

MARIA JOLANTA RĘDOWICZ

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: jolanta@nencki.gov.pl

MIOZYNY NIEKONWENCJONALNE — BUDOWA A POTENCJALNE FUNKCJE W KOMÓRCIE

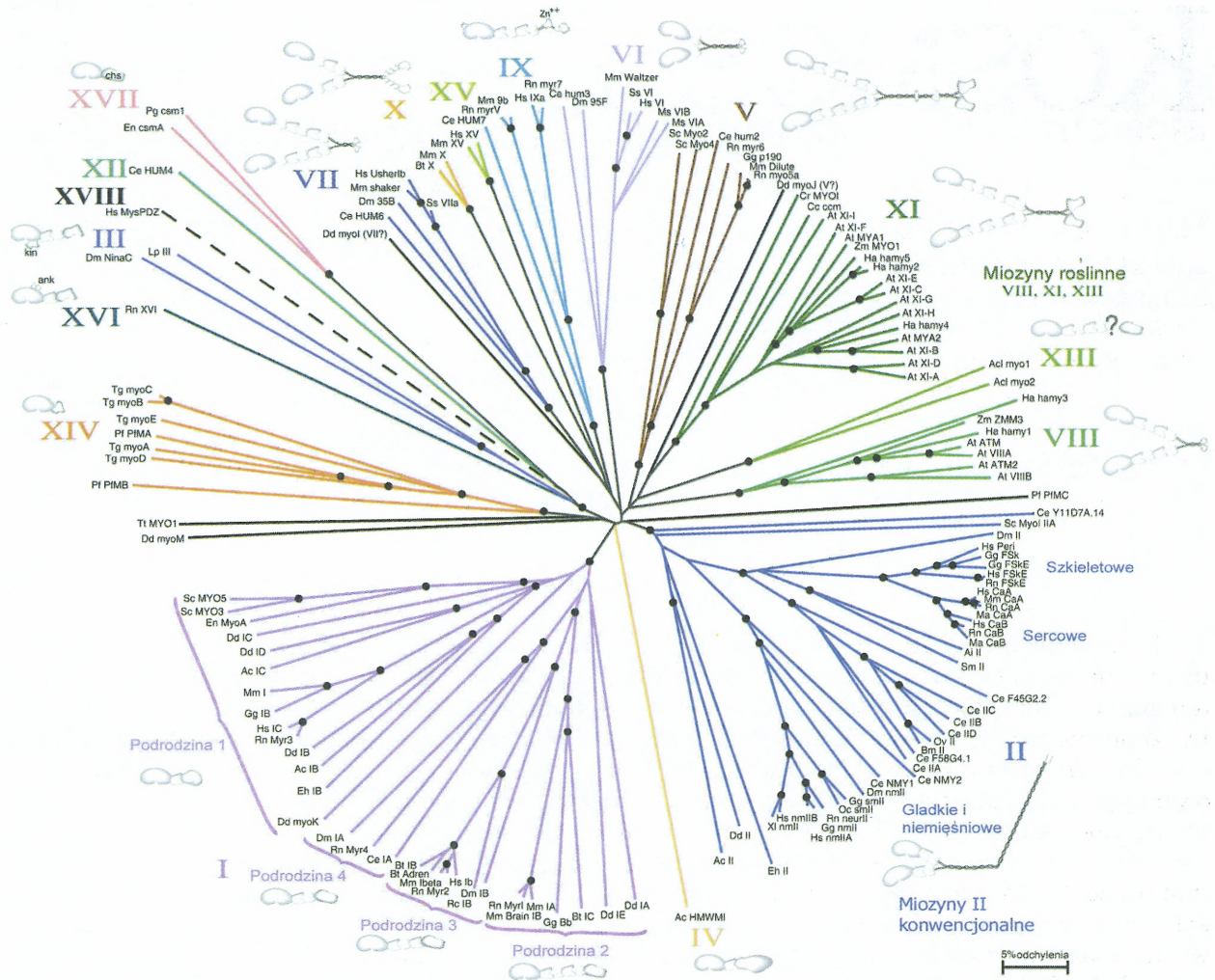
WSTĘP

Znalezienie blisko 30 lat temu przez Pollarda i Korna w małej, słodkowodnej, wolnożyjącej amebie *Acanthamoeba castellanii* nowej miozyny, znacznie różniącej się od znanych wówczas tylko izoform mięśniowych, zapoczątkowało nowy etap w badaniach nad białkami motorycznymi (POLLARD i KORN 1973). Rozwój metod biologii molekularnej oraz technik biochemicznych i immunologicznych przyczynił się do poznania i scharakteryzowania sekwencji aminokwasowych ponad 150 izoform miozyny (BERG i współaut. 2001). Różnice w sekwencji aminokwasowej domeny motorycznej stały się podstawą klasyfikacji izoform miozyny. Nadrodzina miozyn składa się obecnie z co najmniej 18 rodzin (BERG i współaut. 2001) (Ryc. 1).

Ta nowa miozyna, traktowana początkowo jako *curiosum* obecne tylko w amebach i nazwana przez jej odkrywców (jak się potem okazało, słusznie) miozyną I (patrz: BRZESKA 2001), uważana jest obecnie za protoplastę miozyn niekonwencjonalnych. Z kolei miozyny mięśniowe i podobne do nich strukturalnie miozyny pochodzące z komórek niemięśniowych noszą miano miozyn konwencjonalnych i tworzą rodzinę II. Dotychczas tylko kilkanaście miozyn niekonwencjonalnych udało się wyizolować z komórek i zbadać metodami biochemicznymi. Są to przedstawiciele rodziny I, stanowiącej najbardziej różnorodną i najlepiej scharakteryzowaną rodzinę miozyn niekonwencjonalnych, oraz rodziny V i IX. Informacje o pozostałych rodzinach, poza danymi uzyskanymi wyłącznie przez analizę ich sekwencji aminokwasowych, pochodzą z badań wykorzystujących rekombinowane fragmenty miozyn i przeciwciała skierowane

przeciw określonym rejonom cząsteczki oraz z doświadczeń, w których inaktywowano w komórkach gen danej miozyny (patrz: SELLERS 1999, SOKAC i BEMENT 2000). Niektórzy badacze zastanawiają się więc, czy dawnej definicji miozyny jako białka zdolnego do wiązania aktyny i hydrolizowania ATP nie należałoby zastąpić taką, iż jest to białko zawierające sekwencje podobne do sekwencji występujących w domenie motorycznej miozyn mięśniowych.

Miozyny niekonwencjonalne są obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, od ameb i roślin po ssaki. Podczas gdy u drożdży zidentyfikowano 5 genów kodujących izoformy miozyny będące przedstawicielami 3 rodzin, to u człowieka znaleziono 40 genów kodujących miozyny należące do 12 rodzin (I, II, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI, XVIII oraz nowej, nie scharakteryzowanej jeszcze rodziny). Tak duża liczba różnorodnych izoform miozyny implikuje zróżnicowanie funkcji, jakie miozyny mogą pełnić w danym organizmie/komórce (Ryc. 2). Wiadomo, że niektóre miozyny niekonwencjonalne uczestniczą w procesach transportu wewnątrzkomórkowego (zademonstrowano to dla izoform miozyny I, V, VI i VII). Miozyny I biorą udział w lokomocji komórek, miozyna III jest istotna w procesie widzenia, zaś miozyny VI, VII i XV uczestniczą w procesie słyszenia. Wydaje się więc, że podczas ewolucji coraz większa złożoność organizmów powodowała ewoluowanie miozyn, które, aby sprostać nowym zadaniom, stawały się coraz bardziej zróżnicowane. Próbie wyjaśnienia, w jaki sposób struktura cząsteczki miozyny może determinować jej funkcje *in vivo* poświęcony jest niniejszy artykuł.



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne poznanych dotychczas izoform miozyny (wg HODGE'A i COPE'A 2000).

●, punkt węzłowy; --, sekwencja częściowa; —, przynależność do rodziny niepewna. Skróty: Ac — *Acanthamoeba castellanii*, Acl — *Acetabularia cliftonii*, Ai — *Aequipecten irradians*, At — *Arabidopsis thaliana*, Brn — *Brugia malayi*, Bt — *Bos taurus*, Cc — *Chara corallina*, Ce — *Caenorhabditis elegans*, Cr — *Chlamydomonas reinhardtii*, Dd — *Dictyostelium discoideum*, Dm — *Drosophila melanogaster*, En — *Emiricella nidulans* (*Aspergillus*), Eh — *Entamoeba histolytica*, Gg — *Gallus gallus*, Ha — *Helianthus annuus*, Hs — *Homo sapiens*, Lp — *Limulus polyphemus*, Ma — *Mesocricetus auratus*, Mm — *Mus musculus*, Ms — *Morone saxatilis*, Oc — *Oryctolagus cuniculus*, Ov — *Onchocerca volvulus*, Pf — *Plasmodium falciparum*, Pg — *Pyricularia grisea*, Rc — *Rana catesbeiana*, Rn — *Rattus norvegicus*, Sc — *Saccharomyces cerevisiae*, Sm — *Schistosoma mansoni*, Ss — *Sus scrota domestica*, Tg — *Toxoplasma gondii*, Tt — *Tetrahymena thermophila*, Xl — *Xenopus laevis*, Zm — *Zea mays*. Adren — rdzeń nadnerczy krwi (miozyna I), Ank — sekwencje podobne do ankyryny, Bb — miozyna I z mikroskopków jelitowych, CaA — łańcuch ciężki miozyny sercowej typu α (myosin II), CaB — łańcuch ciężki miozyny sercowej typu β , Chs — syntaza chitynowa typu V, Csm — miozyna zawierająca syntazę chitynową, FSk — miozyna z szybkich mięśni szkieletowych, FskE — miozyna II embrjonalna, HMWMI — miozyna IV, Kin — domena kinazowa, Neur — miozyna neuronalna, Nm — miozyna II mięśniowa, PDZ — miozyna zawierająca domenę PDZ, Peri — miozyna okołoporodowa, Sm — miozyna z mięśni gładkich.

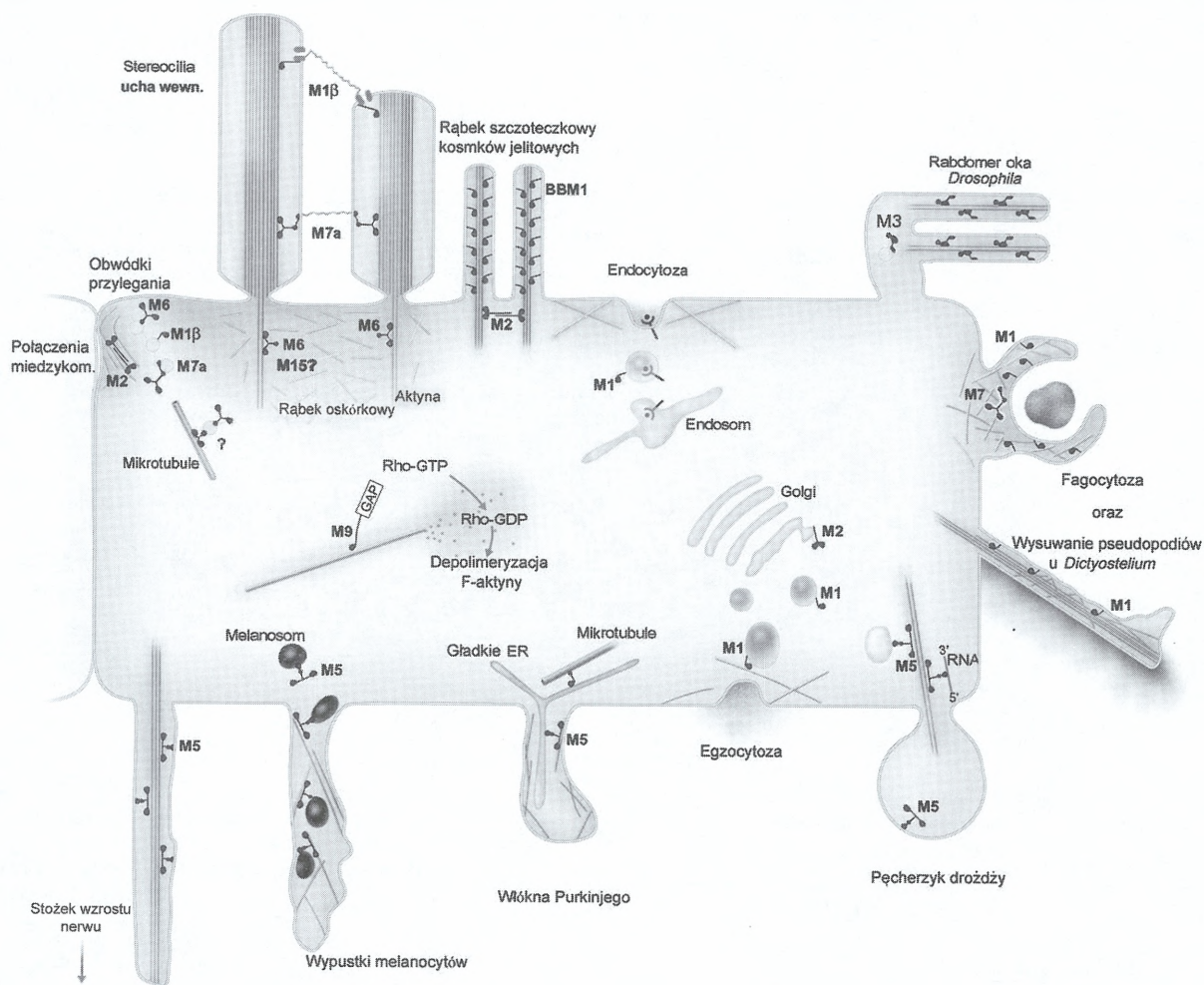
BUDOWA CZĄSTECZKI MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH

Cząsteczka miozyn niekonwencjonalnych składa się, podobnie jak cząsteczka miozyn mięśniowych, z dwóch zasadniczych składowych — łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego (Ryc. 1, Tabela 1). W łańcuchu ciężkim, którego masa cząsteczkowa wynosi, w zależności od izoformy, od ok. 93 kDa (miozyna XIV) aż do ok.

365 kDa (miozyna XV), można wyróżnić trzy zasadnicze domeny (SELLERS 1999, BERG i współaut. 2001). Są to: domena motoryczna, będąca najbardziej konserwatywną częścią wszystkich izoform miozyny; domena zawierająca motywy IQ, stanowiąca miejsce wiązania łańcuchów lekkich, zwana również szyjką (do-

mena motoryczna i szyjka tworzą główkę miozyny); domena C-końcowa, najbardziej zróżnicowana część cząsteczki, zwana pałeczką. W pałeczkach miozyn niekonwencjonalnych, poza obecnością w wielu z nich typowej dla miozyn mięśniowych sekwencji umożliwiającej tworzenie superhelisy (ang. coiled-coil), zidentyfikowano szereg motywów/domen, które albo są

zyci N-końcowej, jeszcze przed domeną motoryczną, unikalne, specyficzne tylko dla danej izoformy sekwencje. Na przykład miozyna III zawiera domenę kinazy podobnej do kinaz STE (aktywowanych przez białka z rodziny Rho — patrz: FABCZAK 2001), miozyna XV posiada olbrzymią domenę (m. cz. ok. 140 kDa), która nie wykazuje homologii do dotychczas poznanych



Ryc. 2. Schemat przedstawiający funkcje pełnione przez miozyny niekonwencjonalne w wymaginowanej „omnipotentnej” komórce (wg MERMALL i współaut. 1998, za zgodą The American Association for the Advancement of Science).

charakterystyczne tylko dla miozyny (np. ang. myosin tail homology MyTH1), albo występują również i w innych białkach, jak np. domeny homologiczne do plekstriny — domeny PH - (ang. pleckstrin homology domain), domeny SH3 (ang. Src homology domain 3), domeny homologiczne do taliny, domena RhoGAP czy też domena syntazy chitynowej (Tabela 1). Interesujące jest, iż analiza sekwencji aminokwasowych szyjki i pałeczki doprowadziła do niemal identycznej klasyfikacji miozyn, jaką uzyskano w wyniku analizy sekwencji domeny motorycznej poznanych dotychczas izoform miozyny (KORN 2000). Niektóre miozyny zawierają w po-

białek, zaś w miozynie XVI zidentyfikowano sekwencje homologiczne do ankiryny, białka cytoszkieletu podbłonowego.

Łańcuchami lekkimi są albo łańcuchy specyficzne dla danej izoformy miozyny albo, najczęściej, cząsteczki kalmoduliny. W przeciwieństwie do innych białek wiążących kalmodulinę, wiązanie kalmoduliny z łańcuchami ciężkimi miozyny zachodzi również w nieobecności jonów wapnia. Uważa się, że liczba motywów IQ w szyjce miozyny jest równoznaczna z liczbą wiązanych łańcuchów lekkich. Poza miozyną XIV z *Toxoplasma gondii*, w sekwencji której nie stwierdzono obecności motywu IQ, łańcuchy

Tabela 1. Charakterystyka miozyn niekonwencjonalnych

Rodzina miozyn	M. cz. ciężkiego łańcucha (kDa)	Ilość motywów IQ/ilość łańcuchów lekkich	Dodatkowe sekwencje w końcu N łańcucha ciężkiego	Charakterystyczne sekwencje w pałeczce
Miozyny I —podrodzina 1 (ameboidalne) —podrodzina 2 —podrodzina 3 —podrodzina 4	110–140	1–6 1 3–6 3 2 (trzecia cz. kalmoduliny w pałeczce)	brak; domena motoryczna we wszystkich podrodzinach pozbawiona jest ok. 80 N-końcowych reszt aminokwasowych	MyTH1, MyTH2 SH3 MyTH1 MyTH1 MyTH1
Miozyny III	122–186	2	Domena kinazowa, podobna do kinaz PAK	sekwencje niespecyficzne
Miozyna* IV	ok. 175	1	brak	MyTH4, SH3
Miozyny V	ok. 212 (dimer)	6/2x6 (4 cz. kalmoduliny i 2 łańcuchy miozyny mięśniowej (17, 25 kDa)	brak	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy, domeny <i>canoe</i> /AF6 i globularna
Miozyny VI	140–160 (dimer)	1/2x1?	brak; dodatkowe 53 reszty na pograniczu domeny motorycznej i szyjki	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy, domena globularna
Miozyny VII	ok. 250 (dimer)	5/5x2?	brak	2 domeny MyTH4, sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy, domeny homologiczne do taliny
Miozyny VIII (tylko w roślinach)	ok. 131 (dimer?)	3/3x2	brak	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy
Miozyny IX	230–300	4	ok. 150 reszt aminokwasowych, homologia do domen wiążących Ras w białku Ral	domena Rho-GAP oraz domena wiążąca jony cynku
Miozyny X	ok. 230 (dimer?)	3/3x2?	brak	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy, domena MyTH4, domena homologiczna do taliny i kilka domen PH
Miozyny XI (tylko w roślinach)	ok. 170 (dimer)	6/6x2	brak	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy
Miozyna* XII	ok. 307 (dimer)	2/2x2?	ok. 150 reszt, brak homologii do znanych białek	sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy, 2 domeny MyTH4
Miozyny XIII (tylko w roślinach)	ok. 125	7	brak	sekwencje niespecyficzne
Miozyny XIV	90–110	0	brak	brak
Miozyny XV	ok. 365	2–6	duża domena ok. 140 Da, brak homologii do znanych białek i sekwencje bogate w reszty prolinowe	domena MyTH4, domeny homologiczne do taliny oraz do domeny regulatorowej kinazy C
Miozyna* XVI	ok. 150	2	domena podobna do ankiryny	brak
Miozyny XVII	ok. 195	??	brak	domena homologiczna do syntazy chitynowej typu 5
Miozyny XVIII	ok. 200 (dimer)	1/1x2?	domena PDZ	domena homologiczna do taliny, sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy??

* — oznacza, że dotychczas został poznany tylko jeden przedstawiciel danej rodziny.

? — oznacza prawdopodobieństwo tworzenia dimerów; ?? — oznacza brak danych w literaturze; pozostałe wyjaśnienia w tekście

ciężkie miozyny zawierają od 1 do 7 takich motywów (SELLERS 1999).

Część miozyny niekonwencjonalnych występuje w postaci monomerycznej, co oznacza, że składają się one z jednego tylko łańcucha ciężkiego i pewnej liczby łańcuchów lekkich, lub w postaci dimerów, składających się z dwóch łańcuchów ciężkich i związanych z nimi łańcuchów

lekkich. Dimeryzacja następuje poprzez część pałeczki zawierającą sekwencje umożliwiające tworzenie superhelisy. Żadna z dotychczas poznanych miozyny niekonwencjonalnych nie wydaje się mieć zdolności do tworzenia filamentów, cechy charakterystycznej dla miozyny należącej do rodziny II (patrz: SELLERS 1999, SOKAC i BEMENT 2000).

STRUKTURALNE DETERMINANTY FUNKCJI MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH

Uważa się, że na wielość i różnorodność funkcji pełnionych przez miozyny niekonwencjonalne wpływa olbrzymie zróżnicowanie ich struktury. Początkowo wydawało się, że to pałeczka jest rejonem determinującym przeznaczenie danej izoformy. Jednakże coraz więcej jest doniesień wskazujących, że i inne rejony miozyny mogą decydować o funkcji tych białek.

ZRÓŻNICOWANIE DOMEN MOTORYCZNYCH MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH

Domeny motoryczne, mimo iż są najbardziej konserwatywną częścią cząsteczki miozyny, wykazują jednocześnie ogromne zróżnicowanie, które — jak już wspomniano — jest podstawą podziału poznanych sekwencji aminokwasowych miozyny na rodziny. Różnice te polegają głównie na braku w ciężkich łańcuchach miozyny niekonwencjonalnych rejonów, które występują w miozynach konwencjonalnych, a także na obecności w nich dodatkowych odcinków o różnej długości w miejscach, o których wiadomo, że są szczególnie istotne dla aktywności miozyny konwencjonalnych.

Jak się okazuje, u wszystkich dotychczas zsekwencjonowanych przedstawicieli rodziny miozyny I brak jest N-końcowego fragmentu składającego się z ok. 80 reszt aminokwasowych, obecnego w pozostałych izoformach miozyny. Miozyna ta jednak, podobnie do miozyny mięśniowych, wiąże aktynę i hydrolizuje ATP, aczkolwiek w sposób odmienny od miozyny konwencjonalnych. Okazuje się bowiem, iż w niektórych izoformach z tej rodziny na generowany przez nie „przesuw” filamentu aktynowego w trakcie hydrolizy jednej cząsteczki ATP składają się dwa kroki robocze, o długościach ok. 6 i ok. 5,5 nm (patrz: SELLERS 1999). Dla przypomnienia, krok roboczy to odległość, na jaką względem filamentu miozynowego przesuwany jest filament aktynowy w jednym cyklu wytworzenia i dysocjacji połączenia główki miozyny z aktyną. Odległość ta dla miozyny z szybkich mięśni szkieletowych królika wynosi, jak wskazuje większość badań, ok. 10 nm. Ponadto, w miejscu

odpowiadającym reszcie kwasu glutaminowego lub asparaginowego w pozycji 408 ciężkiego łańcucha miozyny z mięśni szkieletowych, znajdującego się w miejscu oddziaływania aktyny z miozyną (RAYMENT i współaut. 1993), w wielu miozynach I należących do podrodziny I (Tabela 1) występują fosforylowalne reszty serynowe lub treoninowe (patrz: literatura BRZESKA 2001, REDOWICZ 2001a). Fosforylacja tych reszt w ameboidalnych miozynach I przez kinazy należące do rodziny PAK (kinazy aktywowane przez GTPazy z rodziny Rho) powoduje aktywację tych miozyny. Również badania, w których mutowano te reszty tak, aby *in vivo* odzwierciedlały one stan konstytutywnego ufosforylowania lub zdefosforylowania miozyny, potwierdzają funkcjonalną rolę tej fosforylacji w domenie motorycznej miozyny I (patrz: BRZESKA 2001). Podobne zastąpienie występuje również w ciężkim łańcuchu miozyny VI (BEMENT i MOOSEKER 1995). W tym przypadku udało się wykazać, że obecna w tej miozynie reszta treoninowa, odpowiadająca miejscu fosforylacji w miozynach ameboidalnych, może być fosforylowana przez kinazę PAK w warunkach *in vitro* (patrz: REDOWICZ 2001a). Fosforylacja, podobnie jak w przypadku ameboidalnych izoform miozyny I, powoduje wzrost aktywności rekombinowanej główki miozyny VI (DE LA CRUZ i współaut. 2000).

Porównanie sekwencji domeny motorycznej samych tylko izoform miozyny II wykazało zróżnicowanie składu aminokwasowego w rejonach zwanych pętlą 1 (miejsce podziału trypsyną ciężkiego łańcucha główki miozyny z szybkich mięśni szkieletowych królika na fragment N-końcowy o m. cz. 25 kDa i centralny o m. cz. 50 kDa) i pętlą 2 (miejsca trawienia trypsyną ciężkiego łańcucha główki powyżej zdefiniowanej miozyny na fragment centralny o m. cz. 50 kDa i C-końcowy o m. cz. 20 kDa). Badania z zastosowaniem mutantów ze zmienionymi tylko punktowo resztami aminokwasowymi położonymi w pętlach, czy też hybryd złożonych z fragmentów różnych miozyny (patrz: SOKAC i BEMENT 2000), wykazały, że te rejony cząsteczki pełnią ważne funkcje w pracy, jaką wykonuje miozyna.

Okazuje się bowiem, że im dłuższa i bardziej giętka jest pętla 1, tym szybciej miozyna uwalnia ADP, produkt hydrolizy ATP. Z kolei ładunek elektrostatyczny w pętli 2 wydaje się mieć istotny wpływ na wiązanie miozyny z aktyną (patrz: SOKAC i BEMENT 2000).

Jeszcze większe zróżnicowanie sekwencji aminokwasowych tych rejonów występuje w miozynach niekonwencjonalnych, aczkolwiek w większości z nich pętla 1 nie przekracza długości pętli w izoformach miozyny II. Wyjątkiem jest MyoJ, przedstawiciel miozyny XI w *Dictyostelium discoideum*, zawierająca wstawkę składającą się z ok. 30 reszt aminokwasowych (HAMMER i JUNG 1996). Brak na razie doniesień dotyczących funkcjonalnego znaczenia tak długiej wstawki. W przypadku miozyn IX, w rejonie odpowiadającym pętli 2, obecna jest olbrzymia wstawka o silnie dodatnim ładunku (pI 11,6), zbudowana z ok. 150 reszt aminokwasowych (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Badania nad białkiem wyizolowanym z ludzkiego mózgu wykazały, iż jest to jeden z najwolniejszych motorów, aczkolwiek zdolny do nieprzerwanej pracy przez dużo dłuższy czas niż inne poznane dotychczas miozyny. Okazało się również, iż miozyna ta wiąże aktynę w sposób niezależny od ATP. Mimo że nie zdefiniowano dotychczas tego drugiego miejsca wiązania aktyny przypuszcza się, iż za odmienne właściwości miozyny IX odpowiedzialna jest właśnie dodatkowa wstawka w pętli 2 (POST i współaut. 1998).

Na pograniczu domeny motorycznej i szyjki miozyny VI zidentyfikowano dodatkowo 53 reszty aminokwasowe odpowiedzialne, jak sugerowano, za unikalną zdolność tej miozyny do poruszania filamentów aktynowych w przeciwnym kierunku niż inne badane dotychczas miozyny (WELLS i współaut. 1999). Jednak wyniki doświadczenia, w którym hybryda złożona z domeny motorycznej miozyny V i szyjki miozyny VI (zawierającej tę wstawkę) poruszała aktynę w kierunku ustalonym dla miozyny V, kwestionują to przypuszczenie (HOMMA i współaut. 2001).

REJON SZYJKI MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH

Istotnym zagadnieniem jest rola cząsteczek kalmoduliny związanych z łańcuchem ciężkim. Niewątpliwie jedną z ich funkcji jest, podobnie jak w przypadku lekkich łańcuchów miozyn mięśniowych, stabilizacja α -helisy ciężkiego łańcucha w rejonie szyjki miozyny (patrz art. PLISZKI w tym numerze KOSMOSU). Wykazano że, w przypadku miozyny I z kosmków jelitowych i miozyny IX, spowodowanie zaburzenia oddziaływania łańcucha ciężkiego z cząsteczka-

mi kalmoduliny obniża aktywność enzymatyczną tych miozyn oraz hamuje ich zdolność do przesuwania filamentów aktynowych w teście ruchliwości *in vitro* (WOLENSKI i współaut. 1993, POST i współaut. 1998). Badania nad miozyną III, występującą wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych oka (zarówno u owadów, jak i u człowieka), zdają się wskazywać, że miozyna ta może być odpowiedzialna za zapewnianie obecności kalmoduliny w określonych rejonach rabdomeru w oku *Drosophila* (PORTER i współaut. 1993). Podobne wyniki uzyskano dla miozyny V, której cząsteczka zawiera co najmniej 8 kalmodulin. Okazało się, że *in vitro* może ona „użyczać” swoich kalmodulinowych podjednostek kinazie zależnej od kalmoduliny, z którą, poprzez rejon pałeczki, wydaje się być związana w neuronach (COSTA i współaut. 1999). Być może i inne miozyny posiadające dużą liczbę motywów IQ (np. niektóre miozyny I, miozyna VII, miozyna XI czy też miozyna XIII) mogą pełnić podobną rolę w komórkach.

Liczba motywów IQ determinuje długość szyjki miozyny. Badania miozyny V wskazywały, że długość szyjki wpływa na sposób jej oddziaływania z aktyną i długość jej kroku roboczego. W przeciwieństwie do miozyn konwencjonalnych, ale podobnie jak kinezyny (patrz art. KASPRZAKA w tym numerze KOSMOSU), izoforma miozyny V występująca u kręgowców jest motorem procesywnym, wykonującym krok roboczy o długości ok. 36 nm (MEHTA i współaut. 1999, WALKER i współaut. 2000), czyli dłuższy niż krok miozyn konwencjonalnych (ok. 10 nm), których łańcuch ciężki zawiera dwa motywy IQ. Badając mutanty drożdży ekspresjonujących miozynę Myo2 (jedną z dwóch drożdżowych izoform miozyny V), pozbawioną całej szyjki wykazano jednak, że komórki te praktycznie nie różniły się od fenotypu dzikiego, ekspresjonującego niezmienną izoformę tej miozyny (STEVENS i DAVIS 1998). Te, oraz wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* nad mutantami miozyny V, których łańcuchy ciężkie zawierały tylko po jednym motywie IQ (TANAKA i współaut. 2001), podważają koncepcję, że długość szyjki determinuje długość kroku roboczego miozyny i wskazują że, być może za unikalne właściwości tej rodziny miozyn odpowiedzialna jest domena motoryczna.

ZRÓŻNICOWANIE PAŁECZEK MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH

Analizy sekwencji aminokwasowych pałeczek nowych miozyn wykazały obecność w ich ciężkich łańcuchach motywów/domen wskazujących na możliwość bezpośredniego oddziaływania z lipidami. Do takich z pewnością należy

MyTH1, rejon pałeczki zawierający dużą liczbę naładowanych dodatnio reszt aminokwasowych, występujący we wszystkich dotąd poznanych izoformach miozyny I. Inną domeną, znaną w pałeczkach miozyn VII, X, XV i XVIII (Tabela 1), która potencjalnie uczestniczy w wiązaniu lipidów jest domena homologiczna do taliny (ostatnio nazywana też domeną FERM ang. band four point one/ezrin/radixin/moesin), należącej do nadrodziny białek prażka 4.1. Białka te stanowią integralny składnik cytoszkieletu podbłonowego. Uważa się, że domena FERM determinuje lokalizowanie się różnych białek w błonie plazmatycznej (SOKAC i BEMENT 2000, BERG i współaut. 2001).

Coraz to nowe miozyny ujawniają obecność w ich pałeczkach motywów/domen, które wskazują na możliwość oddziaływania tych potencjalnych motorów z innymi białkami. Implikuje to zaangażowanie wielu miozyn niekonwencjonalnych w interakcję z białkami z różnych szlaków metabolicznych. Do takich domen należy z pewnością domena SH3 znaleziona, poza miozynami I i IV, w wielu białkach cytoszkieletu podbłonowego, takich jak Grb2, fosfolipaza C, kinaza tyrozynowa Src, czy też α -spektryna, które oddziałują z białkami bogatymi w reszty prolinowe (patrz: SELLERS 1999). W miozynach ameboidalnych występuje domena zwana MyTH2, która stanowi drugie, niezależne od nukleotydu, miejsce wiązania aktyny. Rejon ten jest bogaty w reszty glicynowe, prolinowe i alaninowe lub glutaminowe. Z kolei domena plekstrynowa (PH), obecna w miozynach X, występuje w wielu białkach takich jak dynamina, Sos1 i β -spektryna, uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów (BERG i współaut. 2000). Domena zwana canoe/AF6, zidentyfikowana niedawno w C-końcowej części pałeczki miozyn V (SOKAC i BEMENT 2000), występuje również w wielu białkach należących do tzw. małych GTPaz z nadrodziny Ras (patrz: FABCZAK 2001). Sugeruje to, że izoformy tej rodziny mogą uczestniczyć w regulacji szlaków związanych z tymi GTPazami. Co ciekawe, w miozynach IX znaleziono funkcjonalnie aktywną domenę Rho-GAP, obecną w białkach GAP (ang. guanine activator protein), odpowiedzialnych za aktywację rodziny Rho, również należącej do małych GTPaz (POST i współaut. 1998). Miozyny te zawierają także motywy wskazujące na zdolność wiązania jonów cynku (ang. Zn²⁺-binding domain), obecne w czynnikach transkrypcyjnych, oraz domenę homologiczną do domeny regulatorowej kinazy C (POST i współaut. 1998). Sekwencja miozyn znalezionych w grzybach i tworzących rodzinę XVII dowodzi, że jest to hybryda zawierająca, obok domeny motorycz-

nej, pałeczkę składającą się z syntazy chitynowej typu V, co wskazuje na możliwość ich transbłonowej lokalizacji (FUJIWARA i współaut. 1997). Inną ciekawą domeną jest tzw. domena MyTH4, znaleziona po raz pierwszy w miozynie IV z *Acanthamoeba castellanii* i występująca także w miozynach VII, X, XII i XV, oraz w dwóch produktach nie w pełni jeszcze scharakteryzowanych genów *Drosophila melanogaster* (HOROWITZ i HAMMER 1990, SELLERS 1999, BERG i współaut. 2001). Brak jeszcze danych o funkcjonalnej roli tej domeny. Niektóre miozyny, jak np. miozyny V i VI zawierają w końcu C swoich ciężkich łańcuchów domeny globularne, charakterystyczne tylko dla każdej z tych rodzin. Wiadomo, że z tą częścią miozyny V wiąże się łańcuch lekki (o m.c. ok. 8 kDa) dyneiny cytoplazmatycznej (ESPINDOLA i współaut. 1996); tu także może się wiązać, poprzez swoją część C-końcową, inne białko motoryczne — kinezyna (HUANG i współaut. 1999). Doniesienia te wskazują na możliwość oddziaływania ze sobą motorów współpracujących zarówno z filamentami aktynowymi, jak i z mikrotubulami (o tym szerzej w dalszej części artykułu).

DODATKOWE SEKWENCJE N-KOŃCOWE

Sugeruje się, że również dodatkowe domeny położone na końcu N ciężkiego łańcucha, jeszcze przed domeną motoryczną, obecne w miozynach III, IX, XII, XV, XVI i XVIII, mogą pełnić szczególne funkcje w komórkach. Miozyny III zawierają sekwencję podobną do domeny katalitycznej kinaz PAK, aktywowanych przez małe GTPazy z rodziny Rho (patrz: RĘDOWICZ 2001a). Badania z wykorzystaniem rekombinowanej domeny katalitycznej miozyny III z *Drosophila* wykazały, że może ona *in vitro* fosforylować lekkie łańcuchy regulatorowe miozyny z mięśni gładkich, kaldesmon, a także łańcuch ciężki jednej z izoform miozyny III. Nie wiadomo jednak, czy miozyna III pełni rolę kinazy *in vivo*, a także czy może autofosforylować się w komórkach (patrz RĘDOWICZ 2001a). Wiadomo natomiast, że domena ta jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu procesów fototransdukcji (PORTER i MONTELL 1993, LI i współaut. 1998).

W ssaczych izoformach miozyny IX występują sekwencje o długości 140–150 reszt aminokwasowych. Są one podobne do domen obecnych w białkach z rodziny Raf (nadrodzina Ras) i Ral-GEF (stymuluje aktywność GTPazową białka Ral), które to domeny wiążą białko Ras. Doświadczenia z użyciem rekombinowanych białek nie wykazały jednak, aby sekwencje obecne w miozynie IX były zdolne do wiązania Ras (CHIEREGATTI i współaut. 1998). Również w

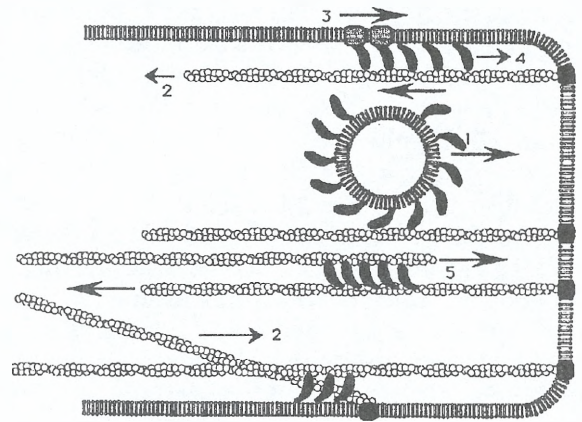
miozynie XII z *Caenorhabditis elegans* znaleziono dodatkowy odcinek składający się z ok. 150 reszt aminokwasowych, aczkolwiek nie wykazuje on homologii do znanych białek (BAKER i TRUS 1997). Także olbrzymia N-końcowa, dodatkowa domena obecna w miozynie XV nie jest podobna do innych białek (LIANG i współaut. 1999), natomiast jej wielkość (ponad 140 kDa) sugeruje, że może ona pełnić funkcjonalną rolę. W miozynie XVI zidentyfikowano sekwencje homologiczne do ankiryny, co wskazuje na możliwość jej oddziaływania z białkami cytoszkieletu podbłonowego (PATEL i współaut. 1998)). Z kolei miozyna XVIII zawiera domenę PDZ, odcinek

zbudowany z ok. 90 aminokwasów, znaleziony początkowo w białkach: PSD-95 (występuje w połączeniach synaptycznych), DlgA (prekursor rodziny kinaz guaninowych związanych z błonami w *Drosophila*) i ZO-1 (wiązący filamenty aktynowe składnik połączenia międzykomórkowych). Domenę PDZ znaleziono również w wielu białkach biorących udział w asocjacji kanałów jonowych i receptorów błonowych oraz w wiązaniu tych receptorów z enzymami efektorowymi (FURUSAWA i współaut. 2000). Dotychczas brak jest doniesień potwierdzających udział miozyny XVIII w tego rodzaju procesach.

TRANSPORTOWE FUNKCJE MIOZYN?

Transport wewnątrzkomórkowy jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek eukariotycznych, bowiem organelle, pęcherzyki lipidowe, kompleksy białkowe i kwasy nukleinowe muszą dotrzeć do miejsca ich przeznaczenia. Transport w komórkach można, w olbrzymim uproszczeniu, porównać do transportu kolejowego. Biologicznymi szynami są mikrotubule i filamenty aktynowe, zaś lokomotywą (motorem) białka uzyskujące energię z rozkładu paliwa jakim jest ATP i przetwarzające ją w ruch, a więc dyneina, kinezyrna i, jak wiadomo od ponad 10 lat, niektóre niekonwencjonalne miozyny, głównie izoformy miozyny I, V i VI. Ładunek, czyli np. organelle lub mRNA, przemocowywany jest z reguły do C-końcowej części białka motorycznego, przy czym wiązanie to zachodzi bezpośrednio lub pośrednio, poprzez inne białka lub kompleksy białkowe, nazywane też receptorami. Drugi koniec cząsteczki, głowka, wiąże się i z szynami i z ATP. Hydroliza nukleotydu i sprzężone z nią zmiany konformacyjne w główce białka motorycznego, powodujące cykliczne powstawanie i dysocjację jego połączeń z mikrotubulami lub filamentami aktynowymi, prowadzą do ruchu białka po szynie, a w konsekwencji do przemieszczania związanego z nim ładunku (Ryc.3). Na powierzchni organelli może znajdować się wiele cząsteczek białka motorycznego, co odpowiada sytuacji w mięśniach, gdzie końcowy efekt jest wzmocniony przez wielość główek na filamencie miozyny reagujących z jednym filamentem aktynowym. Faktycznie, badania obu izoform miozyny V u drożdży wykazały, że aby zaistniał ukierunkowany ruch pęcherzyka lipidowego, na jego powierzchni musi znajdować się co najmniej pięć cząsteczek miozyny (RECK-PETERSON i współaut. 2001). Odmienne niż w przypadku aparatu skurczu w mięśniach, wię-

kszość białek motorycznych to motory procesywne, a więc pozostające w kontakcie z szyną podczas kilku cykli hydrolizy ATP.



Ryc. 3. Schemat przedstawiający przypuszczalne funkcje miozyny niekonwencjonalnych (na przykładzie miozyny I).

1. Miozyna związana z organellum przemieszcza je wzdłuż filamencie aktynowego; 2. Miozyna zakotwiczona w błonie komórkowej (bezpośrednio — poprzez domenę MyTH1, za pośrednictwem innych białek błonowych lub poprzez drugi filament aktynowy — wiązany przez domenę MyTH2) powoduje przesuwanie się filamencie aktynowych; 3. Miozyna powoduje przesuw błony komórkowej w stosunku do filamencie aktynowych. Kierunek ruchu jest zdeterminowany przez polarność filamencie aktynowych. 4. Miozyna i związane z nią lipidy mogą dyfundować w płaszczyźnie błony. Oddziaływanie takiej miozyny z zakotwiczonymi w błonie filamencie aktynowymi korteksu może służyć do jej przesuwania wzdłuż filamencie aktynowych, powodując nagromadzenie się miozyny i lipidów w rejonach aktywnych komórki. 5. Miozyna związana trwale z jednym filamentem aktynowym (przez domenę MyTH2) i reagująca z drugim w sposób zależny od ATP przesuwa te filamenty względem siebie. Może to prowadzić do kurczenia się całej sieci filamencie aktynowych (wg ADAMSA i POLLARDA 1989, zmodyfikowane).

Impulsem do wysunięcia hipotezy o udziale izoform miozyny w transporcie wewnątrz-

komórkowym było odkrycie w końcu lat 80., że w pałeczce miozyny I z *Acanthamoeba castellanii* znajduje się drugie, niezależne od nukleotydu, miejsce wiązania aktyny (domena MyTH2), a także rejon wskazujący na zdolność tej izoformy do wiązania lipidów (domena MyTH1) (patrz: BRZESKA 2001). Nieco później miozynę I z mikroskopów jelitowych (ang. brush border myosin I) zlokalizowano na pęcherzykach lipidowych produkowanych przez aparat Golgiego (FATH i BURGESS 1993). Wykazano również, że mutacje w genach różnych izoform miozyny I, np. z *Aspergillus*, *Dictyostelium* czy *S. cerevisiae*, powodowały dramatyczne zmiany w procesach wewnątrzkomórkowego transportu organelli, prowadząc m. in. do zaburzeń w endocytozie i egzocytozie (patrz SOKAC i BEMENT 2000).

Dwa odkrycia dotyczące nowej rodziny, miozyny V, zdawały się rozszerzać hipotezę o udziale miozyn w transporcie wewnątrzkomórkowym o inne rodziny miozyn niekonwencjonalnych (MERMALL i współaut. 1998). Po pierwsze, okazało się, że produktem genu *dilute*, którego mutacje prowadzi do zaburzenia transportu melanosomów w mysich melanocytach, jest nowo odkryta wówczas miozyna V (MERCER i współaut. 1991). Po drugie, pokazano, że w drożdżach, *Saccharomyces cerevisiae*, istnieją dwie izoformy miozyny V: Myo2p, która jest zaangażowana w proces transportu pęcherzyków sekrecyjnych (JOHNSTON i współaut. 1991) oraz Myo4p, biorąca udział w transporcie mRNA czynnika transkrypcyjnego ASH1 (BOBOLA i współaut. 1996). Potwierdzono, że miozyna V jest zaangażowana w transport melanosomów w melanocytach i melanoforach, pęcherzyków synaptycznych w neuronach, a także mitochondriów w drożdżach. Wykazano także, iż miozyna VI z *Drosophila* bierze aktywny udział w transporcie organelli w cytoplazmie żywych komórek embrionalnych (MERMALL i współaut. 1994). Istnieją również doniesienia wskazujące, że miozyna VII może być zaangażowana w transport opsyny i rodopsyny w komórkach fotoreceptorowych (WOLFRUM i SCHMITT 2000, LIU i WILLIAMS 2001). Szereg innych badań (patrz: SOKAC i BEMENT 2000) zdawało się także potwierdzać słuszność hipotezy o udziale miozyn niekonwencjonalnych w transporcie wewnątrzkomórkowym.

Zdaniem Sokac i Bementa, aby uznać, że dana miozyna jest aktywnym motorem transportującym określony ładunek (organelle, pęcherzyki lipidowe i związane z nimi białka, a także kompleksy białkowe oraz mRNA) muszą być spełnione przynajmniej cztery kryteria. Po pierwsze, należy udokumentować, że transport po szynach aktynowych zachodzi *in vivo* w nie-

uszkodzonych komórkach. Po drugie, należy potwierdzić tożsamość przeniesionego ładunku. Po trzecie, należy wykazać, że ładunek ten jest połączony z motorem miozynowym; ideałem byłaby identyfikacja tego motoru. Po czwarte i najważniejsze, należy udowodnić, że inhibicja, inaktywacja lub też usunięcie danej izoformy miozyny powoduje zaprzestanie transportowania ładunku. Dotychczas tylko nieliczne z proponowanych modeli transportu zależnego, jak się wydaje, od miozyny spełniają jednocześnie wszystkie cztery kryteria (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Czasami jednak trudności natury technicznej uniemożliwiają sprawdzenie wszystkich tych wymogów. Spróbujmy prześledzić dokładniej kilkadziesiąt przykładów.

W przypadku transportu mRNA czynnika transkrypcyjnego przez Myo4p, jedną z dwóch drożdżowych izoform miozyny V, udało się wykazać spełnienie wszystkich czterech kryteriów. Szczególnie istotne było udokumentowanie, że mutacja *in vivo* w genie tej miozyny powoduje zablokowanie transportu (patrz: SOKAC i BEMENT 2000).

Istnieje szereg badań wskazujących, że w transport mitochondriów w drożdżach zaangażowane są motory miozynowe. Organelle te kolokalizują z wiązkami F-aktyny i ulegają ukierunkowanym przemieszczeniom, które nie są zależne od integralności mikrotubul. Przemieszczanie jest zahamowane w mutantach z zaburzonym genem aktyny lub pod wpływem czynników depolimeryzujących filamenty aktynowe (takich jak latrunkulina A lub cytochalazyna D). Jednakże mutacje w genach miozyny I lub V nie zaburzały tego transportu, a jednoczesna inaktywacja obu genów powodowała jedynie niewielkie zmiany tak w lokomocji mitochondriów, jak i organizacji cytoszkieletu aktynowego. Wykluczona jest możliwość zaangażowania innej izoformy miozyny niekonwencjonalnej, gdyż w genomie drożdży ich nie znaleziono. A więc nie jest spełnione kryterium czwarte. Można wobec tego przypuszczać, że właściwa organizacja struktury cytoszkieletu aktynowego jest niezbędna do przemieszczania mitochondriów, aczkolwiek nie jest to równoznaczne z aktywnym udziałem miozyny w tym procesie (patrz: SOKAC i BEMENT 2000).

Szereg doniesień łączyło transport pęcherzyków synaptycznych i retikulum endoplazmatycznego w neuronach z miozyną V (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). W obu przypadkach wykazano, że wyizolowane pęcherzyki są w stanie przemieszczać się *in vitro* po kablach aktynowych. Wykazanie, że defekty w genie miozyny V powodowały zaburzenia neurologiczne u myszy (patrz: RĘDOWICZ 2001b) wskazywało na

aktywny udział tego motoru w transporcie wewnątrzneuronalnym. Wykazano, że depolimeryzacja mikrotubuli w aksonach powoduje zahamowanie transportu pęcherzyków, a także stwierdzono *in vivo*, że bliżej nieokreślone pęcherzyki lipidowe przemieszczają się po kablach aktynowych. Jednakże wzdłuż filamentów aktynowych pęcherzyki te poruszają się dużo wolniej i tylko ku środkowi komórki. Oznacza to więc, że zależny od aktyny transport nie jest transportem efektywnym. Ponieważ pęcherzyków tych nie udało się scharakteryzować, nie zostało spełnione kryterium drugie. Niektórzy badacze sugerują, że miozyna V, obecna na pęcherzykach, może być tam pasażerem biernie transportowanym po szynach mikrotubularnych ku peryferiom aksonów (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Podobna sytuacja jest w melanocytach, gdzie wprawdzie scharakteryzowany jest ładunek, jednakże przyżyciowe obserwacje ziarnistości zawierających pigment wskazują raczej na to, iż miozyna po prostu zakotwicza je w cytoszkieletcie aktynowym, wiążąc się z jednej strony z mikrofilamentami, a z drugiej z melanosomami (patrz SOKAC I BEMENT 2000). Otwartą więc pozostaje kwestia, czy miozyna V działa jako aktywny motor czy też pełni funkcję czynnika stabilizującego organizację cytoszkieletu aktynowego.

Wydaje się, że miozyna VI spełnia wszystkie kryteria, aby być uznana za aktywny motor transportujący pęcherzyki Golgiego w embrionach *Drosophila*. Udało się wykonać doświadczenia w żyjących komórkach i wykazać, że w

sień wskazujących, że miozyny niekonwencjonalne mogą być czynnikami sieciującymi organelle ze strukturami cytoszkieletu aktynowego, bądź też zakotwiczać elementy cytoszkieletu w błonie plazmatycznej (Ryc. 3). Uważa się wręcz, że energia pochodząca z hydrolizy ATP może być zużywana na sieciowanie aktyny (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Na to, że miozyny pełnią funkcję czynników sieciujących zdaje się też wskazywać ich lokalizacja w wysoce uporządkowanych strukturach zawierających filamenty aktynowe, takich jak np. kosmki jelitowe czy stereocilia zmysłowych komórek włoskowatych (patrz: SOKAC i BEMENT 2000, RĘDOWICZ 2001b). Miozyna wiążąc się z aktyną może uczestniczyć w przekazywaniu bodźców wywieranych na filamenty aktynowe i odwrotnie, bodźce wywierane na białka wiążące się z różnorodnymi domenami miozyny mogą być przekazywane na filamenty aktynowe. Przykładem takiego czynnika sieciującego może być miozyna IX. Z badań *in vitro* wiemy, że jest to najwolniejszy ze scharakteryzowanych dotychczas motorów, pozostający w połączeniu z aktyną przez długi czas podczas cyklu hydrolizy ATP. W swojej pałeczce zawiera on aktywną domenę Rho-GAP, która jest zdolna do inaktywacji białka Rho. W komórkach ok. 25% tego białka związane jest z błoną cytoplazmatyczną. Można więc przypuszczać, że miozyna IX, zlokalizowana właśnie w strefie przybłonowej, może być tam zakotwiczona poprzez filamenty aktynowe, aby pełnić funkcję regulatora GTPaz z rodziny Rho (Ryc. 4) (patrz: BAHLER 2000). Wykazano, że z kolei miozyna III

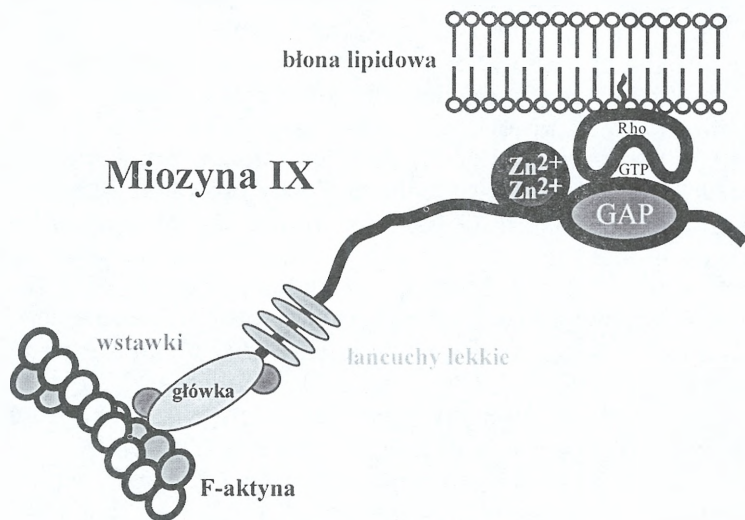


Fig. 4. Miozyna IX jako czynnik sieciujący filamenty aktynowe z obecnym w błonie komórkowej białkiem RhoA (wg BAHLERA 2000, zmodyfikowane).

transporcie uczestniczy motor związany z aktyną, potwierdzić tożsamość i motoru i pęcherzyków lipidowych, a także wykazać, że przeciwciało skierowane przeciw miozynie VI hamuje ten transport (MERMALL i współaut. 1994).

Obok prac dotyczących transportowej funkcji miozyn, coraz więcej pojawia się też donie-

poprzez swoją pałeczkę może wiązać się *in vivo* z białkiem INAD (z ang. inactivation no afterpotential D), zawierającym domeny PDZ i oddziałującym bezpośrednio z wieloma białkami podbłonowymi (BAHLER 2000). Wydaje się, że to oddziaływanie miozyny III z białkami podbłonowymi może być istotne dla utrzymywania upo-

rządkowanej struktury rbdomeru. Udział izoform miozyny I, wskutek oddziaływania poprzez jej domenę SH3 z białkami efektorowymi dla małych GTPaz, w regulacji polimeryzacji aktywny stymulowanej przez białka Rac i Rho w komórkach mięśniowych wskazuje na uczestnictwo miozyn w przekazywaniu sygnałów szlaku tzw. małych GTPaz (patrz: FABCZAK 2001).

Innym interesującym, aczkolwiek dla niektórych badaczy kontrowersyjnym przykładem odmiennej od transportowych funkcji miozyn niekonwencjonalnych wydaje się być zaangażowanie specyficznej dla jądra izoformy miozyny I w procesie transkrypcji genów. Wykazano jej kolokalizację z polimerazą II RNA, a przeciwnie skierowane przeciw unikalnej dla tej miozyny wstawce w domenie motorycznej immunopre-

cypitowało polimerazę II RNA i blokowało *in vitro* syntezę RNA (PESTIC-DRAGOVICH i współaut. 2000). Autorzy sądzą, że miozyna ta może w jądrze stanowić funkcjonalny kompleks z polimerazą.

Jak więc wynika z przytoczonych powyżej przykładów, miozyny mogą być zaangażowane w wielu istotnych dla życia komórki procesach pełniąc rolę aktywnego motoru, umożliwiającego przemieszczanie wielu cząstek i organelli lipidowych, białek oraz kwasów nukleinowych, bądź też pełnić funkcję czynników sieciujących lipidy i błony plazmatyczne z cytoszkieletem aktynowym (Ryc. 3). Mogą także pełnić, o czym poniżej, rolę czynników wiążących cytoszkielet aktynowy z mikrotubulami.

ODDZIAŁYWANIE MIOZYN NIEKONWENCJONALNYCH Z SYSTEMEM MIKROTUBULI

Pierwsze doniesienia o możliwości oddziaływania motorów współdziałających z filamentami aktynowymi również z systemem mikrotubuli pochodzą z początku lat 90., kiedy to pokazano, że w aksoplazmie mątwy ta sama organella może poruszać się i po F-aktynie i po mikrotubulach (KUZNETSOV i współaut. 1992). Późniejsze badania wykazały, że organelle zawierają na swojej powierzchni zarówno miozynę V, jak i konwencjonalną kinezynę, co sugerowało, że oba typy motorów mogą współdziałać w wewnątrzkomórkowym transporcie organelli (GOODE i współaut. 2000). Stosując czynniki depolimeryzujące filamenty aktynowe (latrunkulinę A) oraz zaburzające strukturę mikrotubuli (nokodazol) wykazano *in vivo*, że w transporcie ziarnistości zawierających pigment w melanoforach ropuchy *Xenopus* oraz ryby zebrafish mogą uczestniczyć zarówno motory używające szyn aktynowych, jak i motory wykorzystujące mikrotubule (RODIONOV i współaut. 1998, ROGERS i GELFAND 1998). Uważa się jednak, iż zarówno w przypadku melanoforów melanocytów, jak i neuronów (patrz: SOKAC i BEMENT 2000), podstawą transportu organelli jest system mikrotubuli, natomiast miozyna V uczestniczy co najwyżej w ruchu lokalnym na peryferiach komórki oraz/lub utrzymywaniu organelli w strefie przybłonowej (patrz: SOKAC i BEMENT 2000).

Doświadczenia na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykazały obecność białka Smy1 (z ang. suppressor of myosin) które, jak się później okazało, zawiera domenę homologiczną do domeny motorycznej kinezyny, aczkolwiek nie wykazano, że jest to aktywny motor. Wprowadzenie genu *Smy1* do mutantów, w których

zinaaktywowano gen *Myo2* kodujący miozynę V (nieaktywna była domena motoryczna lub pałeczka) i które, mimo produkowania pęcherzyków sekrecyjnych, nie były zdolne do pączkowania, powodowało odzyskanie fenotypu *Myo2*. Eliminacja genu *Smy1* nie powodowała ewidentnych skutków, natomiast podwójna mutacja *-Myo2/-Smy1* była dla drożdży letalna. Stwierdzono, że białka te kolokalizują i mogą ze sobą bezpośrednio oddziaływać poprzez rejon w C-końcowej części *Smy1* i globularnej, również C-końcowej części *Myo2*. Podejrzewa się, że *Smy1* może indukować zmiany konformacyjne w miozynie, wzmagające jej interakcję z aktyną (patrz: GOODE i współaut. 2000). Sugerowano, że oddziaływanie pomiędzy miozyną V i *Smy1* mogą odgrywać niezmiernie istotną rolę w tworzeniu pączka i ukierunowanej migracji jądra podczas pączkowania drożdży (patrz: GOODE i współaut. 2000).

U ludzi konwencjonalna kinezyzna (Khc_u) kolokalizuje w melanocytach z miozyną V. Białka te wiążą się ze sobą poprzez globularną C-końcową część pałeczki miozyny i C-końcowy odcinek pałeczki kinezyny, tuż przed miejscem, gdzie wiążą się jej łańcuchy lekkie (HUANG i współaut. 1999). Autorzy postulują, że motory związane ze sobą swoimi końcami C przymocowują się do tego samego „ładunku”. W takim „heteromotorze” tylko jeden ze składników może być w danym momencie aktywny, w zależności od rodzaju aktualnie używanych „szyn”. Kinezyzna mogłaby więc wzduż aksonu, na długim dystansie, szybko przenosić np. pęcherzyk Golgiego, zaś miozyna V dostarczałaby go używając filamentów aktynowych, już wolniej, do korteksu przybłonowego, kolbek synaptycz-

nych, czy stożków wzrostu neurytów, tam gdzie w zasadzie nie ma już mikrotubuli (patrz Ryc. 2), a lipidy są niezbędne do budowania błony plazmatycznej (HUANG i współaut. 1999). W procesie tym kinezyzna dostarczałyby zarówno pęcherzyki, jak i nowo zsyntetyzowaną miozynę do rejonów, w których są one potrzebne. Być może, bezpośrednio oddziaływanie kinezyzny i miozyny jest też konieczne do ukierunkowanego ruchu komórki, w którym następuje przesuwanie mikrotubuli ku krawędziom wiodącym. W tym przypadku miozyna pełniłaby funkcję aktywnego motoru wspomagającego ki-

nezyne w przesuwaniu mikrotubuli, mogłaby też być czynnikiem sieciującym mikrotubule z filamentami aktynowymi przyłączonymi do błony komórkowej poprzez białka cytoszkieletu podbłonowego (patrz: GOODE i współaut. 2000). Wykazanie, że przedstawiciel innej rodziny miozyn, miozyna VI w *Drosophila*, oddziałuje z izoformą białka CLIP170 (ang. cytoplasmic linker protein), które wiąże się do mikrotubuli i cytoplazmatycznych struktur peryferyjnych, zdaje się potwierdzać tę ostatnią możliwość (LANTZ i MILLER 1998).

BIAŁKA WIĄŻĄCE SIĘ Z MIOZYNAMI NIEKONWENCJONALNYMI

O oddziaływaniu niektórych z tych białek z różnymi izoformami miozyny wspomniano pokrótce już wyżej. Dotychczas wykryto ich znacznie mniej niż samych miozyn niekonwencjonalnych. Poza aktyną, wiążącą się głównie z domeną motoryczną, oraz kalmoduliną i specyficznymi dla niektórych miozyn łańcuchami lekkimi, które wiążą się z łańcuchem ciężkim w rejonie szyjki, wszystkie inne dotąd wykryte białka wiążą się z pałeczką miozyny. Dotychczas zidentyfikowano białka oddziałujące z przedstawicielami rodzin: I, III, V, VI, VII i IX.

Jednym z takich białek jest Acan-125, białko o m. cz. ok. 125 kDa, występujące w *Acanthamoeba castellanii*, które wiąże się z domeną SH3 miozyny IC poprzez rejonu cząsteczki zawierające zgrupowania reszt prolinowych. Oba te białka występują na wewnątrzkomórkowych organellach (XU i współaut. 1997). Z kolei domena SH3 Myo5p, jednej z dwóch izoform miozyny I w *Saccharomyces cerevisiae*, wiąże się z werproliną, białkiem również bogatym w reszty prolinowe, które przypuszczalnie jest cytoplazmatycznym receptorem dla tej izoformy miozyny (ANDERSON i współaut. 1998).

INAD to białko składające się z 674 reszt aminokwasowych, które wiąże się z pałeczką NINAC, izoformą miozyny III z *Drosophila* o m. cz. ok. 174 kDa. Zawiera ono 5 domen PDZ, którymi, poza miozyną, wiąże się z kalmoduliną, fosfolipazą C, kinazą białkową C oraz białkami transbłonowymi, takimi jak rodopsyna czy białko receptorowe chwilowego potencjału TRP (ang. transient receptor potential protein). Wykazano, że zaburzenia w interakcji INAD z NINAC powodowały opóźnienie w odpowiedzi na bodźce świetlne (patrz: BAHLER 2000).

Udało się zidentyfikować kilka białek oddziałujących z izoformami miozyny V. Zaobserwowano, że pałeczka neuronalnej izoformy miozyny V tworzy stabilne kompleksy z synaptofi-

zyną i synaptobrewiną, białkami związanymi z błoną pęcherzyków synaptycznych (PREKERIS i TERRIAN 1997). Globularna część pałeczki miozyny V wiąże się również z kinezyną KhcU (ang. kinesin heavy chain ubiquitous). Wydaje się, że wiązanie to jest specyficzne dla tej kinezyzny, gdyż izoforma neuronalna kinezyzny (KhcN) nie wykazuje zdolności wiązania miozyny V. Smy1 to białko o m. cz. ok. 75 kDa występujące w drożdżach, wykazujące podobieństwo do kinezyzny, które wiąże się i oddziałuje z drożdżową izoformą miozyny V, Myo2. Wykazano, że do domeny Myo2, która bierze udział w tworzeniu superhelisy, wiąże się Rho3, jeden z czterech przedstawicieli białek Rho w drożdżach. Przypuszcza się, że ta interakcja może być ważna dla utrzymania polaryzacji komórek podczas pączkowania (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Innymi białkami z nadrodziny Ras oddziałującymi z pałeczką miozyny V są przedstawiciele rodziny Rab: Rab27a i Rab11a. Rab27a wiąże się z obecną w melanocytach miozyną Va, podczas gdy Rab11a wiąże się i kolokalizuje z obecną w mózgu miozyną Vb. Postuluje się, że białka te, o masie ok. 27 kDa, w swojej aktywnej formie (ze związanym GTP) pełnią funkcję receptorów umożliwiających wiązanie tych izoform miozyny z powierzchnią organelli (WU i współaut. 2001). Potwierdza to również fakt, że mutacje w genie kodującym Rab27a są odpowiedzialne za chorobę Griscellię, schorzenie autosomalnie związane z zaburzeniami w transporcie melanosomów (patrz: RĘDOWICZ 2001b). Kolejnym białkiem oddziałującym z globularnym rejonem pałeczki miozyny V, jest BERP, białko zawierające motyw zwane „ring finger” (odmiana domen wiążących jony cynku), które występują w wielu białkach biorących udział w regulacji ekspresji genów i proliferacji komórek. Nadekspresja w neuronach białka BERP pozbawionego domeny wiążącej miozynę V powodowała zaburzenia w

tworzeniu wypustek po stymulacji komórek przez czynnik wzrostu nerwów NGF (ang. nerve growth factor) (patrz: SOKAC i BEMENT 2000). Innym białkiem wiążącym się do globularnej części pałeczki jest lekki łańcuch dyneiny o m. cz. ok. 8 kDa, białko oddziałujące, poza dyneiną i miozyną, również z wieloma innymi białkami, takimi jak syntaza tlenu azotu czy cytoplazmatyczny inhibitor transkrypcji IB. Podejrzewa się, że łańcuch ten, wiążąc się z miozyną w stosunku molowym 2:1, pełni funkcję stabilizatora oddziaływań pomiędzy dwoma ciężkimi łańcuchami miozyny w dimerze lub odgrywa rolę w umocowaniu ładunku do pałeczki (patrz: SOKAC i BEMENT 2000).

Białkiem, które oddziałuje z pałeczką miozyny VI jest CLIP-190, homolog ssaczego CLIP-170 w *Drosophila*. Białka CLIP, tworzące w komórkach dimery o m. cz. ok. 310 kDa, po ufosforylowaniu przez np. kinazę białkową C wiążą się poprzez ich koniec N z mikrotubulami. Koniec C uczestniczy w wiązaniu z peryferyjnymi strukturami cytoplazmatycznymi. W wiązaniu miozyny uczestniczy prawdopodobnie część cząsteczki CLIP zdolna do tworzenia superhelisy (LANTZ i MILLER 1998). Oba te białka wiążą się do cząstek lipidowych, pełniąc rolę łącznika między systemem mikrotubuli i filamentów aktynowych (LANTZ i MILLER 1998).

Wezatyna (ang. vezatin) to białko błonowe (m. cz. ok. 65 kDa) oddziałujące, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, końcem C z domeną FERM miozyny VIIA (KÜSSEL-ANDERMAN i współaut. 2000). Wy-

stępuje ona w połączeniach międzykomórkowych typu stref przylegania wielu typów komórek, gdzie jest jednym z elementów kompleksu kateninowo-kadherynowego. Sugeruje się, że miozyna VII zakotwiczona w błonie komórkowej poprzez związanie wezatyny, może być odpowiedzialna za wytwarzanie napięcia pomiędzy strefą przylegania a cytoszkieletem aktynowym, co jest istotne dla wzmocnienia przylegania między komórkami (KÜSSEL-ANDERMAN i współaut. 2000).

W przypadku miozyny IX udało się pokazać, że z jej domeną Rho-GAP oddziałuje kilka izoform białka Rho: RhoA, Rho B i RhoC (Ryc. 4). Miozyna IX stymuluje ich aktywność GTPazową, co prowadzi jednak w konsekwencji do przyjmowania przez te białka formy nieaktywnej, ze związanym GDP (patrz: FABCZAK 2001). Nadekspresja miozyny IX w komórkach powoduje utratę włókien naprężeniowych i miejsc przyczepu komórek nabłonkowych do podłoża, podobnie jak w przypadku innych GAP i czynników hamujących endogenne białka Rho (patrz: BÄHLER 2000).

Z miozynami wiąże się także szereg kinaz, mniej lub bardziej specyficznych, które w przypadku miozyn niekonwencjonalnych fosforylują ich reszty serynowe lub treoninowe położone bądź w domenie motorycznej (ameboidalne miozyny I i miozyna VI), bądź w pałeczce (miozyna III i V). Osoby zainteresowane tym zagadnieniem odsyłam do artykułów BRZESKIEJ (2001) i REDOWICZ (2001a).

MIOZINY NIEKONWENCJONALNE W ROŚLINACH

Pierwsze doniesienia o obecności systemu aktomiozynowego w roślinach pochodzą z połowy lat 60., kiedy to udało się wykazać, że ekstrakty z liści tytoniu (*Nicotiana*) mają aktywność ATPazową i ich konsystencja (lepkość) zmienia się po dodaniu ATP (YEN i SHIH 1965). Zademonstrowano również, że charakterystyczne zwijanie się liści mimozy także zależy od obecności ATP (LYUBIMOVA i współaut. 1964). Pierwsze doniesienia o izolacji i biochemicznej charakterystyce roślinnych izoform miozyny zaczęły pojawiać się w końcu lat 80., a lata 90. to okres rozwoju badań nad genetyką miozyn w systemach roślinnych — od glonów po rośliny wyższe (patrz: VOLKMANN i BALUSKA 1999, REDDY i DAY 2001). Opóźnienie w stosunku do badań nad motorami w innych organizmach wynika z mniejszego zainteresowania modelami roślinnymi i z trudności technicznych, a mianowicie braku odpowiednich metod identyfikacji cytoszkieletu aktynowego w systemach roślinnych.

Obecnie znanych jest w roślinach ok. 30 genów kodujących miozyny należące do trzech rodzin — VIII, XI i XIII. Co ciekawe, rodziny te zawierają jedynie izoformy roślinne (patrz: Tabela 1, Ryc.1). Należy tu jednak przypomnieć, że do rodziny XI niektórzy badacze zaliczają także *MyoJ* z *Dictyostelium discoideum*. Dotychczas udało się poznać sekwencje miozyn z *Acetabularia cliftonii*, *Arabidopsis thaliana* (model do badań genetycznych roślin dwuliściennych, należy do rodziny kapustowatych), *Chara corallina*, słonecznika i kukurydzy. Tylko niektóre natywne miozyny udało się scharakteryzować, np. wyizolowano je z liści tytoniu, pyłku i ziaren traw, lilii, *Arabidopsis*, rzeżuchy, kukurydzy czy też z glonów z rodzaju *Chara* i *Acetabularia* (patrz: REDDY i DAY 2001). W danej roślinie występują przedstawiciele tylko dwóch rodzin — z reguły VIII i XI, a więc mniej niż w innych komórkach eukariotycznych. Natomiast w samym tylko *Arabidopsis* wykryto aż 17 genów

kodujących miozyny, z czego tylko 4 należą do rodziny VIII, a reszta do rodziny XI. Rodzina XIII ma tylko dwóch przedstawicieli, znalezionych w genomie *Acetabularia*. Poza wydedukowaną sekwencją aminokwasową brak jest informacji o przedstawicielach tej grupy miozyn. Łańcuchy ciężkie miozyn VIII mają m.cz. ok. 130 kDa i zawierają od 3 do 4 motywów IQ. Ich pałeczki, poza sekwencjami umożliwiającymi powstawanie superhelisy, nie zawierają charakterystycznych domen. Z kolei rodzina XI to białka złożone z łańcuchów ciężkich o m. cz. ok. 170 kDa, zawierających od 5 do 6 motywów IQ, tworzące dimery dzięki obecności w pałeczce sekwencji umożliwiającej tworzenie superhelisy. Podobnie jak miozyny VIII, przedstawiciele rodziny XI również nie wykazują charakterystycznych domen w pałeczce. Rodzinę XIII stanowią dwie monomeryczne miozyny o m.cz. ciężkiego łańcucha ok. 125 kDa, mające aż 7 motywów IQ. W miozynach XI z *Arabidopsis*, w rejonie odpowiadającym miejscu fosforylacji ameboidalnych izoform miozyny I i miozyny VI lub reszcie glutaminowej w pozycji 408 w łańcuchu ciężkim miozyny z mięśni szkieletowych, obok reszt glutaminowych lub asparaginianowych obecna jest także reszta treoninowa (patrz: REDDY i DAY 2001). Brak dotąd doniesień o możliwości fosforylacji tej reszty treoninowej przez kinazy z rodziny PAK, jak to ma miejsce w miozynie I i miozynie VI. Możliwości tej nie można wykluczyć, zwłaszcza iż w roślinach obecny jest system białek z rodziny Rho.

W przypadku miozyn XI z pyłku lilii i liści tytoniu udało się wykazać, że białka te wiążą kalmodulinę w nieobecności jonów Ca^{2+} . Miozyna XI z glonu *Chara* jest najszybszą izoformą

wśród dotąd poznanych miozyn, porusza ona bowiem filamenty aktynowe, w teście ruchliwości *in vitro*, z prędkością ok. 100 $\mu\text{m/s}$, a więc kilkunastokrotnie szybciej niż miozyny mięśniowe. Przyjmuje się, że to właśnie miozyny XI odpowiedzialne są za szybki przepływ cytoplazmy (ang. cytoplasmic streaming) w roślinach. Zlokalizowano je w pęcherzykach lipidowych, organellach i komórkach rozrodczych. Przyjmuje się, że są one aktywnie zaangażowane w procesy transportu wewnątrzkomórkowego, co w przypadku roślin ma szczególne znaczenie, gdyż mikrotubule nie uczestniczą tam w transporcie organelli generowanych w endoplazmatycznym retikulum i cysternach aparatu Golgiego (patrz: REDDY i DAY 2001, VOLKMANN i BALUSKA 1999).

Z kolei miozyny VIII, dużo słabiej scharakteryzowane, występują w ścianie komórkowej, głównie w połączeniach pomiędzy sąsiednimi komórkami umożliwiającymi bezpośredni przepływ jonów i białek. Struktury te zwane są plazmodesmami. Podczas podziału komórkowego miozyny VIII są związane ze ścianą komórkową, także nowo powstałych komórek. Mikroskopia elektronowa wykazała, że miozyna ta występuje w przestrzeni pomiędzy błoną komórkową a plazmodesmami. Przypuszcza się zatem, że miozyny te biorą udział w transporcie plazmodesmalnym oraz w tworzeniu ściany komórkowej poprzez dostarczanie materiału do miejsca syntezy ściany. Nie wyklucza się również możliwości uczestniczenia tych miozyn w utrzymywaniu organizacji cytoszkieletu aktynowego (patrz: REDDY i DAY 2001, VOLKMANN i BALUSKA 1999).

PODSUMOWANIE

Miozyny stanowią olbrzymią nadrodzinę zależnych od aktyny białek motorycznych, które są obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych. Na podstawie różnic w sekwencji domeny motorycznej podzielono miozyny na 18 rodzin. Miozyny występujące w mięśniach tworzą rodzinę II i noszą też miano miozyn konwencjonalnych, podczas gdy pozostałe miozyny nazywa się miozynami niekonwencjonalnymi. Miozyny niekonwencjonalne wykazują ogromne zróżnicowanie w swojej strukturze pierwszorzędowej, zwłaszcza w rejonie pałeczki. Budowa miozyn ma znaczący wpływ na funkcje, jakie miozyny mogą pełnić w komórkach. Wiele miozyn niekonwencjonalnych wiąże się z szeregiem

innych białek, w tym z przedstawicielami kinezyny, grupy białek motorycznych współdziałających z systemem mikrotubuli. Miozyny zaangażowane są we wszystkie procesy związane z organizacją cytoszkieletu aktynowego i/lub transportu wewnątrzkomórkowego, takie jak endo- i egzocytoza, cytokineza lub migracja komórek. Defekty w genach kilku miozyn niekonwencjonalnych są odpowiedzialne za zaburzenia m. in. słuchu, wzroku czy neurologiczne (patrz literatura: RĘDOWICZ 2001b). Trawestując znane powiedzenie, że w jednościi siła, to w przypadku miozyn siła tkwi w ich różnorodności.

UNCONVENTIONAL MYOSINS — STRUCTURE AND POSSIBLE FUNCTIONS IN THE CELL

Summary

Myosins are the actin based-motors that are expressed in all eukaryotic cells as multiple isoforms. They form a diverse superfamily consisting of at least 18 different families. The classification has been made on the basis of differences in the amino acid sequence of the myosin motor domain. Muscle myosins (and those structurally resembling them) are called conventional myosins and form family II whereas other isoforms are called unconventional myosins. There is a huge diversity in the primary structure of unconventional myosins, particularly in the rod portion constituting the C-terminal part of the myosin heavy chain. The structure of myosin effects its *in vivo* function. There are several proteins that bind to some unconventional

myosins. For example, kinesin, the microtubule-based motor, interacts with myosin V suggesting cooperation between the actin and microtubule systems. Unconventional myosins participate in all processes involving the reorganization of the actin cytoskeleton and/or intracellular transport such as endo- and exocytosis, cytokinesis and cell migration. Mutations within the genes encoding some myosins caused some diseases, for example, neurological disorders (myosin V) and hearing impairment (myosin VI, VII and XV). Thinking about myosins, one should reconsider the saying "unity is strength" and think instead that "strength comes from diversity".

LITERATURA

- ADAMS R. J., POLLARD T. D., 1989. *Binding of myosin I to membrane lipids*. Nature 340, 565-568
- ANDERSON B. L., BOLDOGH I., EVANGELISTA M., BOONE C., GREENE L. A., PON L. A., 1998. *The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type myosin I, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization*. J. Cell Biol. 141, 1357-1370.
- BAHLER M., 2000. *Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules?* Biochim. Biophys. Acta 1496, 52-59.
- BAKER J. P., TITUS M. A., 1997. *A family of unconventional myosins from the nematode Caenorhabditis elegans*. J. Mol. Biol. 272, 523-535.
- BEMENT W. M., MOOSEKER M. S., 1995. *TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head*. Cell Motil. Cytoskeleton. 31, 87-92.
- BERG J. S., DERFLER B. H., PENNISI C. M., COREY D. P., CHENEY R. E., 2000. *Myosin X, a novel myosin with pleckstrin homology domains associates with region of dynamic actin*. J. Cell Sci. 113, 3439-3451.
- BERG J. S., POWELL B. C., CHENEY R. E., 2001. *A millennial myosin census*. Mol. Biol. Cell 12, 780-794.
- BOBOLA N., JANSEN R. P., SHIN T. H., NASMYTH K., 1996. *Asymmetric accumulation of Ash1p in post-anaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells*. Cell 84, 699-709.
- BRZESKA H., 2001. *Przygoda z amebą: dziwaczne miozyny i kinaza*. Kosmos 50, 223-232.
- CHIEREGATTI E., GARTNER A., STOFFLER H. E., BAHLER M., 1998. *Myr 7 is a novel myosin IX-RhoGAP expressed in rat brain*. J. Cell Sci. 111, 3597-3608.
- COSTA M. C., MANI F., SANTORO W., ESPREAFICO E. M., LARSON R. E., 1999. *Brain myosin V, a calmodulin carrying myosin, binds to calmodulin-dependent kinase II and activates its activity*. J. Biol. Chem. 274, 15811-15819.
- DE LA CRUZ E. M., WELLS A. L., MORRIS C. A., OSTAP E. M., SWEENEY H. L., 2000. *Mechanism of myosin VI regulation by phosphorylation*. Mol. Biol. Cell 11, 1943.
- ESPINDOLA F. S., CHENEY R. E., KING S. M., SUTER D. M., MOOSEKER M. S., 1996. *Myosin V and dynein share a similar light chain*. Mol. Biol. Cell 7, 372a.
- FABCZAK H., 2001. *Rodzina białek Rho a cytoszkielet*. Kosmos 50, 283-294.
- FATH K. R., BURGESS D. R., 1993. *Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein*. J. Cell Biol. 120, 117-127.
- FUJIWARA M., HORIUCHI H., OHTA A., TAKAGI M., 1997. *A novel fungal gene encoding chitin synthase with a motor-like domain*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 236, 75-78.
- FURUSAWA T., IKAWA S., YANAI N., OBINATA M., 2000. *Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 270, 67-75.
- GOODE B. L., DRUBIN D. G., BARNES G., 2000. *Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons*. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 63-71.
- HAMMER J. A. III, JUNG G., 1996. *The sequence of Dictyostelium myoJ heavy chain gene predicts a novel, dimeric, unconventional myosin with a heavy chain molecular mass of 258 kDa*. J. Biol. Chem. 271, 7120-7127.
- HODGE T., COPE M. J. T. V., 2000. *A myosin family tree*. J. Cell Sci. 113, 3353-3354.
- HOMMA K., YOSHIMURA M., SAITO J., IKEBE R., IKEBE M., 2001. *The core of motor domain determines the direction of myosin movement*. Nature 412, 81-834.
- HOROWITZ J. A., HAMMER J. A. III, 1990. *A new Acanthamoeba myosin heavy chain: cloning of the gene and immunological identification of the polypeptide*. J. Biol. Chem. 265, 20646-20652.
- HUANG J. D., BRADY S. T., RICHARDS B. W., STENOIEN D., RESAU J. H., COPELAND N. G., 1999. *Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors*. Nature 397, 267-270.
- JOHNSTON G. C., PRENDERGAST J. A., SINGER, R. A., 1991. *The Saccharomyces cerevisiae MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles*. J. Cell Biol. 113, 539-551.
- KORN E. D., 2000. *Co-evolution of head, neck and tail domains of myosin heavy chains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12559-12564.
- KÜSSEL-ANDERMANN P., EL-AMRAOUI A., SAFIEDDINE S., NOUAILLE S., PERFETTINI I., LECUIT M., COSSART P., WOLFRUM U., PETTIT C., 2000. *Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenin complex*. EMBO J. 19, 6020-6029.
- KUZNETSOV S. A., LANGFORD G. M., WEISS D. G., 1992. *Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm*. Nature 356, 722-725.
- LANTZ V. A., MILLER K. G., 1998. *A class VI unconventional myosin I is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of Drosophila embryos*. J. Cell Biol. 140, 897-910.

- LI H. S., PORTER J. A., MONTELL C., 1998. *Requirements for the NINAC kinase/myosin for stable termination of the visual cascade*. J. Neurosci. 18, 9601-9606.
- LIANG Y., WANG A., BELYANTSEVA I. A., ANDERSON D. W., PROBST F. J., BARBER T. D., MILLER W., TOCHMAN J. W., JIN L., SULLIVAN S. L., SELLERS J. R., CAMPER S. A., LLOYD R. V., KACHAR B., FRIEDMAN T. B., FRIDELL R. A., 1999. *Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker-2*. Genomics 61, 243-258.
- LIU X., WILLIAMS D. S., 2001. *Coincident onset of expression of myosin VIIA and opsin in the cilium of the developing photoreceptor cell*. Exp. Eye Res. 72, 351-355.
- LYUBIMOVA M. N., DEMYANOVSKAYA I. B., FEDOROVICH I. B., ITOMLENSKITE I. V., 1964. *Participation of ATP in the motor function of the Mimosa pudica leaf*. Biokhimiya 29, 663-669.
- MEHTA A. D., ROCK R. S., RIDF M., SPUDICH J. A., MOOSEKER M. S., CHENEY, R. E., 1999. *Myosin-V is a processive actin-based motor*. Nature 400, 590-593.
- MERMALL V., MCNALLY J. G., MILLER K. G., 1994. *Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living Drosophila embryos*. Nature 369, 560-562.
- MERMALL V., POST P. L., MOOSEKER M. S., 1998. *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*. Science 279, 527-533.
- MERCER J. A., SEPERACK P. K., STROBEL M. C., COPELAND N. G., JENKINS N. A., 1991. *Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute colour locus*. Nature 349, 709-713.
- PATEL K., CAMERON P. L., CAMERON R., 1998. *Identification of a unconventional myosin present in mammalian brain development*. Mol. Biol. Cell 9s, 387a.
- PESTIC-DRAGOVICH L., STOJILJKOVIC L., PHILIMONENKO A. A., NOWAK G., YUNBO KE, SETTLAGE R. E., SHABANOWITZ J., HUNT D. F., HOZAK P., DE LANEROLLE P., 2000. *A myosin I isoform in the nucleus*. Science 290, 337-341.
- POLLARD T. D., DOBERSTEIN S. K., ZOT H. G., 1991. *Myosin-I*. Annu. Rev. Physiol. 53, 653-681.
- POLLARD T. D., KORN, E. D., 1973. *Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin*. J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.
- PORTER J. A., MONTELL C., 1993. *Distinct roles of the Drosophila ninaC kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis*. J. Cell Biol. 122, 601-612.
- PORTER J. A., YU M., DOBERSTEIN S. K., POLLARD T. D., MONTELL C., 1993. *Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINAC unconventional myosin*. Science 262, 1038-1042.
- POST P. L., BOKOCH G. M., MOOSEKER M. S., 1998. *Human myosin IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho*. J. Cell Sci. 111, 941-950.
- PREKERIS R., TERRIAN D. M., 1997. *Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with synaptobrevin-synaptophysin complex*. J. Cell Biol. 137, 1589-1601.
- RAYMENT I., HOLDEN H. M., WHITTAKER, JOHN C. B., LORENZ M., HOLMES K. C., MILLIGAN R. A., 1993. *Structure of the actin-based complex and its implications for muscle contraction*. Science 261, 58-65.
- RECK-PETERSON S. L., TYSKA M. J., NOVICK P. J., MOOSEKER M. S., 2001. *The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors*. J. Cell Biol. 153, 1121-1126.
- REDDY A. S. N., DAY, I. S., 2001. *Analysis of the myosins encoded in the recently completed Arabidopsis thaliana genome sequence*. Genbiol. 2, 24.1-24.17.
- RĘDOWICZ M. J., 2001a. *Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation*. J. Muscle Res. Cell Motil. 22, 163-173.
- RĘDOWICZ M. J., 2001b. *Miozyna a patologia*. Kosmos 50, 315-324.
- RODIONOV V. I., HOPE A. J., SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1998. *Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores*. Curr. Biol. 8, 165-168.
- ROGERS S. L., GELFAND V. I., 1998. *Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores*. Curr. Biol. 8, 161-164.
- SELLERS J. R., 1999. *Myosin, 2nd edition*. Protein Profile, Oxford University Press, Oxford.
- SOKAC A. M., BEMENT W. M., 2000. *Regulation and expression of metazoan unconventional myosins*. Int. Rev. Cytol. 200, 197-304.
- STEVENS R. C., DAVIS T. N., 1998. *Mlc1p is a light chain for the unconventional myosin Myo2p in Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 142, 711-722.
- TANAKA H., HOMMA K., IWANE A. H., KATAYAMA E., IKEBE R., SAITO J., YANAGIDA T., IKEBE M., 2001. *The motor domain, not a long neck domain, determines the large step of myosin V*. Biophys. J. 80, 361a.
- VOLKMAN D., BALUSKA F., 1999. *Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks*. Microsc. Res. Techn. 47, 135-144.
- WALKER M. L., BURGESS S. A., SELLERS J. R., WANG F., HAMMER J. A. III, TRINICK J., KNIGHT P. J., 2000. *Two-headed binding of a processive myosin to actin*. Nature 405, 804-807.
- WELLS A. L., LIN A. W., CHEN L. Q., SAFER D., CAIN S. M., HASSON T., CARRAGHER B. O., MILLIGAN R. A., SWEENEY H. L., 1999. *Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards*. Nature 401, 505-508.
- WOLENSKI J. S., HAYDEN S. M., FORSCHER P., MOOSEKER M. S., 1993. *Calcium-calmodulin and regulation of brush border myosin I MgATPase and mechanochemistry*. J. Cell Biol. 122, 613-621.
- WOLFRUM U., SCHMITT A., 2000. *Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells*. Cell Motil. Cytoskel. 46, 95-107.
- WU X., RAO K., BOWERS M. B., COPELAND N. G., JENKINS N. A., HAMMER J. A., 2001. *Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle*. J. Cell Science 114, 1091-1100.
- XU P., MITCHELHILL K. I., KOBE B., KEMP B. E., ZOT H. G. 1997. *The myosin-I-binding protein Acan 125 binds the SH3 domain and belongs to the superfamily of leucine-rich repeat proteins*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 3685-3690.
- YEN L. F., SHIH T. C., 1965. *The presence of contractile protein in higher plants*. Scientia Sinica 14, 601-607.