

MARIA JOLANTA RĘDOWICZ

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: jolanta@nencki.gov.pl

PIERWOTNIAKI W BADANIACH BIOCHEMICZNYCH I GENETYCZNYCH

W dobie najnowszych osiągnięć genetyki i biologii molekularnej, gdy klonuje się ssaki, gdy jesteśmy już prawie o krok od rozszyfrowania ludzkiego genomu, można by pytać o potrzebę badań nad organizmami jednokomórkowymi. Należy zdawać sobie jednak sprawę, że, poza aspektem poznawczym, klinicznym (pierwotniaki wciąż są przyczyną wielu chorób ludzi i zwierząt) i ewolucyjnym, badania nad organizmami jednokomórkowymi dostarczały, i wciąż dostarczają, wielu nowych informacji przyczyniających się do postępu wiedzy o organizmach wyższych.

Szczególnie istotne są, moim zdaniem, badania prowadzone na przedstawicielach kilku gatunków z królestwa Protozoa, a mianowicie *Tetrahymena pyriformis* lub *Tetrahymena thermophila* (gromada orzęsków), *Acanthamoeba castellanii* (gromada korzenionózek) oraz *Dictyostelium discoideum* (gromada śluzowców). W niniejszym artykule postaram się omówić najważniejsze osiągnięcia wynikające z badań nad tymi organizmami oraz ich wkład w rozwój nauk biologicznych. Z racji swoich zainteresowań skupię się głównie na badaniach dotyczących cytoszkieletu komórkowego¹.

Orzęski *Tetrahymena thermophila* i *T. pyriformis* to organizmy, których badanie przyczyniło się i wciąż przyczynia, między innymi do poznania budowy i funkcji mikrotubul oraz układu białek z nimi związanych. Już w końcu lat 50. zaobserwowano, a po wprowadzeniu do mikroskopii elektronowej w latach 60. techniki utrwalania z zastosowaniem glutaraldehydu potwierdzono, że rzęski *Tetrahymena* posiadają stałą strukturę — widoczne są w nich cylindryczne elementy o średnicy około 30 nm, zwane

mikrotubulami, ułożone jako 9 par na obwodzie rzęski, a dodatkowe 2 pojedyncze mikrotubule znajdują się w jej środku (patrz art. FABCZAK i FABCZAK w tym numerze KOSMOSU). Mikrotubule, jak się potem okazało, obecne są we wszystkich komórkach eukariotycznych (OLMSTED i BORISY 1973, BRAY 1992). Badania biochemiczne nad mikrotubulami rzęskowymi, zapoczątkowane już w końcu lat 50. (CHILD 1959), kontynuowane między innymi przez Gibbonsa (GIBBONS 1963, 1965) doprowadziły do ustalenia, że podstawowym składnikiem mikrotubul jest tubulina, białko występujące tu w dwóch izoformach α i β , o masach cząsteczkowych około 55 kDa. Natomiast po raz pierwszy tubulinę wyizolowano z mózgu świni, jako białko wiążące kolchicynę (WEISENBERG i współaut. 1966). Wiadomo obecnie, że białko to, podobnie jak aktyna, obecne jest we wszystkich rodzajach komórek eukariotycznych i pełni kluczową rolę między innymi w procesach podziału komórkowego, ruchu rzęskowego i wiciowego, wewnątrzkomórkowego transportu organelli czy też przekazywania sygnałów nerwowych (BRAY 1992). W 1963 r. GIBBONS stwierdził, że obecne w rzęskach *Tetrahymena* struktury wystające z mikrotubul, tworzące tak zwane ramionka mikrotubuli, wykazują zdolność do hydrolizy ATP (GIBBONS 1963), co zainspirowało go do poszukiwania białka odpowiedzialnego za to zjawisko. We współpracy z Rowe wyizolował on z rzęsek i scharakteryzował to zupełnie dotąd nieznanne białko, które nazwał dyneiną (od „dyne” — siła) (GIBBONS i ROWE 1965). Dyneina, podobnie jak tubulina i aktyna, obecna jest we wszystkich rodzajach komórek eukariotycznych. Występuje ona w formie rzęskowej lub

¹Zainteresowanych cytoszkieletem informuję, że pod redakcją dr Roberta Makucha i moją przygotowany jest numer KOSMOSU poświęcony temu zagadnieniu. Numer ten powinien ukazać się w pierwszej połowie roku 2001.

cytoplazmatycznej (BRAY 1992, HIROKAWA 1998), a jej wielkość i skład podjednostkowy zależy od formy występowania. Jest to olbrzymie białko, jego masa cząsteczkowa wynosi od 1000 do 2000 kDa. Dyneina w pełni zasługuje na swoją nazwę, gdyż jest białkiem motorycznym, zdolnym (dzięki energii uzyskanej wskutek hydrolizy ATP) bądź do generowania ruchu rzęsek, bądź do przemieszczania organelli wzdłuż mikrotubul w kierunku tak zwanego końca minus mikrotubuli, czyli do środka komórki. Poznanie motoru związanego z układem mikrotubul, jak się początkowo wydawało obecnego tylko u orzęsków, zainspirowało wielu badaczy do poszukiwania białek motorycznych obecnych w innych komórkach, zwłaszcza w neuronach. W 1974 r. dwie grupy jednocześnie doniosły o znalezieniu dyneiny w mózgu (BURNS i POLLARD 1974, GASKIN i współaut. 1974), stanowiącej formę cytoplazmatyczną tego białka.

W 1985 r. dwie niezależne grupy zaprezentowały wyniki świadczące o obecności w aksonie olbrzymim mątwy (VALE i współaut. 1985) i cytoplazmie jaj konika morskiego (SCHOOLEY i współaut. 1985) innego białka, o masie cząsteczkowej około 400 kDa, wykazującego zdolność do hydrolizowania ATP i wiązania mikrotubul. Białko to, nazwane kinezyną, jest białkiem motorycznym, występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych (także, podobnie jak inne białko motoryczne — miozyna, w wielu izoformach) i uczestniczącym w niektórych istotnych procesach komórkowych (HIROKAWA 1998). Tak więc, badania nad małym, ruchliwym orzęskiem przyczyniły się do poznania struktury i składu mikrotubul oraz do odkrycia i dokładnego zbadania nowych białek motorycznych — dyneiny i kinezy. Pierwotniaki nadal są obiektem wielu badań, prowadzonych również metodami genetycznymi, umożliwiającymi poznanie, między innymi, mechanizmu procesów ruchu rzęskowego i wiciowego, charakterystycznego również dla wielu komórek tkankowych, jak na przykład rzęski płuc czy wici plemników (GAERTIG 2000).

Pisząc o *Tetrahymena thermophila* należy również pamiętać, że badania nad kwasami nukleinowymi z tego organizmu doprowadziły na początku lat 80. do poznania nowych funkcji RNA. W laboratorium Thomasa R. Cecha wykazano, że wyizolowane z orzęska rRNA genów makronuklearnych zachowuje się jak enzym — potrafi ciąć samo siebie i ponownie łączyć powstałe fragmenty (KRUGER i współaut. 1982). Zjawisko to, występujące jak się potem okazało powszechnie w komórkach eukariotycznych, nazwane samousuwaniem się intronów (ang.

intron self-splicing), przyczyniło się nie tylko do poznania funkcji RNA, ale także do wyjaśnienia mechanizmu ekspresji genów. Jego odkrywca, dr T. R. Cech został za te badania uhonorowany (wspólnie z Samuelem Altmanem) w 1989 r. nagrodą Nobla w dziedzinie chemii.

Acanthamoeba castellanii to wolnożyjąca w glebie ameba, która w sprzyjających warunkach może stać się groźnym patogenem. Opisało przypadki zapalenia mózgu, zapalenia płuc i utraty wzroku spowodowane przez tę amebę. Wśród naukowców organizm ten znany jest jednak głównie jako obiekt badań biochemicznych nad aparatem kurczliwym. Z niego to bowiem Pollard i Korn w 1973 r. (POLLARD i KORN 1973) wyizolowali białko o masie cząsteczkowej około 160 kDa posiadające właściwości enzymatyczne, charakterystyczne dla poznanego dużo wcześniej mięśniowego białka motorycznego — miozyny (masa cząsteczkowa około 500 kDa). To amebowe białko, poza typową dla izoformy miozyny mięśniowej zdolnością do wiązania aktyny przyczyniającą się do wzrostu hydrolizy ATP, wykazywało szereg cech odmiennych. Okazało się, że jest to cząsteczka monomeryczna, zawierająca tylko jeden łańcuch lekki, nie tworząca filamentów charakterystycznych dla miozyny mięśniowej. Późniejsze badania niezależnych już grup Korna i Pollarda (patrz SELLERS 1999) dostarczyły dowodów, że białko to zawiera w swojej części karboksylowej, zwanej ogonkiem, dodatkowe miejsce wiązania aktyny oraz miejsce wiązania lipidów. Okazało się też, że jego aktywność enzymatyczna jest regulowana poprzez fosforylację reszty treoninowej lub serynowej w rejonie ciężkiego łańcucha, zwanym główką lub domeną motoryczną, spełniającym funkcje enzymatyczne tego białka (BRZEŚKA i KORN 1996). Dość dużo czasu upłynęło zanim inni badacze zaakceptowali to białko jako nową, odmienną izoformę miozyny pochodzącą z *Acanthamoeba*. O ile bowiem zaakceptowano możliwość istnienia w amebach izoformy miozyny zbliżonej do miozyny mięśniowej, o tyle nie przyjmowano do wiadomości obecności innej, odmiennej jej izoformy. Podejrzewano wręcz, że autorzy izolowali po prostu proteolityczny fragment amebowej izoformy miozyny, podobnej do miozyny występującej w mięśniach szkieletowych. Dopiero otrzymanie w końcu lat 70. tej akceptowalnej izoformy miozyny (MARUTA i KORN 1977, POLLARD i współaut. 1978), a także wykazanie, że obie izoformy miozyny występujące w amebie są kodowane przez odmienne geny (HAMMER i współaut. 1986), położyło kres wątpliwościom. Wykazano ponadto, że ta nietypowa izoforma (według dzisiejszej nomenklatu-

ry zwana miozyną I, zaś izoforma mięśniowa to miozyna II) występuje w amebie w trzech odmianach: A, B, C.

Badania nad miozynami amebowymi zapoczątkowały nowy okres w badaniach nad miozyną. Stosując między innymi metody biologii molekularnej oraz techniki biochemiczne lub immunologiczne wykryto olbrzymią różnorodność wśród izoform miozyny; miozyny te na podstawie różnic w sekwencji tak zwanej domeny motorycznej zostały podzielone na co najmniej 15 klas (rodzin) (SELLERS 1999). Okazało się na przykład, że odkryta w *Acanthamoeba* nowa miozyna, sklasyfikowana jako należąca do klasy IV, jest jak dotychczas jedynym przedstawicielem tej rodziny (HOROWITZ i HAMMER 1990). Obecnie wiadomo, że miozyny występują we wszystkich komórkach eukariotycznych; co więcej, zaobserwować można w jednej komórce (np. w *Dictyostelium*) obecność genów kodujących aż dwanaście izoform miozyny (OISHI i współaut. 2000). Wiadomo też, że miozyny są odpowiedzialne za wiele kluczowych dla życia komórki procesów takich jak: endo- i egzocytoza, transport organelli, cytokineza czy też lokomocja komórek, a także współuczestniczą nie tylko w generowaniu skurczu mięśnia (miozyna II), ale również są zaangażowane w procesy słyszenia (miozyna VI, VIIA i XV) lub widzenia (przedstawiciel miozyny III u *Drosophila* i *Limulus*) (SELLERS 1999). I kto by przypuszczał, że wszystko zaczęło się od kontrowersyjnego odkrycia przez Pollarda i Korna dziwnej izoformy miozyny w małej amebie.

Badania nad miozyną I *Acanthamoeba* przyczyniły się także do poznania mechanizmu fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny w obrębie główki. Ten rodzaj fosforylacji zaobserwowano u większości dotąd poznanych izoform miozyny I, a także u izoform miozyny VI (BRZESKA i KORN 1996). Okazało się także, że kinaza ciężkiego łańcucha miozyny I z *Acanthamoeba* należy do nowopoznanej rodziny kinaz PAK, regulowanych przez białka z rodziny Rho. Kinazy te między innymi regulują fosforylację lekkiego łańcucha miozyny niemięśniowej lub z mięśni gładkich, a więc izoforma amebowa PAK jest być może unikalną wśród tej rodziny kinaz (BRZESKA i współaut. 1999).

W *Acanthamoeba* wykryto też nowe białka regulujące proces polimeryzacji aktyny, na przykład aktobindyne (LAMBOOY i KORN 1986) i aktoforynę (COOPER i współaut. 1986). Ostatnio wykazano, po raz pierwszy właśnie w *Acanthamoeba*, że polimeryzacja aktyny jest regulowana poprzez kompleks białek Arp2/3 i WASP, przez białko cdc42, należące do rodziny tak

zwanych małych GTPaz z rodziny Rho (MULLINS i POLLARD 1999).

Acanthamoeba, z racji łatwości i niskich kosztów otrzymania dużej ilości materiału doświadczalnego (z około 80 l hodowli płynnej można w odpowiednich warunkach otrzymać nawet i 1 kg komórek), umożliwia prowadzenie badań metodami biochemicznymi (BAINES i KORN 1994).

Z kolei, intensywne badania genetyczne były, i nadal są, prowadzone na innym przedstawicielu pierwotniaków, *Dictyostelium discoideum*. Należący do gromady śluzowców (*Mycetozoa*) *D. discoideum* jest organizmem, który przechodzi przez cykl rozwoju prowadzący do wytwarzania spor. Cykl ten został dobrze poznany i wykorzystywany jest w laboratoriach naukowych. Amebowe formy śluzowca hodowane na podłożu stałym w warunkach głodzenia (ang. starvation) wydzielają zewnątrzkomórkowy cAMP, który powoduje spontaniczne łączenie się ameb w wielojądrowe struktury zwane plazmodiami, przechodzące następnie w stadium pełzakowate, z którego powstają sporangia (ang. fruiting bodies) produkujące zarodniki. Cykl ten, przy utrzymywaniu właściwych parametrów gęstości komórek, temperatury i wilgotności powietrza, trwa około 24 godzin i jest powtarzalny z marginesem błędu około 1 godziny. To, oraz fakt, że organizm ten występuje podczas cyklu rozwojowego jako haploid, a także tania i efektywna hodowla spowodowały, że *Dictyostelium* stało się modelowym obiektem badań genetycznych. Badania nad jego genomem, składającym się z około 40 000 kilobaz, doprowadziły do stworzenia warunków rutynowej transformacji komórek i ekspresji egzogennej białek w tym organizmie, a także możliwości badania roli tych białek w procesie rozwojowym, ruchliwości komórkowej czy też endo- lub egzocytozie (DEVREOTES 1989). W komórkach śluzowca białka podlegają, podobnie jak w komórkach wyższych Eukaryota, procesom posttranslacyjnej modyfikacji, na przykład glikozylacji. Wykorzystując więc dostępne komercyjnie plazmidy zdolne do transformowania *D. discoideum*, zawierające umożliwiające selekcję transformantów gen oporności na neomycynę, wbudowany w gen promotora aktywny, opracowano metody umożliwiające ekspresję funkcjonalnych białek zarówno egzo-, jak i endogennej. Z komórek śluzowca udało się, stosując techniki rekombinacyjne, otrzymać między innymi lucyferazę ze świetlika (robaczka świetłańskiego), glukoronidazę ssacza, receptor β -adrenergiczny z chomika oraz ssacze izoformy białka Ras, a także, po zablokowaniu endo-

gennych genów, takie białka jak podjednostki $\alpha 1$ i $\alpha 2$ heterotrimerycznego białka G, fosfodiesterazę, białko Ras, białko RacE, a także szereg izoform miozyny i jej fragmentów (DEVREOTES 1989, SELLERS 1999, OISHI i współaut. 2000). Blokowanie genów kodujących endogenne białka umożliwia także tworzenie nowych szczepów śluzowca, w których dane białko nie podlega ekspresji, co pozwala na bezpośrednie i szybkie zbadanie jego funkcji w warunkach *in vivo* (DEVREOTES 1989). Ponadto fakt, że komórki śluzowca można transformować egzogennym cDNA i otrzymywać w nich funkcjonalne białka, umożliwił tworzenie mutantów tych białek i poznanie ich funkcji w komórce i/lub roli w cyklu rozwojowym tego organizmu. Niewątpliwie przyczyniło się to do postępu w badaniach nad strukturą i funkcją, między innymi, profiliny (LEE i współaut. 2000) i innych białek wiążących aktynę (PONTE i współaut. 2000), RacE (LAROCHELLE i współaut. 2000) czy też izoform miozyny (SELLERS 1999, OISHI i współaut. 2000).

Jak już wcześniej wspomniałam, miozyny występują w przyrodzie w postaci różnorodnych izoform, różniących się nie tylko składem aminokwasowym, strukturą trzecio- lub czwartorzędową, ale również funkcją pełnioną w komórce. Badania genetyczne nad miozyną *Dictyostelium*, zapoczątkowane w 1987 r. przez Spudicha (DELOZANNE i SPUDICH, 1987), doprowadziły z jednej strony, do poznania szeregu nowych jej izoform oraz ich fragmentów/domen, a z drugiej, do poznania ich roli w tym organizmie. Dotychczas w *Dictyostelium* poznano całkowite sekwencje genów kodujących dziesięć izoform miozyny (jednego przedstawiciela klasy II; sześć izoform klasy I; przedstawiciela klasy VII, przedstawiciela klasy V lub XI oraz przedstawiciela nowopoznanej izoformy miozyny — MyoM, którego sekwencja wskazuje, iż jest

to izoforma otwierająca nową klasę miozyn) oraz część sekwencji genów kodujących MyoF i MyoH (OISHI i współaut. 2000). Udało się także wykazać, że na przykład miozyna II (ta przypominająca miozynę mięśniową) jest niezbędna w procesach cytokinezy oraz rozwoju i migracji komórek; izoformy miozyny I, współdziałając ze sobą, odgrywają rolę w procesach ruchliwości komórek, poprzez udział w wewnątrzkomórkowym transporcie organelli, w endo- i egzocytocie; miozyna VII jest zaangażowana w procesie fagocytozy; zaś nowa miozyna MyoM może uczestniczyć w procesie makropinocytozy (SELLERS 1999, OISHI 2000). Stosując mutanty udało się na przykład zbadać *in vivo* rolę fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny II, rolę łańcuchów lekkich miozyny II w cyklu rozwojowym *Dictyostelium*, a także poznać sekwencje istotne dla generacji ruchu w domenie motorycznej miozyny, nie tylko śluzowca (SELLERS 1999).

Dictyostelium, chociaż to pierwotniak, jest organizmem chętnie wykorzystywanym w laboratoriach badawczych zajmujących się problemami dotyczącymi organizmów wyższych. Dużo taniej, łatwiej i szybciej jest przecież, o ile to oczywiście możliwe, wstępnie sprawdzić funkcje danego białka wykorzystując ten organizm, niż otrzymać stabilną linię zwierząt transgenicznych. Nie zapominajmy też o tym, że unika się problemów związanych z rosnącymi w siłę obrońcami praw zwierząt. Praca z pierwotniakami nie powoduje bowiem protestów z ich strony.

Mam nadzieję, że przy pomocy przedstawionych przeze mnie, fragmentarycznych przecieży, danych wykazałam celowość prowadzenia badań nad pierwotniakami, kryjącymi w sobie wiele możliwości i tajemnic, których poznanie może pomóc w zrozumieniu ogólnych zasad rządzących całym światem istot żywych.

PROTOZOA IN BIOCHEMICAL AND GENETIC STUDIES — SOME ASPECTS OF THE PROBLEM

Summary

This essay describes the significance of biochemical and genetic studies on representatives of the Protozoan kingdom, which contribute to the general knowledge of living organisms. In particular, studies on *Tetrahymena* species, *Acanthamoeba castellanii* and *Dictyostelium discoideum* have been briefly depicted. Studies on the structure of *Tetrahymena* cilia aided in the detailed characterization of microtubules and its components, and revealed the novel microtubule-based motor proteins — dynein and kinesin. The intron self-splicing mechanism was found for the first

time in rRNA of macronuclear genes of *T. thermophila*. *A. castellanii* has been explored as a model for biochemical studies of actin-based cytoskeleton, which resulted in the discovery of several novel proteins, including novel myosin isoforms. The latter led to finding of diverse multiisoform myosin superfamily. Since slime mold *D. discoideum* during its life cycle exists as a haploid, it has served as a model for intensive genetic studies. For example expression of different myosin isoforms and their subunits helped in the understanding of their roles *in vivo*.

LITERATURA

- BAINES I. C., KORN E. D., 1994. *Acanthamoeba castellanii*: a model system for correlative biochemical and cell biological studies. [W:] *Cell Biology*. CELIS J.E. (red.) Academic Press, San Diego, CA, 1, 405-411.
- BRAY D., 1992. *Cell Movements*. Garland Publishing Inc., New York & London.
- BRZESKA H., KORN E. D., 1996. Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271, 16983-16986.
- BRZESKA H., YOUNG R., KNAUS U., KORN E. D., 1999. Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 394-399.
- BURNS R. G., POLLARD T. D., 1974. A dynein-like protein from brain. *FEBS Lett.* 40, 274-280.
- CHILD F. M., 1959. The characterization of the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.* 18, 258-267.
- COOPER J. A., BLUM J. D., WILLIAMS R. C. J R., POLLARD T. D., 1986. Purification and characterization of actophorin, a new 15,000-dalton actin-binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol. Chem.* 261, 477-485.
- DELOZANNE A., SPUDICH J. A., 1987. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236, 1086-1091.
- DEVREOTES P., 1989. *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science* 245, 1054-1061.
- GAERTIG J., 2000. Molecular mechanisms of microtubular assembly in *Tetrahymena*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 185-190.
- GASKIN F., KRAMER S. B., CANTOR C. R., ADELSTEIN R., SHELANSKI M. L., 1974. A dynein-like protein associated with neurotubules. *FEBS Lett.* 40, 281-286.
- GIBBONS I. R., 1963. Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 50, 1002-1010.
- GIBBONS I. R., 1965. Chemical dissection of cilia. *Arch. Biol. (Liege)* 76, 317-352.
- GIBBONS I. R., ROWE A. J., 1965. Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149, 424-425.
- HAMMER J., KORN E. D., PATTERSON B. M., 1986. Isolation of non-muscle myosin heavy chain gene from *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* 261, 1949-1956.
- HIROKAWA N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526.
- HOROWITZ J. A., HAMMER J. A.III., 1990. A new *Acanthamoeba* myosin heavy chain. *J. Biol. Chem.* 265, 20646-20652.
- KRUGER K., GRABOWSKI P. J., ZAUG A. J., SANDS J., GOTTSCHLING D. E., CECHE T. R., 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-157.
- LAMBOOY P. K., KORN E. D., 1986. Purification and characterization of actobindin, a new actin monomer binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 261, 17150-17155.
- LAROCHELLE D. A., GERALD N., DELOZANNE A., 2000. Molecular analysis of *racE* function in *Dictyostelium*. *Microsc. Res. Tech.* 49, 145-151.
- LEE S. S., KARAKESISOGLOU I., NOEGEL A., RIEGER D., SCHLEICHER M., 2000. Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in *Dictyostelium* mutants. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 92-103.
- MARUTA H., KORN E.D., 1977. *Acanthamoeba* myosin II. *J. Biol. Chem.* 252, 6501-6509.
- MULLINS R. D., POLLARD T. D. 1999. Rho-family GTPases require the ARP2/3 complex to stimulate actin polymerization in *Acanthamoeba* extracts. *Curr. Biol.* 9, 405-415.
- OISHI N., ADACHI H., SUTOCH K., 2000. Novel *Dictyostelium* myosin, MyoM, has a putative RhoGEF domain. *FEBS Lett.* 474, 16-22.
- OLMSTED J. B., BORISY G. G., 1973. Microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 42, 507-540.
- POLLARD T. D., KORN, E. D., 1973. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 248, 4682-4690.
- POLLARD T. D., STAFFORD W. F. III, PORTER M. E., 1978. Characterization of a second myosin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 253, 4798-4808.
- PONTE E., RIVERO F., FECHHEIMER M., NOEGEL A., BOZZARO S., 2000. Severe developmental defects in *Dictyostelium* null mutants for actin-binding proteins. *Mech. Develop.* 91, 153-161.
- SCHOLEY J. M., PORTER M. J., GRISSOM P. M., MCINTOSH J. R., 1985. Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature* 318, 483-486.
- SELLERS J. R., 1999. *Myosin. Protein Profile*. Oxford University Press, Oxford.
- VALE R. D., REESE T. S., SHEETZ M. P., 1985. Identification of novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.
- WEISENBERG R. C., BORISY G. G., TAYLOR E. W., 1966. The colchicin-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7, 4466-4472.