

WANDA KŁOPOCKA

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: aniak@nencki.gov.pl

STRUKTURA I FUNKCJE CYTOSZKIELETU KORTYKALNEGO AMOEBA PROTEUS

WPROWADZENIE

Komórki wielu różnych typów, takie jak komórki zarodkowe, leukocyty, fibroblasty i komórki nabłonkowe, a także niektóre pierwotniaki (ameby), poruszają się tzw. ruchem ameboidalnym, pełząc przyczepione do podłoża. Ruchliwość tych komórek jest niezmiernie istotna dla wielu podstawowych zjawisk biologicznych, takich jak rozwój zarodkowy, gojenie ran oraz walka z infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi; amebom umożliwia natomiast poszukiwanie pożywienia oraz obronę przed niekorzystnymi czynnikami środowiska.

Komórki tkankowe oraz jednokomórkowe organizmy poruszające się ruchem ameboidalnym są wyjątkowo fascynującym, a zarazem jednym z najtrudniejszych obiektów badań mechanizmów ruchu. Nie posiadają one wyspecjalizowanych, trwałych narządów ruchu, lecz rozwijają przejściowe organy lokomotoryczne — pseudopodia — o różnym kształcie i wielkości (filopodia, lamellipodia, lobopodia). Siłę niezbędną dla ruchu generują dzięki wzajemnie od siebie zależnym mechanizmom, ściśle związanym z funkcjonowaniem cytoszkieletu kortykalnego. Podstawową składową tego cytoszkieletu są filamenty aktynowe, których organizacja zależy od całego szeregu białek wchodzących w interakcje z aktyną, w tym białek motorycznych — miozyn.

Migracja, tak jak wszystkie zjawiska związane z ruchliwością, są odpowiedzią komórek na działanie różnorodnych bodźców. Komórki tkankowe, takie jak granulocyty czy makrofagi, przylegają do podłoża, zmieniają kształt i migrują w odpowiedzi na bodźce chemotaktyczne. Wierzchołek rozwijającego się aksonu stymulowany jest przez czynniki wzrostowe. Migracje swobodnie żyjących, drapieżnych ameb, pełzających nieustannie w poszukiwaniu pożywie-

nia, stale korygują bodźce środowiskowe. Cytoszkielet aktynowy jest zatem wysoce wrażliwym odbiorcą informacji, przekazywanych przez różne receptory.

Odpowiedzią na bodziec może być reorganizacja cytoszkieletu: polimeryzacja, czyli powstawanie filamentarnej aktyny (F-aktyny) z monomerów aktynowych (G-aktyny), tworzenie z filamentów aktynowych struktur wyższego rzędu, takich jak wiązki i sieci, albo dezorganizacja struktur cytoszkieletu i depolimeryzacja aktyny. W utrzymywaniu równowagi pomiędzy aktyną monomeryczną i filamentarną uczestniczy w komórce szereg różnorodnych białek, które wiążąc się z aktyną przyspieszają jej polimeryzację lub depolimeryzację.

W ruchliwości niektórych komórek tkankowych, np. fibroblastów, biorą udział również mikrotubule, będące, obok aktyny i filamentów pośrednich, jednym z trzech podstawowych elementów cytoszkieletu. Małe, wyspecjalizowane komórki, takie jak keratynocyty czy leukocyty, a także ameby, nie wymagają jednak mikrotubul dla swej ruchliwości.

Cytoszkielet aktynowy pełni zarówno funkcje kurczliwe, jak i stabilizujące. Bierze zatem udział nie tylko w generowaniu siły motorycznej dla migracji komórek oraz wszystkich zjawisk związanych z ich ruchliwością (np. endocytoza, cytokineza), lecz decyduje również o kształcie komórki oraz właściwościach mechanicznych jej powierzchni (analogicznym funkcjom mikrotubul, w odniesieniu do morfologii komórek nerwowych, poświęcony jest art. B. MAJEWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Właściwa morfologia umożliwia komórce wypełnianie specyficznych funkcji. Cytoszkielet aktynowy uczestniczy również w takich fundamentalnych procesach, jak przekazywanie informacji z błony pla-

zmatycznej do cytoplazmy i jądra (wpływ na ekspresję genów), transport wewnątrzkomórkowy, oddziaływania międzykomórkowe oraz adhezja komórek do podłoża.

Aby filamenty aktynowe mogły pełnić swe funkcje, muszą być połączone z błoną — końcami lub bocznie, bezpośrednio lub za pośrednictwem białek wiążących aktynę lub miozynę. Zmiany kształtu, migracja i wszystkie zjawiska związane z ruchliwością komórek możliwe są dzięki dynamice połączeń aktyny z błoną komórkową.

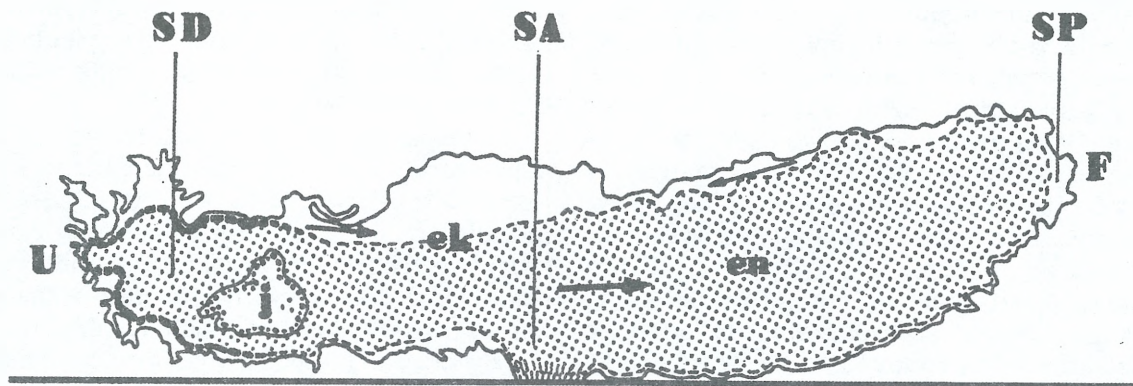
Biochemiczne badania *in vitro* białek cytoszkieletu aktynowego przyniosły wiele interesujących i ważnych wyników, ale przekładanie tych danych na funkcjonowanie aktyny *in vivo* jest nadal problematyczne. Dla zrozumienia mechanizmów związanych z ruchliwością komórek konieczne jest ustalenie organizacji i współdziałania wszystkich białek zaangażowanych w działanie cytoszkieletu korykalnego żywych komórek. Ruchy komórek biologicznie badają od ponad 150 lat, a rozwój metod badawczych daje

możliwość coraz dokładniejszego poznawania właściwości fizycznych i chemicznych struktur za ten ruch odpowiedzialnych. Badania, zarówno *in vitro*, jak i przyżyciowe, prowadzone są na komórkach tkankowych oraz pierwotniakach. Wśród tych ostatnich na największą uwagę zasługują *Acanthamoeba castellanii* — najintensywniej badana pod względem biochemicznym komórka niemięśniowa (część wyników tych badań przedstawiła H. BRZESKA w tym numerze KOSMOSU), *Dictyostelium discoideum* — stanowiący modelowy obiekt badań genetycznych śluzowic, przechodzący w cyklu życiowym stadium wolno-żyjącej komórki ameboidalnej (patrz np. RĘDOWICZ 2000), oraz *Amoeba proteus* — od lat stosowana w badaniach fizjologii ruchu ze względu na tempo migracji i wielkość komórki (patrz: GREBECKI 2000). Omawiając ultrastrukturę i dynamikę cytoszkieletu korykalnego tej wielkiej słodkowodnej ameby posłużę się również wynikami badań prowadzonych na innych pierwotniakach, a także na komórkach tkankowych.

ULTRASTRUKTURA I POLARYZACJA CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO *Amoeba proteus*

Kortykalny cytoszkielet *Amoeba proteus* tworzy ciągłą warstwę podścielającą wewnętrzną powierzchnię błony komórkowej (Ryc. 1). Głównymi jej składowymi są cienkie filamenty spolimeryzowanej aktyny, o średnicy około 6–8 nm, oraz grube filamenty miozynowe, o średnicy około 10–30 nm. Filamenty aktynowe powiązane białkami sieciującymi, tworzą strukturę trójwymiarowej sieci o konsystencji półsztywnego żelu, zwaną „korteksem kurczliwym” (KOMNICK i współaut. 1973, KOROHODA i STOCKEM

1975). Poza filamentami aktyny i związanymi z nią białkami nie zawiera ona żadnych innych struktur. Korteks migrującej ameby ma różną grubość i gęstość, zależnie od rejonu komórki. W strefie frontальной (wysuwanej) jego grubość wynosi 0,1–0,2 μm . W rejonach wycofanych (tylnych) może osiągać grubość nawet ok. 1 μm . W przedniej części komórki mikrofilamenty ułożone są przeważnie równoległe do błony plazmatycznej, w rejonie tylnym i środkowym tworzą nieorientowaną sieć. Podczas gdy filamen-



Ryc. 1. Schemat organizacji wewnętrznej migrującej *Amoeba proteus* w rzucie bocznym.

Uroid (U), front (F), jądro (j), endoplazma (en) — pole zakropkowane, ektoplazma (ek), linia cienka przerywana — sieć filamentów aktynowych, linia przerywana pogrubiona — filamenty aktynowe i filamenty miozyny II, strefa depolimeryzacji aktyny (SD), strefa polimeryzacji aktyny (SP), strefa adhezji (SA), strzałki wskazują kierunek ruchu endoplazmy i ektoplazmy.

ty cienkie są raczej równomiernie rozmieszczone wzdłuż powierzchni ameby, występowanie filamentów miozynowych ograniczone jest do strefy uroidalnej komórki (patrz: STOCKEM i KŁOPOCKA 1988). Brak filamentów grubych w segmentach przednich czy środkowych warstwy korykalnej nie świadczy jednak o braku białek motorycznych, bowiem w cylindrze korykalnym *Amoeba proteus* równomiernie rozmieszczone są nie tworzące filamentów izoformy miozyny (OH i JEON 1998).

Pierwszych dowodów na aktomiozynowy charakter układu kurczliwego ameb dostarczyły na początku lat 70. doświadczenia prowadzone w grupie Korna nad cytoszkieletem *Acanthamoeba castellanii* (patrz art. H. BRZESKIEJ w tym numerze KOSMOSU). W przypadku *Amoeba proteus* dowodów takich dostarczyły badania modeli glicerynowych ameb, które kurczyły się w obecności adenozyntrifosforanu (ATP) i jonów nieorganicznych (SIMARD-DUQUESNE i COUILLARD 1962, RINALDI i współaut. 1975, OPAS 1976). Na przełomie lat 70. i 80. prowadzono intensywne badania ultrastruktury cytoszkieletu korykalnego ameb z zastosowaniem mikroskopii elektronowej (np. TAYLOR i współaut. 1976, GRĘBECKA i HREBENDA 1979, STOCKEM i współaut. 1982). Następnie rozpoczęto badania nad rozmieszczeniem elementów strukturalnych cytoszkieletu ameb, łącząc techniki mikroiniekcji, mikroskopii fluorescencyjnej oraz wideo. Analizowano położenie aktyny w migrującej amebie wstrzykując do niej fluorescencyjnie znakowaną, mięśniową G-aktynę, która łączyła się z pulą endogennej F-aktyny (GAWLITTA i współaut. 1980, TAYLOR i współaut. 1980a, STOCKEM i współaut. 1983a), znakując aktynę przeciwciałami, a także wybarwiając F-aktynę fluorescencyjnie znakowaną falloidyną (STOCKEM i współaut. 1983b). Wyniki tych badań wykazały, że rozkład spolimeryzowanej aktyny jest u ameby związany z morfologią komórki. W migrujących komórkach fluorescencja była 4–5 razy mniej intensywna w warstwie ektoplazmy krawędzi wiodących i tylnej krawędzi uroidu, niż w ektoplazmie pozostałych rejonów ameby, co wskazuje, iż rejony te zawierały mniej spolimeryzowanej aktyny.

Doświadczalnie wywołane zmiany zachowania i postaci ameby, np. działaniem czynników indukujących pinocytozę lub fagocytozę, zawsze związane są ze zmianami w lokalizacji filamentarnej aktyny (STOCKEM i KŁOPOCKA 1988). U pinocytuujących ameb sieć korykalna jest równomiernie rozmieszczona wzdłuż wewnętrznej powierzchni błony komórkowej pinocytotycznych pseudopodiów, kanałów i wczesnych endosomów (STOCKEM i współaut. 1983b),

a jej skurcz powoduje zagłębianie i internalizację pęcherzyków błonowych (GRĘBECKI 1991). Podczas fagocytozy obserwowano czasową akumulację fluorescencyjnie znakowanej aktyny w wierzchołkach pseudopodiów tworzących kubek fagocytarny, a po utworzeniu fagosomu zauważono zmianę w organizacji systemu aktynowego, prowadzącą do równomiernego rozmieszczenia aktyny wokół wakuoli pokarmowej (STOCKEM i współaut. 1983a). Takie samo rozmieszczenie filamentów aktynowych podczas fagocytozy u *Amoeba proteus* wykazały niezależnie badania prowadzone JEON i JEON (1983) z zastosowaniem mikroskopii elektronowej.

„Podziałom” wywołanym sztucznie (bez udziału kariokinezy) poprzez mikroiniekcje sperminy do migrujących *A. proteus* również towarzyszy przemieszczanie się filamentarnej aktyny, która gromadziła się w płaszczyźnie „podziału” oraz na przeciwległych biegunach „dzielącej” się komórki. Po rozdzieleniu obu części ameby akumulacja aktyny w tych miejscach zanikała. Obecność oraz wiązkowy układ filamentów w płaszczyźnie „podziału” wykazały również wyniki obserwacji w mikroskopie elektronowym (GAWLITTA i współaut. 1981). Niestety, nie poznano dotąd rozmieszczenia F-aktyny podczas cytokinezy *A. proteus*. Zmiany lokalizacji aktyny badano natomiast podczas podziałów w komórkach *D. discoideum* (YUMURA 1996). Wykazano, że aktyna gromadzi się na przeciwległych biegunach komórki podczas telofazy oraz w rejonie bruzdy podziałowej.

W przeciwieństwie do mięśni, w komórkach niemięśniowych miozyna II (miozyna konwencjonalna) może zmieniać lokalizację w komórce. U *D. discoideum* jest ona skoncentrowana podczas lokomocji w rejonie tylnym ameby (YUMURA i współaut. 1984), a w czasie cytokinezy w rejonie bruzdy podziałowej (YUMURA i Kitanishi-Yumura 1993). U migrującej *A. proteus* filamenty miozyny są również nierównomiernie rozmieszczone. Widoczne są tylko w obszarach tylnych warstwy korykalnej (STOCKEM i współaut. 1983b). Doświadczalnie wywołany „podział” ameby związany jest z przemieszczeniem nie tylko filamentów aktynowych w rejon płaszczyzny podziału, ale również grubych filamentów miozynowych (GAWLITTA i współaut. 1981).

Drugą formę miozyny — miozynę I, należącą do grupy miozyn niekonwencjonalnych, po raz pierwszy wyizolowano z *Acanthamoeba castellanii* w 1973 r. (POLLARD i KORN 1973, patrz art. H. BRZESKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Miozyny I są monomerycznymi, globularnymi białkami, które nie tworzą filamentów (BAINES i KORN 1990). Sekwencja aminokwasów pojedynczej główki miozyny I jest podobna do sekwencji

występującej w główce miozyny konwencjonalnej, natomiast krótka pałeczka różni się znacznie od odpowiadającego rejonu miozyny II. Wszystkie izoformy miozyny I *Acanthamoeba* i trzy izoformy *Dictyostelium* zawierają dwa miejsca wiązania aktyny, przy czym do jednego z nich, zlokalizowanego w pałeczce, aktyna wiąże się w sposób niezależny od ATP. Ponieważ miozyny I posiadają w pałeczce także miejsca wiązania do błon, mają więc potencjalne możliwości generowania różnych rodzajów ruchu i mogą pełnić w komórkach różnorodne funkcje. Mogą wiązać i powodować skurcz sieci aktynowej, wiązać błonę pęcherzyków, które następnie transportują wzdłuż szlaków aktynowych, mogą też wiązać filamenty aktynowe z błoną komórkową, biorąc udział w ekspansji przedniej krawędzi komórki, a także pełnić funkcję czynnika sieciującego błony plazmatyczne z cytoszkieletem aktynowym.

Badania nad lokalizacją i rolą różnych izoform miozyny I ameb wolno-żyjących prowadzono przede wszystkim na amebowej postaci *D. discoideum* oraz *A. castellanii*. U *Dictyostelium* trzy spośród sześciu izoform miozyny I, MyoB, MyoC i MyoD, zlokalizowane są w rejonie cytoszkieletu korykalnego, wzdłuż krawędzi wiodącej migrującej komórki. Badania na mutantach pozbawionych różnych izoform miozyny I wykazały, że brak izoformy MyoB redukuje fagocytozę i zwalnia do połowy tempo migracji ameb. MyoC zaangażowana jest również w fagocytozę oraz migrację komórek (JUNG i współaut. 1996). U *Acanthamoeba* miozynę IA zlokalizowano w cytoplazmie oraz wokół kubka fagocytarnego i małych pęcherzyków lipidowych. Uczestniczy ona w skurczu warstwy korykalnej, fagocytozie i transporcie pęcherzyków w cytoplazmie. Miozyna IB związana jest z błoną komórkową i zaangażowana w wysuwanie pseudopodiów, pinocytozę i fagocytozę. Miozynę IC zlokalizowano na błonie wodniczki tętniącej (BAINES i współaut. 1992, 1995) jest ona odpowiedzialna za jej kurczenie (DOBERSTEIN i współaut. 1993). Stosując monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw miozynie z *A. proteus* wykazano, że występuje ona w całej cytoplazmie ameby, ale w rejonie ektoplazmy jest bardziej skoncentrowana. Sklonowanie cDNA kodującego miozyny

Amoeba proteus wykazało, że sekwencja aminokwasów domeny motorycznej, podobnie jak w przypadku innych organizmów, jest bardzo podobna do sekwencji domen motorycznych innych izoform miozyny. Wydaje się, że istnieją przynajmniej trzy różne izoformy miozyn u *A. proteus*, posiadające podobne sekwencje aminokwasowe globularnych główek (OH i JEON 1998). W przypadku *A. castellanii* udało się zidentyfikować 5 izoform miozyny należących do trzech rodzin, zaś w *D. discoideum* zidentyfikowano 14 genów kodujących miozyny będące przedstawicielami co najmniej pięciu rodzin.

W wiązaniu sieci mikrofilamentów z błonowymi lipidami i białkami u organizmów wyższych pośredniczą różne białka. W wiązaniach o niewielkiej sile biorą udział m. in. miozyny I, aneksyna II, kompleks spektryna/białko prażka 4.1/ankiryna, czy białko MARCKS (ang. myristoylated alanine-rich protein kinase substrate). W wiązaniach o dużej sile, występujących przede wszystkim w miejscach adhezji i kontaktów międzykomórkowych, uczestniczą takie białka jak: talina, paksylina, winkulina i α -aktynina oraz białka z rodziny ERM (ezryna/radyksyna/moezyna), (STOSSEL 1993). W *Acanthamoeba* wykryto białko Acan-125, które wiąże się z domeną SH3 (ang. Src homology 3 domain) miozyny IC. Przypuszcza się, że zakotwiczone w błonie Acan-125 pełni wraz z miozyną funkcję kompleksu sieciującego filamenty aktynowe z błonami komórkowymi (XU i współaut. 1997). U *A. proteus*, oprócz niekonwencjonalnych miozyn (OH i JEON 1998), wykazano także obecność α -aktyniny, winkuliny (BRIX i współaut. 1990) oraz spektryny (CHOI i JEON 1989, 1992). Białka wiążące F-aktynę z błoną komórkową tworzą u tej ameby regularnie ułożone mostki.

Spśród innych białek wiążących aktynę, u *A. proteus* wykazano ostatnio obecność amebowej izoformy kaldesmonu, białka regulującego w mięśniach gładkich oddziaływanie aktyny i miozyny II. Kaldesmon lokalizuje się w głębszej warstwie ektoplazmy migrujących ameb. Silną koncentrację tego białka obserwowano również w miejscach adhezji komórki do podłoża (GAGOLA i współaut. 2001).

DYNAMIKA I REGULACJA FUNKCJONOWANIA CYTOSZKIELETU KORYKALNEGO

Wyjaśnienie mechanizmu ruchu *Amoeba proteus* opiera się na założeniach dwóch teorii wysuniętych na podstawie badań dynamiki cytoszkieletu wielkich ameb *A. proteus* i *Chaos carolinensis*. Jedną z nich jest teoria skurczu

połączonego z zolifikacją (HELLEWELL i TAYLOR 1979, TAYLOR i CONDEELIS 1979, TAYLOR i FECHHEIMER 1982), oparta na odkryciu, że warunkiem koniecznym, aby skurcz żżelifikowanej sieci aktynowej miał charakter izotoniczny i

mógł wywołać ruch, jest równolegle postępująca jej zolifikacja. Generowanie siły może prowadzić do wykonania pracy (a nie tylko zmiany naprężenia) właśnie w połączeniu z zolifikacją. Podobne wyniki uzyskano u fibroblastów (JANSON i współaut. 1991, KOLEGA i współaut. 1991). Drugą teorią jest teoria ogólnego skurczu korykalnego (GRĘBECKI 1981, 1982, 2000), zgodnie z którą cały korykalny cytoszkielet ameby wykonuje skurcz izotoniczny lub izometryczny, odpowiednio powodując albo zmiany objętości, albo zmiany naprężenia swej struktury wzdłuż komórki. Założenia obu teorii, w połączeniu z wynikami najnowszych badań, wyjaśniają, jakie zmiany zachodzą w obrębie cytoszkieletu korykalnego *A. proteus* i jakie mechanizmy odpowiedzialne są za generowanie siły niezbędnej dla migracji ameby. Podstawy molekularne tych procesów są u tej ameby słabo poznane, natomiast intensywnie bada się je u *Dictyostelium discoideum* i *Acanthamoeba castellanii*.

Do migracji zdolne są tylko komórki spolaryzowane, a więc takie, które mają wyodrębnioną strefę frontálną i tylną. Tylko taka budowa pozwala bowiem na przemieszczenie komórki dzięki generowanej w jej wnętrzu sile. Morfologiczne zróżnicowanie tych stref polega na różnym stopniu pofałdowania oraz różnej aktywności ich powierzchni. W strefie wysuwanej powierzchnia jest gładka, a w komórkach tkankowych jej aktywność przejawia się w postaci formowania lamellipodiów, lobopodiów, czasem także filopodiów, oraz zjawiska zwanego „ruffling” (wsteczny ruch fałd błony w przedniej krawędzi komórki). Biegun tylny komórki jest najsilniej pofałdowany. To zróżnicowanie okolic przednich i rejonu tylnego związane jest z różną ultrastrukturą oraz różnymi procesami zachodzącymi w cytoszkielecie korykalnym tych stref.

W uroidzie i wycofywanych pseudopodiach *A. proteus* skurcz połączony z zolifikacją prowadzi do dezorganizacji aparatu kurczliwego (przemiana żelu w zol). Białka cytoszkieletalne, w tym oligomery i monomery aktynowe, uwalniane są do endoplazmy i wraz z jej strumieniem przenoszone do wierzchołków wysuwanych nibynózek. W ich regionie korykalnym odbywa się rekonstrukcja aparatu kurczliwego (przemiana zolu w żel) dzięki procesom polimeryzacji aktyny i sieciowania filamentów aktynowych.

W miejscach formowania nowych pseudopodiów, a także cyklicznie w wierzchołkach wysuwanych nibynózek *A. proteus*, sieć filamentów aktynowych oddysocjowuje od błony. Warstwy mikrofilamentów, wciąż rekonstruowane przy wewnętrznej powierzchni błony, są od niej cyklicznie odklejane i wycofywane do wnętrza.

Powstaje lokalny spadek ciśnienia hydrostatycznego, które jest wytwarzane w komórce w wyniku aktywności kurczliwej warstwy korykalnej. Z tym zjawiskiem związana jest ekspansja błony, która wypychana jest przez endoplazmę, napływającą pomiędzy błoną a odklejającą się od niej sieć mikrofilamentów. Przepływ endoplazmy w kierunku słabego punktu — zgodnie z prawami hydrodynamiki — powoduje wypchnięcie błony komórkowej i utworzenie nowego frontu bądź progresję strefy wiodącej (GRĘBECKI 1990). Taki mechanizm powoduje nie płynną, lecz skokową progresję strefy wiodącej. Rozdzielenie kompleksu błona-cytoszkielet zachodzi prawdopodobnie dzięki zwiększonemu stężeniu Ca^{2+} bezpośrednio pod błoną frontálną. Wykazano, że podczas ruchu wielkich ameb poziom wapnia w ich strefach czołowych wzrasta rytmicznie co 1–4 sekund (TAYLOR i współaut. 1980b). W tym tempie odklejane są również od błony kolejne warstwy sieci aktynowej (GRĘBECKI 1990). Jony wapnia regulują więc w tym przypadku interakcje pomiędzy filamentami aktyny i błoną plazmatyczną (KAWAKATSU i współaut. 2000).

Ten sam mechanizm zaobserwowano później w leukocytach (KELLER i EGGLI 1998). W innych komórkach tkankowych oraz u *D. discoideum* ekspansja błony krawędzi czołowej bywa przypisywana polimeryzacji aktyny we współdziałaniu z miozynomami I (np. THEIROT i MITCHISON 1991, YUMURA i FUKUI 1998).

Ruch ameboidalny wymaga precyzyjnej kontroli cyklicznej transformacji zol \leftrightarrow żel oraz oddziaływań aktyny z miozynomami. W regulacji tych procesów biorą udział wtórne przekaźniki informacji: jony wapnia, fosfoinozytole (PIP₂ i PIP) oraz cały szereg białek wiążących aktynę. Zolifikacja sieci aktynowej zachodzi w wycofywanych rejonach ameb i komórek tkankowych, np. fibroblastów (GIULIANO i TAYLOR 1995), tj. w strefach o najwyższym stężeniu jonów Ca^{2+} (u *A. proteus* $\sim 10^{-6}$ M) (HELLEWEL i TAYLOR 1979, TAYLOR i współaut. 1980b). W tych warunkach zachodzi dysocjacja białek sieciujących filamenty aktynowe oraz aktywacja białek fragmentujących filamenty, aż do tworzenia monomerów. Białka skracające długość filamentów wiążą się jednocześnie z ich szybko rosnącymi końcami, blokując polimeryzację. Do tej grupy białek należą m. in. żelzolina protowilina, wilina (SCHLEICHER i współaut. 1995, KWIATKOWSKA i SOBOTA 1997) w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych, seweryna u *D. discoideum*, czy fragmina u śluzowca *Physarum polycephalum* (HINSSEN 1981). Do licznych białek regulujących stan organizacji aktyny należą białka wiążące monomery aktynowe, m.in. pro-

filina, tymozyna, kofilina (u *A. castellani* — aktoforyna), destryna, których działanie kontroluje polimeryzację i umożliwia utrzymanie w komórce dużej puli aktywny niespolimeryzowanej (patrz: STOSSEL 1993, SCHLEICHER i współaut. 1995, SUN i współaut. 1995). Pula ta stanowi rezerwę udostępnianą, gdy rozpoczyna się polimeryzacja aktywny podczas aktywacji komórki. Do białek, które biorą udział w organizacji struktur cytoszkieletu z filamentów aktywnych należą m. in. fimbryna, α -aktylina, spektryna, filamina, wilina, czynnik żelifikujący ABP-120 (FUKUI 1993, SCHLEICHER i współaut. 1995). Białka te mogą uczestniczyć w tworzeniu lub dezorganizacji danej struktury cytoszkieletu, w zależności od rodzaju sygnału. Wiążą się one wzdłuż boków filamentów, łącząc je w wiązki (np. włókna naprężeniowe w fibroblastach, cytoszkielet filopodiów) lub trójwymiarowe sieci (np. kortykalny cytoszkielet ameb i poruszających się ruchem ameboidalnym komórek tkankowych). Wysoce dynamiczne oddziaływania różnych białek z aktywną umożliwiają szybką i skuteczną reorganizację cytoszkieletu aktywnego, zmieniającą zdolność komórki do ruchu i rodzaj pełnionych przez nią, lub jej część, funkcji. Procesy te wymagają precyzyjnej kontroli, w której bierze udział cały szereg regulujących białek i fosfolipidów, będących kolejnymi ogniwami kaskad przekazywania sygnałów pomiędzy receptorami a białkami wiążącymi aktywną. Jedyną znaną potranslacyjną modyfikacją aktywny, która hamuje jej polimeryzację, jest jej fosforylacja, występująca u *A. proteus* (SONOBE i współaut. 1986) oraz *Physarum polycephalum* (FURUHASHI i HATANO 1990). W obecności wysokiego stężenia jonów wapnia aktywacji ulega także kalmodulina, która wiążąc się z białkami stabilizującymi filamente aktywny, np. kaldesmonem, sprzyja rozbijaniu sieci filamentów i oddziaływaniom aktywny z miozyną II (HAHN i współaut. 1992, GOUGH i TAYLOR 1993). Zachodzi również fosforylacja łańcuchów regulujących miozyny II, która inicjuje organizację miozyny w bipolarne filamente i kurczliwą aktywność tych agregatów (STOSSEL 1993). Intensywny skurcz połączony z żolifikacją uwalnia ze struktury żelu do endoplazmy białka cytoszkieletalne, niezbędne dla rekonstrukcji sieci aktywny na krawędzi wiodącej lamelli, czy w wierzchołkach wysuwanych pseudopodiów. Rozmieszczenie miozyny II zarówno w komórkach *A. proteus* (STOCKEM i współaut. 1983b), jak i *D. discoideum* (JANSON i współaut. 1991) potwierdza jej udział w kurczeniu się tylnych rejonów tych ameb. Miozyna II nie jest jednak niezbędna dla lokomocji *Dictyostelium*, co pokazały badania na mutantach

pozbawionych tego białka. Pełzną one, choć wolniej niż komórki typu dzikiego. Zaproponowano, że siła generowana dzięki oddziaływaniom aktywny z miozyną II umożliwia oderwanie tylnej krawędzi ameby od podłoża, co z kolei ułatwia przemieszczenie całej komórki ku przodowi (JAY i współaut. 1995). Miozyna II bierze udział nie tylko w ruchu ameb czy komórek tkankowych. Jest ona również bezpośrednio zaangażowana w cytokinezę i zachowanie właściwej morfologii komórek (patrz: BRESNICK 1999). Nie przyłączone do podłoża i pozbawione miozyny II komórki *Dictyostelium* szybko zmieniają kształt i stają się sferyczne. Zaproponowano, że miozyna może usztywniać kortykalną warstwę komórki poprzez wiązanie filamentów aktywnych. Nie ma to jednak związku z migracją komórki i nie wymaga aktywności ATPazowej miozyny II (SHELDEN i KNECHT 1996).

Zmiany organizacji aktywny poprzedzają również wysuwanie krawędzi czołowych lamelli migrujących komórek tkankowych (STOSSEL 1993), pseudopodiów *D. discoideum* (YUMURA i FUKUI 1998) i *A. proteus*. W strefach frontalnych, gdzie stężenie Ca^{2+} jest niższe niż w rejonie tylnym komórek (u *A. proteus* $\sim 10^{-7}$ M), zachodzi polimeryzacja aktywny i sieciowanie filamentów (żelifikacja). Końce filamentów są odblokowywane i udostępniane dla polimeryzacji za pośrednictwem fosfoinozytoli (patrz: KWIATKOWSKA i SOBOTA 1997, KWIATKOWSKI 1999). Z monomerów aktywnych w procesie nukleacji powstają zarodki nowych filamentów. Regulacja tego procesu w komórkach jest obecnie jednym z najintensywniej badanych problemów dotyczących dynamiki cytoszkieletu aktywnego. Kluczową rolę w przyspieszaniu nukleacji, niezbędną dla sprawnej polimeryzacji aktywny, odgrywa kompleks białek Arp2/3, występujących powszechnie w komórkach eukariotycznych (patrz art. K. KWIATKOWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). W regulacji organizacji aktywny biorą również udział białka z rodziny Rho. W fibroblastach zaobserwowano, że Cdc42 reguluje powstawanie filopodiów, Rac1 odpowiedzialne jest za tworzenie lamellipodiów, zaś RhoA kontroluje wiązanie aktywny we włókna naprężeniowe i powstawanie miejsc przyczepu do podłoża. Białka te kontrolują funkcjonowanie cytoszkieletu również poprzez regulację aktywności różnych izoform miozyny (patrz art. H. BRZESKIEJ i H. FABCZAK w tym numerze KOSMOSU). W *Dictyostelium* i *Acanthamoeba castellanii* kinaza ciężkiego łańcucha miozyny I, należąca do rodziny kinaz PAK, aktywowana przez Cdc42 i Rac, fosforyluje miozynę powodując jej aktywację (NOEGEL i SCHLEICHER 2000). Wykazano ostatnio, że białka z rodziny Rho

wpływają na adhezję i ruchliwość komórek *A. proteus*. Blokowanie endogennych izoform Rac lub Rho powoduje dramatyczne zmiany w morfologii i tempie lokomocji tej ameby (KŁOPOCKA i RĘDOWICZ 2001). Wskazuje to na niezmiernie istotną rolę, jaką pełnią te białka u *A. proteus*.

Z organizacją cytoszkieletu aktynowego związane jest także tworzenie punktów przyczepu ameb do podłoża. Kompleksy F-aktyny obecne w strukturach adhezyjnych *A. proteus* (minipodia) zanikają, gdy komórka traci kontakt z podłożem, a pojawiają się, gdy ponownie zaczyna do niego przylegać (GRĘBECKA i współaut. 1997, GRĘBECKI i współaut. 2001). W organizacji aktynowego cytoszkieletu analogicznych struktur w komórkach *Dictyostelium* (eupodia) bierze udział jedna z izoform miozyny I oraz α -aktynina i winkulina (FUKUI i INOUE 1997). Strefa adhezji wyznacza kierunek przemieszczania się żelifikowanej ektoplazmy wzdłuż błony komórki. Migrująca *A. proteus* jest zwykle przyczepiona do podłoża w środkowo-przedniej strefie komórki. Jej sieć korykalna obkurcza się więc dośrodkowo (GRĘBECKI 1984, 1993, 1994) — w regionie przednim przemieszcza się jako całość ku tyłowi, w regionie tylnym natomiast w kierunku zgodnym z kierunkiem loko-

mocji. Korykalna F-aktyna, otaczająca tylną część fibroblastów, przemieszcza się i jest stopniowo akumulowana podczas migracji na biegunie tylnym komórek. W komórkach dzielących się taki ruch odbywa się natomiast w kierunku bruzdy podziałowej. Obserwowana w tych komórkach dynamika cytoszkieletu aktynowego nie wymaga obecności miozyny II — zachodzi również u mutantów bez tego białka (FUKUI i współaut. 1999). Autorzy cytowanej pracy sugerują, że przepływ korykalnej F-aktyny jest odpowiedzialny za generowanie siły dla migracji komórki oraz formowania bruzdy podziałowej.

Wydaje się, że wszystkie procesy w komórce, które można określić wspólnym mianem dynamiki cytoszkieletu — polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny, kurczenie się sieci mikrofilamentów z udziałem białek motorycznych, przemieszczanie się warstwy kurczliwej jako całości — wspólnie generują siłę niezbędną dla migracji komórki, a także wszystkich procesów związanych z jej ruchliwością.

Praca finansowana przez grant Komitetu Badań Naukowych nr 0505/PO4/2001/20.

STRUCTURE AND FUNCTION OF THE CORTICAL CYTOSKELETON OF AMOEBA PROTEUS

Summary

The contractile system of *Amoeba proteus* is represented by a continuous cortical filament layer at the cytoplasmic face of the cell membrane. Two types of filaments participate in the formation of this layer: thin — actin filaments and thick — myosin filaments mostly restricted to the intermediate and posterior cell region. During normal locomotion the cortical cytoskeleton exhibits a distinct structural and physiological polarity with a zone of actin filament network destruction (solation) at the uroid and a zone of reconstruction of the contractile system (gelation) at the front. Calcium ions and actin binding proteins play an essential role in controlling both the interaction of actin and myosin and sol-gel transformation, i.e., actin assem-

bly and disassembly. In the tail region elevated level of free calcium induces a coupled solation and contraction of the network by activation of myosin II and calcium-dependent proteins that sever and depolymerize actin filaments. At the tip of advancing pseudopodium where the concentration of cytoplasmic Ca^{2+} is low another actin binding proteins operate and actin polymerization and network reconstruction take place. The motor force is provided by the whole peripheral actin network and attributed to the interaction of myosin II or I with actin filaments. However, the locomotion of *A. proteus* is controlled by pressure drop at the leading edge where successive actin layers are periodically detached from the cell membrane.

LITERATURA

- BAINES I. C., KORN E. D., 1990. Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J. Cell Biol.* 111, 1895–1904.
- BAINES I. C., BRZESKA H., KORN E. D., 1992. Different localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J. Cell Biol.* 119, 1193–1203.
- BAINES I. C., CORIGLIANO-MURPHY A., KORN E. D., 1995. Quantification and localization of phosphorylated myosin I isoforms in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 130, 591–603.
- BRESNICK A. R., 1999. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 26–33.
- BRIX K., REINECKE A., STOCKEM W., 1990. Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. III. Influence of microinjected antibodies on the organization and function of the microfilament system. *Eur. J. Cell Biol.* 51, 279–284.
- CHOI E. Y., JEON K. W., 1989. A spectrin-like protein present on membranes of *Amoeba proteus* as studied with monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 185, 154–165.
- CHOI E. Y., JEON K. W., 1992. Role of spectrin in *Amoeba proteus*, as studied by microinjection of anti-spectrin monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 199, 174–178.
- DOBERSTEIN S. K., BAINES I. C., WIEGAND G., KORN E. D., POLLARD T. D., 1993. Inhibition of contractile vacuole function in vivo by antibodies against myosin-I. *Nature* 365, 841–8433.
- FUKUI Y., 1993. Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int. Rev. Cytol.* 144, 85–127.

- FUKUI Y., INOUE S., 1997. Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in *Dictyostelium*. *Cell Motil. Cytoskel.* 36, 339-354.
- FUKUI Y., KITANISHI-YUMURA T., YUMURA S., 1999. Myosin II-independent F-actin flow contributes to cell locomotion in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 112, 877-886.
- FURUHASHI K., HATANO S., 1990. Control of actin filament length by phosphorylation of fragmin-actin complex. *J. Cell Biol.* 111, 1081-1087.
- GAWLITTA W., STOCKEM W., WEHLAND J., WEBER K., 1980. Organization and spatial arrangement of fluorescein-labeled native actin microinjected into normal locomoting and experimentally influenced *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 206, 181-191.
- GAWLITTA W., STOCKEM W., WEBER K., 1981. Visualization of actin polymerization and depolymerization cycles during polyamine-induced cytokinesis in living *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 215, 249-261.
- GAGOLA M., MAKUCH R., ŁOPATOWSKA A., KŁOPOCKA W., 2001. Identification and localisation of caldesmon-like protein in *Amoeba proteus*. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6, 203.
- GIULIANO K. A., TAYLOR D. L., 1995. Measurement and manipulation of cytoskeletal dynamics in living cells. *Curr Opin. Cell Biol.* 7, 4-12.
- GOUGH A. H., TAYLOR D. L., 1993. Fluorescence anisotropy imaging microscopy maps calmodulin binding during cellular contraction and locomotion. *J. Cell Biol.* 121, 1095-1107.
- GREBECKA L., HREBENDA B., 1979. Topography of cortical layer in *Amoeba proteus* as related to the dynamic morphology of moving cell. *Acta Protozool.* 18, 493-502.
- GREBECKA L., POMORSKI P., GREBECKI A., ŁOPATOWSKA A., 1997. Adhesion-dependent F-actin in *Amoeba proteus* as a common feature of amoebae and the metazoan motile cells. *Cell Biol. Int.* 21, 565-573.
- GREBECKI A., 1981. Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications. *Eur. J. Cell Biol.* 24, 163-175.
- GREBECKI A., 1982. Supramolecular aspects of amoeboid movement. *Acta Protozool.* 21, 117-130.
- GREBECKI A., 1984. Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. I. Behaviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon. *Protoplasma* 123 116-134.
- GREBECKI A., 1990. Dynamic of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement. *Protoplasma* 154, 98-111.
- GREBECKI A., 1991. Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae. *Protoplasma* 160, 144-158.
- GREBECKI A., 1993. Ruchy lateralne podbłonowej sieci aktywnej w komórkach ruchliwych. *Post. Biol. Kom.* 20, 97-111.
- GREBECKI A., 1994. Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae. *Int. Rev. Cytol.* 148, 37-80.
- GREBECKI A., 2000. Spory o mechanizm ruchu ameb. *Kosmos* 49, 571-581.
- GREBECKI A., GREBECKA L., WASIK A., 2001. Minipodia, the adhesive structures active in locomotion and endocytosis of amoebae. *Acta Protozool.* 40, w druku.
- HAHN K., DEBIASIO R., TAYLOR D. L., 1992. Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* 359, 736-738.
- HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., 1979. The contractile basis of amoeboid movement VI. The solation-contraction coupling hypothesis. *J. Cell Biol.* 83, 633-648.
- HINSSSEN H., 1981. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification. *Eur. J. Cell Biol.* 23, 225-233.
- JANSON L. W., KOLEGA J., TAYLOR D. L., 1991. Modulation of contraction by gelation/solation in a reconstituted motile model. *J. Cell Biol.* 114, 1005-1015.
- JAY P. Y., PHAM P. A., WONG S. A., ELSON E. L., 1995. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J. Cell Sci.* 108, 387-393.
- JEON K. W., JEON M. S., 1983. Generation of mechanical forces in phagocytosing amoebae: light and electron microscopic study. *J. Protozool.* 30, 536-538.
- JUNG G. J., WU X., HAMMER III J. A., 1996. *Dictyostelium* mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J. Cell Biol.* 133, 305-323.
- KAWAKATSU T., KIKUCHI A., SHIMMEN T., SONOBE S., 2000. Interaction of actin filaments with the plasma membrane in *Amoeba proteus*: studies using a cell model and isolated plasma membrane. *Cell Struct. Funct.* 25, 269-277.
- KELLER H., EGGLI P., 1998. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskel.* 41, 181-93.
- KŁOPOCKA W., RĘDOWICZ M. J., 2001. Effects of blocking of endogenous Rho family GTP-binding proteins on morphology, adhesion and locomotion of *Amoeba proteus*. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 6, 211.
- KOLEGA J., JANSON L. W., TAYLOR D. L., 1991. The role of solation-contraction coupling in regulating stress fiber dynamics in non-muscle cells. *J. Cell Biol.* 114, 993-1003.
- KOMNICK H., STOCKEM W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., 1973. Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and amoeboid movement. *Int. Rev. Cytol.* 34, 169-249.
- KOROHODA W., STOCKEM W., 1975. On the nature of hyaline zones in the cytoplasm of *Amoeba proteus*. *Microscop. Acta* 18, 75-90.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1997. Rola wapnia w organizacji cytoszkieletu podbłonowego. *Kosmos* 46, 579-585.
- KWIATKOWSKI D. J., 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 103-108.
- NOEGEL A. A., SCHLEICHER M., 2000. The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J. Cell Sci.* 113, 759-766.
- OH S. W., JEON K. W., 1998. Characterization of myosin heavy chain and its gene in *Amoeba proteus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 600-605.
- OPAS M., 1976. Course of glycerination of *Amoeba proteus*, and contraction of glycerinated models. *Acta Protozool.* 15, 485-499.
- 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.
- RĘDOWICZ M. J., 2000. Pierwotniaki w badaniach biochemicznych i genetycznych. *Kosmos* 49, 583-587.
- RINALDI R. A., OPAS M., HREBENDA B., 1975. Contractility of glycerinated *Amoeba proteus* and *Chaos chaos*. *J. Protozool.* 22, 286-292.
- SCHLEICHER M., ANDRE B., ANDREOLI C., EICHINGER L., HAUGWITZ M., HOFMANN A., KARAKESISOGLOU J., STOCKELHUBER M., NOEGEL A. A., 1995. Structure/function studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoebae* as a paradigm. *FEBS Lett.* 369, 38-42.
- SHELDEN E., KNECHT D. A., 1996. *Dictyostelium* cell shape generation requires myosin II. *Cell Motil. Cytoskel.* 35, 59-67.
- SIMARD-DUQUESNE N., COUILLARD P., 1962. Amoeboid movement. I. Reactivation of glycerinated models of *Amoeba*

- proteus with adenosine triphosphate*. *Expl. Cell Res.* 28, 85-91.
- SONOBE S., TAKAHASHI S., HATANO A., KURODA K., 1986. Phosphorylation of *Amoeba* G-actin and its effect on actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 261, 14837-14843.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. Ameboid movement and related phenomena. *Int. Rev. Cytol.* 112, 137-183.
- STOCKEM W., HOFFMANN H.-U., GAWLITTA W., 1982. Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 221, 505-519.
- STOCKEM W., HOFFMANN H.-U., GRUBER B., 1983a. Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus* I. Redistribution of microinjected fluorescein-labeled actin during locomotion, immobilization and phagocytosis. *Cell Tissue Res.* 232, 79-96.
- STOCKEM W., NAIB-MAJANI W., WOHLFARTH-BOTTERMAN K. E., OSBORN M., WEBER K., 1983b. Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIX. Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in *Amoeba proteus*. *Eur. J. Cell Biol.* 29, 171-178.
- STOSSEL T. P., 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260, 1086-1093.
- SUN H.-Q., KWIAKOWSKA K., YIN H. L., 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 102-110.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., 1979. Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int. Rev. Cytol.* 56, 57-144.
- TAYLOR D. L., FECHHEIMER M., 1982. Cytoplasmic structure and contractility: the solation-contraction coupling hypothesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 299, 185-197.
- TAYLOR D. L., RHODES J. A., HAMMOND S. A., 1976. The contractile basis of amoeboid movement. II. Structure and contractility of motile extracts and plasmalemma-ectoplasm ghosts. *J. Cell Biol.* 70, 123-143.
- TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G., 1980a. Contractile basis of amoeboid movement VIII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis, and capping. *J. Cell Biol.* 86, 599-607.
- TAYLOR D. L., WANG Y.-L., HEIPLE M., 1980b. Contractile basis of amoeboid movement VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amoebas. *J. Cell Biol.* 86, 590-598.
- THEIROT J. A., MITCHISON T. J., 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126-131.
- 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.
- YUMURA S., 1996. Spatial distribution of fluorescently labeled actin in living *Dictyostelium amoebae*. *Cell Struct. Funct.* 21, 189-197.
- YUMURA S., KITANISHI-YUMURA T., 1993. A mechanism for the intracellular localization of myosin II filaments in the *Dictyostelium amoeba*. *J. Cell Sci.* 105, 233-242.
- YUMURA S., FUKUI Y., 1998. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 111, 2097-2108.
- YUMURA S., MORI H., FUKUI Y., 1984. Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 99, 894-899.