

RENATA DĄBROWSKA i ROBERT MAKUCH

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: robma@nencki.gov.pl

MIEŚNIE GŁADKIE: BUDOWA, AKTYWNOŚĆ MOTORYCZNA I JEJ REGULACJA

Mięśnie gładkie charakteryzują się dużą różnorodnością morfologiczną i strukturalną. Wchodzą one w skład ścian wielu narządów wewnętrznych kręgowców (układu krwionośnego, oddechowego, moczowego, rozrodczego i pokarmowego), występują także w tęczęwce oka. Mięśnie te uczestniczą w procesach życiowych o zasadniczym znaczeniu. Długość komórek (włókien) mięśni gładkich w organizmie człowieka, w zależności od miejsca występowania, pozostaje w zakresie od poniżej 20 μm (ściany naczyń krwionośnych) do około 500 μm (macica

ciężarnej kobiety), natomiast średnica wynosi zazwyczaj około 5–10 μm . Siła i częstotliwość skurczów pozostają pod kontrolą obwodowego układu nerwowego i układu hormonalnego.

Dotychczasowe badania fizjologiczne prowadzono prawie wyłącznie na mięśniach naczyń krwionośnych, natomiast badania biochemiczne i strukturalne głównie na mięśniach układu pokarmowego. Dlatego też, dla powiązania danych biochemicznych z właściwościami fizjologicznymi mięśni gładkich, konieczne były pewne ekstrapolacje i uogólnienia.

STRUKTURA KOMÓREK MIĘŚNI GŁADKICH

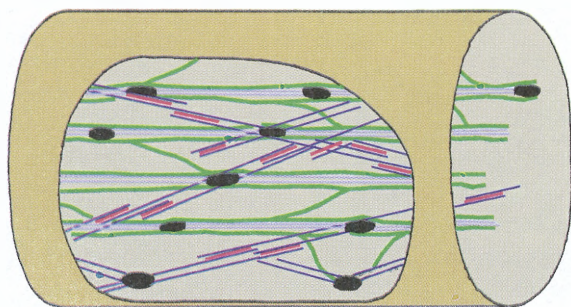
STRUKTURA APARATU SKURCZU

Chociaż mięśnie gładkie, podobnie jak mięśnie szkieletowe, posiadają aparat skurczu funkcjonujący w oparciu o oddziaływanie filamentów miozynowych z filamentami aktynowymi w obecności ATP, to różnią się od tych ostatnich zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Mięśnie gładkie nie wykazują regularnej, sarkomerycznej struktury. Wiele obserwacji wskazuje, że zawierają one jednak jednostki kurczliwe, funkcjonalnie odpowiadające sarkomerom. Dotąd trwają dyskusje nad budową tych jednostek i ich funkcjonalnymi współzależnościami z cytoszkieletem.

Jak wykazały badania immunocytochemiczne, w gładkim włóknie mięśniowym można wyróżnić domeny zawierające aparat skurczu oraz domeny cytoszkieletowe (FÜRST i współaut. 1986; SMALL i współaut. 1986; NORTH i współaut. 1994a, 1994b; MABUCHI i współaut. 1996 oraz artykuł przeglądowy SMALL 1995). W regionach komórki stanowiących domenę kurczliwą

stwierdza się występowanie aktyny, miozyny oraz białek regulujących ich oddziaływanie, podczas gdy w domenie cytoszkieletowej, poza aktyną i charakterystycznymi dla tej domeny białkami wiążącymi się z filamentami aktynowymi, obecne są zbudowane z desminy filamenty pośrednie. Filamenty aktynowe każdej z domen tworzone są przez odmienne izoformy tego białka (NORTH i współaut. 1994b). Domeny te nie są wyraźnie oddzielone, ale wzajemnie się przenikają (Ryc. 1). Filamenty aktynowe i miozynowe domeny kurczliwej, choć ich orientacja w komórce nie jest jednakowa, w jednej jednostce kurczliwej są względem siebie równoległe. Filamenty aktynowe rozpoczynają się i kończą w strukturach o większej gęstości optycznej, zwanych ciałkami gęstymi, równomiernie rozmieszczonymi w cytoplazmie, oraz w płytkach mocujących, przytwierdzonych do błony komórkowej. Struktury te wydają się pełnić analogiczną rolę do dysków Z w mięśniach szkieletowych. Część filamentów aktynowych (tj. te tworzące aparat skurczu) wyłaniających się z ciałek gęstych napotyka w ich sąsiedztwie wy-

kazujące polarność boczną filamenty miozynowe, o długości około 1,6 μm (BOND i SOMLYO 1982). Najprawdopodobniej filamenty aktynowe pomiędzy dwoma sąsiednimi ciałkami gęstymi tworzą podstawową jednostkę kurczliwą (BOND i SOMLYO 1982, KARGACIN i współaut. 1989). Z płytkami mocującymi i ciałkami gęstymi łączą się też desminowe filamenty pośrednie, wchodzące w skład cytoszkieletu.



Ryc. 1. Schemat organizacji aparatu skurczu i cytoszkieletu w komórce mięśnia gładkiego.

Dla uproszczenia przedstawiono tylko najważniejsze elementy, oznaczone następującymi kolorami: czerwony — filamenty miozynowe, ciemnoniebieski — filamenty aktynowe aparatu skurczu, jasnoniebieski — filamenty aktynowe cytoszkieletu, zielony — filamenty pośrednie, czarny — ciałka gęste.

Z dotychczasowej znajomości struktury aparatu skurczu komórek mięśni gładkich nie wynika bezpośrednio, w jaki sposób oddziaływanie aktyna-miozyna w obecności ATP prowadzi do skracania tych komórek. Już wczesne obserwacje histologiczne pozwoliły stwierdzić, że komórki przylegające do podłoża, i w skutek tego nie mające możliwości skracania się, w warunkach indukujących skurcz wykazują obecność regularnie rozmieszczonych stref skurczu, w wyniku czego przypominają długie strąki wypełnione nasionami (KÖLLIKER 1849). Obserwacje te, chociaż prowadzone w warunkach odbiegających od fizjologicznych, sugerowały segmentację aparatu skurczu. Obecnie dysponujemy podobnymi wynikami także na poziomie molekularnym. Stwierdzono na przykład, że w komórkach utrwalanych podczas skurczu obserwuje się podobną, periodyczną obecność stref występowania ufosforylowanej miozyny (BENNETT i współaut. 1988) (znaczenie fosforylacji miozyny w inicjacji skurczu wyjaśnione zostanie poniżej). Analiza zmian położenia ciałek gęstych podczas skurczu wykazała zgrupowania tych struktur przemieszczających się w sprzężony sposób, również występujące periodycznie wzdłuż długiej osi komórki (KARGACIN i współaut. 1989). Szczegółowych danych o segmentacji aparatu skurczu dostarczyły

również analizy lokalizacji licznych białek tego aparatu, a także cytoszkieletu, prowadzone metodą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. Analizy te dotyczyły zarówno odpowiadających pojedynczym strefom kurczliwym fragmentów komórek w stanie indukowanego „superskurczu” (SMALL i współaut. 1990), jak i całych, przylegających do podłoża włókien na różnych etapach skurczu (DRAEGER i współaut. 1990).

BIAŁKA APARATU SKURCZU

W mięśniach gładkich występuje szereg izoform miozyny i aktyny, które są charakterystyczne tylko dla tej tkanki, jak również obecnych także w komórkach niemięśniowych, ale różnych od występujących w komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych (Tabela 1). Mimo wysokiego stopnia homologii, stosunkowo niewielkie różnice w sekwencjach białek aparatu skurczu obu typów mięśni wywierają istotny wpływ na strukturę białek i — w konsekwencji — powodują różnice w aktywności motorycznej obu typów mięśni.

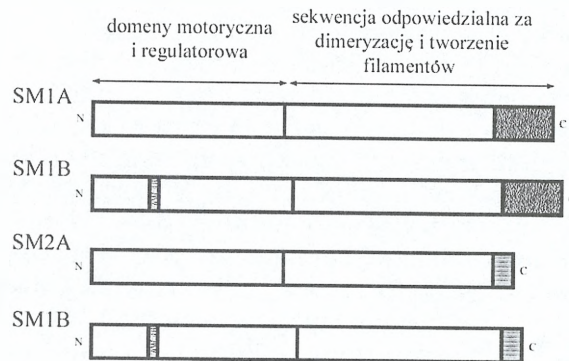
Dotyczy to zwłaszcza miozyny, ponieważ różnice w sekwencji miozyny mięśni gładkich w stosunku do sekwencji izoform tego białka z mięśni szkieletowych i sercowego dotyczą miejsc ważnych funkcjonalnie: rejonu N-końcowego, gdzie obecne są dwie powierzchniowe pętle domeny motorycznej, z których jedna znajduje się w „kieszeni” wiążącej ATP (pętla 1), a druga w miejscu wiązania aktyny (pętla 2), a także domeny regulatorowej, czyli rejonu wiązania lekkich łańcuchów. Miozyna mięśni gładkich występuje w postaci kilku izoform, które wynikają ze strukturalnej heterogenności jej łańcuchów ciężkich i lekkich (SOMLYO 1993). Wykazano istnienie czterech izoform łańcuchów ciężkich tego białka: SM1A, SM1B, SM2A i SM2B (Tabela 1, Ryc. 2) (EDDINGER i MEER 1997, LOUKIANOV i współaut. 1997, BABU i współaut. 2000). Izoformy te, kodowane przez jeden gen, powstają poprzez alternatywne składowanie eksonów pierwotnego transkryptu. Ekspresja izoform ciężkiego łańcucha miozyny regulowana jest, w sposób specyficzny tkankowo, podczas rozwoju mięśni. Wykazano, że izoformy SM1 ulegają ekspresji już podczas wczesnego rozwoju płodowego, a izoformy SM2 podczas późnego rozwoju płodowego lub po narodzeniu. W czasie dojrzewania stosunek SM2/SM1 wzrasta, ale jego wartość jest różna dla różnych typów mięśni gładkich. Izoformy SM1 i SM2 różnią się sekwencją i długością C-końcowego rejonu łańcucha polipeptydowego. Różnice między izoformami SMA i SMB spowodowane są obecnością 7-aminokwasowej wstawki w pętli 1

Tabela 1. Izoformy białek aparatu skurczu i cytoszkieletu mięśni gładkich

Białko lub podjednostka	Izoforma	Charakterystyka molekularna
Ciężki łańcuch miozyny mięśni gładkich (około 200–205 kDa)	SM1A	koniec C — unikalna dla izoform SM1 sekwencja 43 aminokwasów
	SM1B	koniec C — unikalna dla izoform SM1 sekwencja 43 aminokwasów; obecność dodatkowych 7 aminokwasów w powierzchniowej pętli główki
	SM2A	koniec C — unikalna dla izoform SM2 sekwencja 9 aminokwasów
	SM2B	koniec C — unikalna dla izoform SM2 sekwencja 9 aminokwasów; obecność dodatkowych 7 aminokwasów w powierzchniowej pętli główki
Istotny lekki łańcuch miozyny mięśni gładkich	SMLC17a	17 kDa, bardziej kwaśny
	SMLC17b	17 kDa, bardziej zasadowy
Regulujący lekki łańcuch miozyny mięśni gładkich	SMLC20	20 kDa, ulega fosforylacji pod wpływem kinazy lekkich łańcuchów miozyny
Ciężki łańcuch miozyny niemięśniowej	NM1	196 kDa
	NM2	198–200 kDa
Regulujący lekki łańcuch miozyny niemięśniowej	NMLC20	20 kDa, ulega fosforylacji pod wpływem kinazy lekkich łańcuchów miozyny
Aktyna mięśni gładkich	SM alfa	około 42 kDa; sekwencje izoform w obrębie grup SM i NM są w prawie 99% identyczne, natomiast różnice pomiędzy sekwencjami izoform należących do różnych grup nie przekraczają 7%
	SM gamma	
Aktyna niemięśniowa	NM beta NM gamma	

izoform SMB (Ryc. 2). Lekki łańcuch regulujący mięśni gładkich występuje w postaci jednej izoformy (SMLC20), natomiast lekki łańcuch istotny w postaci dwóch izoform — SMLC17a i SMLC17b. Mięśnie gładkie zawierają ponadto

dwie izoformy ciężkiego łańcucha miozyny, które występują również w komórkach niemięśniowych — NMA i NMB (GAYLINN i współaut 1989, MORANO 1992), oraz towarzyszące im lekkie łańcuchy (GAYLINN i współaut 1989) (Tabela 1). Niemięśniowy regulujący lekki łańcuch miozyny (NMLC20), kodowany przez oddzielny gen, ulega również znacznej ekspresji w hodowlanych komórkach mięśni gładkich.



Ryc. 2. Porównanie sekwencji izoform łańcucha ciężkiego miozyny mięśni gładkich.

Identyczne odcinki sekwencji oznaczono w taki sam sposób. Litery N i C oznaczają odpowiednio koniec aminowy i karboksylowy sekwencji.

Różnice w sekwencjach izoform aktyny i tropomiozyny z mięśni gładkich i z mięśni szkieletowych są stosunkowo niewielkie. Spośród czterech izoform aktyny (Tabela 1), ekspresja dwóch jest specyficzna dla komórek mięśni gładkich i występują one w domenie kurczliwej komórek, podczas gdy dwie pozostałe, występujące również w komórkach niemięśniowych, obecne są w domenie cytoszkieletowej. Podczas rozwoju zmiany zawartości ciężkich łańcuchów niemięśniowej miozyny i niemięśniowej aktyny zachodzą równolegle (EDDINGER i MURPHY 1991). Tropomiozyna, wiążąca się z filamentami aktynowymi aparatu skurczu zarówno mięśni szkieletowych, jak i gładkich, stanowi składnik układu regulującego skurcz. Przeglądu jej izoform, ich właściwości i funkcji dokonała ostatnio MORACZEWSKA (2001). W mięśniach szkieletowych białko to współdziała z troponiną, również związaną z filamentami aktynowymi, natomiast w mięśniach gładkich, gdzie troponina nie występuje, podobną rolę pełni kaldesmon, białko występujące tylko w komórkach niemięśniowych i mięśniach gładkich. Jego rolę w regulacji aktywności aktomiozyny omawiamy poniżej.

Wyżej wymieniono i krótko scharakteryzowano tylko najważniejsze białka mięśniowego aparatu skurczu i cytoszkieletu. Białek takich, pełniących różne funkcje komórkowe, jest oczy-

wiście znacznie więcej i rola niektórych z nich w regulacji aktywności motorycznej mięśni

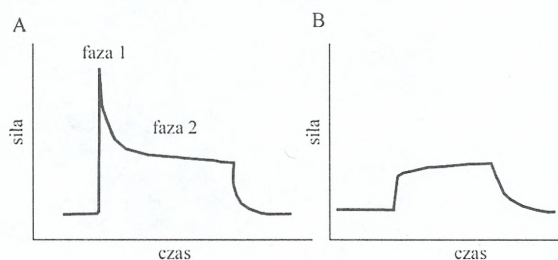
gładkich opisana zostanie w dalszych częściach tego artykułu.

AKTYWNOŚĆ MOTORYCZNA

Mimo, że zawartość miozyny w mięśniach gładkich stanowi tylko około 20% zawartości tego białka w mięśniach szkieletowych, aktywność motoryczna, liczona na powierzchnię przekroju poprzecznego, w przypadku mięśni gładkich jest wyższa od aktywności mięśni szkieletowych. Przypuszczano, że może to zależeć od czynników geometrycznych mięśni gładkich, obecności dodatkowych białek, a także dłuższych filamentów miozynowych (i większej liczby „mostków” na filamentach). W późniejszych badaniach wykazano jednak, że miozyna z mięśni gładkich (żołądków kury) w teście ruchliwości *in vitro* przesuwają filamenty aktynowe 10 razy wolniej niż miozyna z mięśni szkieletowych (piersiowych kury) (WARSHAW i współaut. 1990), podczas gdy generowana przez nią siła jest od 3 do 4 razy większa (VANBUREN i współaut. 1994). Wyniki te nasunęły dwa ważne pytania: (1) czy wyższa zdolność do generacji siły wynika ze zwiększenia siły generowanej przez pojedyncze mostki, czy czasu trwania tej części cyklu hydrolizy ATP (cykl roboczy, ang. duty cycle), w której miozyna jest połączona z aktyną w konformacji generującej siłę (ang. duty ratio)? oraz (2) czy mała szybkość przesuwania filamentów aktynowych jest wynikiem dłuższego czasu połączenia aktyny z miozyną, czy mniejszego przesunięcia filamentu aktynowego w wyniku jednego cyklu hydrolizy? Odpowiedzi na te pytania można było uzyskać dopiero dzięki pomiarom oddziaływań aktyny z miozyną na poziomie molekularnym, czyli pojedynczej cząsteczki miozyny i filamentu aktynowego, przy zastosowaniu pułapki laserowej (PIERZCHALSKA 1993) w połączeniu z testem ruchliwości. Okazało się, że miozyna z mięśni gładkich generuje siłę jednostkową podobną do generowanej przez miozynę z mięśni szkieletowych (Tabela 2). Także jednostkowe przesunięcie filamentu aktynowego jest podobne i wynosi około 11 nm. Wydaje się więc, że przyczyną mniejszej szybkości

przesuwania filamentów aktynowych przez miozynę mięśni gładkich i większej siły skurczu tych mięśni jest dłuższy względny czas trwania generacji siły (GUILFORD i współaut. 1997, GUILFORD i WARSHAW 1998). Związane jest to prawdopodobnie z opisanymi wyżej różnicami w strukturach pierwszorzędowych domen motorycznych miozyn z obu typów mięśni.

Ze względu na fizjologiczną charakterystykę skurczu, wyodrębniono dwa typy mięśni gładkich. Mięśnie, które wykazują wysoką szybkość skracania (Ryc. 3A, faza 1) i bardzo małą zdol-



Ryc. 3. Siła generowana w mięśniach gładkich myszy normalnych (A) i pozbawionych funkcjonalnego genu miozyny mięśni gładkich (B). Wg MORANO i współaut. 2000, zmodyfikowane.

ność do wytwarzania napięcia (faza 2), nazwano mięśniami fazowymi. Należą do nich mięśnie taśmy okrężnicy, jelit i żyły wrotnej. Te mięśnie układów krwionośnego, oddechowego i pokarmowego, które charakteryzuje znacznie niższa szybkość skracania, ale są bardziej efektywne w długotrwałym utrzymywaniu napięcia, nazwano mięśniami tonicznymi. Mięśnie te służą na przykład do utrzymania odpowiedniego ciśnienia krwi. Do różnic w aktywności motorycznej poszczególnych typów mięśni gładkich przyczyniają się różnice w ekspresji izoform łańcuchów miozyny. Wyniki dotyczące roli izoform łańcuchów ciężkich w zróżnicowaniu aktywności motorycznej są kontrowersyjne. Izoforny

Tabela 2. Aktywność motoryczna pojedynczych cząsteczek miozyny z mięśni gładkich i szkieletowych

Miozyna	Siła generowana w jednym cyklu hydrolizy ATP (pN)	Czas generacji siły w jednym cyklu hydrolizy ATP (ns)	Przesunięcie filamentu aktynowego w jednym cyklu hydrolizy ATP (nm)	Czas trwania przesunięcia w jednym cyklu hydrolizy ATP (ns)
Mięśnie gładkie	1,5–3,7	198	10,7	182
Mięśnie szkieletowe	1,2–3,4	25	10,6	45

Wg GUILFORDA I WARSHAWA 1998

SMB występują głównie w mięśniach fazowych i wykazują wyższą aktywność motoryczną (hydrolityczną i mechaniczną) od izoform SMA, występujących głównie w mięśniach tonicznych (DISANTO i współaut. 1997, WHITE i współaut. 1998). Za różnice w aktywności motorycznej mogą też częściowo odpowiadać izoformy istotnych lekkich łańcuchów miozyny (SMLC17a i SMLC17b) (MATTHEW i współaut. 1998). Mięśnie gładkie układu pokarmowego, zawierające izoformę LC17a, wykazują wyższą maksymalną szybkość skurczu niż mięśnie układu oddechowego i krwionośnego, zawierające izoformę LC17b (MALMQVIST i ARNER 1991).

Molekularne podłoże zdolności utrzymywania długotrwałego skurczu nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione. Wielu autorów przyczyny tej zdolności widzi w różnicach mechanizmów regulacji aktywności oddziaływań miozyny mięśni

gładkich z aktywną — zagadnienie to zostanie przedstawione w następnej części. W ubiegłym roku ukazał się jednak artykuł zatytułowany „Skurcz mięśni gładkich bez miozyny mięśni gładkich” (MORANO i współaut. 2000), który rzucił wyzwanie dotychczasowym poglądom. Autorzy ci wyeliminowali u myszy ekspresję genu kodującego ciężkie łańcuchy miozyny mięśni gładkich, co pozwoliło im wykazać, że ekspresja ciężkich łańcuchów miozyn niemięśniowych (NMA i NMB) jest wystarczająca do powstania i utrzymywania długotrwałego napięcia (Ryc. 3B). W takich włóknach mięśniowych brak było jednak fazy 1 normalnego skurczu. Miozyny te tworzyły w komórkach filamenty podobne do filamentów miozyny mięśniowej i nie obserwowano zaburzeń rozwojowych płodów, choć zwierzęta ginęły wkrótce po narodzeniu.

REGULACJA AKTYWNOŚCI MOTORYCZNEJ MIĘŚNI GŁADKICH

Mięśnie gładkie, podobnie jak mięśnie szkieletowe, charakteryzuje ścisła zależność aktywności motorycznej od stężenia jonów wapnia. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia do około 1 μM inicjuje skurcz poprzez ich wiązanie z białkami, które w sposób pośredni powodują modyfikacje aparatu skurczu. W przypadku mięśni gładkich napływ jonów wapnia następuje bądź ze źródła wewnątrzkomórkowego — siateczki sarkoplazmatycznej, poprzez kanały regulowane przez IP_3 (inozytolo-1,4,5-trisfosforan), bądź z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przy udziale aktywowanych w różny sposób kanałów i wymiennaczy jonowych. Wzrastające stężenie jonów wapnia aktywuje w mięśniach gładkich obie składowe aparatu skurczu — zarówno filamenty miozynowe, jak i filamenty aktynowe.

MODYFIKACJA FILAMENTÓW MIOZYNOWYCH

Podstawowy mechanizm aktywacji skurczu komórek mięśni gładkich związany jest z zależnością od stężenia jonów wapnia modyfikacją cząsteczek miozyny (zarówno mięśniowej, jak i niemięśniowej) w wyniku fosforylacji reszty Ser-19 jej regulujących lekkich łańcuchów (LC20). Enzymem katalizującym tę reakcję jest specyficzna kinaza lekkich łańcuchów miozyny, aktywowana przez kalmodulinę po związaniu przez nią jonów wapnia. Fosforylacja tej samej reszty aminokwasowej może zachodzić także przy udziale innych kinaz, np. kinazy białkowej II aktywowanej przez jony wapnia i kalmodulinę, kinazy aktywowanej przez białko Rho, kinazy C

czy kinazy aktywowanej przez białko p21 (PFITZER 2001).

Fosforylacja miozyny powoduje znaczny wzrost jej aktywności motorycznej (wzrost szybkości ruchu filamentów aktynowych w teście ruchliwości *in vitro*) i aktywności enzymatycznej (wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej). Miozyna po defosforylacji przez specyficzną, niezależną od stężenia jonów wapnia fosfatazę wykazuje kilkaset razy niższą aktywność enzymatyczną i nie wykazuje aktywności motorycznej (TRYBUS 1991). Ponieważ miozyna pozbawiona jednej z dwóch główek, a także same główki, wykazują pełną, niezależną od fosforylacji aktywność enzymatyczną, a ciężka mero-miozyna (HMM, ang. heavy meromyosin; fragment cząsteczki miozyny obejmujący dwie główki z ich domenami regulatorowymi i część superhelikalnej pałeczki) podlega regulacji, sugeruje to, że dla występowania stanu nieaktywnego, a tym samym umożliwienia regulacji aktywności, niezbędne są oddziaływania między główkami tej samej cząsteczki (CREMO i współaut. 1995). TRYBUS i współaut. (1998) stwierdzili, że do uzyskania w pełni nieaktywnego stanu konieczna jest obecność rejonu S2 miozyny.

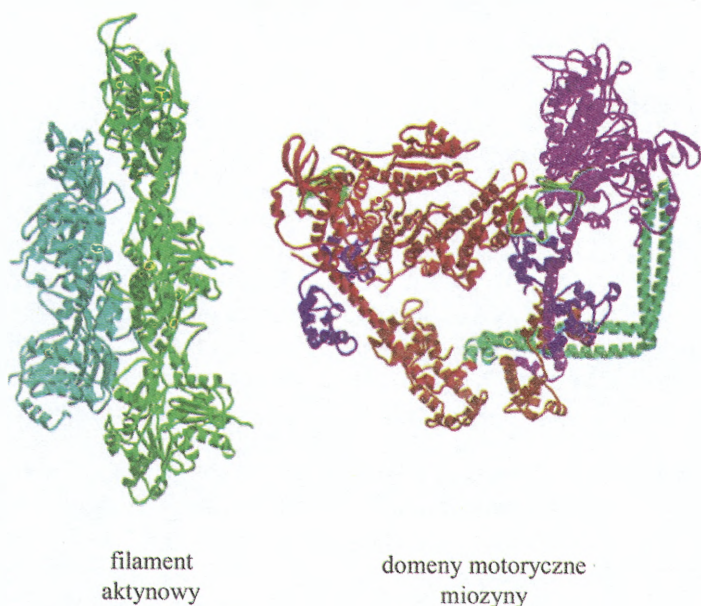
Badania struktury miozyny nieaktywnej okazały się bardzo istotne dla zrozumienia molekularnego mechanizmu procesu regulacji przez fosforylację miozyny. WENDT i współaut. (1999) uzyskali w obecności ATP dwuwymiarowe krystaliczne ułożenie cząsteczek ciężkiej mero-miozyny w stanie nieufosforylowanym i ufosforylowanym na dodatnio naładowanych mo-

nowarstwach lipidowych. Porównanie obrazów obydwu form HMM przy rozdzielczości 2,3 nm uwidocznilo zupełnie różne ich struktury. W obrazach aktywnej, tiofosforylowanej (często stosowana w badaniach miozyny modyfikacja naśladująca fosforylację, ale nieodwracalna) HMM widoczne były oddziaływania pomiędzy główkami sąsiednich cząsteczek, podczas gdy w nieaktywnej, nieufosforylowanej HMM obserwowano wewnątrzcząsteczkowe kontakty główek.

Wpisanie atomowego modelu główki miozyny w dwuwymiarową projekcję otrzymaną w mikroskopie elektronowym pokazało, że w obserwowanych w stanie nieaktywnym wewnątrzcząsteczkowych kontaktach uczestniczy wiążą-

techniką kriomikroskopii elektronowej (bez barwienia preparatów) doprowadziły do dokładniejszego określenia przestrzennej struktury nieufosforylowanej HMM niż to było możliwe przy zastosowaniu negatywowego barwienia. Nowy model, oparty na założeniu, że główki są ułożone asymetrycznie, potwierdził bliskie oddziaływania miejsca odpowiedzialnego za wiązanie aktyny jednej główki z konwerterem drugiej (dzięki czemu obie są zablokowane) oraz wykazał usytuowanie odcinka domeny S2 w pobliżu obu główek (Ryc. 4).

Ostatnio BERGER i współaut. (2001) przeprowadzili kinetyczną analizę zmian oddziaływania ufosforylowanej i nieufosforylowanej HMM podczas cyklu tworzenia mostków. Analiza ta wy-



Ryc. 4. Budowa filamentu aktynowego i nieufosforylowanej HMM mięśni gładkich.

W modelu filamentu aktynowego kolorem niebieskim i zielonym oznaczono dwie nici monomerów aktyny w filamencie. W modelu HMM kolorami czerwonym i fioletowym oznaczono dwie główki miozynowe tworzone przez N-końcowe odcinki łańcuchów ciężkich, z wyróżnieniem domen konwertera kolorem jasnozielonym. Istotne lekkie łańcuchy oznaczono kolorem granatowym, a regulujące lekkie łańcuchy kolorem ciemnożółtym. Kolorem ciemnozielonym oznaczono część superheliczną HMM. Wg WENDTA i współaut. 2001, zmodyfikowane.

ca aktyne pętla 2 jednej główki i subdomena konwertera drugiej. Bardziej szczegółowo znaczenie tej subdomeny dla aktywności miozyny opisała B. PLISZKA w tym numerze KOSMOSU. Na podstawie wcześniejszych badań wiadomo, że zablokowanie jednej z pętli wiążących aktyne powoduje zaledwie 3-4 krotny spadek aktywności ATPazy, natomiast zablokowanie konwertera uniemożliwia ruch domeny motorycznej niezbędny dla uwolnienia produktu hydrolizy ATP, P_i , hamując prawie całkowicie aktywność enzymatyczną miozyny (YOUNT i współaut. 1995). W ufosforylowanej miozynie mięśni gładkich, a więc po przejściu ze stanu nieaktywnego do aktywnego, obserwuje się rotację rejonu konwertera o około 70° . Wykazano także, że zamiana sekwencji subdomeny konwertera miozyny z mięśni gładkich na odpowiadającą jej sekwencję białka z mięśni szkieletowych powoduje powstanie chimery, która nie może ulegać regulacji przez fosforylację (TRYBUS i współaut. 1998). Późniejsze badania (WENDT i współaut. 2001)

kazała znaczne różnice w tworzeniu silnego wiązania z aktyną przez ufosforylowaną i nieufosforylowaną HMM w różnych warunkach. W nieobecności nukleotydu obie główki wiążą się silnie z aktyną niezależnie od stanu ufosforylowania, w obecności ADP natomiast tylko jedna główka miozynowa wiąże aktyne, a obie główki wykazują różne powinowactwo wobec tego nukleotydu. Można więc sądzić, że ADP wprowadza asymetrię pomiędzy główkami nieufosforylowanej miozyny, a fosforylacja powoduje zmiany sprzężenia mechanicznego pomiędzy nimi.

Wewnątrzcząsteczkowa asocjacja główek w nieufosforylowanej, nieaktywnej HMM z mięśni gładkich mogła sugerować, że zmniejszenie dodatniego ładunku przez fosforylację LC20 na każdej z dwóch główek wywołuje ich dysocjację i, w konsekwencji, wzrost aktywności enzymatycznej i motorycznej miozyny. Jednak, badania przy użyciu licznych mutantów N-końcowego rejonu LC20 wykazały, że mutanty z podstawieniami reszt o ładunku podobnym do tego

wnoszonego przez fosforylację Ser-19 nie wykazują pełnej aktywności (SWEENEY i współaut. 1994). A zatem, regulacji aktywności miozyny przez fosforylację nie można tłumaczyć wyłącznie zmianami wypadkowego ładunku. Mutacje C-końcowej połowy LC20 wykazały, że odgrywa ona istotną rolę w przekazywaniu informacji o zmianach konformacyjnych wywołanych fosforylacją Ser-19 w końcu N LC20 do fragmentu ciężkiego łańcucha w obu główkach cząsteczki miozyny (TRYBUS i CHATMAN 1993, IKEBE i współaut. 1994). W ten sposób udowodniono, że regulacja aktywności miozyny mięśni gładkich przez fosforylację jest procesem złożonym i wymagającym, poza pewnym odcinkiem superhelikalnej części cząsteczki i właściwą strukturą pętli 2, także właściwego ustawienia końca C regulującego łańcucha lekkiego w stosunku do odpowiedniego superhelikalnego odcinka łańcucha ciężkiego w każdej z dwóch główek.

Podczas utrzymującego się napięcia tonicznych mięśni gładkich dochodzi do utraty korelacji napięcia ze stanem ufosforylowania LC20 miozyny, co doprowadziło do poszukiwania dodatkowego mechanizmu regulacji. Najbardziej popularną hipotezą próbującą wyjaśnić przyczynę utrzymującego się napięcia, która przetrwała kilkanaście lat, była hipoteza tzw. mostków zahaczonych (ang. latch bridges) (HAI i MURPHY 1988). Według tej hipotezy utrzymywanie napięcia mięśni po defosforylacji miozyny wywołane jest bardzo powolną dysocjacją aktywny od miozyny zawierającej ADP w centrum aktywnym, co powoduje znaczne obniżenie szybkości cyklu hydrolizy ATP (a tym samym wyczerpywania rezerwy energetycznych komórek) z zachowaniem wytworzonego napięcia. Czy rzeczywiście taki mechanizm przyczynia się do utrzymywania napięcia mięśni nie jest pewne — model ten wymaga obecnie weryfikacji w świetle licznych nowych danych doświadczalnych, w tym opisanych powyżej wyników dotyczących indukowanej przez ADP asymetrii główek.

Kolejne hipotezy dotyczące biochemicznych mechanizmów umożliwiających długotrwałe utrzymywanie napięcia gładkich włókien mięśniowych zakładają udział białek związanych z filamentami aktynowymi — kaldesmonu (MARSTON 1989, WALSH i SUTHERLAND 1989, ALBRECHT i współaut. 1997) lub kalponiny (HAEBERLE 1994, MALMQVIST i współaut. 1997). Zagadnieniom tym poświęcimy nieco uwagi w dalszych częściach artykułu. Tutaj stwierdzić należy jednak, że żadna z tych hipotez nie zdobyła powszechnego uznania i że często są one sprzeczne ze sobą. Obecnie wydaje się, że za toniczny skurcz niektórych komórek mięśniowych odpo-

wiadają głównie, jak już wspomniano, niemięśniowe izoformy miozyny, NMA i NMB (MORANO i współaut. 2000). Pozostaje jednak do wyjaśnienia sposób regulacji aktywności tych izoform podczas utrzymywania stanu skurczu. Analogicznie jak w przypadku izoform mięśniowych, ulegają one aktywacji przez fosforylację LC20. Podczas przedłużonego skurczu, jednakże, poziom jonów wapnia w sarkoplazmie ulega obniżeniu, co prowadzi do inaktywacji specyficznej, zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny, kinazy lekkich łańcuchów. Wiadomo jednak, że układy kurczliwe zarówno włókien mięśniowych (zawierające mięśniowe i niemięśniowe izoformy miozyny), jak i komórek niemięśniowych (zwierające wyłącznie izoformy niemięśniowe) mogą ulegać aktywacji poprzez niezależną od stężenia jonów wapnia fosforylację lekkich łańcuchów miozyny. Prawdopodobnie enzymem katalizującym tę fosforylację jest kinaza zależna od białka Rho (AMANO i współaut. 1996).

Opisany szlak regulacji aktywności motorycznej komórek mięśniowych przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny może ulegać modulacji dzięki szeregowi innych mechanizmów regulujących. Do najważniejszych z nich należą:

— bezpośrednia fosforylacja wiążącej miozynę fosfatazy podjednostki lekkich łańcuchów miozyny przez kinazę zależną od białka Rho, prowadząca do hamowania aktywności tej fosfatazy, a zatem zwiększenia stopnia fosforylacji miozyny (KIMURA i współaut. 1996);

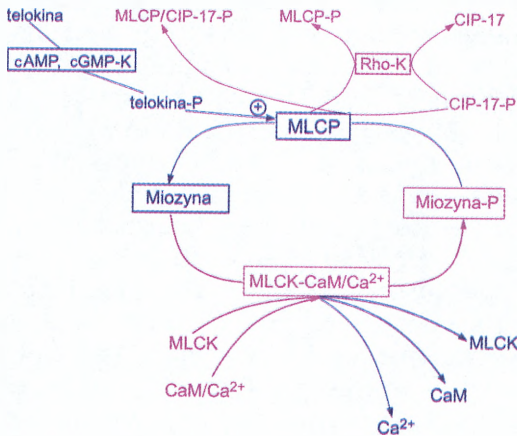
— hamowanie aktywności tej fosfatazy przez wiązanie białka CIP-17 (ang. protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa). Wiązanie to stymulowane jest pod wpływem fosforylacji CIP-17 przez szereg kinaz białkowych, w tym przez kinazę zależną od Rho (LI i współaut. 1998, HAMAGUCHI i współaut. 2000, KOYAMA i współaut. 2000);

— działająca przeciwnie do dwóch poprzednich mechanizmów regulujących aktywacja fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny przez telokinę. Aktywacja ta wzmacniana jest po fosforylacji telokiny przez kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) (WU i współaut. 1998, WALKER i współaut. 2001). Telokina ma sekwencję identyczną z C-końcową sekwencją kinazy lekkich łańcuchów miozyny i kodowana jest przez ten sam gen, ale stanowi produkt translacji odrębnego transkryptu, powstającego dzięki aktywności promotora zlokalizowanego w intronie przerywającym ciągłość sekwencji kodującej domenę wiążącą kalmodulinę MLCK (ITO i współaut. 1989, HERRING i SMITH 1996).

Współzależności pomiędzy tymi szlakami regulacji przedstawiono schematycznie na Ryc. 5.

MODYFIKACJA FILAMENTÓW AKTYNOWYCH

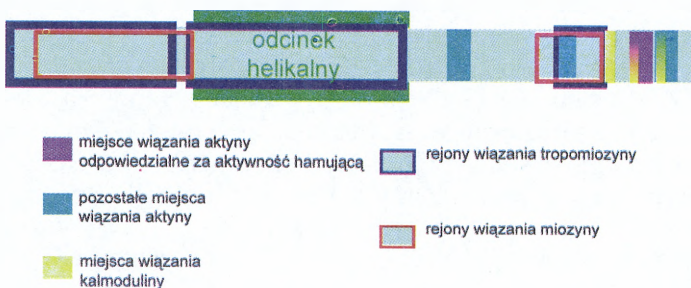
Filamenty aktynowe domeny kurczliwej mięśni gładkich zawierają aktynę, tropomiozynę i kaldesmon w stosunku molowym około 14:2:1 oraz białko wiążące wapń. Aktywność ATPazy miozynowej stymulowanej przez filamenty aktynowe rekonstruowane z wymienionych składników jest kontrolowana przez jony wapnia. Właściwości białek filamentów aktynowych opisała szerzej DĄBROWSKA (1994).



Ryc. 5. Uproszczony schemat regulacji stanu fosforylacji Ser-19 regulującego lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich.

Kolorem czerwonym oznaczono procesy i białka uczestniczące w fosforylacji (aktywacji) miozyny, a kolorem niebieskim prowadzące do jej defosforylacji (inaktywacji). P — białko ufosforylowane, MLCK — kinaza lekkich łańcuchów miozyny, CaM — kalmodulina, Rho-K — kinaza zależna od białka Rho, cAMP, cGMP-K — kinazy zależne od cyklicznego AMP i cyklicznego GMP. Symbolem ⊕ oznaczono aktywujący wpływ telokiny, zwłaszcza ufosforylowanej, na aktywność fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny.

Kaldesmon jest białkiem oddziałującym ze wszystkimi pozostałymi składnikami filamentów aktynowych oraz z miozyna (Ryc. 6). Jego oddziaływaniom z F-aktyną towarzyszy hamowanie aktywności stymulowanej przez aktynę ATPazy miozynowej i, tym samym, aktywności motorycznej. Badania *in situ* na pozbawionych sarkolemy włóknach mięśni szkieletowych (TAGGART i MARSTON 1988) i mięśni gładkich



Ryc. 6. Mapa sekwencji cząsteczki kaldesmonu z mięśni gładkich.

(PFITZER i współaut. 1993) wykazały, że kaldesmon powoduje zmniejszenie generacji siły. Białko to nie wywiera wpływu na fosforylację lekkich łańcuchów miozyny, ale w jego obecności do generacji takiej samej siły niezbędne są wyższe poziomy fosforylacji (MALMGVIST i współaut. 1996).

W doświadczeniach *in vitro* tropomiozyna znacznie wzmacnia hamujący wpływ kaldesmonu na aktywność ATPazy aktomiozynowej, choć w nieobecności kaldesmonu sama stymuluje tę aktywność. Istnieją dwa alternatywne modele tłumaczące, w jaki sposób kaldesmon pełni swoją funkcję. W pierwszym z nich zakłada się decydującą rolę współzawodnictwa pomiędzy kaldesmonem a główkami miozynowymi o jedno z miejsc wiązania tych ostatnich na aktynie — tzw. miejsce „słabego wiązania”, występującego w cyklu hydrolizy ATP przed oddysocjowaniem P_i od domeny motorycznej miozyny. Zachodzące w wyniku współzawodnictwa zmniejszenie szybkości wiązania miozyny z aktyną jest dalej pogłębiane przez tropomiozynę (CHALOVICH i współaut. 1998, SEN i współaut. 2001). Inni autorzy uważają, że hamowanie ATPazy przez kaldesmon spowodowane jest jego wpływem na konformację aktyny i wywołuje spowolnienie ograniczającego szybkość hydrolizy ATP etapu uwolnienia P_i, który jest w nieobecności kaldesmonu przyspieszany przez aktynę; tropomiozyna nadaje kooperatywność działaniu kaldesmonu (MARSTON i REDWOOD 1993, MARSTON i współaut. 1998).

Stężenie jonów wapnia kontroluje hamującą aktywność kaldesmonu przy udziale białka wiążącego wapń, stanowiącego integralny składnik filamentów aktynowych. Białko to prawdopodobnie wiąże się z kaldesmonem niezależnie od stężenia jonów wapnia, ale przy wysokim ich stężeniu (tj. 1 μM, występującym w cytoplazmie po aktywacji komórek) zmienia konformację kaldesmonu i jego oddziaływania z aktyną w taki sposób, że znosi hamowanie oddziaływań aktyna-miozyna wywoływane przez kaldesmon. Dotychczas badano zdolność kalmoduliny oraz białek do niej podobnych, kaltropiny i S100, do znoszenia inhibicji aktywności ATPazy aktomiozynowej przez kaldes-

mon. Wszystkie te białka powodowały w obecności jonów wapnia wzrost aktywności ATPazy, ale tylko w ograniczonym zakresie, a ponadto nie wykazano ich obecności w filamentach aktynowych. Ostatnio z filamentów aktynowych mięśni tęcznicy owcy udało się wydzielić białko wiążące wapń, które wraz z aktyną, tropomiozyną i kaldesmonem przywracało pełną aktywność funkcjonalną filamentu aktynowego. Białko to okazało się strukturalnie zmienioną postacią kalmoduliny (NOTARIANNI i współaut. 2000). Inny proponowany mechanizm regulacji inhibicji ATPazy aktomiozynowej przez kaldesmon polega na zależnej od wapnia fosforylacji tego białka, katalizowanej przez jedną z kilku kinaz białkowych. Najbardziej prawdopodobne jest udział kinazy ERK (ang. extracellular regulated kinase) lub kinazy PAK (ang. p21-activated kinase), bądź dotąd jeszcze niezidentyfikowanej kinazy białkowej. Zagadnienie fizjologicznego znaczenia fosforylacji kaldesmonu, nadal budzące liczne kontrowersje, obszernie przedyskutowali MORGAN i GANGOPADHYAY (2001). Nie można również wykluczyć współdziałania obu mechanizmów regulacji hamującej aktywności kaldesmonu — bezpośrednich oddziaływań z białkiem wiążącym wapń oraz fosforylacji.

W poszukiwaniu strukturalnych podstaw hamowania aktywności mięśni gładkich przez kaldesmon analizowano strukturę filamentów aktynowych w obecności i nieobecności tego białka. Przestrzenna rekonstrukcja filamentów aktynowych mięśni gładkich wykazała, że cząsteczki kaldesmonu o długości około 75 nm, podobnie jak polimery tropomiozyny, ułożone są wzdłuż podwójnej helisy monomerów aktyny, w kontakcie z zewnętrznymi domenami jej cząsteczek aktyny (HODGKINSON 2000). Koncentrację masy kaldesmonu obserwowano w pobliżu odcinka C-końcowego, a mniejszą gęstość w pobliżu końca N w subdomenie 1 aktyny oraz w okolicach jej subdomeny 2 (LEHMAN i współaut. 1997). Miejsca wiązania kaldesmonu nie pokrywają się z postulowanymi miejscami silnego wiązania miozyny z aktyną, chociaż może on zakłócać wiązanie słabe. Tropomiozyna znajduje się wówczas tylko nad częścią hydrofobowych i obdarzonych ładunkami elektrostatycznymi reszt aminokwasowych (332–336) aktyny tworzących miejsca silnego wiązania miozyny, podczas gdy w przypadku hamowania skurczu przez troponinę (w mięśniach szkieletowych) tropomiozyna blokuje wszystkie reszty aminokwasowe silnie wiążące miozynę (patrz art. Z. GRABARKA w tym numerze KOSMOSU). W nieobecności kaldesmonu (w stanie aktywnym) tropomiozyna pokrywa całe miejsce silnego wi-

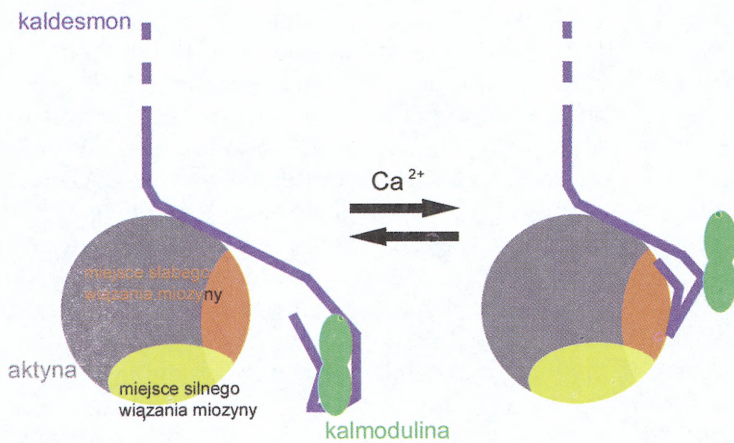
zania aktyny z miozyną. Pojawia się zatem pytanie, jaką rolę w mechanizmie inhibicji ATPazy aktomiozynowej pełni tropomiozyna: czy aktywną, jeśli zablokowanie części miejsca silnego wiązania miozyny z aktyną wystarczy do hamowania, czy też bierną, gdy sam kaldesmon zmienia konformację aktyny wpływając na jej oddziaływanie z miozyną, a tropomiozyna jedynie stabilizuje te zmiany i propaguje je wzdłuż filamentu aktynowego (HODGKINSON 2000).

Duże znaczenie dla zrozumienia sposobu działania kaldesmonu miały badania z zastosowaniem fragmentów jego łańcucha polipeptydowego, także tych z wprowadzonymi podstawieniami lub delecjami aminokwasowymi. Wykazano, że za hamowanie aktywności ATPazy aktomiozynowej, w sposób zależny od tropomiozyny i regulowany przez białko wiążące wapń/ Ca^{2+} , odpowiedzialna jest domena C-końcowa, obejmująca zaledwie 20% cząsteczki kaldesmonu (FRASER i współaut. 1997). W domenie tej znajdują się trzy wiążące aktynę sekwencje o długościach kilkunastu aminokwasów, oznaczone C, B i B' (w kolejności od końca N). Co interesujące, w doświadczeniach *in vitro* dla pełnej, podlegającej regulacji, aktywności wystarczająca jest obecność tylko sekwencji B oraz jednej z dwóch pozostałych sekwencji — C lub B'. Ten C-końcowy odcinek sekwencji kaldesmonu oddziałuje z subdomeną 1 aktyny obejmującą jej C- i N-końcowe rejony (GAO i współaut. 1999). Sąsiedztwo miejsc wiążących aktynę, tropomiozynę i kalmodulinę pozwoliło na przedstawienie modelu zależnej od jonów wapnia regulacji kompleksu aktyna-tropomiozyna mięśni gładkich przez kaldesmon, pokazanego na Ryc. 7 (MARSTON i współaut. 1998).

N-końcowy rejon sekwencji kaldesmonu obejmuje główną sekwencję odpowiedzialną za wiązanie miozyny mięśni gładkich, a ściślej rzecz biorąc jej subfragmentu 2 (IKEBE i REARDON 1988, VOROTNIKOV i współaut. 1997, WANG i współaut. 1997). Jak już wspomniano w części poświęconej regulacji przez modyfikacje filamentów miozynowych, sugerowano, że zdolność kaldesmonu do jednoczesnego wiązania zarówno z filamentami aktynowymi, jak i miozynowymi, może odpowiadać za utrzymywanie napięcia przez toniczne włókna mięśni gładkich. (MARSTON 1989, WALSH i SUTHERLAND 1989, ALBRECHT i współaut. 1997). Mechanizm ten można wyobrazić sobie następująco: w stanie rozkurczu mięśni kaldesmon utrzymuje filamente aktynowe w stanie niezdolnym do aktywacji miozyny, a jednocześnie wiąże domenę regulatorową miozyny i stabilizuje nieufosforylowany łańcuch LC20. Po stymulacji mięśnia zmiany konformacyjne kaldesmonu (zachodzą-

ce pod wpływem białka wiążącego wapń lub fosforylacji) umożliwiają oddziaływania aktyny z miozyną. Podczas utrzymywania napięcia kal-desmon powraca do sieciowania filamentów miozynowych z aktynowymi, ale w ich nowych względnych położeniach, uzyskanych dzięki skurczowi. Alternatywnym, bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem funkcji wiążącego mio-

ATPazy aktomiozynowej, wydaje się ona być konieczna do hamowania ruchu filamentów aktynowych po podłożu opłaszczonym miozyną w teście ruchliwości *in vitro* (WANG i współaut. 1997). Do podobnych wniosków prowadzą również wyniki doświadczeń na permeabilizowanych komórkach, do których wprowadzano N-końcowe fragmenty cząsteczki kal-desmonu



Ryc. 7. Schemat regulacji przez jony wapnia i kalmodulinę oddziaływań kal-desmonu z aktyną.

Przedstawiono tylko jeden monomer aktynowy filamentu i jego oddziaływanie z C-końcową częścią cząsteczki kal-desmonu.

zynę rejonu cząsteczki kal-desmonu jest utrzymywanie właściwej organizacji aparatu skurczu. Zgodnie z tą hipotezą, kal-desmon, poza udziałem w regulacji aktywności aparatu skurczu, pełni również rolę białka strukturalnego. Przemawia za tym fakt, że, chociaż obecność sekwencji odpowiedzialnej za wiązanie miozyny nie jest konieczna do hamowania aktywności

(LEE i współaut. 2000). Użyte peptydy indukowały skurcz wskutek współzawodnictwa z endogennym kal-desmonem o miozynę. Sugeruje to, że sieciowanie aktyny z miozyną przez kal-desmon odgrywa ważną rolę we właściwym ustawianiu C-końcowej, wiążącej aktynę domeny kal-desmonu wobec filamentu aktynowego.

ROLA CYTOSZKIELETU W AKTYWNOŚCI MOTORYCZNEJ

Związanym ze skurczem zmianom kształtu komórek mięśni gładkich muszą towarzyszyć zmiany organizacji cytoszkieletu. Coraz liczniejsze dane wskazują, że nie są to wyłącznie zmiany bierne, polegające na dostosowywaniu się struktury cytoszkieletu do zmienionego kształtu włókna mięśniowego, ale że mogą one aktywnie uczestniczyć w generacji siły lub utrzymywaniu napięcia, bądź, co nie mniej istotne, w zapobieganiu nadmiernemu skracaniu komórek.

CYTOSZKIELET AKTYNOWY

W licznych doświadczeniach obserwowano, że czynniki hamujące polimeryzację aktyny blokują lub znacząco zmieniają właściwości kurczliwe komórek mięśni gładkich (np. BATTISELLA-PATERSON i współaut. 1997, JONES i współaut. 1999). W komórkach linii pochodzącej od zarodkowych komórek aorty szczura zarówno izo-

forma α aktyny, specyficzna dla komórek mięśni gładkich i występująca w domenie kurczliwej, jak i „niemięśniowa” izoforma β , występują w postaci wiązek filamentów ciągnących się wzdłuż całej długości komórek. Wiązki takie, zwane włóknami naprężeniowymi, są charakterystyczne dla komórek w hodowli. Jednakże, po indukcji skurczu, obie izoformy zachowują się w zupełnie różny sposób (FULTZ i współaut. 2000). Włókna naprężeniowe zbudowane z aktyny α zanikają, a filamente zbudowane z tej aktyny tworzą, wraz z α -aktyniną, pierścieni kolumnopodobnych struktur na peryferiach komórek, którym zapewne towarzyszy miozyna. W przeciwieństwie, aktyna β pozostaje we włóknach naprężeniowych, których długość maleje podczas skurczu. Co istotne, pod wpływem cytochalazyny B (czynnika w dość złożony sposób wpływającego na stan organizacji aktyny, w tym zapobiegającego jej polimeryzacji), w komórkach w stanie skurczu zanikają wiązki fila-

mentów złożone z cytoszkieletowej aktyny β , co bezpośrednio prowadzi do wydłużania komórki. Nasuwa się zatem wniosek, iż właśnie cytoszkielet aktynowy co najmniej częściowo odpowiada za utrzymywanie komórki w stanie skurczu. Taka reorganizacja i sieciowanie filamentów cytoszkieletu aktynowego mogą przyczynić się również do utrzymywania długotrwałego napięcia mięśni (BATTISELLA-PATERSON i współaut. 1997, SMALL i współaut. 1986).

Szlaki przekazywania sygnałów prowadzące do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w opisanych powyżej i podobnych doświadczeniach nie zostały jeszcze dobrze poznane. Najprawdopodobniej współdziałają tu liczne mechanizmy, w tym aktywacja kinazy zależnej od Rho, kinaz MAP (ang. mitogen-activated protein kinases) oraz innych kinaz białkowych. Poza polimeryzacją aktyny, wpływają one m.in. na płytki mocujące, zawierające wśród innych białek także integryny — oddziałujące z cytoszkieletem aktynowym transbłonowe białka uczestniczące w „mechanotransdukcji”, czyli przekazywaniu siły generowanej w mięśniach do macierzy zewnątrzkomórkowej. Z braku miejsca, Czytelnika zainteresowanego tymi problemami, obejmującymi także zagadnienia dotyczące adaptacji cytoszkieletu aktynowego komórek mięśniowych do częstych skurczów, wpływu sił zewnętrznych na organizację tej składowej cytoszkieletu oraz jej zróżnicowania w komórkach o często bardzo różnych właściwościach fizjologicznych, odsyłamy do innych prac przeglądowych (DAVIS i HILL 1999, DAVIS i współaut. 2001, GERTHOFFER i GUNST 2001, GUNST i TANG 2000, HAI 2000, SEOW i FREDBERG 2001).

Innym mechanizmem, dzięki któremu cytoszkielet aktynowy może wpływać na obserwowaną aktywność motoryczną mięśni, jest sieciowanie filamentów aktynowych, a tym samym „utrwalanie” struktury komórki po skurczu. Białkiem, które wydaje się szczególnie predysponowane do takiej roli, jest kalponina. Białko to, mimo zupełnie różnej struktury, wykazuje właściwości podobne do kaldesmonu — wiąże aktynę, tropomiozynę, kalmodulinę i miozynę, *in vitro* wykazuje również zdolność do hamowania aktywności ATPazy aktomiozynowej, hamowania ruchu filamentów aktynowych w teście ruchliwości, a nawet, po wprowadzeniu do włókien mięśniowych pozbawionych błon komórkowych, zmniejszania maksymalnej szybkości skurczu. Te obserwacje sugerowały, że kalponina, podobnie jak kaldesmon, może bezpośrednio uczestniczyć w regulacji aktywności aktomiozyny mięśni gładkich, i niektórzy autorzy nadal wyznają taki pogląd (WINDER i współaut.

1998). Istnieje szereg danych, które zaprzeczają takiej możliwości. Przede wszystkim, analizy rozmieszczenia tego białka w komórkach wskazują, że jest ono obecne głównie (NORTH i współaut. 1994a) lub wyłącznie (MABUCHI i współaut. 1996) w domenie cytoszkieletowej, a nie kurczliwej, w której występuje miozyna. Dane te zgodne są z wynikami analiz natywnych filamentów aktynowych izolowanych z komórek, które zawierały albo tylko kalponinę, albo tylko kaldesmon (LEHMAN 1991), również występujący tylko w domenie kurczliwej, oraz ze stwierdzeniem współzawodnictwa obu tych białek *in vitro* o miejsca ich wiązania na filamentach aktynowych (MAKUCH i współaut. 1991). Nie wydaje się zatem możliwe, aby kalponina mogła bezpośrednio regulować aktywność aparatu skurczu. Kalponina wykazuje również zdolność do oddziaływań z desminą (MABUCHI i współaut. 1997, WANG i GUSIEV 1996), białkiem mięśniowych filamentów pośrednich (patrz niżej), obecnym w domenie cytoszkieletowej. Wiązaniu takiemu towarzyszy tworzenie wiązek filamentów desminowych (FUJII i współaut. 2000). Kalponina oddziałuje również z mikrotubulami (FUJII i współaut. 1997, FUJII i KOIZUMI 1999). Wyniki te sugerują jej udział w funkcjonalnym współdziałaniu wszystkich trzech składowych cytoszkieletu. Ponadto, w badaniach mechanicznych parametrów skurczu włókien i skrawków mięśniowych zwierząt pozbawionych genu kalponiny albo nie obserwowano żadnych zmian (FACEMIRE i współaut. 2000, YOSHIMOTO i współaut. 2000), albo nie stwierdzono wpływu braku ekspresji tego białka na generację siły, choć obserwowano zwiększenie szybkości skurczu (TAKAHASHI i współaut. 2000, MATTHEW i współaut. 2000), prawdopodobnie w wyniku zmian liczby filamentów aktynowych (MATTHEW i współaut. 2000). Brak ekspresji kalponiny powodował natomiast znaczne obniżenie odporności mechanicznej tkanek zawierających mięśnie gładkie, w tym osłabiał integralność ścian naczyń krwionośnych (TANIGUCHI i współaut. 2001). Wydaje się zatem, że hamujący wpływ kalponiny na aktywność ATPazy aktomiozynowej, wymagający zresztą znacznie większych ilości tego białka niż kaldesmonu i niezależny od obecności tropomiozyny (MAKUCH i współaut. 1991), jest efektem występującym jedynie *in vitro*, wynikającym ze zmian struktury filamentów aktynowych, a nie ich regulacji.

Ponieważ stwierdzono zmiany konformacyjne kalponiny podczas skurczu (BARANY i współaut. 1992), jej udział w związanych z aktywnością kurczliwą zmianach struktury cytoszkieletu jest wysoce prawdopodobny. Jest ona biał-

kiem nie tylko silnie sieciującym filamenty aktynowe, ale współdziała również z innymi białkami o podobnych właściwościach, z którymi współwystępuje w komórkach, takimi jak α -aktynina i filamina, tworząc żele aktynowe o wysokiej sprężystości (LEINWEBER i współaut. 1999). Mimo że udział kalponiny w indukowanej skurczem reorganizacji cytoszkieletu i utrzymywaniu zmian kształtów komórki *in vivo* nadal pozostaje do udowodnienia, znane są czynniki, które mogłyby regulować dysocjację usieciowanych filamentów aktynowych. Mogłoby to być ATP (MAKUCH i współaut. 1991) lub fosforylacja kalponiny (ROKOLYA i współaut. 1998, YUASA i współaut. 1999, KANEKO i współaut. 2000), prowadzące do dysocjacji tego białka od aktyny, bądź wiązanie Ca^{2+} /kalmoduliny z kalponiną (KOŁAKOWSKI i współaut. 1995) lub wiązanie miozyny z aktyną (KOŁAKOWSKI i współaut. 1997), prowadzące do rozpadu wiązek filamentów. W tym ostatnim przypadku nie byłaby to oczywiście miozyna aparatu skurczu, ale na przykład nie tworząca filamentów, rozpuszczalna miozyna I, której obecność w komórkach mięśni gładkich udowodniono (CHACKO i współaut. 1994), choć jej funkcja pozostaje nieznana. Zmiany stężenia jonów wapnia również wpływają na zdolność kalponiny do tworzenia wiązek filamentów aktynowych — przy wyższych stężeniach zdolność ta jest znacznie osłabiana (Kołakowski i Dąbrowska, dane nieopublikowane).

FILAMENTY POŚREDNIE

Wszystkie mięśnie gładkie zawierają filamenty pośrednie. W mięśniach gładkich trzewnych, podobnie jak w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym, filamenty te tworzy wyłącznie desmina. W naczyniowych mięśniach gładkich występują również filamenty zbudowane z wimentyny (OSBORN i współaut. 1981). Filamenty pośrednie tworzą we włóknach luźne wiązki

ciągnące się wzdłuż długiej osi komórki, oddziałujące z cytoszkieletem podbłonowym (TSUKITA i współaut. 1983, DRAEGER i współaut. 1989). Od dawna postulowano znaczenie tych struktur w utrzymywaniu kształtu komórek, uzyskanie jednak pełniejszych informacji o ich funkcjach stało się możliwe po uzyskaniu ras myszy pozbawionych genu kodującego desminę (SJUVE i współaut. 1998, LACOLLEY i współaut. 2001, LOUFRANI i współaut. 2001). Badania tkanek mięśni gładkich z komórkami, w których brak jest normalnej ekspresji desminy, wykazały, że, pomimo zachowanej morfologii, ich właściwości mechaniczne są znacznie zmienione. Szczegółne znaczenie fizjologiczne zmiany takie mają w przypadku mięśni gładkich ścian naczyń, poddawanych działaniu ciśnienia krwi. Wyniki te sugerują udział filamentów pośrednich w przekazywaniu siły generowanej w aparacie skurczu na powierzchnię komórek.

MIKROTUBULE

O roli układu mikrotubularnego w skurczu mięśni gładkich wiadomo stosunkowo niewiele. Nie mniej jednak, w kilku przypadkach obserwowano, że czynniki depolimeryzujące mikrotubule prowadzą do wzrostu szybkości skurczu lub napięcia różnych mięśni gładkich (SHERIDAN i współaut. 1996, LEITE i WEBB 1998, PLATTS i współaut. 1999, PAUL i współaut. 2000, ZHANG i współaut. 2000). Ostatnie prace wskazują, że indukowany przez depolimeryzację mikrotubul wzrost aktywności motorycznej włókien mięśni gładkich nie jest spowodowany aktywacją kinazy lekkich łańcuchów miozyny, ale, przynajmniej częściowo, aktywacją kinazy zależnej od Rho (CHITALEY i WEBB 2001, ZHANG i współaut. 2001). Szczegóły tego mechanizmu pozostają nieznane, jego występowanie wskazuje jednak na aktywną rolę mikrotubul w regulacji funkcji mięśni gładkich.

SMOOTH MUSCLE: STRUCTURE, CONTRACTILE ACTIVITY AND ITS REGULATION

Summary

Unique structural and functional properties of smooth muscle are described. Special attention is paid to the regulation of its contractile activity via myosin filament-linked and actin filament-linked mechanisms. The former involves precise regulation of the phosphorylation state of Ser-19 of myosin regulatory light chain. This phosphorylation initiates the interaction of myosin with actin leading to contraction. Myosin phosphorylation is catalyzed by Ca^{2+} -calmodulin-activated myosin light chain kinase, whereas its dephosphorylation is mediated by calcium-independent

myosin light chain phosphatase whose activity is modulated by additional regulatory factors. The actin-filament linked regulatory mechanism depends mainly on caldesmon, the protein which inhibits actomyosin activity and functions in concert with calcium-binding protein and/or phosphorylation. The role of cytoskeletal filaments, namely actin-based cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules, in induction and maintenance of contraction is also discussed.

LITERATURA

- ALBRECHT K., SCHNEIDER A., LIEBETRAU C., RÜEGG J. C., PFITZER G., 1997. Exogenous caldesmon promotes relaxation of guinea-pig skinned taenia coli smooth muscles: inhibition of COOPERATIVE reattachment of latch bridges? *Pflügers Arch.* 434, 534–542.
- AMANO M., ITO M., KIMURA K., FUKATA Y., CHIHARA K., NAKANO T., MATSUURA Y., KAIBUCHI K., 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246–20249.
- BABU G. J., DAVID M., WARSHAW D. M., PERIASAMY M., 2000. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc. Res. Tech.* 50, 532–540.
- BARANY K., POLYAK E., BARANY M., 1992. Involvement of calponin and caldesmon in sustained contraction of arterial smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 847–852.
- BATTISTELLA-PATTERSON A. S., WANG S., WRIGHT G. L., 1997. Effect of disruption of the cytoskeleton on smooth muscle contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1287–1299.
- BENNETT J. P., CROSS R. A., KENDRICK-JONES J., WEEDS A. G., 1988. Spatial pattern of myosin phosphorylation in contracting smooth muscle cells: evidence for contractile zones. *J. Cell Biol.* 107, 2623–2629.
- BERGER C. E. M., FAGNANT P. M., HEIZMANN S., TRYBUS K. M., GEEVES, M. A., 2001. ADP binding induces an asymmetry between the heads of unphosphorylated myosin. *J. Biol. Chem.* 276, 23240–23245.
- BOND M., SOMLYO A. V., 1982. Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscles. *J. Cell Biol.* 95, 403–413.
- CHACKO S., JACOB S. S., HORIUCHI K. Y., 1994. Myosin I from mammalian smooth muscle is regulated by caldesmon-calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269, 15803–15807.
- CHALOVICH J. M., SEN A., RESETAR A., LINWEBER B., FRIEDERICKSEN S., LU F., CHEN Y.-D., 1998. Caldesmon: binding to actin and myosin and effects on elementary steps in ATPase cycle. *Acta Physiol. Scand.* 164, 427–435.
- CHITALEY K., WEBB R. C., 2001. Microtubule depolymerization facilitates contraction of vascular smooth muscle via increased activation of RhoA/Rho-kinase. *Med. Hypotheses* 56, 381–385.
- CREMO C. R., SELLERS J. R., FACEMYER K. C., 1995. Two heads are required for phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 270, 2171–2175.
- DAVIS M. J., HILL M. A., 1999. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 79, 387–423.
- DAVIS M. J., WU X., NURKIEWICZ T. R., KAWASAKI J., DAVIS G. E., HILL M. A., MEININGER G. A., 2001. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H1427–H1433.
- DĄBROWSKA R., 1994. Actin and thin-filaments associated proteins in smooth muscle [W:] REABURN D., GIEMBYCZ, M. A. (red.), *Airways Smooth Muscle: Biochemical Control of Contraction and Relaxation*. Birkhäuser Verlag Basel, str. 31–59.
- DISANTO M. E., COX R. H., WANG Z., CHACKO S., 1997. NH₂-terminal-inserted myosin II heavy chain is expressed in smooth muscle of small muscular arteries. *Am. J. Physiol.* 272, C-182–C1542.
- DRAEGER A., STELZER E. H., HERZOG M., SMALL J. V., 1989. Unique geometry of actin-membrane anchorage sites in avian gizzard smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* 94, 703–711.
- DRAEGER A., AMOS W. B., IKEBE M., SMALL J. V., 1990. The cytoskeletal and contractile apparatus of smooth muscle: Contraction bands and segmentation of the contractile elements. *J. Cell Biol.* 111, 2463–2473.
- EDDINGER T. J., MEER D. P., 1997. Myosin isoform heterogeneity in single smooth muscle cells. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 117, 29–38.
- EDDINGER T. J., MURPHY R. A., 1991. Developmental changes in actin and myosin heavy chain isoform expression in smooth muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 232–237.
- FACEMYER C., BROZOVICH F. V., JIN J. P., 2000. The maximal velocity of vascular smooth muscle shortening is independent of the expression of calponin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 367–373.
- FRASER I. D., COPELAND O., BING W., MARSTON S. B., 1997. The inhibitory complex of smooth muscle caldesmon with actin and tropomyosin involves three interacting segments of the C-terminal domain 4. *Biochemistry* 36, 5483–5492.
- FUJII T., KOIZUMI Y., 1999. Identification of the binding region of basic calponin on alpha and beta tubulins. *J. Biochem.* 125, 869–875.
- FUJII T., HIROMORI T., HAMAMOTO M., SUZUKI T., 1997. Interaction of chicken gizzard smooth muscle calponin with brain microtubules. *J. Biochem.* 122, 344–351.
- FUJII T., TAKAGI H., ARIMOTO M., OOTANI H., UEEDA T., 2000. Bundle formation of smooth muscle desmin intermediate filaments by calponin and its binding site on the desmin molecule. *J. Biochem.* 127, 457–465.
- FULTZ M. E., LI C., GENG W., WRIGHT G. L., 2000. Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 775–787.
- FÜRST D. O., CROSS R. A., DE MEY J., SMALL J. V., 1986. Caldesmon is an elongated, flexible molecule localized in the actomyosin domains of smooth muscle. *EMBO J.* 5, 251–257.
- GAO Y., PATCHELL V. B., HUBER P. A., COPELAND O., EL-MEZGUELDI M., FATTOM A., CALAS B., THORSTED P. B., MARSTON S. B., LEVINE B. A., 1999. The interface between caldesmon domain 4b and subdomain 1 of actin studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 38, 15459–15469.
- GAYLINN B. D., EDDINGER T. J., MARTINO P. A., MONICAL P. L., HUNT D. F., MURPHY R. A., 1989. Expression of nonmuscle myosin heavy and light chains in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 257, C997–C1004.
- GERTHOFFER W. T., GUNST S. J., 2001. Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, 963–972.
- GUILFORD W. H., WARSHAW D. M., 1998. The molecular mechanics of smooth muscle myosin. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 119, 451–458.
- GUILFORD W. H., DUPUIS D. E., KENNEDY G., WU J., PATLAK J. B., WARSHAW D. M., 1997. Smooth and skeletal muscle myosins produce similar unitary forces and displacements in the laser trap. *Biophys. J.* 72, 1006–1021.
- GUNST S. J., TANG D. D., 2000. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* 15, 600–616.
- HAEBERLE J. R., 1994. Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in an in vitro motility assay. *J. Biol. Chem.* 269, 12424–12431.
- HAI C. M., 2000. Mechanosensitive modulation of receptor-mediated crossbridge activation and cytoskeletal organ-

- ization in airway smooth muscle. *Arch. Pharm. Res.* 23, 535-547.
- HAI C. M., MURPHY R. A., 1988. *Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle.* *Am. J. Physiol.* 254, C99-C106.
- HAMAGUCHI T., ITO M., FENG J., SEKO T., KOYAMA M., MACHIDA H., TAKASE K., AMANO M., KAIBUCHI K., HARTSHORNE D. J., NAKANO T., 2000. *Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 825-830.
- HERRING B. P., SMITH A. F., 1996. *Telokin expression is mediated by a smooth muscle specific promoter.* *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 270, C1656-C1665.
- HODGKINSON J. L., 2000. *Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective.* *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 115-30.
- IKEBE M., REARDON S., 1988. *Binding of caldesmon to smooth muscle myosin.* *J. Biol. Chem.* 263, 3055-3058.
- IKEBE M., REARDON S., MITANI Y., KAMISOYAMA H., MATSUURA M., IKEBE R., 1994. *Involvement of the C-terminal residues of the 20,000-dalton light chain of myosin on the regulation of smooth muscle actomyosin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9096-9100.
- ITO M., DĄBROWSKA R., GUERIERO V. J. R., HARTSHORNE D. J., 1989. *Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase.* *J. Biol. Chem.* 264, 13971-13974.
- JONES K. A., PERKINS W. J., LORENZ R. R., PRAKASH Y. S., SIECK G. C., WARNER D. O., 1999. *F-actin stabilization increases tension cost during contraction of permeabilized airway smooth muscle in dogs.* *J. Physiol.* 519, 527-538.
- KANEKO T., AMANO M., MAEDA A., GOTO H., TAKAHASHI K., ITO M., KAIBUCHI K., 2000. *Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 110-116.
- KARGACIN G. J., COOKE P. H., ABRAMSON S. B., FAY F. S., 1989. *Periodic organization of the contractile apparatus in smooth muscle revealed by the motion of dense bodies in single cells.* *J. Cell* 108, 1465-1475.
- KIMURA K., ITO M., AMANO M., CHIHARA K., FUKATA Y., NAKAFUKU M., YAMAMORI B., FENG J., NAKANO T., OKAWA K., IWAMATSU A., KAIBUCHI K., 1996. *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).* *Science* 273, 245-248.
- KOLAKOWSKI J., MAKUCH R., STEPKOWSKI D., DĄBROWSKA R., 1995. *Interaction of calponin with actin and its functional implications.* *Biochem. J.* 306, 199-204.
- KOLAKOWSKI J., KARKUCIŃSKA A., DĄBROWSKA R., 1997. *Calponin inhibits actin-activated MgATPase of myosin subfragment 1 (S1) without displacing S1 from its binding site on actin.* *Eur. J. Biochem.* 243, 624-629.
- KOYAMA M., ITO M., FENG J., SEKO T., SHIRAKI K., TAKASE K., HARTSHORNE D. J., NAKANO T., 2000. *Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase.* *FEBS Lett.* 475, 197-200.
- KÖLLIKER, A., 1849. *Beiträge zur Kenntnis der glatten Muskeln.* *Zeitschr. F. Wiss. Zool.* 1, 48-87.
- LACOLLEY P., CHALLANDE P., BOUMAZA S., COHUET G., LAURENT S., BOUTOUYRIE P., GRIMAUD J. A., PAULIN D., LAMAZIERE J. M., LI Z., 2001. *Mechanical properties and structure of carotid arteries in mice lacking desmin.* *Cardiovasc. Res.* 51, 178-187.
- LEE Y.-H., GALLANT C., GUO H., LI Y., WANG C.-L. A., MORGAN K. G., 2000. *Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon.* *J. Biol. Chem.* 275, 3213-3220.
- LEHMAN W., 1991. *Calponin and the composition of smooth muscle thin filaments.* *J. Muscle Res. Cell Motil.* 12, 221-224.
- LEHMAN W., VIBERT P., CRAIG R., 1997. *Visualization of caldesmon on smooth muscle thin filaments.* *J. Mol. Biol.* 274, 310-317.
- LEINWEBER B., TANG J. X., STAFFORD W. F., CHALOVICH J. M., 1999. *Calponin interaction with alpha-actinin-actin: evidence for a structural role for calponin.* *Biophys. J.* 77, 3208-3217.
- LEITE R., WEBB R. C., 1998. *Microtubule disruption potentiates phenylephrine-induced vasoconstriction in rat mesenteric arterial bed.* *Eur. J. Pharmacol.* 351, R1-R3.
- LI L., ETO M., LEE M. R., MORITA F., YAZAWA M., KITAZAWA T., 1998. *Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle.* *J. Physiol.* 508, 871-881.
- LOUFRANI L., MATROUGUI K., LI Z., LEVY B. I., LACOLLEY P., PAULIN D., HENRIEN D., 2001. *Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin.* *FASEB J.*, w druku.
- LOUKIANOV E., LOUKIANOVA T., PERIASAMY M., 1997. *Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle.* *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 117, 13-18.
- MABUCHI K., LI Y., TAO T., WANG C. L., 1996. *Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle.* *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17, 243-260.
- MABUCHI K., LI B., IP W., TAO T., 1997. *Association of calponin with desmin intermediate filaments.* *J. Biol. Chem.* 272, 22662-22666.
- MAKUCH R., BIRUKOV K., SHIRINSKY V., DĄBROWSKA R., 1991. *Functional interrelationship between calponin and caldesmon.* *Biochem. J.* 15, 33-38.
- MALMQUIST U., ARNER A., 1991. *Correlation between isoform composition of the 17 kDa myosin light chain and maximal shortening velocity in smooth muscle.* *Pflügers Arch.* 418, 523-530.
- MALMQUIST U., ARNER A., MAKUCH R., DĄBROWSKA R., 1996. *The effects of caldesmon extraction on mechanical properties of skinned smooth muscle fibre preparations.* *Pflügers Arch.* 432, 241-247.
- MALMQUIST U., TRYBUS K. M., YAGI S., CARMICHAEL J., FAY F. S., 1997. *Slow cycling of unphosphorylated myosin is inhibited by calponin, thus keeping smooth muscle relaxed.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7655-7660.
- MARSTON S. B., 1989. *What is latch? New ideas about tonic contraction in smooth muscle.* *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10, 97-100.
- MARSTON S. B., REDWOOD C. S., 1993. *The essential role of tropomyosin in cooperative regulation of smooth muscle thin filament activity by caldesmon.* *J. Biol. Chem.* 268, 12317-12320.
- MARSTON S. B., BURTON B., COPELAND O., FRASER I., GAO Y., HODGKINSON J., HUBER P., LEVINE B., EL-MEZGUELDI M., NOTARIANNI G., 1998. *Structural interactions between actin, tropomyosin, caldesmon and calcium binding protein and the regulation of smooth muscle thin filaments.* *Acta Physiol. Scand.* 164, 401-414.
- MATTHEW J. D., KHROMOV A. S., TRYBUS K. M., SOMLYO A. V., 1998. *Myosin essential light chain isoforms modulate the velocity of shortening propelled by nonphosphorylated cross-bridges.* *J. Biol. Chem.* 273, 31289-31296.
- MATTHEW J. D., KHROMOV A. S., MCDUFFIE M. J., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., TANIGUCHI S., TAKAHASHI K., 2000. *Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse.* *J. Physiol.* 529, 811-824.
- MORACZEWSKA J., 2001. *Tropomiozyna — białko regulatorowe filamentów aktynowych.* *Kosmos* 50, 263-270.
- MORANO I., 1992. *Molecular biology of smooth muscle.* *J. Hypertens.* 10, 411-416.
- MORANO I., CHAI G.-X., BALTAS L. G., LAMOUNIER-ZEPTEP V., LUTSCH G., KOTT M., HAASE H., BADER M., 2000. *Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin.* *Nature Cell Biol.* 2, 371-375.

- MORGAN K. G., GANGOPADHYAY S. S., 2001. *Cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins*. J. Appl. Physiol. 91, 953–962.
- NORTH A. J., GIMONA M., CROSS R. A., SMALL J. V., 1994a. *Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells*. J. Cell Sci. 107, 437–44.
- NORTH A. J., GIMONA M., LANDO Z., SMALL J. V., 1994b. *Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells*. J. Cell Sci. 107, 445–455.
- NOTARIANNI G., GUSEV N., LAFITTE D., HILL T. J., COOPER H. S., DERRICK P. J., MARSTON S. B., 2000. *A novel Ca²⁺ binding protein associated with caldesmon in Ca²⁺-regulated smooth muscle thin filaments: evidence for a structurally altered form of calmodulin*. J. Muscle Res. Cell Motil. 21, 537–549.
- OSBORN M., CASELITZ J., WEBER K., 1981. *Heterogeneity of intermediate filament expression in vascular smooth muscle: a gradient in desmin positive cells from the rat aortic arch to the level of the arteria iliaca communis*. Differentiation 20, 196–202.
- PAUL R. J., BOWMAN P. S., KOLODNEY M. S., 2000. *Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and [Ca²⁺]_i in porcine coronary arteries*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279, H2493–H2501.
- PFITZER G., 2001. *Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle*. J. Appl. Physiol. 91, 497–508.
- PFITZER G., ZEUGNER C., TROSCHEK M., CHALOVICH J. M., 1993. *Caldesmon and a 20-kDa actin-binding fragment of caldesmon inhibit tension development in skinned gizzard muscle fiber bundles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5904–5908.
- PIERZCHALSKA M., 1993. *Pęseta optyczna — nowe narzędzie do badania systemów ruchowych komórek*. Post. Biol. Kom. 20 (Supl. 2), 17–22.
- PLATTS S. H., FALCONE J. C., HOLTON W. T., HILL M. A., MEININGER G. A., 1999. *Alteration of microtubule polymerization modulates arteriolar vasomotor tone*. Am. J. Physiol. 277, H100–H106.
- ROKOLYA A., WALSH M. P., SINGER H. A., MORELAND R. S., 1998. *Protein kinase C-catalyzed calponin phosphorylation in swine carotid arterial homogenate*. J. Cell Physiol. 176, 545–552.
- SEN A., CHEN Y. D., YAN B., CHALOVICH J. M., 2001. *Caldesmon reduces the apparent rate of binding of myosin S1 to actin-tropomyosin*. Biochemistry 40, 5757–5764.
- SEOW C. Y., FREDBERG J. J., 2001. *Historical perspective on airway smooth muscle: the saga of a frustrated cell*. J. Appl. Physiol. 91, 938–952.
- SHERIDAN B. C., MCINTYRE R. C. JR., MELDRUM D. R., CLEVELAND J. C. JR., AGRAFOJO J., BANERJEE A., HARKEN A. H., FULLERTON D. A., 1996. *Microtubules regulate pulmonary vascular smooth muscle contraction*. J. Surg. Res. 62, 284–287.
- SJUVE R., ARNER A., LI Z., MIES B., PAULIN D., SCHMITTNER M., SMALL J. V., 1998. *Mechanical alterations in smooth muscle from mice lacking desmin*. J. Muscle Res. Cell Motil. 19, 415–429.
- SMALL J. V., 1995. *Structure-function relationships in smooth muscle: the missing links*. Bioessays 17, 785–792.
- SMALL J. V., FÜRST D. O., DE MEY J., 1986. *Localization of filamin in smooth muscle*. J. Cell Biol. 102, 210–220.
- SMALL J. V., HERZOG M., BATRH M., DRAEGER, A., 1990. *Supercontracted state of vertebrate smooth muscle cell fragments reveals myofilament lengths*. J. Cell Biol. 111, 2451–2461.
- SOMLYO A. P., 1993. *Myosin isoforms in smooth muscle: How may they affect function and structure?* J. Muscle Res. Cell Motil. 14, 557–563.
- SWEENEY H. L., YANG Z., ZHI G., STULL J. T., TRYBUS K. M., 1994. *Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1490–1494.
- TAGGART M. J., MARSTON S. B., 1988. *The effects of vascular smooth muscle caldesmon on force production by „desensitized” skeletal muscle fibres*. FEBS Lett. 242, 171–174.
- TAKAHASHI K., YOSHIMOTO R., FUCHIBE K., FUJISHIGE A., MITSUISAITO M., HORI M., OZAKI H., YAMAMURA H., AWATA N., TANIGUCHI S., KATSUKI M., TSUCHIYA T., KARAKI H., 2000. *Regulation of shortening velocity by calponin in intact contracting smooth muscles*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150–157.
- TANIGUCHI S., TAKEOKA M., EHARA T., HASHIMOTO S., SHIBUKI H., YOSHIMURA N., SHIGEMATSU H., TAKAHASHI K., KATSUKI M., 2001. *Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deficient mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells*. Cancer Res. 61, 7627–7634.
- TRYBUS K. M., 1991. *Regulation of smooth muscle myosin*. Cell Motil. Cytoskel. 18, 81–85.
- TRYBUS K. M., CHATMAN T. A., 1993. *Chimeric regulatory light chains as probes of smooth muscle myosin function*. J. Biol. Chem. 268, 4412–4419.
- TRYBUS K. M., NARODITSKAYA V., SEENEY H. L., 1998. *The light chain-binding domain of the smooth muscle myosin heavy chain is not the only determinant of regulation*. J. Biol. Chem. 273, 18423–18428.
- TSUKITA S., TSUKITA S., ISHIKAWA H., 1983. *Association of actin and 10 nm filaments with the dense body in smooth muscle cells of the chicken gizzard*. Cell Tissue Res. 229, 233–242.
- VANBUREN P., WORK S. S., WARSHAW D. M., 1994. *Enhanced force generation by smooth muscle myosin in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 202–205.
- VOROTNIKOV A. V., MARSTON S. B., HUBER P. A. J., 1997. *Location and functional characterization of myosin contact sites in smooth muscle caldesmon*. Biochem. J. 328, 211–218.
- WALSH M. P., SUTHERLAND C., 1989. *A model for caldesmon in latch-bridge formation in smooth muscle*. Adv. Exp. Med. Biol. 255, 337–346.
- WALKER L. A., MACDONALD J. A., LIU X., NAKAMOTO R. K., HAYSTEAD T. A., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., 2001. *Site-specific phosphorylation and point mutations of telokin modulate its Ca²⁺-desensitizing effect in smooth muscle*. J. Biol. Chem. 276, 24519–24524.
- WANG P., GUSEV N. B., 1996. *Interaction of smooth muscle calponin and desmin*. FEBS Lett. 392, 255–258.
- WANG Z., JIANG H., YANG Z. Q., CHACKO S., 1997. *Both N-terminal myosin-binding and C-terminal actin-binding sites on smooth muscle caldesmon are required for caldesmon-mediated inhibition of actin filament velocity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11899–11904.
- WARSHAW, D. M., DESROSIERS J. M., WORK S. S., TRYBUS K. M., 1990. *Smooth muscle myosin cross-bridge interactions modulate actin filament sliding velocity in vitro*. J. Cell Biol. 111, 453–463.
- WENDT T., TAYLOR D., MESSIER T., TRYBUS K. M., TAYLOR K. A., 1999. *Visualization of head-head interactions in the inhibited state of smooth muscle myosin*. J. Cell Biol. 147, 1385–1389.
- WENDT T., TAYLOR D., TRYBUS K. M., TAYLOR K., 2001. *Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4361–4366.
- WHITE S. L., ZHOU M. Y., LOW R. B., PERIASAMY M., 1998. *Myosin heavy chain isoform expression in rat smooth muscle development*. Am. J. Physiol. 275, C581–C589.

- WINDER S. J., ALLEN B. G., CLEMENT-CHOMIENNE O., WALSH M. P., 1998. *Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin*. *Acta Physiol. Scand.* 164, 415–426.
- WU X., HAYSTEAD T. A., NAKAMOTO R. K., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., 1998. *Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase*. *J. Biol. Chem.* 273, 11362–11369.
- YOSHIMOTO R., HORI M., TAKAHASHI K., TANIGUCHI S. I., KATSUKI M., OZAKI H., KARAKI H., 2000. *Ca²⁺-sensitization of contraction in the h1 calponin-deficient smooth muscle*. *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 474–475.
- YOUNT R. G., LAWSON D., RAYMENT I., 1995. *Is myosin a „back door” enzyme?* *Biophys. J.* 68, 44s–49s.
- YUASA U., MINO T., NAKA M., YADA I., TANAKA T., 1999. *Regulatory mechanisms of calponin phosphorylation in endothelin-1-induced contraction of porcine coronary artery*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1281–1287.
- ZHANG D., JIN N., RHOADES R. A., YANCEY K. W., SWARTZ D. R., 2000. *Influence of microtubules on vascular smooth muscle contraction*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 293–300.
- ZHANG D., WANG Z., JIN N., LI L., RHOADES R. A., YANCEY K. W., SWARTZ D. R., 2001. *Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 193–200.