls in myosin subfragment 1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4966-4970.
- WELLS J.A., YOUNT R.G., 1980. *Reaction of 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) with myosin subfragment one: evidence for formation of a single protein disulfide with trapping of metal nucleotide at the active site*. Biochemistry 19, 1711-1717.
- WHITTAKER M., WILSON-KUBALEK E.M., SMITH J.E., FAUST L., MILLIGAN R.A., SWEENEY H.L., 1995. *A 35 Å movement of smooth muscle myosin on ADP release*. Nature 378, 748-751.
- YAMAGUCHI M., SEKINE T., 1966. *Sulfhydryl groups involved in the active site of myosin A adenosine triphosphatase*. J. Biochem. 59, 24-33.
- YOUNT R.G., LAWSON D., RAYMENT I., 1995. *Is myosin a "back door" enzyme?* Biophys. J. 68, 44s-49s.
- YANAGIDA T., ARATA T., OOSAWA F., 1985. *Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle*. Nature 316, 366-369.
- YANAGIDA T., IWANE A.H., 2000. *A large step for myosin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9357-9359.