

ANNA MOCZARSKA

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: Orton@nencki.gov.pl

WPLYW PUNKTOWYCH MUTACJI W CIĘŻKIM I LEKKICH ŁAŃCUCHACH MIOZINY NA ZMIANY FUNKCJI SKURCZOWEJ MIĘŚNIA SERCOWEGO PROWADZĄCE DO KARDIOMIOPATII PRZEROSTOWEJ

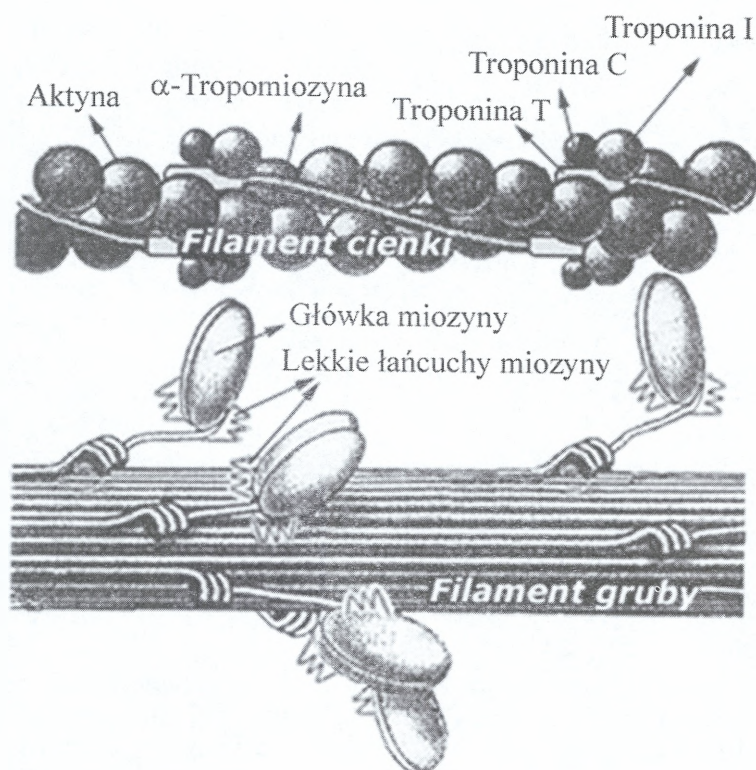
WPROWADZENIE

Dotychczasowe badania wskazują, że podstawą molekularnego mechanizmu skurczu mięśnia są strukturalne zmiany zachodzące w główce miozyny podczas jej oddziaływania z aktyną, wiązania i hydrolizy ATP oraz uwalniania produktów hydrolizy. Obok metod krystalograficznych, mikroskopowych, a także metod biochemii klasycznej, obejmujących badania kinetyczne, spektroskopowe czy chemiczne sieciowanie, ważną rolę w poznawaniu tych zmian odgrywają badania genetyczne. Analiza strukturalnych i funkcjonalnych konsekwencji naturalnych mutacji punktowych, jak i tych indukowanych sztucznie stanowi cenne źródło informacji nie tylko o molekularnych podstawach zaburzenia funkcji skurczowej mięśnia w wielu jego stanach patologicznych, ale pomaga też lepiej poznać i zrozumieć rolę różnych rejonów główki miozyny, określić najważniejsze dla jej funkcji obszary, a także sposoby przenoszenia informacji pomiędzy nimi.

Jedną z chorób wywołanych przez naturalnie występujące mutacje w genach kodujących białka aparatu skurczu jest rodzinna kardiomiopatia przerostowa (ang. familial hypertrophic cardiomyopathy FHC). Jest to choroba dziedziczona około 70 % przypadków, co wskazuje na etiologiczną ważność czynników genetycznych. Dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący i charakteryzuje się przerostem najczęściej lewej komory serca, nie związanym z przeciążeniem ciśnieniowym (np. z nadciśnieniem tętniczym czy stenozą aortalną). W schorzeniu tym pogrubiały mięsień jest sztywny. Powoduje to podwyższenie ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca (FANG 1996).

Mutacje odpowiedzialne za powstanie FHC zlokalizowano w 9 genach, których produktami

są takie białka jak izoforma β ciężkiego łańcucha miozyny (β -MHC), łańcuchy lekkie miozyny — istotny (ELC) i regulujący (RLC), białko C wiązane przez miozynę, aktyna — główny składnik filamentu cienkiego oraz połączone z nią białka regulujące skurcz: tropomiozyna α , troponina T, troponina I, a także tytyna — obficie występujący w sarkomerze składnik miofibrili, który rozciągając się od linii Z do prążka M mechanicznie stabilizuje układ miofilamentów sarkomeru (Tabela 1, Ryc. 1). Udowodniono też związek FHC ze zmianami w locus 7q3., jednak dotychczas nie zidentyfikowano odpowiadającego mu białka (DOMAL-KWIATKOWSKA i współaut. 2000). Większość mutacji występujących w genach kodujących wyżej wymienione białka to mutacje punktowe, wśród których dominują małe delecje prowadzące do usunięcia jednego aminokwasu i mutacje zmiany *sensu*, których efektem jest podstawienie pojedynczego, najczęściej wysoce konserwatywnego aminokwasu macierzystego przez inny aminokwas. Może to wpłynąć na strukturę i funkcję białka, chociaż wielkość i znaczenie tych zmian zależne są od miejsca, w którym doszło do podstawienia, a także od rodzaju aminokwasu, który wymienił aminokwas macierzysty. Wbudowanie takich „trujących” polipeptydów do sarkomeru zmniejsza jego integralność, co w konsekwencji prowadzi do dysfunkcji miocytu. Innym rodzajem mutacji punktowych, obserwowanych często w przypadku genu kodującego białko C, są prowadzące do przedwczesnego zakończenia syntezy białka mutacje nonsensowe oraz zmiany nukleotydowe w obrębie miejsc donorowych lub akceptorowych, które zaburzają proces alternatywnego składowania eksonów (DOMAL-KWIATKOWSKA i współaut. 2000). Powstające w obu przy-



Ryc. 1. Schemat organizacji podstawowych białek sarkomeru. (wg KAMISAGO i współaut. 2000, zmodyfikowany).

padkach białka skrócone poważnie zmieniają proporcje prawidłowych składników grubego oraz cienkiego filamentu, powodując ostatecznie zaburzenia struktury i funkcji sarkomeru.

Tabela 1. Geny zaangażowane w rozwój kardiomiopatii przerostowej.

Białko aparatu kurczliwego	Gen	Lokalizacja genu	Miejsce ekspresji genu
β-MyHC	MYH7	14q11.2-q13	Mięsień sercowy i wolny mięsień szkieletowy
ELC s/v	MYL3	3p21.2-p21.3	Mięsień sercowy i wolny mięsień szkieletowy
RLC s/v	MYL2	12q23-q24.3	Mięsień sercowy i wolny mięsień szkieletowy
cTnT	TNNT2	1q32	Mięsień sercowy
cTnI	TNNI3	19p13.2-q13.2	Mięsień sercowy
α-TM	TPM1	15q22	Mięsień sercowy i szybki mięsień szkieletowy
cMyBP-C	MYBPC3	11p11.2	Mięsień sercowy
cAktyna	ACTC	15q14	Mięsień sercowy
Tytyna	TTN	2q24.3	Mięsień sercowy i mięsień szkieletowy
?	?	7q3	?

c — oznacza izoformę występującą w mięśniu sercowym

Badania genetyczne ostatnich lat doprowadziły do istotnego postępu w zdefiniowaniu molekularnej patogenezы hypertroficznej kardiomiopatii. Różnorodność mutacji w obrębie genów odpowiedzialnych za powstanie choroby sprawia, że często pojedynczy objaw kliniczny w rzeczywistości reprezentuje grupę genetycznie odmiennych zaburzeń. Analiza funkcjonalna pokazała, że defekty w białkach sarkomeru prowadzą do zmian w generowaniu siły przez sercowe miocyty. Taki chroniczny bodziec może być przyczyną kompensacyjnego przerostu komórek mięśnia sercowego. Jak wykazały badania mikroskopowe, niejednorodnie przerośnięte włókna mięśniowe są nieuporządkowane na rozległych obszarach i chaotycznie ułożone w różnych kierunkach. Brak uporządkowania jest prawdopodobnie jedną z przyczyn obserwowanej w kardiomiopatii przerostowej nieprawidłowej sztywności rozkurczowej i zaburzeń rytmu serca. Choć kardiomiopatia przerostowa może obejmować dowolny fragment komory, to najczęściej (~90% przypadków) spotyka się asymetryczny przerost przegrody międzykomorowej. W wielu przypadkach przerostowi temu towarzyszą zaburzenia funkcji przedniego płata zastawki mitralnej (dwudzielnej), co może ograniczać przepływ krwi do aorty. Patologia zastawki, obserwowana u około 66% pacjentów (KLUES i współaut. 1992), obejmuje najczęściej jej stan zapalny, zgrubienie, tworzenie płytek i skrzepów. Ponieważ zastawki nie zawierają mięśniówki serca (*myocardium*) i prawdopodob-

nie też nie ekspresjonują zmutowanych białek, ich uszkodzenia obserwowane w FHC są raczej efektami wtórnymi, wynikającymi z mechanicznego urazu płotka zastawki, powstającego na skutek zmian w architekturze hipertroficzej komory. Przerośnięty mięsień komory wykazuje zwiększone zapotrzebowanie na tlen. Pierwszym i często jedynym objawem choroby, szczególnie u ludzi młodych może być ich nagły zgon w trakcie dużego wysiłku fizycznego.

Badania procentowego udziału mutacji poszczególnych genów kodujących białka sarkomeryczne w rozwoju kardiomiopatii przerostowej wykazały, że 15% wszystkich przypadków tej choroby wywołane jest mutacjami w

genie kodującym jeden z trzech składników troponiny — troponinę T. Taki sam udział w rozwoju FHC mają mutacje genu kodującego białko C, 3% przypadków wiąże się z mutacjami w genach tropomiozyny α i troponiny I, a 1% z mutacjami w lekkich łańcuchach miozyny — istotnym i regulującym (DOMAŁ-KWIATKOWSKA i współaut. 2000). Najwięcej, bo ponad 35% zachorowań na hipertroficzną kardiomiopatię rodzinną wywołują punktowe mutacje w genie *MYH 7* kodującym izoformę β ciężkiego łańcucha miozyny mięśnia sercowego człowieka. Temu zagadnieniu poświęcony jest niniejszy artykuł.

CIEŻKI ŁAŃCUCH MIOZINY I JEGO IZOFORMY

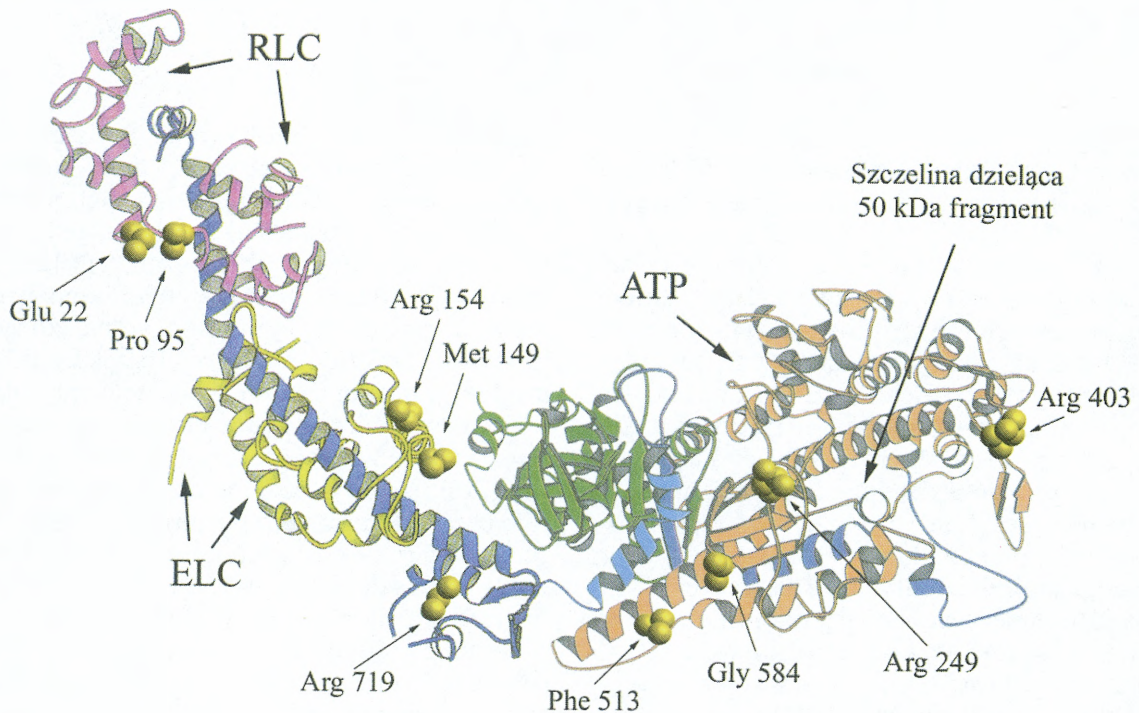
Miozyna — główny składnik filamentu grubego, jest molekularnym motorem, który przekształca energię chemiczną w pracę skurczu mięśnia. Zbudowana jest z dwóch łańcuchów ciężkich (MHCs), tworzących pałeczkę i dwie główki, oraz dwóch par łańcuchów lekkich (LCs), związanych ze strukturą główek (patrz też art. PLISZKI w tym numerze KOSMOSU). W mięśniu sercowym człowieka zidentyfikowano izoformy α i β ciężkich łańcuchów miozyny, będące produktami dwóch różnych genów. Izofорма β jest prawie wyłączną formą w komorach ludzkiego serca (~90%), obserwowaną tam we wszystkich przedziałach wieku. Ulega także ekspresji w przedsionkach oraz w wolno kurczących się mięśniach szkieletowych. Prędkość skurczu serca zawiera głównie izoformę typu α (BOUVAGNET i współaut. 1984). Dojrzałe serca gryzoni, w których wzór izoform MHCs w porównaniu z mięśniem sercowym człowieka jest nieco odmienny, adaptują się do zwiększonych hemodynamicznych wymagań poprzez reekspresję genów płodowych. Chroniczne przeciążenie pracą komory szczerzego serca indukuje przejście dominującej tu formy α ciężkiego łańcucha, o wysokiej aktywności ATP-azowej, w formę typu β , która wykazuje niższą aktywność ATP-azy, co koreluje z niższą maksymalną szybkością skracania włókien. Przekształcenie molekularnego fenotypu związane jest ze zmianami funkcji skurczowej i stanu energetycznego serca. W dotkniętych hipertrofią przedsionkach serca człowieka także obserwowano pojawianie się znacznych ilości izoformy β -MHC, która w prawidłowych warunkach prawie tam nie występuje (CUMMINS i LAMBERT 1986). Obecności β -MHC w przedsionkach towarzyszył spadek maksymalnej szybkości skracania włókien i wzrost wydajności skurczu (ARNDT i

współaut. 1989). Oczekiwano, że w podobny sposób regulowana jest kurczliwość komór ludzkiego serca w różnych jego stanach patologicznych. Liczne badania wskazują jednak na istnienie innego mechanizmu regulacji niż zmiana wzoru izoform ciężkich łańcuchów miozyny. Mimo, że w komorach serca zdrowego człowieka obok dominującej tu formy β -MHC występują też niewielkie ilości izoformy α -MHC (~ 4%), nie ustalono dotychczas czy może to mieć istotne znaczenie fizjologiczne, tym bardziej, że różnice w poziomach ekspresji α -MHC między komorami serc pacjentów z kardiomiopatią przerostową, a komorami serc kontrolnych wynoszą mniej niż 1% (RITTER i współaut. 1999). Gen *MYH 7* kodujący izoformę β ciężkiego łańcucha miozyny oraz *MYH 6* kodujący izoformę α -MHC znajdują się na długim ramieniu chromosomu 14q 11.2- q13. (SAEZ i współaut. 1987).

Zidentyfikowano ponad 50 mutacji w *MYH 7*. Są one często przyczyną nagłej śmierci obciążonych nimi pacjentów, ale niektóre wiążą się z łagodnym przebiegiem choroby. Zdecydowana większość mutacji znalezionych w genie *MYH 7* występuje w rejonie główki, czyli subfragmencie-1 (S1) miozyny. Pozostałe, znalezione w początkowym fragmencie pałeczkowatej części miozyny — subfragmencie-2 (S2), skupione są bliżej połączenia S1-S2. Główki, będące N-końcowymi fragmentami ciężkiego łańcucha, we wszystkich typach mięśni charakteryzują się wspólnym schematem budowy pomimo występowania istotnych często różnic w sekwencji aminokwasowej tworzących je łańcuchów polipeptydowych. Poznanie krystalicznej struktury główki miozyny (RAYMENT i współaut. 1993, RAYMENT i HOLDEN 1994) pozwoliło na wyróżnienie w niej dwóch domen: (i) motorycz-

nej – obejmującej dystalną część główki zawierającą miejsce wiązania i hydrolizy ATP, a także miejsca kontaktu z aktyną i (ii) regulatorowej – utworzonej przez C-końcowy fragment ciężkiego łańcucha S1 oraz niekowalencyjnie związane z nim łańcuchy lekkie (Ryc. 2). Domena motoryczna, zwana również katalityczną, zbudowana jest wyłącznie z łańcucha ciężkiego, obejmując jego fragment N-końcowy (25 kDa), centralny (50 kDa) i część fragmentu C-końcowego, którego masa cząsteczkowa wynosi 20 kDa. Miejsce katalityczne znajduje się w N-końcowym fragmencie, natomiast 50 kDa centralny fragment, podzielony długą wąską szczeliną na

czenia tych mutacji posłużono się krystaliczną strukturą główki miozyny mięśnia szkieletowego kury (RAYMENT i współaut. 1993). Naniesienie na nią mutacji znalezionych w izoformie β ciężkiego łańcucha miozyny komórek mięśnia sercowego człowieka pokazało, że nie są one rozmieszczone w sposób przypadkowy, lecz skupione wokół ważnych pod względem funkcjonalnym i strukturalnym rejonów S1, a mianowicie przy powierzchni oddziaływania główki miozyny z aktyną, wokół kieszeni katalitycznej oraz w jej wnętrzu, w rejonie zawierającym reaktywne grupy tiolowe i w domenie regulatorowej główki miozyny, obejmując zarówno ciężki łańcuch



Ryc. 2. Struktura główki miozyny mięśnia szkieletowego kury, z zaznaczeniem reszt aminokwasowych odpowiadających punktowym mutacjom w genie kodującym izoformę β ciężkiego łańcucha miozyny komórek mięśnia sercowego człowieka. Rycinę przygotowano w oparciu o współrzędne atomowe S1 z pliku Protein Data Bank.

dwie subdomeny – górną i dolną, zawiera po obu jej stronach miejsca kontaktu z aktyną. Z obecnych w domenie regulatorowej dwóch łańcuchów lekkich, łańcuch zwany istotnym (ELC) połączony jest ze środkową częścią α -helikalnego, C-końcowego fragmentu ciężkiego łańcucha S1, natomiast regulujący (RLC) owija się wokół α -helisy ciężkiego łańcucha główki w jego końcu C.

Krystaliczna struktura główki miozyny mięśnia sercowego nie została dotychczas poznana, dlatego dla zinterpretowania efektów zmian indukowanych przez podstawienia w genie *MYH7* oraz określenia funkcjonalnego zna-

tworzący trzon tej domeny, jak i związane z nim lekkie łańcuchy – istotny i regulujący (RAYMENT i współaut. 1995). Mimo, że interpretacja efektów wszystkich zlokalizowanych dotychczas w genie *MYH7* podstawień nie jest jeszcze możliwa ze względu na brak wystarczającej ilości badań, to dokładna charakterystyka niektórych z nich ujawniła, że mutacje w ciężkim łańcuchu typu β mają znaczący wpływ na strukturę i funkcję mięśnia sercowego. Już sama ich lokalizacja dostarcza pewnych informacji o sposobie wywoływania przez nie zaburzeń w funkcjonowaniu molekularnego motoru, jakim jest miozyna.

MUTACJE W REJONIE ODDZIAŁYWANIA GŁÓWKI MIOZINY Z AKTYNĄ

Jedną z najwcześniej poznanych i najlepiej scharakteryzowanych grup mutacji w β -MHC zlokalizowana jest w górnej subdomenie 50 kDa centralnego fragmentu ciężkiego łańcucha S1, przy powierzchni oddziaływania miozyny z aktyną. Badania efektów niektórych spośród zidentyfikowanych w tym rejonie podstawień aminokwasowych wykazały, że mogą one destabilizować lub zmieniać strukturę miejsc kontaktu z aktyną przyczyniając się w ten sposób do osłabienia akto-miozynowych oddziaływań w procesie generowania siły. Największe zainteresowanie wzbudziła arginina 403, której odpowiednikiem w miozynie mięśnia szkieletowego kury jest arginina 405. Aminokwas ten znajduje się u podstawy pętli (Pro404-Lys415), która wysunięta nieco ze struktury główki miozyny stanowi część akto-miozynowej powierzchni kontaktowej. Jak wykazała analiza rentgenostrukturalna, nie bierze on udziału w żadnych specyficznych oddziaływaniach z innymi resztami aminokwasowymi S1. Przypuszcza się natomiast, że bezpośrednio oddziałuje z aktyną lub stabilizuje pętlę wiążącą aktynę (RAYMENT i współaut. 1995). Arginina 403 może być zastąpiona w wyniku mutacji przez glutaminę, leucynę lub tryptofan. Te trzy niezależne mutacje towarzyszące kardiomiopatii przerostowej są przyczyną odmiennych cech klinicznych choroby. O ile bowiem podstawienie Arg403 tryptofanem lub leucyną powoduje stosunkowo łagodny przebieg choroby, to mutacja Arg403→Gln jest przyczyną wysokiej śmiertelności wśród obciążonych nią ludzi, którzy zazwyczaj umierają przed 40 rokiem życia. Badania miozyny z mutacją Arg403→Gln, pochodzącej z mięśnia sercowego człowieka, wykazały spadek szybkości przemieszczania przez nią filamentów aktynowych w teście ruchliwości *in vitro* oraz poważną redukcję stymulowanej przez aktynę aktywności MgATP-azowej miozyny (CUDA i współaut. 1993). Także włókna wyizolowane z wolnego mięśnia szkieletowego pacjentów z tą mutacją wykazywały spadek maksymalnej szybkości skracania i znaczną redukcję generowanej przez nie siły izometrycznej w porównaniu z włóknami zdrowymi (CUDA i współaut. 1993, 1997).

Aby prawidłowo zinterpretować strukturalne i funkcjonalne skutki mutacji, niezbędne jest zrozumienie zależności między zachodzącymi w mięśniu procesami chemicznymi, w wyniku których uwalniana jest energia, a zjawiskami mechanicznymi, w których ta energia jest

wykorzystywana (szerzej problem ten omówiony jest w art. PLISZKI w tym numerze KOSMOSU). Dotychczasowe wyniki badań oraz nowe hipotezy dotyczące tych zagadnień można streścić następująco: skurcz mięśnia jest wynikiem cyklicznego oddziaływania główek miozyny z filamentami aktyny. Proces ten sprzężony jest z hydrolizą jednej cząsteczki ATP w każdym cyklu. Badania kinetyczne wykazały, że powinowactwo S1 do aktyny spada wraz z wiązaniem ATP w centrum katalitycznym, a następująca po tym hydroliza nukleotydu zachodzi bez udziału aktyny. Rolą aktyny jest natomiast przyspieszanie uwalniania ortofosforanu (P_i), jednego z produktów hydrolizy ATP. Reakcja ta przywraca wysokie powinowactwo główki miozyny do filamentów aktyny i jej właśnie towarzyszą zmiany struktury główki połączone z zamianą energii chemicznej w pracę, czyli przesunięciem filamentu aktynowego o pewien odcinek. Miejsca kontaktu domeny motorycznej S1 z aktyną oraz wiązania nukleotydu w centrum katalitycznym oddalone są od siebie o około 4–5 nm. Analiza krystalicznej struktury główki miozyny sugeruje, że przenoszenie informacji pomiędzy tymi rejonami zachodzi podczas otwierania/zamykania szczeliny znajdującej się w centralnym fragmencie ciężkiego łańcucha która, jak już wcześniej wspomniano, rozciąga się od miejsc oddziaływania S1 z aktyną do podstawy kieszeni katalitycznej, gdzie znajduje się pętla wiążąca fosforan γ ATP. Do zmian szerokości szczeliny dochodzi w wyniku rotacji dolnej subdomeny centralnego fragmentu ciężkiego łańcucha S1 względem subdomeny górnej. Gdy wiązany jest ATP, zarówno kieszeń katalityczna, jak i szczelina są otwarte (stan otwarty). Hydroliza nukleotydu wymaga zamknięcia kieszeni, co wyzwala zmiany zamykające szczelinę (stan zamknięty główki). Na tym etapie oba produkty hydrolizy: P_i i ADP, znajdują się jeszcze w centrum katalitycznym. Połączenie główki miozyny z aktyną prowadzi do uwolnienia P_i i jednocześnie ponownego otwarcia szczeliny. Jaka jest jednak dokładna kolejność tych zjawisk, dotychczas nie ustalono, nie ma bowiem możliwości wykrycia S1 połączonego z aktyną. Istnieją natomiast dowody na to, że przejściu od stanu zamkniętego do otwartego towarzyszą zmiany konformacji kilku rejonów domeny motorycznej, które z kolei inicjują obrót całej domeny regulatorowej. Domena regulatorowa jest sztywnym elementem działającym na zasadzie ramienia dźwigni. Ruch ra-

mienia, które w jego końcu C połączone jest z nieruchomym filamentem miozynowym, powoduje w efekcie przesunięcie filamentu aktynowego, przez „silnie” z nim związaną domenę motoryczną główki, o około 10 nm w kierunku centrum sarkomeru. Można zatem przypuszczać, że mutacje powodujące zaburzenie któregoś etapu wymienionych wyżej procesów, bądź trwale zmiany strukturalne w tych rejonach główki, które ważne są dla ich wzajemnej komunikacji, spowodują upośledzenie czynności skurczowej mięśnia. Badania miozyny *Dictyostelium discoideum* wykazały, że sztu-

cznie indukowane mutacje punktowe, położone w dolnej subdomenie 50 kDa fragmentu blisko powierzchni oddziaływania z aktyną, wywołują wyraźny spadek szybkości przemieszczania przez zmodyfikowaną miozynę filamentów aktynowych w testach ruchliwości *in vitro*, przy niezmienionej aktywności ATP-azowej (FUJITA i współaut. 1997). Sugeruje to, że towarzyszące kardiomiopatii przerostowej mutacje w miejscach kontaktu główki miozynowej z aktyną mogą prowadzić do częściowego zaburzenia przekształcania energii chemicznej w ruch.

MUTACJE W REJONIE KIESZENI WIĄŻĄCEJ NUKLEOTYD

Wśród znalezionych w rejonie kieszeni katalitycznej mutacji związanych z kardiomiopatią przerostową wyróżnia się te położone we wnętrzu kieszeni oraz umiejscowione na zewnątrz, u jej podstawy, przy powierzchni białka. Podlegające mutacji reszty aminokwasowe, położone wewnątrz kieszeni wiążącej nukleotyd, znajdują się albo w bliskim sąsiedztwie pętli wiążącej fosforan, a ich łańcuchy boczne wchodzi w skład struktur tworzących część podstawy miejsca aktywnego, lub wpływają na ułożenie innych reszt bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie fosforanu. Zakłada się, że wszelkie zmiany aminokwasów w tym rejonie mogą wpływać na pozycję krytycznych reszt w kieszeni nukleotydu i zmieniać przez to katalityczną funkcję cząsteczki miozyny oraz jej właściwości kinetyczne (RAYMENT i współaut. 1995). Mutacje zlokalizowane u podstawy kieszeni wiążącej nukleotyd obejmują dosyć liczną grupę aminokwasów, których łańcuchy boczne najczęściej skierowane są ku powierzchni białka. Położone w pobliżu szczeliny dzielącej 50 kDa fragment S1, blisko rejonu przypuszczalnego wiązania aktyny, mogą mieć wpływ zarówno na międzydomenowe oddziaływania, jak i na kontakt S1 z aktyną. Ponadto bliskie sąsiedztwo kieszeni nukleotydu i zależne od ładunku oddziały-

wania podlegających mutacji reszt z resztami aminokwasowymi bezpośrednio zaangażowanymi w wiązanie i hydrolizę ATP sugerują, że jakiegokolwiek zmiany ładunku, powstałe w wyniku wprowadzenia nowego aminokwasu, będą negatywnie wpływać na aktywność miozynowej ATP-azy. Przykładem tego jest efekt mutacji w wyniku której Arg 249 zastępowana jest glutaminą. Zmodyfikowana w ten sposób miozyna uzyskana z serc transgenicznym myszy wykazywała prawie dwukrotny spadek aktywności ATP-azowej w porównaniu z miozyną typu dzikiego. Obserwowano też podobny spadek szybkości przemieszczania przez nią filamentów aktynowych w testach ruchliwości *in vitro* (ROPNARINE i LEINWAND 1998). Arginina 249 znajduje się u podstawy kieszeni katalitycznej w odległości ~ 29 Å od pętli wiążącej fosforan. Łańcuchy boczne tej reszty aminokwasowej skierowane są ku powierzchni cząsteczki w stronę szczeliny dzielącej centralny fragment ciężkiego łańcucha główki (RAYMENT i współaut. 1995). Przypuszcza się, że mutacja w tym miejscu może zaburzać ruch dolnej subdomeny zamkniętej szczeliny. U pacjentów z tego typu mutacją obserwuje się łagodny przebieg choroby i rzadkie przypadki wystąpienia nagłej śmierci.

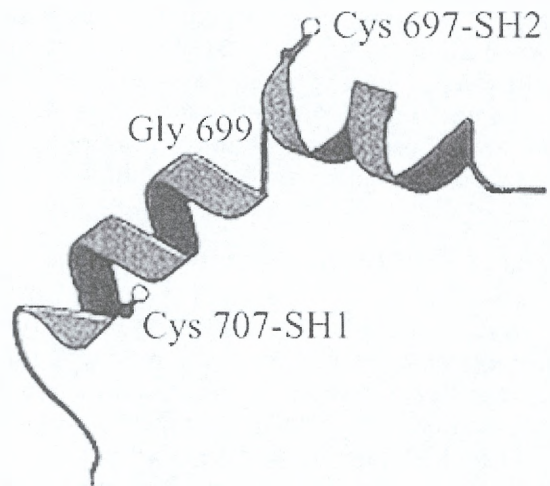
MUTACJE W REJONIE ZAWIERAJĄCYM REAKTYWNE GRUPY TIOLOWE

W subdomenie dolnej 50 kDa fragmentu S1 miozyny mięśnia sercowego zlokalizowano mutacje, z których dwie: Phe513→Cys i Gly584→Arg, położone są blisko Cys705 i Cys695 wchodzących w skład biegnącej pod kieszenią nukleotydu α -helisy stanowiącej fragment C-końcowego segmentu ciężkiego łańcucha główki. Resztom tym w mięśniach szkieleto- kury odpowiadają Cys707 i Cys697, a ich wysoce reaktywne grupy tiolowe znane są

jako SH1 i SH2. Wiadomo, że chemiczna modyfikacja obu cystein wpływa na aktywność ATP-azową miozyny (SLEEP i współaut. 1981), a indukowane wiązaniem nukleotydu zmiany konformacyjne w domenie motorycznej główki obejmują również helikalne fragmenty zawierające te reszty aminokwasowe (DUKE i współaut. 1976, BURKE i REISLER 1977).

W helisie z reaktywnymi cysteinami znajdują się też trzy glicyny: Gly699, Gly703 i Gly710,

reszty pełniące często funkcję „zawiasów” w białkach. Wyniki licznych eksperymentów podkreślają szczególną rolę glicyny 699, która znajduje się w miejscu zagięcia helisy, stanowiąc łącznik pomiędzy dwoma jej krótkimi fragmentami, z których jeden zawiera grupę SH1(Cys707), a drugi SH2 (Cys697) (Ryc. 3). Doświadczenia polegające na zastąpieniu Gly699 innymi aminokwasami sugerują, że reszta ta odgrywa kluczową rolę w zmianach wzajemnej orientacji fragmentów łańcucha zawierających grupy SH1 i SH2 (HUSTON i współaut. 1988) uczestniczących, jak się uważa, w łączeniu zmian konformacyjnych zachodzących w domenie motorycznej z ruchem domeny regulatorowej (ramienia dźwigni). Zastąpienie glicyny 699 alaniną w embrionalnej miozynie kury spowodowało zahamowanie jej motorycznej aktywności oraz znaczny spadek aktywności ATP-azowej (KINOSE i współaut. 1996). Podobne badania przeprowadzono na miozynie z *Dictyostelium discoideum* (PATTERSON i współaut. 1997), gdzie indukowane mutacje redukowały szybkość wędrowania filamentów aktynowych po opłaszczonej zmutowaną miozyną powierzchni do 10% szybkości prawidłowej. Obserwowano też utratę stymulacji ATP-azowej aktywności miozyny przez aktynę, co wyjaśnia przyczynę jej zmniejszonej aktywności motorycznej. Sugeruje się, że zaburzenie ruchliwości może wynikać



Ryc. 3. Rozmieszczenie reszt Cys707 i Cys 697 z reaktywnymi grupami tiolowymi SH1 i SH2 odpowiednio, oraz Gly 699 w helikalnym fragmencie ciężkiego łańcucha główki miozyny.

z wydłużenia czasu trwania kompleksu AM •ADP lub kompleksu AM w trakcie hydrolizy każdej cząsteczki ATP (AM-akto-miozyna). W świetle tych wyników można przypuszczać, że wymienione na wstępie naturalne mutacje, znalezione w sąsiedztwie reaktywnych reszt cysteinowych mogą mieć wpływ na przekazywanie zmian konformacyjnych z domeny motorycznej do domeny regulatorowej.

MUTACJE NA POGRANICZU DOMEN MOTORYCZNEJ I REGULATOROWEJ

Jak wynika ze struktury główki miozynowej, helikalny fragment z grupą SH1 (tzw. helisa SH1) może oddziaływać z większą helisą, zwaną przekaźnikiem, która wychodzi ze szczeliny i biegnie poniżej kieszeni wiążącej nukleotyd w kierunku domeny regulatorowej główki (patrz Ryc.5 w art. PLISZKI w tym numerze KOSMOSU). Helisa ta prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w transmitowaniu do ramienia dźwigni zmian strukturalnych zachodzących w domenie motorycznej podczas oddziaływania miozyny z aktyną oraz wiązania nukleotydu. Krótka helisa SH1 przechodzi bezpośrednio w małą, zwartą domenę wyznaczoną przez reszty aminokwasowe 711–781 sąsiadującą z domeną regulatorową. Domena ta, nazwana „konwerterem”, podczas zamykania/otwierania szczeliny pomiędzy subdomenami 50 kDa fragmentu ulega rotacji o kąt ~ 70. Wywołane jest to ruchem obrotowym przekaźnika i towarzyszącą temu zmianą ułożenia helisy SH1. Jak wynika z badań krystalograficznych, osią obrotu konwertera są reszty aminokwasowe 707–711 wchodzące w skład dystalnego fragmentu helisy SH1 (HOUDUSSE i

COHEN 1996; patrz też art. przegl. GEEVES i HOLMES 1999). W rejonie konwertera zidentyfikowano cztery naturalnie występujące mutacje. Wszystkie zlokalizowane są w tej części ciężkiego łańcucha, która graniczy lub bezpośrednio tworzy powierzchnię kontaktu z lekkim łańcuchem istotnym miozyny. Testy ruchliwości *in vitro*, którym poddano miozynę z mutacją Arg 719→Gln położoną w obszarze graniczącym z miejscem wiązania ELC, wykazały wzrost szybkości przemieszczania filamentów aktynowych w porównaniu z miozyną kontrolną (POETTER i współaut. 1996). Przeprowadzono także badania kurczliwości włókien zawierających miozynę z mutacją Gly741→Arg znajdującą się w pobliżu miejsca wiązania ELC. Poddane analizie włókna pochodziły z mięśnia płaszczkowego łydki (*soleus*), zawierającego od 75% do 90% wolno kurczących się włókien, których izoforma β -MHC, identyczna z izoformą występującą w miozynie komór serca, kodowana jest przez ten sam gen znajdujący się na chromosomie 14 (CUDA i współaut. 1993, 1997). Zmutowana forma β -MHC ulega ekspresji w wolnym mięśni

szkieletowym pacjentów z hipertroficzną kardiomiopatią. Podstawienie Gly741 arginina powodowało redukcję maksymalnej szybkości skracania włókien do 39% wartości prawidłowych oraz 58% spadek generowanej przez nie siły izometrycznej (LANKFORD i współaut. 1995).

DOMENA REGULATOROWA GŁÓWKI MIOZINY I JEJ MODYFIKACJE

Mutacje zlokalizowane w domenie regulatorowej obejmują zarówno lekkie łańcuchy, jak i łańcuch ciężki, a dokładniej te jego fragmenty, które wchodzi w skład powierzchni wspólnej dla MHC i lekkiego łańcucha istotnego. Wiązanie lekkich łańcuchów przez C-końców α -heliś ciężkiego łańcucha zapewnia jej sztywność, niezbędną do pełnienia funkcji ramienia dźwigni. Usunięcie jednego lub obu lekkich łańcuchów prowadzi do spadku ruchliwości filamentów aktynowych *in vitro* bez istotnego obniżenia aktywności ATP-azowej miozyny (LOWEY i współaut. 1993), natomiast wbudowanie dodatkowych segmentów ciężkiego łańcucha wraz z łańcuchami istotnymi powoduje, że zmodyfikowana miozyna przemieszcza filamenty aktywne szybciej niż miozyna kontrolna (UYEDA i współaut. 1996). Całkowite usunięcie domeny regulatorowej wywołuje około 90% redukcję ruchliwości *in vitro*, choć nie zmienia funkcji katalitycznej miozyny (ITAKURA i współaut. 1993,

Badane włókna wykazywały też zmienioną sztywność co, jak sugerują autorzy, może być związane ze zmianą elastyczności rejonu konwertera w którym występuje mutacja, utrudniająca transmisję siły z domeny motorycznej do ramienia dźwigni.

WALLER i współaut. 1995). Eksperymenty *in vivo*, w których sprawdzano jakie zmiany w funkcjonowaniu mięśnia sercowego wyzwała pozabawienie miozyny jej domeny regulatorowej, wykazały asymetryczny przerost badanych serc, ograniczony pierwotnie do ich przedniej ściany. Analiza histologiczna potwierdziła wyraźną hipertrofię miocytów i zaburzenie ich organizacji. Obserwowano też ciężką w przebiegu patologię zastawek serca. Włókna wyizolowane z takich serc wykazywały zmniejszenie zależności rozwijanego napięcia od stężenia jonów wapnia oraz spadek szybkości rozkurczu (WELIKSON i współaut. 1999). Z przeprowadzonych doświadczeń wynika zatem, że zaburzenia produkcji siły, wywołane przez mutacje wpływające na funkcjonowanie domeny regulatorowej jako ramienia dźwigni, mogą być wystarczające dla wyzwolenia rozwoju hipertroficznego kardiomiopatii.

MUTACJE W LEKKICH ŁAŃCUCHACH MIOZINY

W sercu człowieka ekspresji ulegają dwie izoformy lekkich łańcuchów istotnych, będące produktami dwóch różnych genów: forma przedsionkowa (ALC1), zbudowana ze 196 aminokwasów, kodowana przez gen umieszczony na chromosomie 17q21 (SEHARASEYON i współaut. 1990), oraz forma komorowa (VLC1), zbudowana ze 194 aminokwasów i kodowana przez gen, który w sercu człowieka umieszczony jest na chromosomie 3p21 (FODOR i współaut. 1989). VLC1 jest identyczny z izoformą, która występuje w dojrzałym, wolno kurczącym się mięśniu szkieletowym. W okresie życia płodowego izoforma przedsionkowa łańcucha istotnego występuje w dużych ilościach w całym sercu, a więc zarówno w komorach, jak i przedsionkach. Po urodzeniu jej ilość w komorach gwałtownie spada, jednakże w przypadku różnych wad rozwojowych serca nadal utrzymuje się na wysokim poziomie (AUCKLAND i współaut. 1986, MOCZARSKA 1997). U dorosłego człowieka pojawianie się ALC1 w komorach serca wyzwalane jest obecnością takich chorób, jak np. kardiomiopatia przerostowa (HCM), kardiomi-

opatia rozstrzeniowa (IDC-idopathic dilated cardiomyopathy) (MORANO i współaut. 1997), czy uszkodzenie funkcji zastawek (SÜTSCH i współaut. 1992), i może stanowić mechanizm adaptacyjny, który poprzez zmianę ekspresji genu kodującego lekkie łańcuchy istotne, kompensuje wymagania wzmożonej pracy serca lub zaburzonej funkcji sarkomeru. Regulacja ekspresji ALC1 w ludzkim sercu nie została dokładnie poznana. Nie wiadomo także, w jakim stopniu i w jaki sposób izoformy lekkich łańcuchów miozyny wpływają na kinetykę oddziaływania główek miozyny z filamentem aktynowym. Wpływ ELC może zależeć od cyklicznego wiązania jego końca N z aktyną. Niedawne badania wykazały, że ciężki łańcuch główki miozyny i lekki łańcuch istotny oddziałują nie z tym samym, lecz z dwoma sąsiednimi monomerami aktyny w filamencie aktynowym (TIMSON i współaut. 1998). Zaproponowano zatem, że ELC stanowi łącznik w oddziaływaniu MHC z drugim monomerem aktyny. Kompetycyjne zablokowanie tego oddziaływania przez wprowadzenie syntetycznego peptydu o sekwencji koń-

ca N łańcucha istotnego podnosi produkcję siły i szybkość skracania wyizolowanych włókien. Wysznięto hipotezę, że wzmocnienie wiązania główek z aktyną przez kontakt z ELC stanowi dla nich dodatkowe „obciążenie” prowadzące do zmniejszenia szybkości aktomiozynowego cyklu (MORANO i współaut. 1995, MORANO i HAASE 1997). Sekwencja aminokwasowa końca N izoformy przedsionkowej ELC jest wyraźnie różna od sekwencji końca N formy komorowej (FODOR i współaut. 1989), a to powoduje, że wiązanie ALC1 z aktyną jest słabsze, co zwiększa siłę generowaną przez miozynę zawierającą tę izoformę. Wydaje się zatem, że oddziaływanie końca N lekkiego łańcucha istotnego z aktyną jest jednym z mechanizmów kontrolujących kinetykę oddziaływania główek miozyny z filamentem aktynowym i generowania siły (patrz też art. MOCZARSKIEJ 1999).

Jeżeli, jak wyżej wspomniano, ELC jest dodatkowym łącznikiem w oddziaływaniach MHC/aktyna, to osłabienie jego interakcji z ciężkim łańcuchem miozyny powinno wywołać zmiany w funkcjonowaniu główek, podobnie jak to ma miejsce w przypadku osłabienia wiązania aktyna/ELC (MORANO i współaut. 1996). Założenie to potwierdzają wyniki badań aktywności motorycznej miozyny pochodzącej od pacjentów z kardiomiopatią HOCM (ang. hypertrophic obstructive cardiomyopathy) charakteryzującą się przerostem mięśni brodawkowatych lewej komory serca, a wywołaną punktową mutacją polegającą na zastąpieniu w ELC metioniny-149 waliną. Metionina-149 znajduje się przy powierzchni kontaktu ELC z łańcuchem ciężkim. Badania ruchliwości *in vitro* tak zmutowanej miozyny wykazały wzrost szybkości przemieszczania filamentów aktynowych. Podobny wzrost aktywności motorycznej obserwowano w przypadku miozyny z omawianą wcześniej mutacją Arg719→Gln w ciężkim łańcuchu, blisko powierzchni kontaktu MHC/ELC, i w rzadko spotykanej punktowej mutacji Arg154→His w łańcuchu istotnym, w miejscu jego oddziaływania z ciężkim łańcuchem miozyny (POETTER i współaut. 1996). Wyniki te wskazują, że zaburzenie oddziaływania łańcucha ciężkiego z lekkim łańcuchem istotnym, rzeczywiście zmienia funkcjonowanie główki miozyny.

Zmiany kurczliwości mięśnia sercowego mogą być także wywołane mutacjami punktowymi zlokalizowanymi w lekkim łańcuchu regulującym. Chociaż obecny stan wiedzy pozwala jedynie spekulować na temat mechanizmów, które przy udziale RLC mogą prowadzić do zmiany funkcji skurczowej serca, to towarzysząca często mutacjom tych łańcuchów hipertrofia kardiomiocytów wskazuje, że modyfikacja

struktury łańcucha regulującego wyzwała procesy kompensujące osłabienie funkcji skurczowej i jednocześnie adaptujące serce do pracy w nowych warunkach. Poznanie tych zjawisk może ułatwić zrozumienie roli łańcuchów regulujących w oddziaływaniu główek miozyny z aktyną w procesie skurczu mięśnia. Badania miozyny z mięśni szkieletowych wykazały, że usunięcie łańcuchów regulujących w sposób istotny obniża szybkość przemieszczania filamentów aktynowych w testach ruchliwości *in vitro* (LOWEY i współaut. 1993). Natomiast częściowa wymiana komorowych RLC na izoformy szkieletowe w sercach myszy transgenicznych prowadziła do spadku kurczliwości lewej komory serca i zaburzenia jej funkcji rozkurczowej (GULLICK i współaut. 1997). Uszkodzenie genu kodującego komorowe formy łańcucha regulującego prowadzi do dezorganizacji sarkomeru i rozwoju kardiomiopatii rozstrzeniowej (CHEN i współaut. 1998). Wszystkie te obserwacje wskazują, że dla prawidłowej struktury oraz funkcji mioocytów serca potrzebne są nieuszkodzone łańcuchy regulujące.

W sercu ludzkim znaleziono kilka izoform lekkich łańcuchów regulujących: formę przedsionkową (ALC2), którą koduje gen o nie poznanej dotąd lokalizacji, oraz dwie formy komorowe: VLC2a i VLC2b mające ten sam ciężar cząsteczkowy, ale różne punkty izoelektryczne, a kodowane przez gen umieszczony na chromosomie 12q23-q24. (MACERA i współaut. 1992). Interesująca jest fizjologiczna rola izoenzymów VLC2. Badania miozyny uzyskanej z komórek serc pacjentów cierpiących na kardiomiopatię HOCM wykazały wyraźny spadek ekspresji formy VLC2a na korzyść formy VLC2b (RITTER i współaut. 1999). Czy zatem łańcuch regulujący ma wpływ na kinetykę oddziaływania główek miozyny z aktyną, a zmiana ekspresji jego komorowych izoform reguluje kurczliwość kardiomiocytów? Przemawia za tym fakt, iż polimorfizm RLC występuje w wolno kurczących się komorach serca ludzkiego, czy też w mięśniu *soleus*, a nie wykazują go szybko kurczące się przedsionki serca człowieka ani podobnie szybko pracujące komory serca szczura. Jednak pozostaje też wiele znaków zapytania. Dlaczego, na przykład, u większości pacjentów z poważnym upośledzeniem funkcji skurczowej serca wywołanym różnymi jego chorobami proporcje izoenzymów VLC2 pozostają niezmienione?

Koniec N lekkiego łańcucha regulującego zawiera miejsce wiążące kationy dwuwartościowe (Ca^{2+} , Mg^{2+}), a także miejsce fosforylacji, przy czym formy VLC2 serca człowieka ulegają fosforylacji w jednym miejscu (seryna 15), a izoforma przedsionkowa może być mono- i difo-

sforolowana (seryna 21 i 22) (MORANO i współaut. 1989). Fosforylację katalizuje kinaza lekkich łańcuchów miozyny, która aktywowana jest przez odwracalne, zależne od jonów wapnia wiązanie kalmoduliny. Fosforylacja RLC inicjuje skurcz mięśnia gładkiego. W mięśniu sercowym i szkieletowym nie jest potrzebna dla wyzwolenia aktywności skurczowej. Jaką zatem funkcję pełni fosforylacja łańcuchów regulujących w mięśniu sercowym? Podczas skurczu i rozkurczu ludzkiego serca poziomy fosforylacji RLC nie zmieniają się. Wynika to z ciągłej aktywacji kinazy lekkich łańcuchów w czasie cyklu pracy serca. Obserwacje fizjologiczne szczurów ujawniły, że starzeniu się organizmu towarzyszy spadek prawidłowych poziomów fosforylacji RLC do wartości znacznie niższych od tych, które występują u zwierząt młodych. Duży wysiłek fizyczny jest przyczyną wzrostu poziomów fosforylacji RLC miozyny komórek serca (FITZSIMONS i współaut. 1990). Może to być przejawem mechanizmu adaptacyjnego umożliwiającego wykonanie zwiększonej pracy. Natomiast różnym stanom chorobowym prowadzącym do poważnego uszkodzenia mięśnia sercowego i związanego z tym upośledzenia jego funkcji skurczowej towarzyszy często całkowita defosforylacja RLC (zagadnienie to omówiła szerzej w artykule przeglądowym MOCZARSKA 1999), co wskazywałoby, że ta modyfikacja odgrywa ważną fizjologiczną rolę w regulowaniu kurczliwości serca.

Obecność lekkich łańcuchów regulujących i ich oddziaływanie z łańcuchem ciężkim zwiększa strukturalne uporządkowanie filamentów miozynowych. W przypadku usunięcia lub uszkodzenia RLC (np. przez częściową proteolizę) porządek ten zostaje zaburzony. Badania mikroskopowe ujawniły, że fosforylacja RLC ma wpływ na ułożenie główek na filamencie miozynowym: zwiększa ich odległość od osi tego filamentu i przybliża je do filamentów aktynowych. Zatem proces ten może ułatwiać międzyfilamentowe oddziaływania i generowanie siły. Efekt fosforylacji najlepiej jest widoczny przy niskich poziomach aktywacji wapniowej, a więc w warunkach, jakie panują w mięśniu sercowym (PAWLOSKI -DAHM i współaut. 1998). Spadek poziomu fosforylacji RLC redukuje cykliczne akto-miozynowe oddziaływania. Może to być czynnikiem wyzwalającym rozwój kardiomiopatii przerostowej.

W łańcuchu regulującym zidentyfikowano pięć mutacji towarzyszących hipertroficznnej kardiomiopatii. Mogą one redukować stabilność i/lub zmieniać konformację tego łańcucha zakłócając w ten sposób jego oddziaływanie z łańcuchem ciężkim miozyny. Trzy spośród znalezionych w RLC mutacji, a mianowicie

Ala13→Thr, Glu22→Lys i Pro95→Ala związane są z chorobą HOCM (POETTER i współaut. 1996). Pozostałe dwie Phe18→Leu i Arg58→Gln, odkryte przez FLAVIGNY i współautorów (1998) u pacjentów we Francji, prowadzą do rozwoju typowej formy kardiomiopatii przerostowej przebiegającej bez zaciopowania światła lewej komory serca. Zmutowane reszty aminokwasowe położone są najczęściej albo w bliskim sąsiedztwie miejsca fosforylacji, albo w pobliżu pętli wiążącej kationy dwuwartościowe. Dlatego też zbadano ich wpływ na zdolność fosforylacji i wiązanie jonów wapnia (SZCZESNA i współaut. 2001). Okazało się, że oba procesy są wyraźnie zmienione, a charakter tych zmian uzależniony jest od miejsca mutacji. Położone najbliżej miejsca wiązania jonów wapnia mutacje Glu22→Lys i Arg58→Gln powodowały spadek powinowactwa do Ca^{2+} lub całkowite wyeliminowanie jego wiązania przez RLC. Fosforylacja RLC miozyny z mutacją Arg58→Gln przywracała wiązanie Ca^{2+} , natomiast mutant Glu22→Lys nie ulegał fosforylacji nawet w obecności 20-krotnego nadmiaru kinazy lekkich łańcuchów. POETTER i współautorzy (1996) pokazali, że aktywność motoryczna tak zmienionej miozyny nie różni się od preparatów kontrolnych, chociaż według innych eksperymentatorów zastąpienie Glu22 przez lizynę powodowało zaburzenie relaksacji wyizolowanych włókien, obniżenie generowanego przez nie napięcia i spadek ich sztywności, co sugeruje, że miejsce wiążące kation dwuwartościowy jest ważne dla prawidłowej funkcji miozyny, a pojawiające się w jego bezpośrednim sąsiedztwie mutacje mogą mieć wpływ na oddziaływanie RLC z łańcuchem ciężkim. Przeprowadzone przez SZCZESNA i współautorów (2001) badania miozyny z mutacją znajdującą się w bliskim sąsiedztwie miejsca fosforylacji RLC (Ala13→Thr) wykazały kilkakrotny spadek powinowactwa takiego mutantu do Ca^{2+} . Jego fosforylacja powodowała poważny wzrost stałej równowagi wiązania wapnia, znacznie przekraczający wartości obserwowane dla miozyny typu dzikiego. Zatem fosforylacja RLC może odwracać fizjologiczne konsekwencje mutacji w pracującym sercu, przez co staje się ważnym procesem regulującym skurcz mięśnia sercowego. Niektórzy badacze zakładają, że w zdrowym sercu fosforylacja moduluje miejscową elastyczność domeny regulatorowej, co potrzebne jest dla prawidłowej funkcji główek. Z kolei mutacje w tym rejonie mogą przyczyniać się do trwałej zmiany jego sztywności, zaburzając w ten sposób skuteczność całego procesu. Obserwowane w warunkach doświadczalnych przywrócenie przez fosforylację upośledzonej muta-

cją zdolności wiązania jonów wapnia można natomiast traktować jako przywrócenie miejscu wiążącemu kationy dwuwartościowe właściwej konformacji. Sugeruje to, że oba procesy, a więc zarówno fosforylacja jak i wiązanie jonów wapnia, wzajemnie na siebie wpływają wywołując zmiany struktury tych miejsc, jak również są-

siadujących z nimi rejonów. Mutacje w łańcuchu regulującym mogą zakłócać jego oddziaływanie z ciężkim łańcuchem miozyny oraz lekkim łańcuchem istotnym, co prawdopodobnie wpłynie na funkcjonowanie domeny regulatorowej jako ramienia dźwigni i w konsekwencji zaburzy prawidłowe działanie główek miozyny.

MECHANIZM WYZWAŁAJĄCY PRZEROST KARDIOMIOCYTÓW

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się badaniom zmierzającym do wyjaśnienia mechanizmu, który poprzez mutacje w białkach sarkomerycznych, wyzwała hipertroficzną odpowiedź miocytów. Dotychczas jednak nie udało się jednoznacznie zdefiniować czynnika przenoszącego sygnał inicjujący przerost komórek mięśniowych. Co więcej, uzyskane w różnych laboratoriach wyniki nie zawsze są zgodne.

Dla prawidłowej funkcji sarkomeru niezbędne jest utrzymanie odpowiedniego stężenia jonów wapnia, które regulują kurczliwość miocytów. Liczne badania sugerują, że obecność zmutowanych białek w sarkomerze lub sztuczna stymulacja hipertrofii prowadzą do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , co pozwala sercu zachować prawidłową kurczliwość i wydajność jego pracy. Przeprowadzone przez SUSSMAN i współautorów (1998) badania wykazały, że kalcineuryna — fosfataza aktywowana przez jony wapnia — odgrywa ważną rolę w patogenezie hipertroficznego kardiomiotopii (HCM). Wysłunięto przypuszczenie, że może ona inicjować zmiany przerostowe w sercu, co wskazywałoby na istnienie powiązań między stężeniem Ca^{2+} a obecnością tej sygnałnej — jak założyli autorzy — molekuly. Dla potwierdzenia wysuniętej hipotezy przedstawiono wyniki badań, w których zastosowano inhibitory kalcineuryny: cyklosporynę A (CsA) i FK506, na trzech modelach transgenicznych myszy. Ich wspólną cechą było zaburzenie kurczliwości serca wywołane zmianą funkcji białek sarkomerycznych na skutek mutacji w kodujących je genach. Odpowiednio wczesne podawanie inhibitorów chroniło myszy genetycznie predysponowane do choroby przed jej rozwojem. Jednym z przykładów są transgeniczne zwierzęta, których serca zawierały miozynę z mutacją w lekkich łańcuchach regulujących. Mutacja uniemożliwiała fosforylację tych łańcuchów. U takich zwierząt dochodziło zwykle do rozwoju kardiomiotopii przerostowej, prawdopodobnie na skutek upośledzenia funkcji główek miozyny i przez to kurczliwości serca. Podawanie CsA chroniło je przed rozwojem HCM. Innym mode-

lem doświadczalnym były transgeniczne myszy z nadekspresją tropomiozyny β . Mutacja prowadziła do rozwoju kardiomiotopii rozstrzeniowej i, dodatkowo, do defektu w usuwaniu jonów wapnia. Wczesne podanie cyklosporyny zapobiegało rozwojowi choroby. Ponieważ, jak sugerują autorzy badań, wzrost podstawowego poziomu Ca^{2+} w miocyocie związany był z rozwojem kardiomiotopii u β -tropomiozynowych mutantów, uzyskane przez nich wyniki uznano za dowód, że kalcineuryna może pośredniczyć w przekazywaniu sygnału inicjującego zmiany w miocytach w odpowiedzi na utrzymujące się zaburzenie poziomu wapnia w komórce.

Przeciwnego zdania byli jednak badacze z innego laboratorium. Wyniki ich doświadczeń pokazały, że hamowanie kalcineuryny nie chroni przed HCM, a wprost przeciwnie — wzmacnia rozwój choroby, co wykazano na przykładzie transgenicznych myszy z mutacją Arg403→Gln w izoformie α ciężkiego łańcucha miozyny (FATKIN i współaut. 2000). Okazało się, że podawanie CsA myszom z defektami w białkach sarkomerycznych, podobnymi do tych znalezionych u człowieka, zdecydowanie pogłębia histopatologiczne zmiany i często jest przyczyną nagłej śmierci poddanych eksperymentowi zwierząt. Badania przeprowadzone z zastosowaniem cyklosporyny A, FK 506 oraz minoxidilu (agonisty kanałów potasowych) wykazały, że czynniki te przyspieszają rozwój hipertrofii u myszy z mutacją Arg403→Gln. W celu zdefiniowania mechanizmu wyzwalającego hipertroficzną odpowiedź w zmutowanych miocytach, porównywano odpowiedzi na te czynniki miocytów zmutowanych i miocytów typu dzikiego. Miocyty pochodzące od myszy zdrowych, pod wpływem minoxidilu i CsA wykazywały ponad 30% wzrost rozkurczowego stężenia Ca^{2+} . W miocytach myszy z mutacją Arg403→Gln wzrost rozkurczowego stężenia Ca^{2+} w odpowiedzi na te czynniki nie przekraczał 10%. Badania te potwierdzają wysuniętą wcześniej hipotezę, że regulacja poziomu wapnia w zmutowanych komórkach mięśnia sercowego jest zaburzona i to prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w rozwoju hipertrofii. Mniejszy

wzrost poziomu rozkurczowego stężenia Ca^{2+} w miocytach z mutacją Arg 403→Gln w odpowiedzi na działanie minoxidilu lub CsA w porównaniu z jego wzrostem w miocytach typu dzikiego, a także w zdrowych komórkach innego typu traktowanych w ten sam sposób, zinterpretowano jako wskaźnik wyczerpania się wewnątrzkomórkowych zapasów Ca^{2+} . Autorzy sugerują, że aparat kurczliwy miocytów z punktową mutacją w ciężkim łańcuchu funkcjonuje jak nie podlegająca regulacji „pułapka jonowa”, która jest przyczyną chronicznego podwyższenia poziomu wapnia w sarkomerze. Hipotezę tę potwierdzają fizjologiczne badania zmutowanych włókien mięśniowych, które wykazują wyższy niż normalnie rozwój napięcia izometrycznego przy submaksymalnych poziomach Ca^{2+} (BLANCHARD 1997) oraz obniżoną szybkość relaksacji (GEORGAKOPOULOS 1999). W zdrowym miocycie utrzymywana jest równowaga wapniowa pomiędzy sarkomerem, siateczką sarkoplazmatyczną i cytoplazmą. Zaburzenie funkcji sarkomeru przesuwają równowagę wapniową, co być może wyzwała czynniki, które przebudowu

ją miocyt i ostatecznie zmieniają strukturę mięśnia sercowego. Zatem właściwy dla zdrowych komórek mięśniowych przepływ jonów wapnia, niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania mechanizmu pobudzenie — skurcz, w zmutowanych miocytach jest wyraźnie upośledzony. Skoro więc zastosowane w eksperymentach czynniki modyfikują stężenie Ca^{2+} w komórce i dramatycznie przyspieszają rozwój kardiomiopatii przerostowej, to należy sądzić, że różne czynniki środowiskowe zmieniające homeostazę wapniową będą mieć wpływ na obraz choroby, co mogłoby w pewnym stopniu tłumaczyć zróżnicowany jej przebieg obserwowany u pacjentów z tymi samymi mutacjami (MARON i współaut. 1987, FATKIN i współaut. 2000). Jeżeli jest tak w rzeczywistości, fakt ten może mieć ogromne znaczenie terapeutyczne, szczególnie w przypadku tych pacjentów, którzy są genetycznie obciążeni kardiomiopatią przerostową, ale nie wykazują jeszcze żadnych objawów klinicznych choroby. Prewencyjne podawanie im leków blokujących kanały wapniowe być może opóźni rozwój choroby lub złagodzi jej przebieg.

THE INFLUENCE OF POINT MUTATIONS IN THE MYOSIN HEAVY AND LIGHT CHAINS ON CHANGES IN CARDIAC MUSCLE FUNCTION THAT CAUSE FAMILIAL HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

Summary

Multiple point mutations in different genes encoding cardiac muscle structural proteins like β -myosin heavy chain (β -MHC), essential and regulatory light chains, troponin T, troponin I, α -tropomyosin, actin, titin and myosin binding protein C, have been related to the familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). FHC is a genetically dominant, autosomal heart disease characterized by unexplained increase in the left ventricular wall thickness in the absence of another cause of cardiac hypertrophy such as chronic hypertension, valvular disease or metabolic disorders. The mechanism by which mutations in the sarcomeric protein genes produce cardiac hypertrophy is unknown. Some of the recent studies suggest that the mutations lead to abnormal Ca^{2+} responses that trigger myocyte growth and remodel the heart. The β -cardiac isoform of the myosin heavy chain was the first locus associated with FHC. More than 50 point mutations have been

described that lie in the head region of the myosin molecule where they are clustered near functionally significant regions of the myosin motor domain, such as the actin-binding sites, the nucleotide pocket, the area close to the thiol hinge region and the myosin light chain-binding domain. A number of mutations have also been described at the head-rod junction. Biochemical and *in vitro* functional studies have shown that the mutant β -MHC protein has impaired contractility characterized by reduced contraction velocity and impaired interaction with actin filaments. Investigation of the effects of point mutations in the myosin molecule on cardiac function and physiology provide new insights not only into the mechanisms by which mutations produce pathology, but also into the role and function of different parts of the myosin head and the pathways of information transfer between them.

LITERATURA

- ARNDT H., BLETZ C., KARUS H. A., MALL G., RÜEGG C., 1989. Calcium sensitivity and unloaded shortening velocity of hypertrophied and non-hypertrophied skinned human atrial fibers. *Pflugers Arch.* 415, 209–213.
- AUCKLAND L. M., LAMBERT S. J., CUMMINS P., 1986. Cardiac myosin light and heavy chain isotypes in tetralogy of Fallot. *Cardiovasc. Res.* 20, 828–863.
- BLANCHARD E. M., 1997. Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin gene. *Circ. Res.* 81, 1005–1010.
- BOUVAGNET P., LEGER J., PONS F., DECHESNE C., LEGER J. J., 1984. Fiber types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium. *An anatomical description.* *Circ. Res.* 55, 794–804.
- BURKE M., REISLER E., 1977. Effect of nucleotide binding on the proximity of the essential sulfhydryl groups of myosin. *Chemical probing of movement of residues during conformational transitions.* *Biochemistry* 16, 5559–5563.
- CHEN J., KUBALAK S. W., MINAMISAWA S., PRICE R. L., BECKER K. D., HICKEY R., ROSS J. J., CHIEN K. R., 1998. Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function. *J. Biol. Chem.* 273, 1252–1256.
- CUDA G., FANANAPAZIR L., ZHU W. S., SELLERS J. R., EPSTEIN N. D., 1993. Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 91, 2861–2865.

- CUDA G., FANANAPAZIR L., EPSTEIN N. D., SELLERS J. R., 1997. *The in vitro motility activity of β -cardiac myosin depends on the nature of the β -myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy.* J. Muscle Res. Cell Motil. 18, 275-283.
- CUMMINS P., LAMBERT S. J., 1986. *Myosin transitions in the bovine and human heart. A developmental and anatomical study of heavy and light subunits in the atrium and ventricle.* Circ. Res. 58, 846-858.
- DOMAL-KWIATKOWSKA D., SMOLIK S., MAZUREK U., MORIC E., POŁOŃSKA J., NOWALANY-KOZIELSKA E., GLANOWSKA G., WODNIECKI J., SZAREK J., WILCZEWSKI P., KOZAKIEWICZ K., TENDERA M., WILCZOK T., 2000. *Zmiany genetyczne a obraz kliniczny rodzinnej kardiomiopatii przerostowej.* Wiadomości Lekarskie LIII, 1-2.
- DUKE J., TAKASHI R., UE K., MORALES F., 1976. *Reciprocal reactivities of specific thiols when actin binds to myosin.* Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 302-306.
- FANG K., 1996. *Kardiomiopatie [W]: Patofizjologia chorób serca.* LILLY L. S. (red), Urban & Partner, Wrocław, 176-188.
- FATKIN D., MC CONNELL B. K., MUDD J. O., SEMSARIAN C., MOSKOWITZ J. G., SCHOEN F. J., GIEWAT M., SEIDMAN C. E., SEIDMAN J. G., 2000. *An abnormal Ca(2+) response in mutant sarkomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy.* J. Clin. Invest. 106, 1351-1359.
- FITZSIMONS D. P., BODELL P. W., BADWIN K. M., 1990. *Myocardial function correlates of cardiac myosin light chain 2 phosphorylation.* J. Appl. Physiol. 68, 2426-2433.
- FLAVIGNY J., RICHARD P., ISNARD R., CARRIER L., CHARRON P., BONNE G., FORISSIER J. F., DESNOS M., DUBOURG O., KOMAJDA M., SCHWARTZ K., HAINGUE B., 1998. *Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy.* J. Mol. Med. 76, 208-214.
- FODOR W. L., DARRAS B., SEHARASEYON J., FALKENTHAL S., FRANCKE U., VANIN E. F., 1989. *Human ventricular/slow twitch myosin alkali light chain gene characterization, sequence and chromosomal location.* J. Biol. Chem. 264, 2143-2149.
- FUJITA H., SUGIURA S., MOMOMURA S., OMATA M., SUGI H., SUTOH K., 1997. *Characterization of mutant myosins of Dictyostelium discoideum equivalent to human familial hypertrophic cardiomyopathy mutants.* J. Clin. Invest. 99, 1010-1015.
- GEEVES M. A., HOLMES K. C., 1999. *Structural mechanism of muscle contraction.* Annu. Rev. Biochem. 68, 687-728.
- GEORGAKOPOULOS D., 1999. *The pathogenesis of familial hypertrophic cardiomyopathy: early and evolving effects from an alpha-cardiac myosin heavy chain missense mutation.* Nat. Med. 5, 327-330.
- GULICK J., HEWETT T. E., KLEWITSKY R., BUCK S. H., MOSS R. L., ROBBINS J., 1997. *Transgenic remodeling of the regulatory myosin light chains in the mammalian heart.* Circ. Res. 80, 655-664.
- HOUDUSSE A., COHEN C., 1996. *Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2A resolution implications for regulation.* Structure 4, 21-32.
- HUSTON E. E., GRAMMER J. C., YOUNT R. G., 1988. *Flexibility of the myosin heavy chain: direct evidence that the region containing SH1 and SH2 can move 10 Å under the influence of nucleotide binding.* Biochemistry 27, 8945-8952.
- ITAKURA S., YAMAKAWA H., TOYOSHIMA Y. Y., ISHIJIMA A., KOJIMA T., HARADA Y., YANAGIDA T., WAKABAYASHI T., SUTOH K., 1993. *Force-generating domain of myosin motor.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 196, 1504-1510.
- KAMISAGO M., SHARMA S. D., DEPALMA S. R., SOLOMON S., SHARMA P., McDONOUGH B., SMOOT L., MULLEN M. P., WOOLF P. K., WIGLE E. D., SEIDMAN J. G., SEIDMAN C. E., 2000. *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy.* New Engl. J. Med. 343, 1688-1696.
- KINOSE F., WANG S. X., KIDAMBI U. S., MONCMAN C. L., WINKELMANN D. A., 1996. *Glycine 699 is pivotal for the motor activity of skeletal muscle myosin.* J. Cell. Biol. 134, 895-909.
- KLUES H. G., MARON B. J., DOLLAR A. L., ROBERTS W. C., 1992. *Diversity of structural mitral valve alterations in hypertrophic cardiomyopathy.* Circulation 85, 1651-1660.
- LANKFORD E. B., EPSTEIN N. D., FANANAPAZIR L., SWEENEY H. L., 1995. *Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing β -myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy.* J. Clin. Invest. 95, 1409-1414.
- LOWEY S., WALLER G. S., TRYBUS K. M., 1993. *Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening.* Nature 365, 454-456.
- MACERA M. J., SZABO P., WADGAONKAR R., SIDDIQUI M. A., VERMA R. S., 1992. *Localization of the gene coding for ventricular regulatory light chain (Myl 2) to human chromosome 12q23-q24.3.* Genomics 13, 829-831.
- MARON B. J., BONOW R. O., CANNON R. O., LEON M. B., EPSTEIN S. E., 1987. *Hypertrophic cardiomyopathy interrelations of clinical manifestations, pathophysiology and therapy.* N. Engl. J. Med. 316, 780-789 i 844-852.
- MOCZARSKA A., 1997. *Zmiany w domenie regulatorowej główek miozyny obserwowane w niektórych chorobach serca.* Postępy Biochem. 43, 120-126.
- MOCZARSKA A., 1999. *Rola lekkich łańcuchów miozyny w regulacji skurczu mięśnia sercowego.* Postępy Biochem. 45, 185-192.
- MORANO I., HAASE H., 1997. *Different actin affinities of human cardiac essential myosin light chain isoforms.* Febs Lett. 408, 71-74.
- MORANO I., WANKERL M., BÖHM M., ERDMANN E., RÜEGG J. C., 1989. *Myosin P- light chain isoenzymes in the human heart: evidence for diphosphorylation of the atrial P-LC form.* Basic Res. Cardiol. 84, 298-305.
- MORANO I., RITTER O., BONZ A., TIMEK T., VAHL C. F., MICHEL G., 1995. *Myosin light chain-actin interaction regulates cardiac contractility.* Circ. Res. 76, 720-725.
- MORANO M., ZACHARZOWSKI U., MAIER M., LANGE P. E., ALEXI-MESKISHVILI V., HAASE H., MORANO I., 1996. *Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms.* J. Clin. Invest. 98, 467-473.
- MORANO I., HÄDICKE K., HAASE H., BÖHM M., ERDMANN E., SHAUB M. C., 1997. *Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in failing human heart.* J. Mol. Cell Cardiol. 29, 1177-1187.
- PATTERSON B., RUPPEL K. M., WU Y., SPUDICH J. A., 1997. *Cold-sensitive mutants G680V and G691C of Dictyostelium myosin II confer dramatically different biochemical defects.* J. Biol. Chem. 272, 27612-27617.
- PAWLOSKI-DAHM C. M., SONG G., KIRKPATRICK D. L., PALERMO J., GULICK J., DORN G. W., ROBBINS J., WALSH R. A., 1998. *Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic rats.* Circulation 97, 1508-1513.
- POETTER K., JIANG H., HASSANZADEH S., MASTER S. R., CHANG A., DALAKAS M. C., RAYMENT I., SELLERS J. R., FANANAPAZIR L., EPSTEIN N. D., 1996. *Mutation in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle.* Nat. Genet. 13, 63-69.
- RAYMENT I., HOLDEN H. M., 1994. *The three-dimensional structure of a molecular motor.* TIBS 19, 129-134.
- RAYMENT I., RYPNIEWSKI W. R., SCHMIDT-BÄASE K., SMITH R., TOMCHICK D. R., BENNING M. M., WINKELMANN D. A., WESENBERG G., HOLDEN H. M., 1993. *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor.* Science 261, 50-58.

- RAYMENT I., HOLDEN H. M., SELLERS J. R., FANANAPAZIR L., EPSTEIN N. D., 1995. *Structural interpretation of the mutations in the β -cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3864–3868.
- RITTER O., LUTHER H. P., HAASE H., BALTAS L. G., BAUMANN G., SCHULTE H. D., MORANO I., 1999. *Expression of atrial myosin light chains but not α -myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. J. Mol. Med. 77, 677–685.
- ROOPNARINE O., LEINWAND L. A., 1998. *Functional analysis of myosin mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy*. Biophys. J. 75, 3023–3030.
- SAEZ L. J., GIANOLA K.M., Mc NALLY E. M., FEGHALI R., EDDY R., 1987. *Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome*. Nucleic Acids Res. 15, 5443–5459.
- SEHARASEYON J., BOBER E., HSIEH C. L., FODOR W. L., FRANCKE U., ARNOLD H. H., VANIN E.F., 1990. *Human embryonic/atrial myosin alkali light chain gene: characterization, sequence and chromosomal location*. Genomics 7, 289–293.
- SLEEP J. A., TRYBUS K. M., JOHNSON K. A., TAYLOR E. W., 1981. *Kinetic studies of normal and modified heavy meromyosin and subfragment-1*. J. Muscle Res. Cell Motil. 2, 373–400.
- SUSSMAN M. A., LIM H.W., GUDE N., TAIGEN T., OLSON E. N., ROBBINS J., COLBERT M. C., GUALBERTO A., WIECZOREK D. F., MOLKENTIN J. D., 1998. *Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition*. Science 281, 1690–1693.
- SÜTSCH G., BRUNNER U. T., VON SCHULTHESS C., HIRZEL H. O., HESS O. M., TURINA M., KRAYENBUEHL H. P., SHAUB M. C., 1992. *Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement*. Circ. Res. 70, 1035–1043.
- SZCZESNA D., GHOSH D., LI Q., GOMES A.V., GUZMAN G., ARANA C., ZHI G., STULL J. T., POTTER J.D., 2001. *Familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in the regulatory light chains of myosin affect their structure, Ca^{2+} binding and phosphorylation*. J Biol. Chem. 276, 7086–7092.
- TIMSON D. J., TRAYER H. R., TRAYER I. P., 1998. *The N-terminus of A1-type myosin essential light chains binds actin and modulates myosin motor function*. Eur. J. Biochem. 255, 654–662.
- UYEDA T. Q. P., ABRAMSON P. D., SPUDICH J. A., 1996. *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4459–4464.
- WALLER G. S., OUYANG G., SWAFFORD J., VIBERT P., LOWEY S., 1995. *A minimal motor domain from chicken skeletal muscle myosin*. J. Biol. Chem. 270, 15348–15352.
- WELIKSON R. E., BUCK S. H., PATEL J. R., MOSS R.L., VIKSTROM K. L., FACTOR S. M., MIYATA S., WEINBERGER H. D., LEINWAND L. A., 1999. *Cardiac myosin heavy chain lacking the light chain binding domain cause hypertrophic cardiomyopathy in mice*. Am. J. Physiol. 276 (Heart Circ. Physiol. 45), H 2148–2158.