

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 5 · NR 3

1978 (217–324)

**Postępy
Biologii
Komórki**

PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,
01 - 813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 518 + 102 egz. Ark. wyd. 9,25. Ark. druk. 6,75 + 5/8 wkl. Papier druk. sat. III kl. 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania w kwietniu 1978 r. Podpisano do druku w lipcu 1978 r.
Druk ukończono w sierpniu 1978 r. Zam. 280/78 — M-17. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

ROLA NIEHISTONOWYCH BIAŁEK CHROMATYNY (NHP) W KONTROLI TRANSKRYPCJI PODCZAS CYKLU KOMÓRKOWEGO

THE ROLE OF NON - HISTONE CHROMATIN PROTEINS (NHP) AS REGULATORS OF TRANSCRIPTION DURING THE CELL CYCLE

Ewa WILAND

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. Rezultaty badań nad NHP proliferujących komórek wskazują, że NHP mogą odgrywać istotną rolę w kontroli transkrypcji podczas cyklu komórkowego. Nicwiele jednak dotąd wiadomo o sposobie ich działania. Wiadomo jedynie, że synteza NHP biegnie poprzez cały okres cyklu komórkowego, niezależnie od replikacji DNA; maksymalny wzrost ilości NHP w fazie G_1 zachodzi na skutek migracji z cytoplazmy oraz jednoczesnej syntezy specyficznych frakcji, przy czym maksymalna fosforylacja NHP również poprzedza replikację DNA. Synteza pewnych frakcji NHP, występująca wkrótce po stymulacji komórki do proliferacji i niezbędna do aktywacji genomu, zachodzi na preegzystujących matrycach mRNA. Uwzględniając zarówno fakt zmniejszonej matrycowej aktywności chromatyny podczas mitozy w porównaniu z fazą S, oraz to, że histony są silniej związane z DNA podczas mitozy niż podczas fazy S, niektórzy autorzy sugerują, że udział NHP w regulacji transkrypcji u eukariotów może odbywać się poprzez pośredniczenie w wiązaniu histonów do DNA.

Summary. Results of investigations on NHP in proliferating cells indicate, that NHP may be important in control of transcription during the cell cycle. However up to now it is only little known about the mechanism of their action. They are synthesized during all stages of the cell cycle, independent of DNA synthesis. Maximal increase of NHP in G_1 is the result of migration of NHP from the cytoplasm with simultaneous synthesis of specific new fractions. Maximal phosphorylation of NHP precedes DNA replication. Synthesis of some fractions of NHP, appearing soon after cell stimulation to proliferation and indispensable for genome activation, occur on preexisting mRNAs. Because of the decreased template activity of chromatin during mitosis in comparison to S phase and stronger binding of histones to DNA during mitosis than in the S phase, some authors suggest, that NHP may participate in regulation of transcription in eucariots by interaction with histones bound to DNA.

Wykaz stosowanych skrótów

SDS — sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego
cAMP — 3',5' - cykliczny adenozymonofosforan

WSTĘP

Chromatyna eukariotów jest nukleoproteidowym kompleksem składającym się z DNA, białek i RNA. Mimo postępujących badań, wciąż mało jeszcze wiadomo o specyficznej funkcji, jaką odgrywają poszczególne białka chromatyny. Obecnie na ogół przyjmuje się, że histony pełnią rolę niespecyficznego supresora syntezy RNA DNA - zależnego oraz uczestniczą w tworzeniu struktury chromosomów podczas cyklu komórkowego [13-15, 20]. Coraz więcej badań wskazuje, że w regulacji ekspresji genu u eukariotów biorą udział NHP. NHP są niezwykle heterogenną, słabo jeszcze scharakteryzowaną frakcją białek jądrowych, obejmującą białka strukturalne, enzymatyczne i prawdopodobnie białka biorące udział w specyficznej aktywacji genów (por. komentarz red. Nature 1975, 257, 644-645). Masa cząsteczkowa NHP wynosi od dziesięciu do kilkuset tysięcy daltonów [15]. Punkt izoelektryczny NHP zawiera się w granicach 3,7-9,0. Poddając NHP dwukierunkowej elektroforezie: w roztworze mocznika (zależność rozdziału od punktu izoelektrycznego) i w SDS (zależność rozdziału od masy cząsteczkowej), uzyskano około 7000 frakcji tych białek [8].

W przeciwieństwie do histonów, których synteza jest ściśle związana z replikacją DNA, NHP są syntetyzowane poprzez cały okres cyklu komórkowego, niezależnie od replikacji DNA [19, 51, 52, 64]. Istnieją natomiast wyraźne różnice między frakcjami NHP zsyntetyzowanymi w różnych fazach cyklu [4, 19, 24]. Białka te ulegają specyficznym zmianom w odpowiedzi na stymulację komórek mitogenami [1, 23, 34], hormonami [11, 48, 65, 66, 69], podczas procesu różnicowania się komórek [25, 36, 39, 41, 46], produkcji przeciwciał [21, 42] oraz w procesie transformacji nowotworowej [9, 74]. Wiadomo także, że matrycowo aktywna chromatyna w porównaniu z matrycowo nieaktywną zawiera więcej NHP [5, 73].

W polskim piśmiennictwie ukazało się szereg prac przeglądowych omawiających obszernie ogólną charakterystykę i udział NHP w regulacji transkrypcji [20, 26, 27, 33, 43]. W pracach tych podkreśla się, że regulatorowe funkcje NHP należy przypisywać jedynie małej frakcji NHP, wyróżniającej się swoistością tkankową i gatunkową [2, 35, 50, 68, 72], szybkim obrotem metabolicznym [12, 70], specyficznością wiązania z DNA [28, 30, 67, 68, 71], specyficznością oddziaływania na aktywność matrycową chromatyny [10, 38, 43, 49] i podlegającej zmianom w okresach indukcji aktywności genu [23, 56, 66]. Natomiast wyjaśnienie mechanizmu, na podstawie którego białka te mogą regulować transkrypcję, pozostaje nadal w sferze hipotez [7, 20, 40, 62].

W badaniach nad regulatorową funkcją NHP u eukariotów, szczególnie interesującym modelowym systemem aktywacji genów i tym samym udziału białek regulatorowych jest komórka, przechodząca przez kolejne etapy cyklu komórkowego. Jeżeli NHP faktycznie biorą udział w kontroli transkrypcji podczas cyklu komórkowego, to zmiany w syntezie specyficznych frakcji NHP związanych z DNA podczas kolejnych faz cyklu powinny wskazywać na regulatorową rolę tych białek. Do badania mechanizmu kontroli ekspresji genów podczas cyklu komórkowego nadają się szczególnie stale dzielące się, zsynchronizowane komórki, względnie spoczynkowe komórki, pobudzane do podziałów przez zastosowanie odpowiednich stymulatorów.

ILOŚCIOWE ZMIANY NHP PODCZAS SYNCHRONICZNEGO WZROSTU KOMÓREK HELA

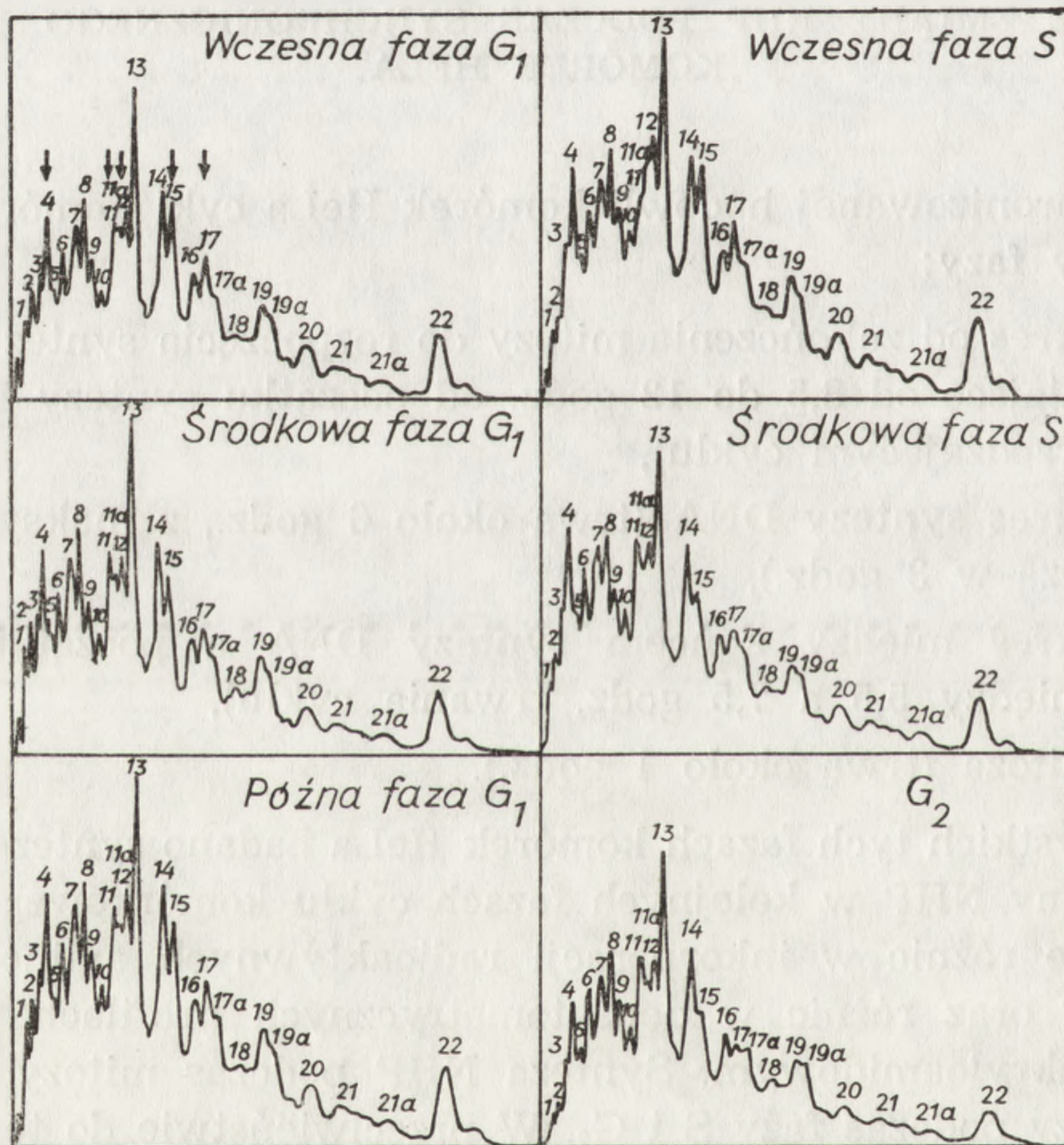
W zsynchronizowanej hodowli komórek HeLa cykl komórkowy dzieli się na cztery fazy:

- G₁ — okres od zakończenia mitozy do rozpoczęcia syntezy DNA (ma miejsce od 8,5 do 12 godz. od początku syntezy DNA w poprzedzającym cyklu),
- S — okres syntezy DNA (trwa około 6 godz., z maksymalną syntezą w 3 godz.),
- G₂ — okres między końcem syntezy DNA a początkiem mitozy (między 5,5 a 7,5 godz. trwania cyklu),
- M — mitoza (trwa około 1 godz.).

We wszystkich tych fazach komórek HeLa badano syntezę NHP [4, 6, 24, 51]. Zmiany NHP w kolejnych fazach cyklu komórkowego określano na podstawie różnic w inkorporacji radioaktywnych aminokwasów do frakcji NHP oraz różnic w densytometrycznych profilach tych białek w żelu poliakryloamidowym. Synteza NHP podczas mitozy nie różniła się od syntezy podczas fazy S i G₂. W przeciwieństwie do tego, w okresie mitozy, kiedy zostaje zahamowana synteza RNA, następowało obniżenie o 70–90% syntezy wszystkich pozostałych białek komórkowych [51]. Maksymalna inkorporacja ³H-leucyny do NHP występowała w późnej fazie G₁, poprzedzając początek syntezy DNA [53].

NHP ekstrahowane z komórek HeLa są heterogenną frakcją białek jądrowych o masach cząsteczkowych w granicach 15 000–180 000 daltonów, przy czym 85% tych białek ma masę cząsteczkową ponad 40 000 daltonów [4]. Poszczególne frakcje NHP wykazują specyficzne dla po-

szczególnych faz cyklu komórkowego zmiany w syntezie i obrocie metabolicznym. Szczególnie szybkim obrotem metabolicznym w komórkach HeLa cechują się polipeptydy wysokocząsteczkowe [53]. Przedstawione na ryc. 1 elektroforogramy NHP w kolejnych fazach cyklu komórek HeLa wskazują na zmniejszanie frakcji NHP o masie cząsteczkowej 75 000 daltonów (pasma 11) bezpośrednio przed replikacją DNA. W połowie fazy S frakcja ta wracała do poprzedniego poziomu. Od połowy fazy S do połowy G_2 następowało zmniejszanie o 50% frakcji przedstawionej jako pasmo 15. W fazie G_2 ulegały obniżeniu także dwie dalsze frakcje NHP (pasma 4 i 17) [4]. Podobne zmiany w syntezie NHP w kolejnych fazach cyklu komórkowego obserwowano także podczas synchronicznego wzrostu komórek jajowych chomika [19].



Ryc. 1 Profile densytometryczne elektroforetycznego rozdzielania NHP izolowanych z synchronizowanych komórek HeLa [4]

Stein i Matthews [59] działali na komórki HeLa podczas mitozy aktynowycyną D w dawce, która hamuje syntezę RNA DNA - zależnego do poziomu 0,5% kontroli ($2\mu\text{g}/1\text{ml}$). Synteza pewnych frakcji NHP, o wysokiej masie cząsteczkowej, badana 20, 50 i 80 min. po mitozie okazała się niewrażliwa na aktynowycynę D. Ten wynik może oznaczać, że

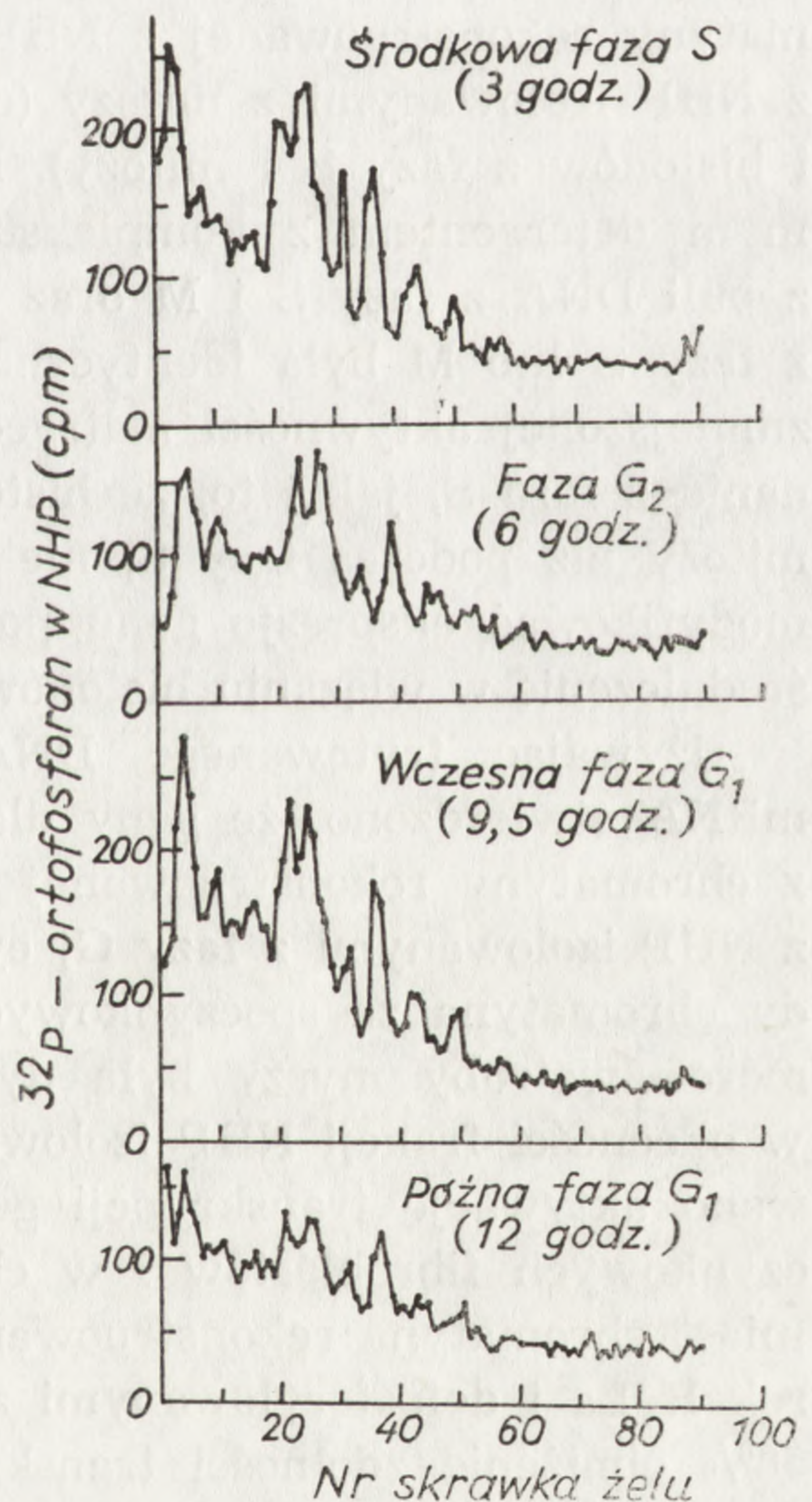
w komórkach HeLa synteza pewnych frakcji NHP odbywa się we wczesnej fazie G_1 na matrycach mRNA transkrybowanych przed mitozą i aktywowanych podczas fazy G_1 .

FOSFORYLACJA NHP W RÓŻNYCH FAZACH CYKLU KOMÓREK HELA

Badania fosforylacji NHP w synchronicznie dzielących się komórkach HeLa wskazują, że fosforylacja tych białek zależy od fazy cyklu komórkowego [24]. Podstawą oceny tego procesu jest inkorporacja ^{32}P -fosforanu do NHP ekstrahowanych z jąder komórkowych fenolem. Maksymalna fosforylacja NHP przypada na wczesną fazę G_1 oraz na początkowy okres fazy S cyklu komórkowego, natomiast minimalna fosforylacja występuje w fazach G_2 i M. Wbudowywanie ^{32}P -fosforanu do poszczególnych frakcji NHP przebiega z różną intensywnością i wykazuje zmiany zależne od fazy cyklu (ryc. 2). Obrót metaboliczny grup fosforanowych trwa w różnych frakcjach od 5,5 do 12 godz. Stwierdzono, że grupy fosforanowe ulegają wymianie bez degradacji łańcucha polipetydowego NHP [24]. Wbudowywanie fosforanu do NHP podczas różnych faz cyklu komórkowego wydaje się mieć istotny związek z aktywacją kinaz białkowych zależnych od cAMP, którego poziom zmienia się w czasie synchronicznego wzrostu komórek HeLa. Maksymalne stężenie cAMP występuje na początku fazy S, minimalne — od późnego okresu fazy G_2 do M. Szczegółowe dane na temat fosforylacji NHP zawiera artykuł Famulskiego [16].

REKONSTRUKCJA CHROMATYNY Z KOMÓREK HeLa

Bardziej szczegółowych danych, przemawiających za tym, że NHP są odpowiedzialne za specyficzne dla fazy cyklu komórkowego różnice w ekspresji genów, dostarczyły badania z rekonstruowaną chromatyną. Podczas mitozy następuje obniżenie



Ryc. 2 Wbudowywanie ^{32}P -fosforanu do frakcji NHP rozdzielonych elektroforetycznie w różnych fazach cyklu komórek HeLa [24]

matrycowej zdolności chromatyny do syntezy RNA. Poprzez rekonstrukcję chromatyny z DNA i białkami izolowanymi z fazy S lub alternatywnie z fazy M wykazano, że obniżenie aktywności matrycowej chromatyny następuje w wyniku interakcji białek chromatyny z fazy M z DNA [18]. Po oddzieleniu histonów od NHP stwierdzono, że aktywność matrycowa chromatyny rekonstruowanej z DNA i histonami z fazy S i M oraz z NHP pochodzącymi z fazy M była obniżona w porównaniu z aktywnością chromatyny rekonstruowanej z NHP z fazy S cyklu komórek HeLa [57]. Poprzez selektywną dysocjację histonów z chromatyny jonowym detergentem dezoksycholeinianem sodu ustalono następnie, że histony są ściślej związane z DNA podczas mitozy w porównaniu z fazą S. Przypuszczalnie za zmiany w asocjacji histonów z DNA są odpowiedzialne specyficzne dla fazy cyklu komórkowego NHP. Okazało się bowiem, że dezoksycholeinian sodu silniej ekstrahował histony z chromatyny rekonstruowanej z NHP izolowanymi z fazy S w porównaniu z NHP izolowanymi z mitozy (do rekonstrukcji użyto także puli DNA i histonów z fazy S i mitozy). Natomiast ekstrakcja histonów tym samym detergentem z kompleksu nukleohistonowego rekonstruowanego z puli DNA z fazy S i M oraz z histonami izolowanymi alternatywnie z fazy S lub M była identyczna [58]. Biorąc pod uwagę zarówno fakt zmniejszonej aktywności matrycowej chromatyny w fazie M w porównaniu z fazą S, jak i to, że histony są silniej związane z DNA podczas mitozy niż podczas fazy S, niektórzy autorzy sugerują, że NHP mogą modyfikować ekspresję genu podczas cyklu komórkowego poprzez pośredniczenie w wiązaniu histonów do DNA [58].

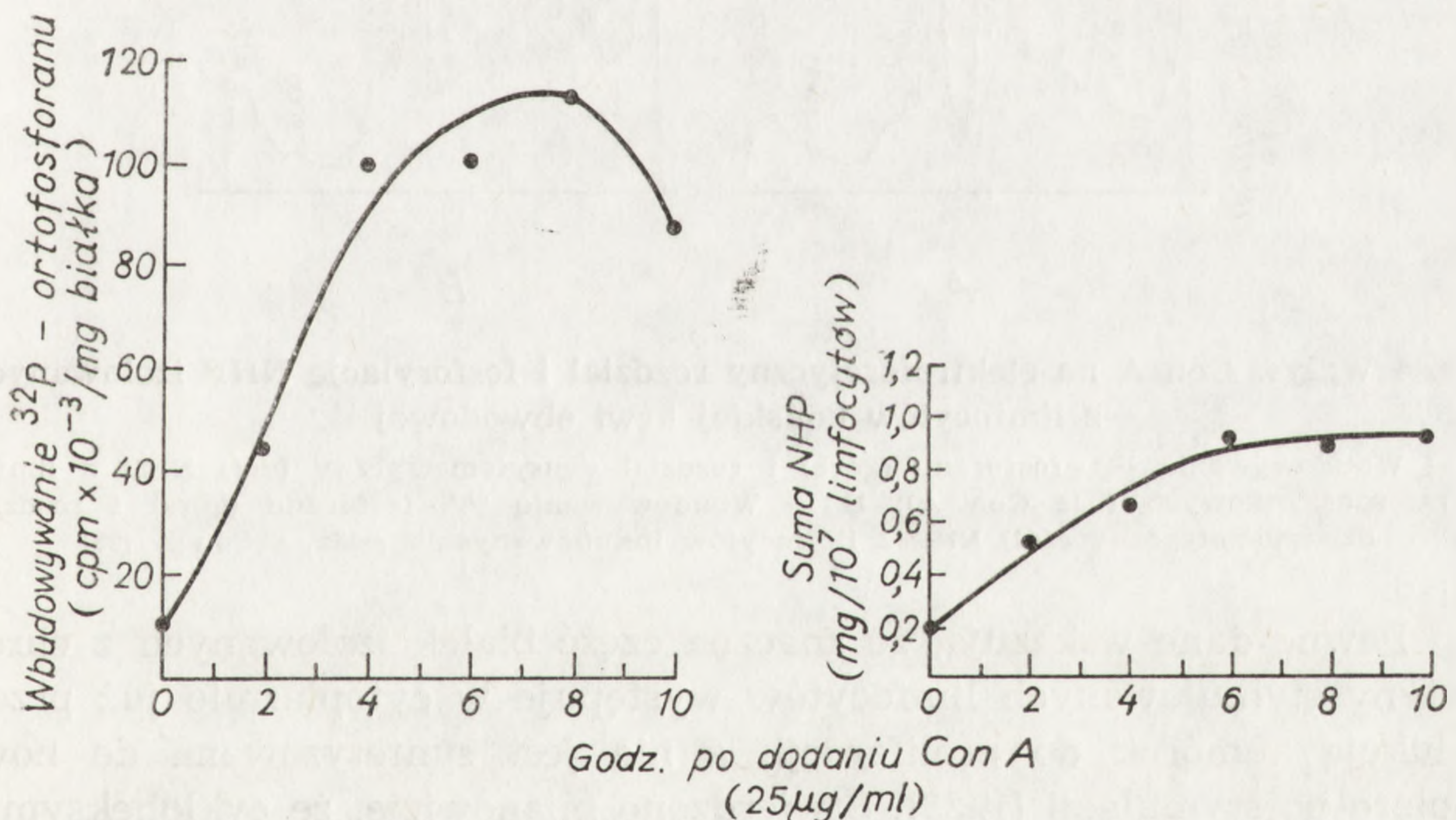
Używając trytowanego DNA komplementarnego do histonowego mRNA stwierdzono, że geny dla histonów są transkrybowane *in vitro* z chromatyny rekonstruowanej z NHP izolowanymi z fazy S, ale nie z NHP izolowanymi z fazy G₁ cyklu komórek HeLa [10, 60, 61, 63]. Kiedy chromatyna ze spoczynkowych fibroblastów linii WI-38 lub z komórek wątroby myszy była dysocjowana i następnie rekonstruowana w obecności frakcji NHP izolowanej z fazy S komórek HeLa, obserwowano aktywację transkrypcji genów histonowych w chromatynie spoczynkowych fibroblastów i w chromatynie wątroby myszy [37]. Natomiast chromatyna rekonstruowana z NHP izolowanymi z fazy S komórek HeLa i defosforylowanymi za pomocą fosfatazy wykazywała ponad 50% obniżenie zdolności transkrypcji genów kodujących dla histonów w porównaniu z kontrolą [31, 32].

ZMIANY NHP W LIMFOCYTACH STYMULOWANYCH DO PROLIFERACJI

Mitogeny roślinne, takie jak fitohemaglutynina (PHA) i konkanawalina A (Con A), stymulują *in vitro* transformację spoczynkowych lim-

focytów do limfocytów proliferujących. Limfocyty stymulowane do proliferacji są modelowym systemem do badania aktywacji genów poprzedzających syntezę DNA. Indukowana synteza DNA rozpoczyna się w limfocytach około 24 godz. po stymulacji. Początek syntezy DNA poprzedzają zawsze zmiany NHP. Levy [34] wykazał, że jednym z wcześniejszych procesów modyfikujących chromatynę w limfocytach świnki morskiej stymulowanych przez PHA był wzrost syntezy NHP. Wzrost syntezy NHP obserwowano już po pierwszej godzinie od podania mitogenu do hodowli komórkowej, przy czym wzrost ten był szczególnie wysoki w kilku specyficznych frakcjach NHP. Stwierdzono także, że PHA stymuluje fosforylację NHP już po 15 min. inkubacji z tym mitogenem [29].

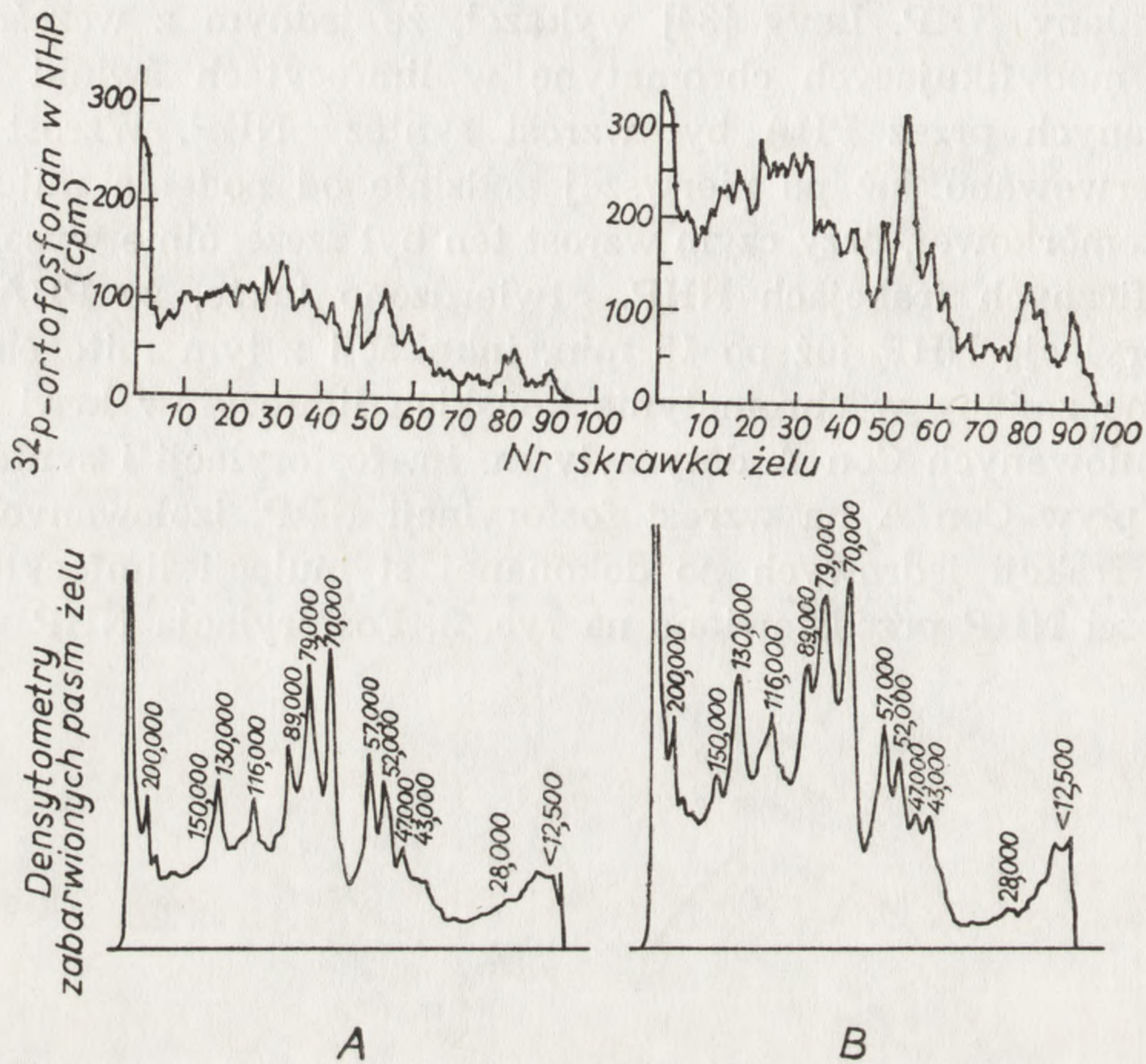
Wczesne zmiany w chromatynie końskich limfocytów krwi obwodowej stymulowanych Con A dotyczyły m. in. fosforylacji i syntezy NHP [1, 23]. Wpływ Con A na wzrost fosforylacji NHP, izolowanych sukcesywnie z frakcji jądrowych po dokonanej stymulacji limfocytów, oraz wzrost ilości NHP przedstawiono na ryc. 3. Fosforylacja NHP wzrastała



Ryc. 3 Wpływ Con A na wzrost fosforylacji i ilości NHP izolowanych z limfocytów końskiej krwi obwodowej [23]

4 - krotnie w ciągu 2 godz. od momentu podania Con A do hodowli limfocytów i była maksymalna po 8 godz. inkubacji z tym mitogenem. Ilość NHP rosła progresywnie od około 270 mg/ 10^7 komórek w hodowli kontrolnej do około 800 mg/ 10^7 komórek w hodowli po 6 godz. inkubacji z Con A, kiedy ilość NHP osiągała stały poziom (oznacza to 4 - krotny wzrost ilości NHP w ciągu 6 godz.). Porównując elektroforogramy

NHP izolowanych ze spoczynkowych limfocytów i limfocytów stymulowanych Con A wykazano także ilościowe zmiany w poszczególnych frakcjach NHP oraz różnice w poziomie ich fosforylacji [1, 23] (ryc. 4).



Ryc. 4 Wpływ Con A na elektroforetyczny rozdział i fosforylację NHP izolowanych z limfocytów końskiej krwi obwodowej

A — Wbudowywanie ^{32}P -fosforanu (górze) i rozdział densytometryczny (dół) NHP z limfocytów spoczynkowych (bez Con A); B — Wbudowywanie ^{32}P -fosforanu (górze) i rozdział densytometryczny (dół) NHP z limfocytów inkubowanych 2 godz. z Con A [23]

Pewne dane wskazują, że znaczna część białek izolowanych z chromatyny stymulowanych limfocytów występuje w cytoplazmie już przed indukcją komórek do proliferacji, a nie jest syntetyzowana de novo dopiero po stymulacji [1, 23]. Stwierdzono mianowicie, że cykloheksymid (10 $\mu\text{g}/1\text{ml}$) dodany do hodowli limfocytów hamował wbudowywanie ^3H -leucyny do NHP w ponad 94%, nie miał natomiast żadnego wpływu na wzrost ilości jądrowych NHP wywołanych stymulacją Con A. Z tego wypływa wniosek, że indukowana mitogenem akumulacja NHP w chromatynie nie jest spowodowana jedynie syntezą tych białek już po dokonanej stymulacji komórek. Do takiego wniosku prowadzi także wynik doświadczenia, w którym spoczynkowe limfocyty hodowano w pożywce zawierającej ^3H -leucynę, a następnie stymulowano Con A w pożywce nieznakowanej. W stymulowanych limfocytach obserwowano

wzrost ilości znakowanych NHP. Zdaniem Allfrefya [1], na początku aktywacji genów w limfocytach stymulowanych mitogenem zachodzi masowa migracja NHP z cytoplazmy do jądra, jednak niezależnie od migracji NHP z cytoplazmy do jądra, w stymulowanych limfocytach następuje również wzrost syntezy NHP.

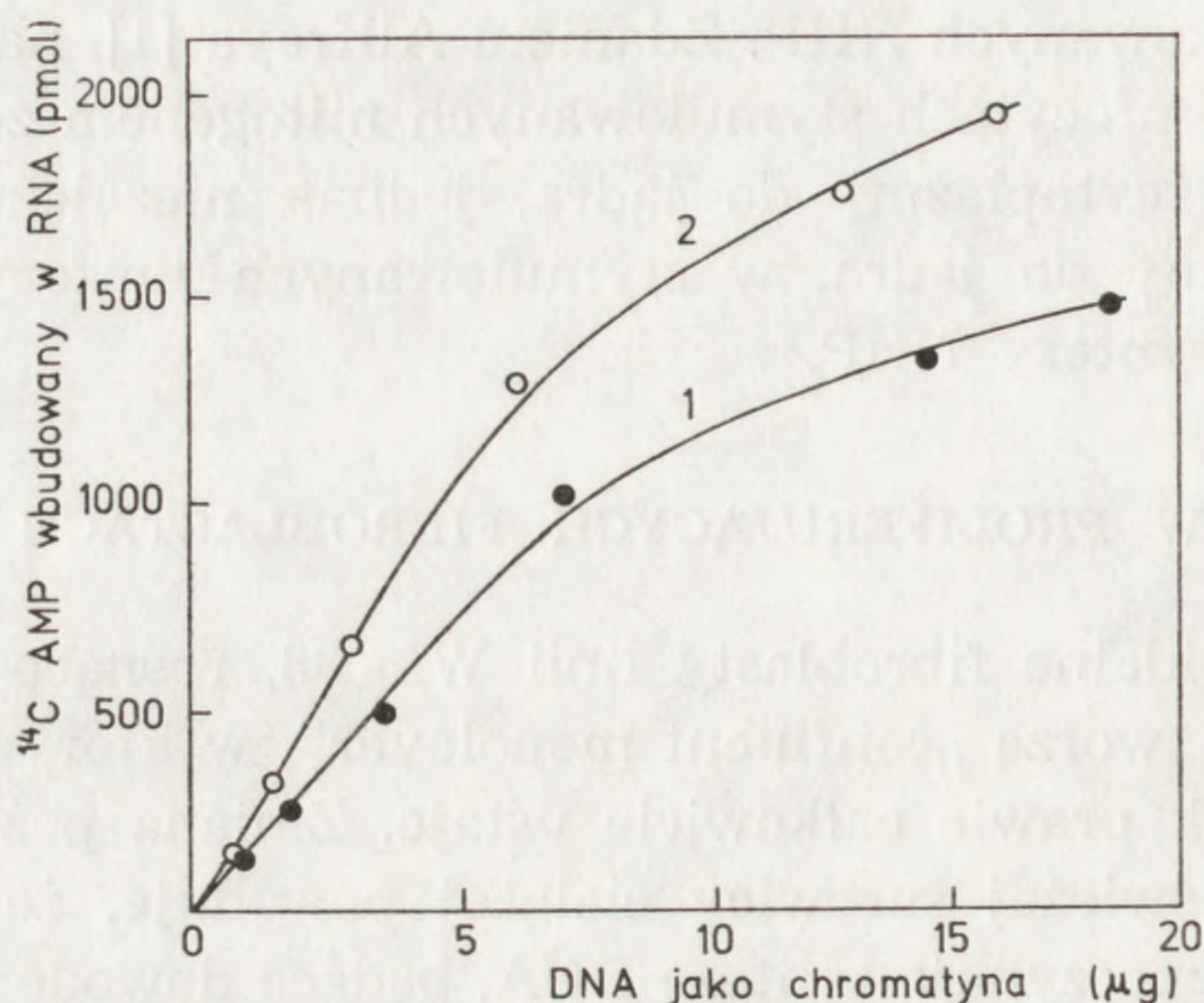
ZMIANY NHP W PROLIFERUJĄCYCH FIBROBLASTACH LINII WI - 38

Ludzkie diploidalne fibroblasty linii WI - 38, rosnące w hodowli bez zmiany pożywki, tworzą „confluent monolayer”, w których synteza DNA i podział komórek prawie całkowicie ustaje. Zmiana pożywki lub dodanie do pożywki świeżej surowicy cielej powoduje, że po około 9–15 godz. komórki rozpoczynają syntezę DNA, będącą dowodem, że pod wpływem zmiany pożywki wystąpiła stymulacja fibroblastów z następującą aktywacją genomu [3, 17, 44]. Stwierdzono, że już w ciągu pierwszej godz. po stymulacji zachodzi 70% wzrost matrycowej aktywności chromatyny. Przypuszczalnie za wzrost w matrycowej aktywności chromatyny stymulowanych fibroblastów są odpowiedzialne NHP, wkrótce bowiem po stymulacji następowało zwiększenie syntezy NHP. Obrót metaboliczny NHP w stymulowanych komórkach linii WI - 38 był 3 - krotnie wyższy w porównaniu z komórkami spoczynkowymi [45]. W stymulowanych fibroblastach wykazano także zmiany w syntezie dwóch specyficznych frakcji NHP o masach cząsteczkowych 35 000 i 120 000 daltonów [54]. Podobnie jak w doświadczeniach z komórkami HeLa [51] stwierdzono brak zależności syntezy NHP od replikacji DNA [64].

REKONSTRUKCJA CHROMATYNY Z FIBROBLASTÓW LINII WI - 38

Bardziej szczegółowy dowód na udział NHP w regulacji transkrypcji w fibroblastach linii WI - 38 przedstawił Stein [56]. Badał on matrycową aktywność chromatyny w układzie rekonstrukcyjnym zawierającym DNA pochodzący z komórek HeLa oraz NHP i histony pochodzące zarówno ze spoczynkowych, jak i stymulowanych fibroblastów. Matrycowa aktywność chromatyny rekonstruowanej z NHP izolowanymi z fibroblastów po pierwszej godz. stymulacji była wyższa w porównaniu z chromatyną rekonstruowaną z NHP izolowanymi z fibroblastów spoczynkowych (ryc. 5).

Zahamowanie cykloheksymidem (5 μ g/1ml) syntezy białek w stymulowanych komórkach linii WI - 38 w ciągu pierwszej godz. po zmianie pożywki powodowało obniżenie matrycowej aktywności chromatyny w tym okresie i zapobiegało syntezie DNA [44]. Te wyniki wskazują, że dla aktywacji genomu w stymulowanych fibroblastach konieczna jest synteza NHP.



Ryc. 5 Matrycowa aktywność chromatyny rekonstruowanej z DNA pochodzącym z komórek HeLa, pułą histonów z fibroblastów spoczynkowych i po pierwszej godz. stymulacji oraz alternatywnie z NHP fibroblastów spoczynkowych (1) albo z fibroblastów po pierwszej godz. stymulacji (2) [56]

Używając trytowanego DNA, komplementarnego do histonowego mRNA i techniki rekonstrukcji chromatyny, badano również regulację ekspresji genów histonowych w pobudzonych do proliferacji fibroblastach [22]. Rekonstrukcja chromatyny z DNA i histonami izolowanymi ze spoczynkowych fibroblastów oraz z NHP izolowanymi z fazy S fibroblastów powodowała 500 - krotne zwiększenie transkrypcji mRNA dla histonów w porównaniu z chromatyną komórek spoczynkowych.

BADANIA mRNA DLA NHP FIBROBLASTÓW LINII WI - 38

W celu określenia syntezy mRNA dla NHP związanych z chromatyną w stymulowanych fibroblastach wykonano doświadczenia z użyciem aktynomycyny D jako inhibitora syntezy RNA. Rovera i wsp. [45] wykazali dużą wrażliwość syntezy NHP zachodzącej zarówno we wczesnych, jak i w późniejszych godz. po stymulacji fibroblastów na bardzo niskie dawki, aktynomycyny D (0,01 µg/1ml). Natomiast Stein i Burtner stwierdzili, że aktynomycyna D (1 µg/1ml) dodana do hodowli komórkowej 30 min. przed stymulacją fibroblastów nie wpływała na wzrost syntezy NHP obserwowany w fibroblastach po pierwszej godz. od stymulacji [54]. W dalszych badaniach autorzy ci uwzględnili wiek komórek linii WI - 38 (zależny od liczby pasaży) i wykazali, że stymulowana synteza NHP jest niewrażliwa na aktynomycynę D w fibroblastach „młodych”, będąc wrażliwą w fibroblastach „starych”. Ten wynik badania zdaje się wskazywać na syntezę NHP w „młodych” komórkach na preegzystują-

cym mRNA, nieobecnym w komórkach „starych”. Stąd dyskutowana jest możliwość, że stymulowana synteza NHP i aktywacja transkrypcji wkrótce po zmianie pożywki w hodowli fibroblastów może być regulowana na poziomie translacji.

ZMIANY NHP W STYMULOWANYCH IZOPROTERENOLEM KOMÓRKACH GRUCZOŁÓW ŚLINOWYCH MYSZY

Przedstawione obserwacje, dotyczące komórek pobudzanych *in vitro*, są zgodne z badaniami NHP komórek stymulowanych do proliferacji *in vivo*. W komórkach gruczołów ślinowych myszy, po pojedynczym wstrzyknięciu izoproterenolu, następowała po około 20 godz. stymulacja syntezy DNA, poprzedzająca podział komórek [47, 52]. W różnych okresach po podaniu izoproterenolu zwierzęta zabijano, po czym komórki gruczołów ślinowych inkubowano w pożywce z ^3H -leucyną przez 30 min. Synteza NHP wzrastała w ciągu pół godz. po stymulacji, osiągając maksymalny poziom w 12 godz., po czym wracała do poziomu kontroli po 48 godz. Aktynomycyna D (30 μg /mysz) podana 30 min. przed wstrzyknięciem izoproterenolu hamowała inkorporację ^3H -leucyny do NHP syntetyzowanych w 8 i 12 godz. po stymulacji, nie wywierając natomiast żadnego wpływu na wzrost syntezy NHP w pierwszych godz. po stymulacji. Cykloheksymid (0,03 μg /1g wagi ciała) podany 60 min. po wstrzyknięciu izoproterenolu hamował syntezę DNA i powodował przemijającą, trwającą między 1 i 3 godz. po stymulacji, inhibicję syntezy NHP, w następstwie czego ulegała zahamowaniu również synteza NHP w 8 i 12 godz. [52]. Wyniki te zdają się wskazywać, że synteza NHP we wczesnym okresie stymulacji komórek izoproterenolem może być spowodowana aktywacją preegzystującego mRNA i translacyjną kontrolą początkowych procesów w prereplikacyjnej fazie cyklu komórkowego. W tym wypadku białko syntetyzowane w pierwszych 3 godz. po dokonaniu stymulacji mogło jednocześnie wyzwolić syntezę mRNA dla syntezy NHP występującej w późniejszym okresie fazy G_1 (8–12 godz. po stymulacji).

LITERATURA

- [1] ALLFREY V. G., INOUE A., KARN J., JOHNSON E. M., GOOD R. A., HADDEN J. W., Sequence - specific binding of DNA by non - histone proteins and their migration from cytoplasm to nucleus during gene activation, [w] The Structure and Function of Chromatin, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 199–219.

- [2] BARRET T., MARYANKA D., HAMLYN P. H., GOULD H. J., Non-histone proteins control of gene expression in reconstituted chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 5057-5061, 1974.
- [3] BASERGA R., BOMBIK B., NICOLINI C., Changes in chromatin structure and function in WI-38 cells stimulated to proliferate, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. S., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 269-279.
- [4] BHORJEE J. S., PEDERSON T., Nonhistone chromosomal proteins in synchronized HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 3345-3349, 1972.
- [5] BONNER J., Regulation of gene in higher organisms: how it all works, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 315-335.
- [6] BORUN T. W., STEIN G. S., The synthesis of acidic chromosomal proteins during the cell cycle of HeLa S-3 cells. II. The kinetics of residual synthesis and transport, *J. Cell Biol.*, **52**: 308-315, 1972.
- [7] BRADBURY E. M., Histones in chromosomal structure and control of cell division, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford New York 1975, 131-149.
- [8] BRAY D., The protein explosion, *Nature*, **267**: 481-482, 1977.
- [9] CHAE C. B., SMITH C., MORRIS H., Chromosomal nonhistone proteins of rat hepatomas and normal rat liver, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **60**: 1468-1471, 1974.
- [10] CHIU J. F., TSAI J. H., SEKUMA K., HNILICA L., Regulation of in vitro mRNA transcription by fraction of chromosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**: 9431-9433, 1975.
- [11] COHEN M. E., HAMILTON T. H., Effect of estradiol-17 on the synthesis of specific uterine nonhistone chromosomal proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 4346-4350, 1975.
- [12] COURTOIS Y., DASTUQUE B., KRUH J., Effect of lysin deprivation and serum stimulation on the synthesis of non-histone chromosomal proteins by confluent chick fibroblasts, *Exptl. Cell Res.*, **83**: 152-158, 1974.
- [13] DELANGE R. J., SMITH E. L., Histones function and evolution as viewed by sequence studies, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 59-70.
- [14] DIXON G. H., CANDIDO E. P., HONDA B. M., LOUIE A. J., MACLEODI A. R., SUNG M. T., The biological roles of post-synthetic modifications of basic nuclear proteins, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 229-250.
- [15] ELGIN C. S. R., STUMPH W. E., Chemistry of the non-histone chromosomal proteins., [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 113-123.
- [16] FAMULSKI K. S., Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne substraty jądrowych kinaz białkowych, *Post. Biochem.*, **23**: 379-397, 1975.
- [17] FARBER J., ROVERA G., BASERGA R., Template activity of chromatin

- during stimulation of cellular proliferation in human diploid fibroblasts, *Biochem. Cell J.*, **122**: 189–195, 1971.
- [18] FARBER J., STEIN G., BASERGA R., The regulation of RNA synthesis during mitosis, *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **47**: 790–798, 1972.
- [19] GERNER E. W., HUMPHREY R. M., The cell - cycle phase synthesis of non - histone proteins in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **331**: 117–127, 1973.
- [20] HORST A., Regulacja czynności genu u eukariotów, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 127–154, 1976.
- [21] HORST A., RAKOWICZ - SZULCZYŃSKA E. M., New fractions of non - histone proteins in spleen cells of mice immunized with various antigens, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **25**: 211–215, 1977.
- [22] JANSING R. L., STEIN J. L., STEIN G. S., Activation of histone gene transcription by nonhistone chromosomal proteins in WI - 38 human diploid fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 173–177, 1977.
- [23] JOHNSON E. M., KARN J., ALLFREY V. G., Early nuclear events in the induction by lymphocyte proliferation by mitogens, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4990–4999, 1974.
- [24] KARN J., JOHNSON E. M., VIDALI G., ALLFREY V. G., Differential phosphorylation and turnover of nuclear acid proteins during the cell cycle of synchronized HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 667–677, 1974.
- [25] KEPPEL F., ALLET B., EISEN H., Appearance of a chromatin protein during the erythroid differentiation of Friend virus - transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 653–656, 1977.
- [26] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Biologiczna rola białek niehistonowych chromatyny, *Post. Biochem.*, **19**: 533–538, 1973.
- [27] — Specyficzność białek niehistonowych, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 31–50, 1976.
- [28] KLEINSMITH L. J., Specific binding of phosphorylated non-histone chromatin proteins to deoxyribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **248**: 5648–5653, 1973.
- [29] KLEINSMITH L. J., ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei, *Biochemistry*, **55**: 1182–1189, 1966.
- [30] KLEINSMITH L. J., HEIDEMA J., CARROL A., Specific binding of rat liver nuclear proteins to DNA, *Nature*, **226**: 1025–1026, 1970.
- [31] KLEINSMITH L. J., STEIN J., STEIN G., Dephosphorylation of non - histone proteins specifically alters the pattern of gene transcription in reconstituted chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1174–1178, 1976.
- [32] — Direct evidence for a functional relationship between nonhistone chromosomal protein phosphorylation and gene transcription, [w] *Chromosomal Proteins and Their Role in Regulation of Gene Expression*, red. Stein G. S Klein-smith L. J., Acad. Press. In., New York — San Francisco, London 1975, 59–66.
- [33] KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., POLANOWSKA Z., Kwaśne białka jąder komórkowych, *Post. Biochem.*, **17**: 601–629, 1971.
- [34] LEVY R., LEVY S., ROSENBERG S., SIMPSON R. T., Selective stimulation of nonhistone chromatin protein synthesis in lymphoid cells by phytohemagglutinin, *Biochemistry*, **12**: 224–228, 1973.
- [35] MacGILLIVRAY A. J., CARROL D., PAUL J., The heterogeneity of the non - histone chromatin proteins from mouse tissues, *FEBS Lett.*, **13**: 204–208, 1971.
- [36] NEWMAN S. A., BIRNBAUM J., YEOCH G. C. T., Loss of a non - histone

- chromatin protein parallels in vitro differentiation of cartilage, *Nature*, **259**: 417-419, 1976.
- [37] PARK W., JANSING R., STEIN J. L., STEIN G. S., Activation of histone gene transcription in quiescent WI - 38 cells or mouse liver by a nonhistone chromosomal protein fraction from HeLa S₃ cells, *Biochemistry*, **16**: 3713-3720, 1977.
- [38] PARK W., STEIN J. L., STEIN G. S., Activation of in vitro histone gene transcription from HeLa S₃ chromatin by S - phase nonhistone chromosomal proteins, *Biochemistry*, **15**: 3296-3300, 1976.
- [39] PATEL G., Chromatin acidic proteins with affinity for nucleohistone and DNA, *Life Sci.*, **11**: 1135-1142, 1972.
- [40] PAUL J., GILMOUR R. S., The regulatory role of non - histone proteins in RNA synthesis, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E., Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford — New York 1975, 181-192.
- [41] PLATZ R. D., HNILICA L. S., Phosphorylation of nonhistone chromatin proteins during sea urchin development, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **54**: 222-227, 1973.
- [42] RAKOWICZ - SZULCZYŃSKA E. M., HORST A., Non - histone chromatin proteins (NHP) of spleen cells of mice during the primary immune response. II. Immunization with aggregated human gamma - globulin, *Acta Biochim. Pol.* (praca oddana do druku).
- [43] RAKOWICZ - SZULCZYŃSKA E. M., Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów, *Post. Biochem.*, **23**: 189-209, 1977.
- [44] ROVERA G., BASERGA R., Early changes in the synthesis of acidic nuclear proteins in human diploid fibroblasts stimulated to synthesize DNA by changing the medium, *J. Cell Physiol.*, **77**: 201-212, 1971.
- [45] ROVERA G., FARBER J., BASERGA R., Gene activation in WI - 38 fibroblasts stimulated to proliferate: requirement for protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 1725-1729, 1971.
- [46] SANDERS L. A., Isolation and characterization of the non - histone chromosomal proteins of developing avian erythroid cells, *Biochemistry*, **13**: 527-534, 1974.
- [47] SASAKI T., LITWACK G., BASERGA R., Protein synthesis in the early prereplicative phase of isoproterenol - stimulated synthesis of deoxyribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4831-4837, 1969.
- [48] SCHANDER P., STARMAN B. J., WILLIAMS R. H., Effect of testosterone on phenol - soluble nuclear acidic proteins of rat ventral prostate (38803), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**: 331-333, 1974.
- [49] Shea M., Kleinsmith L. J., Template - specific stimulation of RNA synthesis by phosphorylated non - histone chromatin proteins, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **50**: 473-477, 1973.
- [50] SPELSBERG T. C., HNILICA L. S., Deoxyribonucleoproteins and the tissue-specific restriction of the deoxyribonucleic acid in chromatin, *Biochem. J.*, **120**: 435-437, 1970.
- [51] STEIN G. S., BASERGA R., Continued synthesis of non - histone proteins during mitosis, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **41**: 715-722, 1970.
- [52] — The synthesis of acid nuclear proteins in the prereplicative phase of the isoproterenol - stimulate salivary gland, *J. Biol. Chem.*, **245**: 6097-6105, 1970.
- [53] STEIN G. S., BORUN T. W., The synthesis of acidic chromosomal proteins

- during the cell cycle of HeLa S₃ cells. I. The accelerated accumulation of acidic residual nuclear protein before the initiation of DNA replication, *J. Cell Biol.*, **52**: 292-307, 1972.
- [54] STEIN G. S., BURTNER D. E., Utilization of pre-existing messenger RNAs for nonhistone chromosomal protein synthesis in WI-38 human diploid fibroblasts, *Exptl. Cell Res.*, **88**: 319-326, 1974.
- [55] — Gene activation in human diploid cells. Age-dependent modifications in the stability of messenger RNAs for nonhistone chromosomal proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **390**: 56-68, 1975.
- [56] STEIN G. S., CHAUNDHURI S., BASERGA R., Gene activation in WI-38 fibroblasts stimulated to proliferate. Role of non-histone chromosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, **247**: 3918-3922, 1972.
- [57] STEIN G. S., FARBER J., Role of nonhistone chromosomal proteins in the restriction of mitotic chromatin template activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2918-2921, 1972.
- [58] STEIN G. S., HUNTER G., LAVIE L., Non-histone chromosomal proteins. Evidence for their role in mediating the binding of histones to deoxyribonucleic acid during the cell cycle, *Biochem. J.*, **139**: 71-76, 1974.
- [59] STEIN G. S., MATTHEWS D. E., Nonhistone chromosomal protein synthesis: Utilization of preexisting and newly transcribed messenger RNAs, *Science*, **181**: 71-73, 1973.
- [60] STEIN G. S., PARK W., THRALL C., RUSTY M., STEIN J., Regulation of cell cycle stage-specific transcription of histone genes from chromatin by non-histone chromosomal proteins, *Nature*, **257**: 764-767, 1975.
- [61] STEIN J. L., REED K., STEIN G. S., Effect of histones and nonhistone chromosomal proteins on the transcription of histone genes from HeLa S₃ cell DNA, *Biochemistry*, **15**: 3291-3295, 1976.
- [62] STEIN G. S., SPELSBERG T. C., KLEINSMITH L. J., Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation, *Science*, **183**: 817-824, 1974.
- [63] STEIN G. S., STEIN J. L., THRALL C., PARK W., Regulation of histone gene transcription during the cell cycle by nonhistone chromosomal proteins, [w] *Chromosomal Proteins and Their Role in Regulation of Gene Expression*, red. Stein G. S., Kleinsmith L. J., Acad. Press. Inc., New York — San Francisco, London 1975, 1-17.
- [64] STEIN G. S., THRALL C. L., Uncoupling of nonhistone chromosomal protein synthesis and DNA replication in human diploid WI-38 fibroblasts, *FEBS Lett.*, **34**: 35-39, 1973.
- [65] TENG C. S., HAMILTON T. H., Role of chromatin in estrogen action in the uterus. II. Hormone-induced synthesis of nonhistone acidic proteins which restore histone-inhibited DNA-dependent RNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**: 465-472, 1969.
- [66] — Regulation by estrogen of organ-specific synthesis of a nuclear acidic protein, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **40**: 1231-1238, 1970.
- [67] TENG C. S., TENG C. T., ALLFREY V. G., Species-specific interactions between nuclear phosphoproteins and DNA, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **41**: 690-696, 1970.
- [68] — Studies of nuclear acidic proteins. Evidence for their phosphorylation, tissue specificity, selective binding to DNA, and stimulatory effect on transcription, *J. Biol. Chem.*, **246**: 3597-3609, 1971.
- [69] TSAI S. Y., TSAI M. J., HARRIS S. E., O'MALLEY B. W., Effect of estrogen

- on gene expression in the chick oviduct. Control of ovalbumin gene expression by non-histone protein, *J. Biol. Chem.*, **251**: 6475-6478, 1976.
- [70] TSANEV R., DIONDIUROV D. J., IVANOVA E., Cell cycle dependent turnover of non-histone proteins in chromatin, *Exptl. Cell Res.*, **84**: 137-142, 1974.
- [71] UMANSKY S. R., KOVALEV Y. I., TOKARSKAYA V. I., Specific interaction of chromatin non-histone proteins with DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **383**: 242-254, 1975.
- [72] WANG T. Y., KOSTRABA N. C., Stimulation and inhibition of transcription in vitro by nonhistone chromosomal proteins, [w] *Chromosomal Proteins and Their Role in Regulation of Gene Expression*, red. Stein G. S., Kleinsmith L. J., Acad. Pres. In., New York — San Francisco, London 1975, 20-23.
- [73] WARNECKE P., KRUSE K., HARBERS E., Studies on Deoxyribonucleoproteins. VIII. Isolation and characterization of nonhistone proteins from euchromatic and heterochromatic deoxyribonucleoprotein of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **331**: 295-304, 1973.
- [74] YEOMAN L. C., TAYLOR C. W., JORDAN J. J., BUSCH H., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of chromatin proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **53**: 1067-1076, 1973.

Otrzymano: 19 stycznia 1978.

Przyjęto: 2 lutego 1978.

Adres autora: Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Święcickiego 6, 60 - 781 Poznań.

EGZYNA: STRUKTURA, CHEMIZM I ONTOGENEZA

EXINE: STRUCTURE, CHEMISTRY AND ONTOGENESIS

Barbara GABARA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, UŁ

Streszczenie. Opisano strukturę egzyny w sporach i ziarnach pyłku u roślin niższych i wyższych ze szczególnym uwzględnieniem ściany ziaren pyłku u okrytozależnych. Badania składu chemicznego egzyny dojrzałych ziaren pyłku wskazują, że obok sporopolleniny, stanowiącej główny składnik, występują w niej niewielkie ilości lipidów, białek (głównie enzymów), śladowe ilości polisacharydów i lignina. U większości roślin egzyna tworzy się w stadium tetrad; jest to egzyna pierwotna o celulozowym charakterze. Egzyna pierwotna stanowi wzorzec dla egzyny budowanej ze sporopolleniny bądź jej prekursorów. Wzorzec egzyny powstaje w cytoplazmie, a następnie odwzorowany jest na powierzchnię plazmolemy. W tworzeniu wzorca wydaje się uczestniczyć ściana kalozowa bądź struktury membranowe typu pęcherzyków Golgiego lub siateczki śródplazmatycznej. Tworzenie wzorca egzyny wydaje się być kontrolowane przez gametofit. Dyskutowany jest ponadto udział tapetum w tworzeniu egzyny, poprzez powstawanie ciał Ubischa i tapetosomów będących nośnikami sporopolleniny.

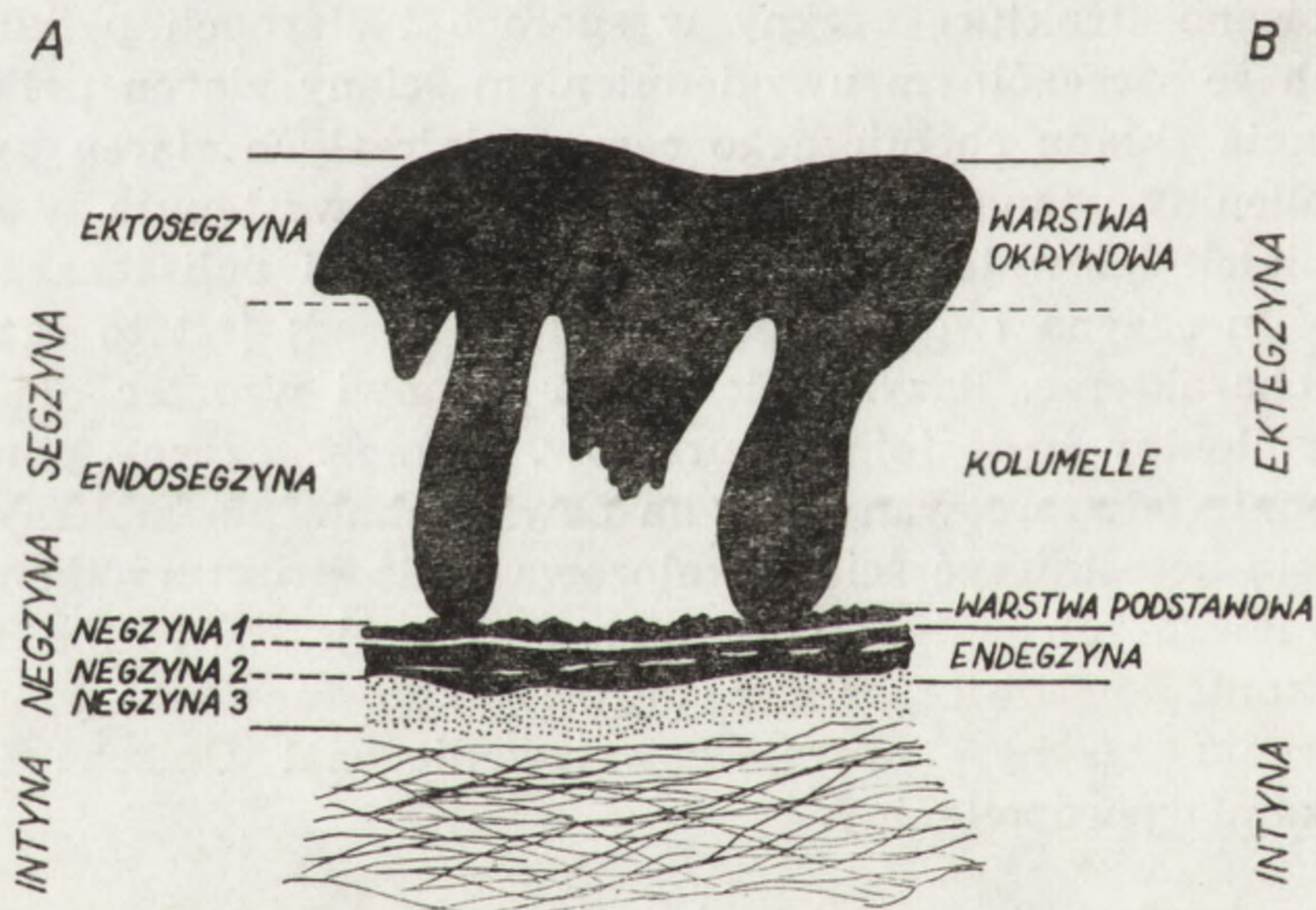
Summary. Exine structure in spores and pollen grains of lower and higher plants has been described with particular attention to the pollen grain cell wall of *Angiosperms*. The studies of the composition of exine in the mature pollen grains have revealed besides of sporopollenin being a main component, lipids, proteins (mainly enzymes) and trace amounts of polisaccharides and lignin. In the majority of plants the exine is formed in tetrad stage, it has been named primary exine, cellulose in character.

The primary exine being the pattern for exine formed of sporopollenin or its precursors, is determined in the cytoplasm and then this pattern is reprinted upon plasmalemma surface. The callose wall or membrane structures of Golgi vesicles type or endoplasmic reticulum are supposed to be involved in the formation of exine pattern. Formation of exine pattern seems to be under gametophytic control. Moreover, the contribution of the tapetum to the exine formation through the appearance of Ubisch bodies and tapetosomes being the sporopollenin carriers has been discussed.

Ziarna pyłku i ich ściana o unikalnej strukturze są od wielu lat przedmiotem intensywnych badań zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym. W badaniach tych zwraca się szczególną uwagę na: ontogenezę i strukturę wyjątkowo odpornej na działanie związków chemicznych egzyny, miejsce syntezy i skład chemiczny sporopolleniny, pochodzenie i kontrolę wzorca ściany [33, 63, 66, 67, 90, 112, 132].

STRUKTURA EGZYNY I JEJ EWOLUCJA

Egzyna jest zewnętrzną warstwą ściany komórkowej spor i ziaren pyłku roślin wielu grup systematycznych — sporodermy (zawierającej obok egzyny głębiej położoną intynę) i wykazuje skomplikowaną budowę. Złożoność budowy i urzeźbienia egzyny jest właściwością wykorzystywaną w taksonomii, pozwalającą na określenie przynależności rodzajowej, a czasem gatunkowej roślin. Ponadto nadzwyczajna trwałość egzyny umożliwia rozpoznawanie gatunków roślin kopalnych.



Ryc. 1. Schemat budowy sporodermy: A — według Erdtmana [36], B — według Faegriego [38]

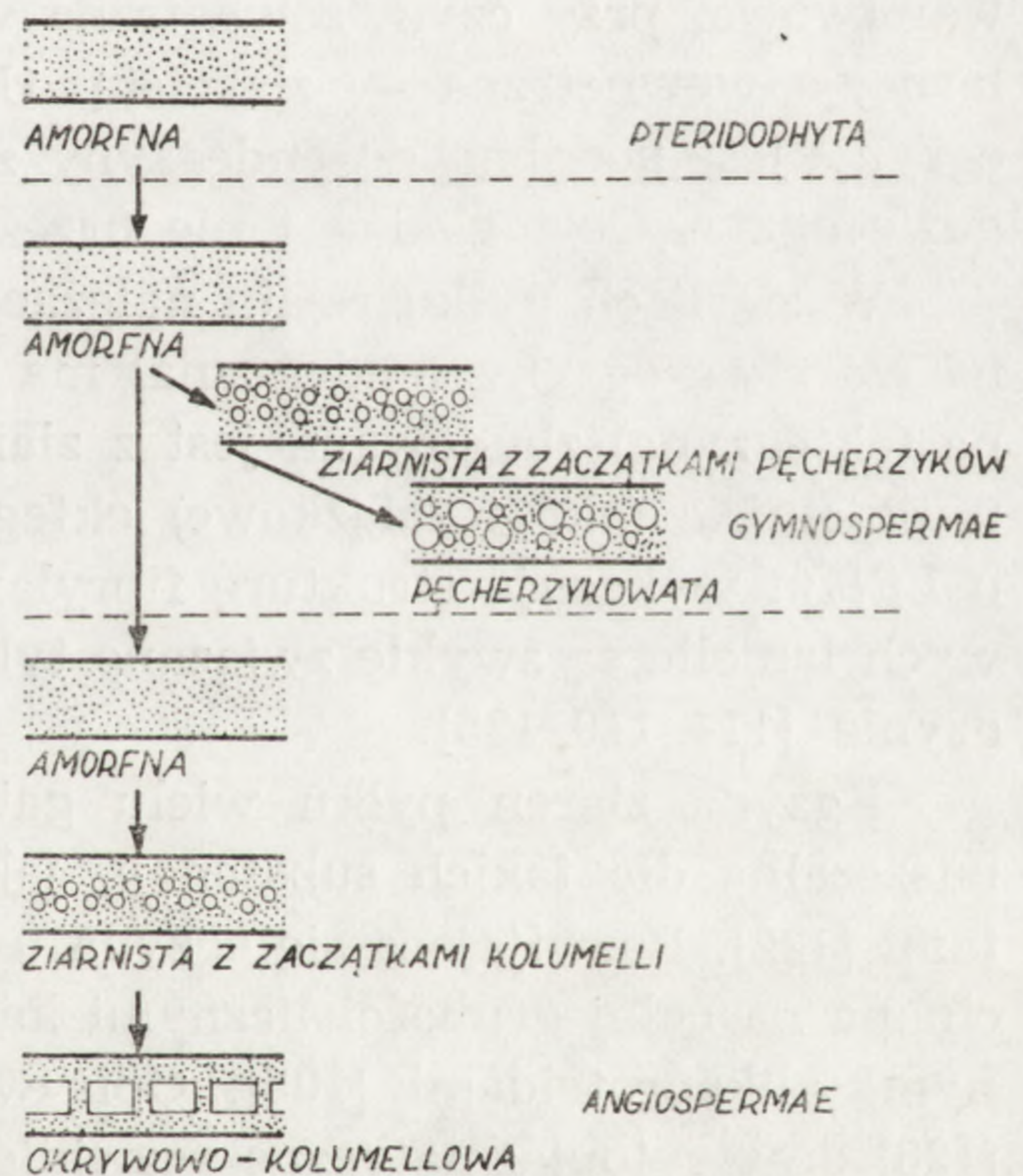
Badania mikroskopowo - elektronowe ujawniły kilkuwarstwową strukturę egzyny. Mimo licznych prac dotyczących sporodermy, brak jest ujednoczonej terminologii dla elementów budujących egzynę (ryc. 1 A, B). Liczba wymienianych warstw w egzynie bywa różna [36, 38, 143; Reistsma, 1970, cyt. za 139]. W niniejszym artykule zastosowano nazewnictwo wprowadzone przez Faegriego [38].

Nie u wszystkich roślin egzyna jest w pełni wykształcona. Niektóre rodziny jednoliściennych, np. *Iridaceae*, *Cannaceae* i *Zingiberaceae*, mają pofragmentowaną, a czasami znacznie zredukowaną egzynę. Tak np.

u *Crocus* brak jest zarówno ciągłej egzyny, jak i wyraźnie zaznaczonych kolumelli [70], u *Canna* [133] zaś egzyzna jest zredukowana do nielicznych kolców rozmieszczonych w dużych odstępach na powierzchni ziarna pyłku. Natomiast egzyzna spor wątrobowców składa się wyłącznie z endegzyny. Pewne rodziny dwuliściennych nie posiadają ciągłej warstwy endegzyny [86], a u niektórych gatunków traw endegzyzna jest tak cienka, że intyna jest grubsza aniżeli całkowicie wykształcona egzyzna. Podobnie u *Rumex acetosella* i *Rumex acetosa* ściana ziaren pyłku zawiera więcej intyny niż egzyny. Stosunek ilościowy endegzyny do ektegzyzny wydaje się podlegać zmianom w toku filogenezy (Walker i Kemp, 1972, cyt. za [147]).

Obserwuje się dużą zmienność w strukturze egzyny u przedstawicieli roślin różnych, a nawet jednej grupy systematycznej (ryc. 2). Dla przykładu, u okrytozalążkowych najbardziej prymitywny typ struktury ściany ziaren pyłku znaleziono np. u *Degeneria* (*Degeneriaceae*) i *Eupomatia* (*Eupomatiaceae*), gdzie egzyzna jest homogenna. Natomiast u *Magnoliaceae* i *Annonaceae* występuje egzyzna o strukturze ziarnistej. W miarę ewolucji ziarnista forma zastępowana jest przez egzynę wykazującą zaczątki kolumelli. Bezkolumellowe ściany pyłków charakterystyczne są dla prymitywnych rodzin *Magnoliales*, tj. *Magnoliaceae*, *Degeneriaceae*, *Eupomatiaceae*, i prymitywnych gatunków *Annonaceae*. Natomiast bardziej wyspecjalizowane gatunki *Annonaceae*, *Canellaceae* i *Myristicaceae* posiadają w większości kolumelle [148]. Obecność wyraźnych kolumelli pokrytych warstwą okrywową (*tectum*) jest jedną z głównych cech, którymi egzyzna ziaren pyłku okrytozalążkowych różni się od nagozalążkowych [145]. Wtórny zanik kolumellowej struktury ściany ziaren pyłku następuje u roślin kwiatowych wodnych, pasożytów i saprofitów.

Z badań Walkera [147] nad 35 rodzinami prymitywnych okrytozalążkowych wynika, że ewolucja struktury egzyny u roślin kwiatowych przebiega w kierunku od nieperforowanej (homogennej) pokrytej warstwą



Ryc. 2. Kierunki ewolucji struktury egzyny u roślin naczyniowych [148]

okrywową poprzez perforowaną (ziarnistą, pęcherzykową z kolumellami) zawierającą warstwę okrywową do egzyny wykazującej obecność częściowo wykształconej warstwy okrywowej.

Wyraźne różnice obserwuje się u przedstawicieli różnych grup systematycznych również w strukturze dwu dających się wyróżnić w egzynie warstw: ektegzynie i endegzynie. I tak ściany spor mchów zawierają dwie warstwy egzyny odmiennie barwiące się fuksyną zasadową, podobnie jak ektegzyna i endegzyna ziaren pyłku [40]. Egzyna spor mchów wykazuje obecność pojedynczych lamelli [94]. Dla odmiany w sporach wątrobowców, jak np. *Riccardia pinquis* [77], *Scapania nemerosa* [125] oraz u *Jungermaniales* [61], w egzynie są liczne lamelle. W megasporach i mikrosporach *Marsilea vestita* egzyna jest kompleksem złożonym z zewnętrznej warstwy o strukturze pęcherzykowej i wewnętrznej gładkiej o nieco odmiennych zdolnościach barwienia [14].

U widłaka, *Lycopodium clavatum*, [1] egzyna jest wyraźnie dwuwarstwowa, przy czym zewnętrzna warstwa wykazuje strukturę lamelarną, a wewnętrzna — ziarnistą. U niektórych paprotników struktura egzyny jest podobna do endegzyny ziaren pyłku, jak np. u *Bolbitis* sp., gdzie egzyna jest gładka i nie urzeźbiona [62].

W ziarnach pyłku roślin należących do nagozalążkowych wewnętrzna warstwa egzyny (endegzyna) ma strukturę blaszkową, a zewnętrzna (ektegzyna) zbudowana jest z ziarenek i kuleczek [20, 59]. Natomiast u *Artemisia* (okrytozalążkowe) ektegzyna jest homogenna, podczas gdy u *Lilium* wykazuje strukturę fibrylną [138]. U okryto- i nagozalążkowych lamelle są zwykle związane tylko z endegzyną, a brak ich w ektegzynie [114, 119, 125].

Egzyna ziaren pyłku wielu gatunków roślin wyższych jest przepuszczalna dla takich substancji, jak np. białka [117] czy związki lantanu [122]. Rozwijająca się egzyna u *Lycopodium guidioides* jest przecinana na całej grubości licznymi kanałami wypełnionymi lub wyścielonymi glikoproteidami [103]. Opisywano także kanały w egzynie traw [126] oraz cytoplazmatyczne rozwidlenia w egzynie *Parkinsonia aculeata* [89]. Obecność kanałów cytoplazmatycznych w rozwijającej się i dojrzalej egzynie, a także w intynie u *Parkinsonia aculeata* wskazuje, że protoplasty mikrospor jak i ziaren pyłku utrzymują cytoplazmatyczny kontakt z egzyną [89]. Wyraźne kanały przecinają endegzynę i tectum u *Sorghum bicolor*, przy czym w miarę postępującego rozwoju kanały stają się mniej wyraźne. Dzięki obecności kanałów ściana ziaren pyłku wydaje się być przepuszczalna dla różnych substancji zarówno w rejonie zawierającym pory, jak i w miejscach ich pozbawionych [12].

Egzyna jest powoli rozkładana przez mikroorganizmy [34, 35, 37, 60], a w jednym przypadku (u *Pharbitis*) zaobserwowano nawet jej tra-

wienie przez substancje wydzielane przez zamię [53]. Z badań pyłków i zarodników trawionych przez *Phycomycetes* wynika, że ściany ziaren pyłku u nagozależkowych są bardzo wrażliwe na infekcję [56], ale nie dotyczy to ziaren pyłku iglastych, np. sosny, które są wyraźnie odporne na niszczące działanie mikroorganizmów [60, 127, 128]. Z drugiej strony, brak jest danych wskazujących, że sporopollenina (stanowiąca główny składnik egzyny) jest substratem zużywanym przez mikroorganizmy [39]. Wydaje się natomiast prawdopodobne, że enzymy trawiące sporopolleninę są wykorzystywane przez grzyby jedynie do penetracji w głąb egzyny.

Istnieje także pogląd, w myśl którego zmiany jakie opisuje się w sporodermie spowodowane są nie trawieniem tego związku [3], a raczej uwalnianiem komponentu białkowego.

SKŁAD CHEMICZNY EGZINY

Egzyna dojrzałych spor i ziaren pyłku zbudowana jest głównie z substancji zwanej sporopolleniną, która nadaje sporodermie jej wyjątkową strukturę. Ze względu na dużą zawartość sporopolleniny utożsamia się często tę substancję z egzyną. Obok sporopolleniny egzyna zawiera niewielkie ilości białek, lipidów, śladowe ilości polisacharydów i ligninę. Są one wtopione w sporopolleninę, ale głównie występują na jej powierzchni i w kanałach [44, 83, 84, 100, 115, 135]. Materiały te mogą okrywać ziarno pyłku tak szczelnie, że utrudniają obserwację architektury sporopolleniny w mikroskopie skanningowym [79, 111].

SPOROPOLLENINA

Frey - Wyssling [46] zaliczył sporopolleninę do substancji powlekających (Adkrusten), zlokalizowanych częściowo poza właściwym terenem ściany komórkowej. Sporopollenina wchodzi w skład egzyny u okryto- i nagozależkowych, w skład ścian spor paprotników, mszaków, grzybów i glonów [6, 56, 57]. Substancja ta buduje ściany komórkowe zarówno form żyjących, jak i kopalnych, wchodzi w skład ścian glonów *Tasmanites* obecnych w skałach osadowych z syluru (w Anglii, na Tasmanii i w rejonie Bałtyku); materiał podobny do sporopolleniny obserwuje się również u kopalnych form *Dinoflagellatae* żyjących na Alasce przed 150 milionami lat czy wreszcie w megasporach z karbonu [6]. Brooks i Shaw [8] wykazali obecność materiału typu sporopolleniny w meteorytach Orgueil i Murray, co sugerować mogłoby istnienie form życia pozaziemskiego. Skoro sporopollenina pojawia się już w okresie prekambryjskim, można przypuszczać, że była ona produkowana przez bardzo

prymitywne organizmy lub że powstawanie sporopolleniny było możliwe w takich zredukowanych warunkach atmosferycznych, jakie panowały w prekambrium.

Pierwsze wzmianki o sporopolleninie pochodzą z XIX w. (John, 1814; Braconnot, 1829; cyt. za [130]), kiedy to substancję budującą ściany ziaren pyłku nazwano „polleniną”. Następnie Zetsche i jego współpracownicy analizowali materiał wysycający ściany spor *Lycopodium clavatum* i nazwali go „sporoniną”. Ze względu na podobieństwo sporoniny do wcześniej opisanej polleniny, w późniejszych pracach dla określenia związków wysycających zewnętrzną warstwę ściany spor i ziaren pyłku — egzynie, wprowadzony został termin „sporopollenina” [156].

TABELA 1

Zawartość sporopolleniny i celulozy w egzynie roślin niższych i wyższych

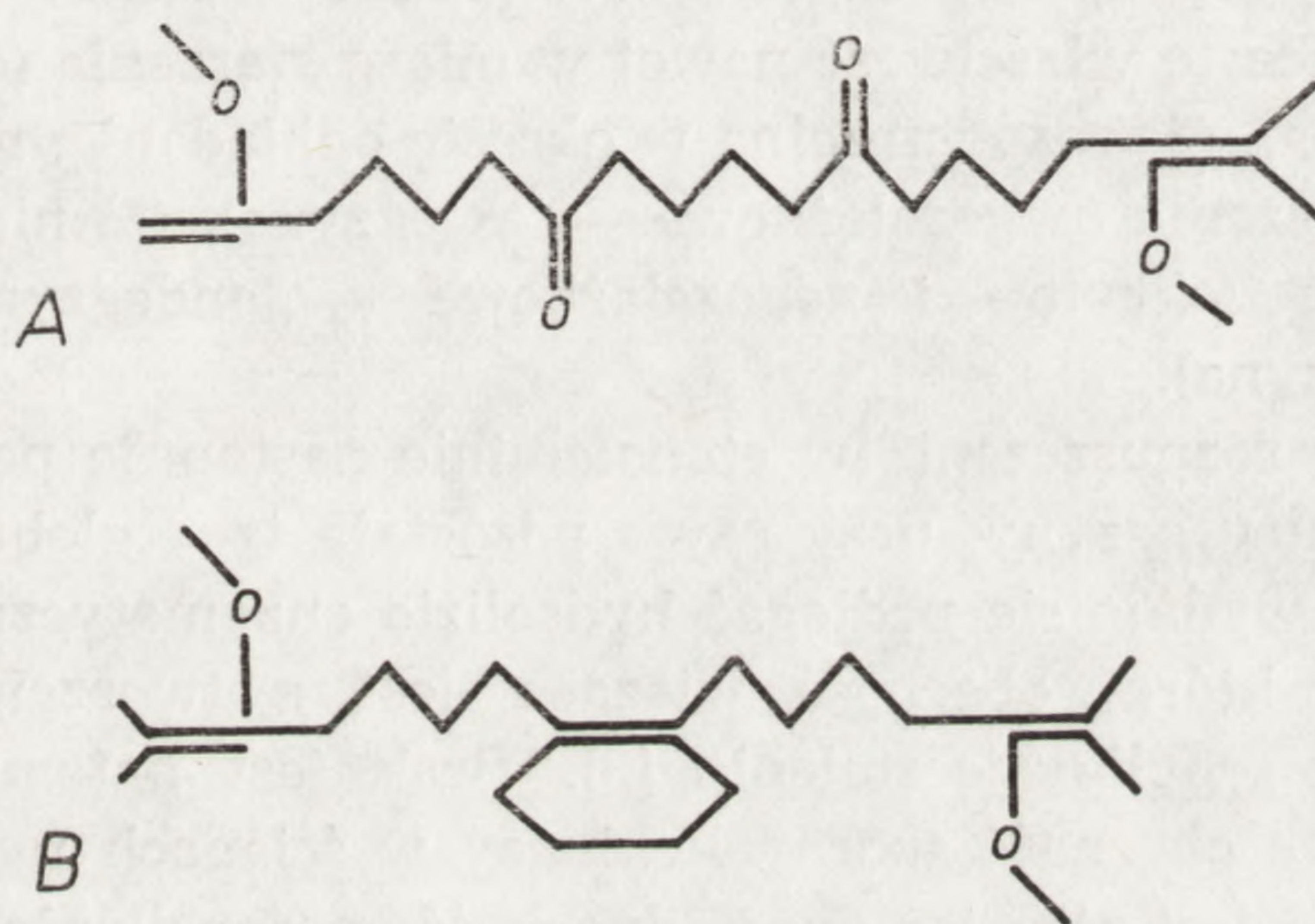
Grupa systematyczna	Gatunek	Sporopollenina (%)	Celuloza (%)	Literatura
<i>Algae</i> (glony)	<i>Chara corallina</i>	3,20	4,40	[130]
<i>Fungi</i> (grzyby)	<i>Aspergillus niger</i>	4,80	6,10	[130]
	<i>Mucor mucedo</i>	4,25	5,25	[130]
<i>Selaginellales</i> (widliczki)	<i>Selaginella kraussiana</i> (megaspóra)	27,80	3,10	[6]
<i>Lycopodiales</i> (widlaki)	<i>Lycopodium clavatum</i> (spory)	23,40	2,70	[6]
<i>Gymnospermae</i> (nagozalążkowe)	<i>Pinus silvestris</i>	19,60	3,60	[88]
	<i>Pinus contorta</i>	20,70	5,50	[6]
<i>Angiospermae</i> (okrytozalążkowe)	<i>Tilia</i> sp.	14,90	8,10	[88]
	<i>Lilium henryii</i>	5,30	3,10	[6]
	<i>Rumex acetosa</i>	4,20	7,00	[6]
	<i>Corylus avellana</i>	8,50	2,70	[88]

Istnieją uderzające różnice w ilości sporopolleniny (tabela 1) zawartej w ziarnach pyłku okryto- i nagozalążkowych, w sporach u widłaków, widliczek, grzybów i glonów [6, 88, 130, 155]. Przypuszcza się, że wyraźne zmniejszenie zawartości sporopolleniny w ścianie ziaren pyłku u okrytozalążkowych w porównaniu z nagozalążkowymi i roślinami zarodnikowymi (*Selaginellales*, *Lycopodiales*) jest wynikiem stopniowej utraty przetrwalnikowego charakteru ziaren pyłku u nagozalążkowych, a zwłaszcza u okrytozalążkowych [88]. Jak jednak wytłumaczyć małą zawartość sporopolleniny w sporach glonów i grzybów, komórkach wybitnie przetrwalnikowych?

Sporopollenina zawiera C i H w stosunku 1 : 1,6 [156] oraz grupy OH, C - Me [130]. Udział C, H i O [6] przedstawia się nieco odmiennie

dla poszczególnych jednostek systematycznych, np. $C_{90}H_{124}O_{81}$ (*Selaginella kraussiana*), $C_{90}H_{144}O_{27}$ (*Lycopodium clavatum*), $C_{90}H_{158}O_{44}$ (*Pinus silvestris*), $C_{90}H_{142}O_{36}$ (*Lilium henryii*). Porównując wzory sporopolleniny przedstawicieli różnych grup systematycznych można przypuszczać, że w miarę postępującej ewolucji wzrasta ilość wodoru i tlenu w tym związku.

Sporopollenina jest substancją homogeną, silnie osmofilną, wykazuje obecność podwójnych wiązań alifatycznych sprzężonych z pierścieniem aromatycznym. Brak jednak określonego wzoru strukturalnego cząsteczki sporopolleniny. Różni autorzy w odmienny sposób przedstawiają jednostkę strukturalną sporopolleniny (dla porównania cząsteczka sporopolleniny — ryc. 3).



Ryc. 3. Budowa cząsteczki sporopolleniny: A — według Shaw i Yeadon [131], B — według Potonie i Rehnelta [106]

Pozytywne barwienie egzyny barwnikami zasadowymi, np. błękitem Nilu A, azurem B czy błękitem toluidynowym, wskazuje na obecność w niej grup anionowych [135], ale być może spowodowane jest raczej obecnością grup anionowych na lamellach zatopionych w egzynie aniżeli w samej sporopolleninie [129], która nie zawiera grup karboksylowych warunkujących bazofilie typową dla egzyny [116].

Sporopollenina charakteryzuje się ogromną odpornością na czynniki chemiczne, jest jedynym składnikiem ziaren pyłku pozostającym po trawieniu mieszaniną bezwodnika kwasu octowego i kwasu siarkowego w stosunku 9 : 1 [36]. Nie działają na nią rozpuszczalniki organiczne, jest bardzo odporna na zasady i kwasy nieutleniające. Substancja ta jest natomiast rozpuszczalna w silnie utleniających roztworach i w pewnych zasadach organicznych. Związki utleniające powodują powolny rozkład sporopolleniny z wytworzeniem kwasu szczawiowego, dwutlenku węgla

i ciekłych produktów utlenienia. Ściany niektórych ziaren pyłku wykazują zmniejszoną odporność na takie czynniki utleniające, jak np. 40% kwas chromowy [97, 121], kwaśny podchloryn sodu [138], stężony HNO_3 , KMnO_4 [88], podchloryn sodu, potasu, wapnia czy KMnO_2 [80].

Interesująca jest rozpuszczalność egzyny pyłków i spor w etanolaminie [137]. I tak, egzyna świeżych pyłków u okrytozalążkowych i nagozalążkowych rozpuszcza się na gorąco w etanolaminie — warstwą, która ulega rozpuszczeniu, jest ektegzyna. Egzyna starych pyłków nagozalążkowych i jednoliściennych jest trudniejsza do rozpuszczenia i w niektórych przypadkach może być nawet nierozpuszczalna. Natomiast egzyna spor paprotników i mszaków jest niewrażliwa na etanolaminę.

Na podstawie różnej rozpuszczalności egzyny w etanolaminie wyróżnia się [137] 3 grupy sporopolleniny: (1) rozpuszczalną w etanolaminie i zachowującą tę właściwość nawet w miarę starzenia (okrytozalążkowe — ektegzyna), (2) rozpuszczalną w okresie odkładania, nierozpuszczalną w miarę starzenia (nagozalążkowe — ektegzyna), (3) nierozpuszczalną w etanolaminie (okryto- i nagozalążkowe — endegzyna, paprotniki i mszaki — egzyna).

W procesie rozpuszczania w etanolaminie następuje pęcznienie i destrukcja struktury egzyny, przy czym pozostają tzw. globule resztkowe. Sporopollenina wydaje się podlegać hydrolizie enzymatycznej pod wpływem esterazy, której obecność wiązana jest z tworzeniem por, np. w ścianie ziaren pyłku jęczmienia [3]. Brak jest natomiast dowodów wskazujących na obecność sporopolleninazy w ścianach pyłku [83].

Interesująca jest również duża odporność sporopolleniny na działanie temperatury. Dopiero powyżej 180°C wydziela się z tego związku woda, nie powodując jednakże jego zmian fizycznych [158, 159]. Powyżej zaś 300°C rozpoczyna się widoczny rozkład termiczny sporopolleniny, a w $340\text{--}360^\circ\text{C}$ tworzy się z niej smolista masa (cyt. według [88]).

Powstały następujące koncepcje składu chemicznego sporopolleniny: (a) sporopollenina jest polimerem terpenów [157], (b) polimerem lipidów podobnych do kutyny i suberyny [42, 45], (c) polisacharydem o dużym ciężarze cząsteczkowym [142]. Natomiast analiza chemiczna [7, 130] wykazała, że produktem utlenienia sporopolleniny są krótkie (C_2) i długie (C_{16}) kwasy dwukarboksylowe i fenolowe. Na tej podstawie wysunięto pogląd, że sporopollenina jest utlenionym polimerem karotenoidów i ich estrów (np. palmitynianu β -karotenu). Istnieje także pogląd, w myśl którego sporopollenina składa się z mieszaniny celulozy i ksylanów, materiału ligninopodobnego oraz dużych ilości lipidów [131]. Nie wydaje się, aby skład chemiczny sporopolleniny mógł być definitywnie ustalony, skoro zmienia się on w zależności od przynależności systematycznej roślin, jak i w czasie rozwoju egzyny.

Miejsce powstawania sporopolleniny jest przedmiotem licznych dyskusji. Według pierwotnej koncepcji Heslop - Harrisona [63] mitochondria były organellami odpowiedzialnymi za syntezę tego związku. W kilka lat później autor jednak wycofał się z tej koncepcji [67]. W komórkach *Citrus* i *Selaginella* sporopollenina tworzyłaby się w pęcherzykach Golgiego i siateczce śródplazmatycznej [76]. Natomiast Risueño i wsp. [107] sugerują, że pęcherzyki związane z siateczką śródplazmatyczną oraz powierzchnia kropli lipidowych (prociał Ubischa?) jest miejscem powstawania sporopolleniny. Istnieją wreszcie dowody, że prekursorzy sporopolleniny pochodzą z tkanki odżywczej pylnika — tapetum [72]. Sporopollenina wchodząca w skład ektegzyny jest deponowana wyłącznie na lamelkach, które są zawsze produkowane przez cytoplazmę spory i we wszystkich badanych dotąd przypadkach są zwykle układane na powierzchni komórki wzdłuż szlaków wyznaczonych przez mikrotubule [19, 22].

Ze względu na miejsce powstawania wyróżnia się dwa rodzaje sporopolleniny: sporopolleninę spor (S - sporopollenina) elastyczną i PAS - dodatnią, której obecność pozwala na zwiększenie objętości spory po uwolnieniu z tetrad, i sporopolleninę tapetum (T - sporopollenina) odkładaną wokół spory już uformowanej o ostatecznej wielkości, charakteryzującą się brakiem materiału PAS - dodatniego i dużą sztywnością. Jest wysoce prawdopodobne, że T - sporopollenina pochodzi z typu S. Nie można również wykluczyć, że dodatnia reakcja PAS i elastyczność charakteryzują częściowo spolimeryzowaną sporopolleninę [23], zwaną także protosporopolleniną [67, 70]. Na dwa rodzaje sporopolleniny wskazują również badania nad egzyną *Parkinsonia aculeata* [91], ponieważ endegzyna i ektegzyna wydają się mieć odmienny skład chemiczny. Obecność kilku typów sporopolleniny wykazano także w egzynie męskosterylonego mutantu jęczmienia [2].

INNE SKADNIKI

1. **L i g n i n a**. Badania cytochemiczne wskazują na obecność w sporopolleninie, podobnie jak w ligninie, grup fenolowych w śladowych ilościach [135]. Obecność niewielkiej ilości ligniny budującej wraz z lipidami i węglowodanami sporopolleninę opisano również w endegzynie [44, 100]. Sporopollenina negatywnie reaguje na wszystkie testy cytochemiczne charakterystyczne dla ligniny, ale w obecności barwników metachromatynowych zachowuje się podobnie jak lignina [135]. Bardziej nierozpuszczalne frakcje ligniny przypominają nawet pewne właściwości sporopolleniny. Uważa się, że skoro oba te związki są bardziej utlenione niż kutyna i rozpuszczają się w etanolaminie, a także reagują z barwnikami zasadowymi [42, 75, 135], są one dużymi cząsteczkami z regularnie ułożonymi grupami anionowymi.

Z drugiej strony, obecność kwasów fenolowych podobnych do występujących w ligninie zdaje się wynikać z aromatyzacji karotenoidów w czasie izolowania sporopolleniny; nie są więc one składnikiem natywnej sporopolleniny [9].

2. **Białka.** Pierwsze doniesienie o istnieniu białek w ścianie ziaren pyłku pochodzi z pracy Tsinger i Petrowskiej - Baranowej [143]. Autor-ki te wykazały obecność kwaśnej fosfatazy i oksydazy cytochromowej w dojrzałej egzynie u *Peonia* i *Amaryllis*. Później stwierdzono, że w egzynie ziaren pyłku u niektórych okrytozalążkowych brak jest białek enzymatycznych, występowały one jedynie w intynie bądź w przestrzeni między intyną a endegzyną, bądź wreszcie w miejscach por [83].

W późniejszych pracach wykazano, że białka sporodermy, np. u *Malvaceae* [74], są gromadzone w dwóch miejscach: (1) w celulozowej intynie, głównie w okolicy por i (2) w kanałach ektegyny. Endegzyna nie zawiera białek. Wiele z białek zlokalizowanych w przestrzeniach i kanałach egzyny wykazuje aktywność enzymów hydrolitycznych [83, 84].

Metodą immunofluorescencji wykazano, że w egzynie jak również w intynie obecne są antygeny. Tak np. w przestrzeniach i kanałach ektegyny u *Cosmos bipinnatus* i *Ambrosia* sp. obok innych białek występuje alergiczny antygen E [78]. Złożonym spektrum antygenów dyfuzyjnych charakteryzują się pyłki traw [153]. Uwalnianie białek z egzyny następuje już po 30 sek. od chwili umieszczenia w wodzie [85], natomiast usunięcie białek intyny wymaga 4–5 min. [74]. Większość tak gwałtownie uwalnianego materiału ściany ziaren pyłku jest związana z reakcją rozpoznawania zgodności wewnątrz - i międzygatunkowej [81, 87].

Z obserwacji Heslop - Harrisona [74] wynika, że białka egzyny ziaren pyłku okrytozalążkowych są zawsze pochodzenia sporofitycznego — z tapetum, w odróżnieniu od białek intyny, produkowanych przez gametofit męski [78].

3. **Lipidy.** Lipidy, które często zawierają barwniki karotenoidowe [92] tworzą powłokę na powierzchni tectum bądź występują w formie dużych kul między kolumellami lub na powierzchni tectum [134].

Lipidy obecne w egzynie mogą chronić ziarno pyłku przed wysychaniem, ułatwiając jednocześnie wymianę gazową. Ponadto lipidy czynią ziarna pyłku bardziej kolorowymi i lepкими, które to cechy ułatwiają przenoszenie pyłku przez owady.

Zarówno białka, jak i lipidy nie budują właściwej egzyny, wchodzą one w skład warstwy powlekającej (Pollenkitt czy tryfyny) pojawiającej się na powierzchni egzyny po jej całkowitym uformowaniu [21, 69].

4. Polisacharydy. Od kilku lat ukazują się prace wskazujące na obecność w egzynie niewielkich ilości polisacharydów; czy rzeczywiście polisacharydy wchodzą w skład egzyny, trudno ustalić. Rowley [116] i Sengupta i Rowley [129] wykazali, że w egzynie podgrzanej do wysokiej temperatury, jak i w częściowo rozpuszczonej, obserwuje się duże ilości lamelli, zwanych także filamentami czy „white tapes”.

Istnieją dwie koncepcje dotyczące składu chemicznego opisanych lamelli. W myśl pierwszej, lamelle egzyny zbudowane są z lipoproteidów [24], natomiast druga koncepcja zakłada obecność w nich lipopolisacharydów [116]. Prawdopodobnie rola lipopolisacharydów w egzynie mogłaby być tłumaczona przez analogię do lipopolisacharydów zewnętrznej ściany bakterii gram - ujemnych.

Pierwszy opis lamelli w egzynie pochodzi z pracy Afzeliusa i wsp. [1], dotyczącej spor u *Lycopodium*. Następnie opisywano lamelle w egzynie wielu ziaren pyłku i spor [4, 11, 16–18, 24, 29, 55, 61, 77, 90, 98, 119, 125, 134, 140]. Lamelle podobne morfologicznie do lamelli obecnych w sporach i ziarnach pyłku były obserwowane w ścianach bardzo wielu komórek. Dla przykładu — opisywano je w komórkach korzenia *Lemna minor* [41], w nasionach grochu i fasoli [96], w regenerującej ścianie izolowanych protoplastów owocu pomidora [105], w suberynie komórek bulwy ziemniaka [15] i w ścianie komórkowej bakterii [102, 149].

Powstawanie, skład i rola lamelli w rozwoju spor i ziaren pyłku jest jednym z ważnych i jak dotąd nie rozstrzygniętych problemów w palynologii i cytologii.

Wspomniane lamelle o grubości błony elementarnej (5 nm u *Artemisia* — [138]) i długości od 10 nm do 1 μ m lub więcej, przejrzyste dla elektronów, barwią się kwasem fosforowo - wolframowym w kwasie chromowym, co wskazuje na obecność w nich polianionów [116]. Lamelle te wydają się powstawać na zewnętrznej powierzchni plazmolemy i prawie natychmiast na obu ich powierzchniach odkładana jest sporopollenina. Takie lamellarne struktury otoczone sporopolleniną wchodzą w skład egzyny ziaren pyłku i spor.

W czasie wczesnych stadiów rozwoju ziaren pyłku widoczne jest uwarstwienie egzyny dzięki obecności trójwarstwowych lamelli przypominających membranę elementarną. W miarę jak egzyzna grubieje, dwie zewnętrzne warstwy lamelli stają się stopniowo nieodróżnialne od sporopolleniny, która gromadzi się na nich w taki sposób, że tylko środkowa, bezbarwna lamella jest widoczna na mikrofotografiach elektro- nowych. W czasie dojrzewania egzyny lamelle mogą całkowicie zniknąć z rejonu egzyny, w którym uprzednio dominowały. Z badań Sengupta i Rowleya [129] wynika, że lamelle w egzynie spor i ziaren pyłku są bardziej odporne na etanolaminę aniżeli sporopollenina.

ONTOGENEZA EGZINY

Proces tworzenia ściany ziaren pyłku rozpoczyna się wkrótce po zakończeniu mejozy. Powszechnie przyjmuje się, że tworzenie egzyny i wczesne stadia jej rozwoju mają miejsce, kiedy komórki tetrad otoczone są ścianą kalozową [32, 54, 55, 67, 95], tylko z badań nad wątrobowcami wynika, że tworzenie egzyny rozpoczyna się dopiero po rozpuszczeniu ściany kalozowej (u *Corsinia carianadrina*) [154], ale u *Riccardia pinguis* [77] egzyna jest zakładana i rozbudowywana prawie całkowicie wewnątrz ściany kalozowej otaczającej komórki tetrad.

Formowanie ściany ziaren pyłku rozpoczyna się od egzyny. Pierwszą warstwą, która pojawia się, jest ektegzyna. U okrytozalążkowych wewnątrz tetrad może być inicjowana również endegzyna, ale jej rozwój zachodzi głównie po zniknięciu ściany kalozowej. Egzyna może tworzyć się wokół całego kompleksu mikrospor, rozwija się wówczas jednolicie, np. u *Eleocharis* [27], bądź tworzenie egzyny jest ograniczone do pewnych obszarów, jak np. u *Styphelia* ektegzyna nie pojawia się w rejonie przegrody pierwotnej, gdzie uprzednio nie odkładała się kalozą [44].

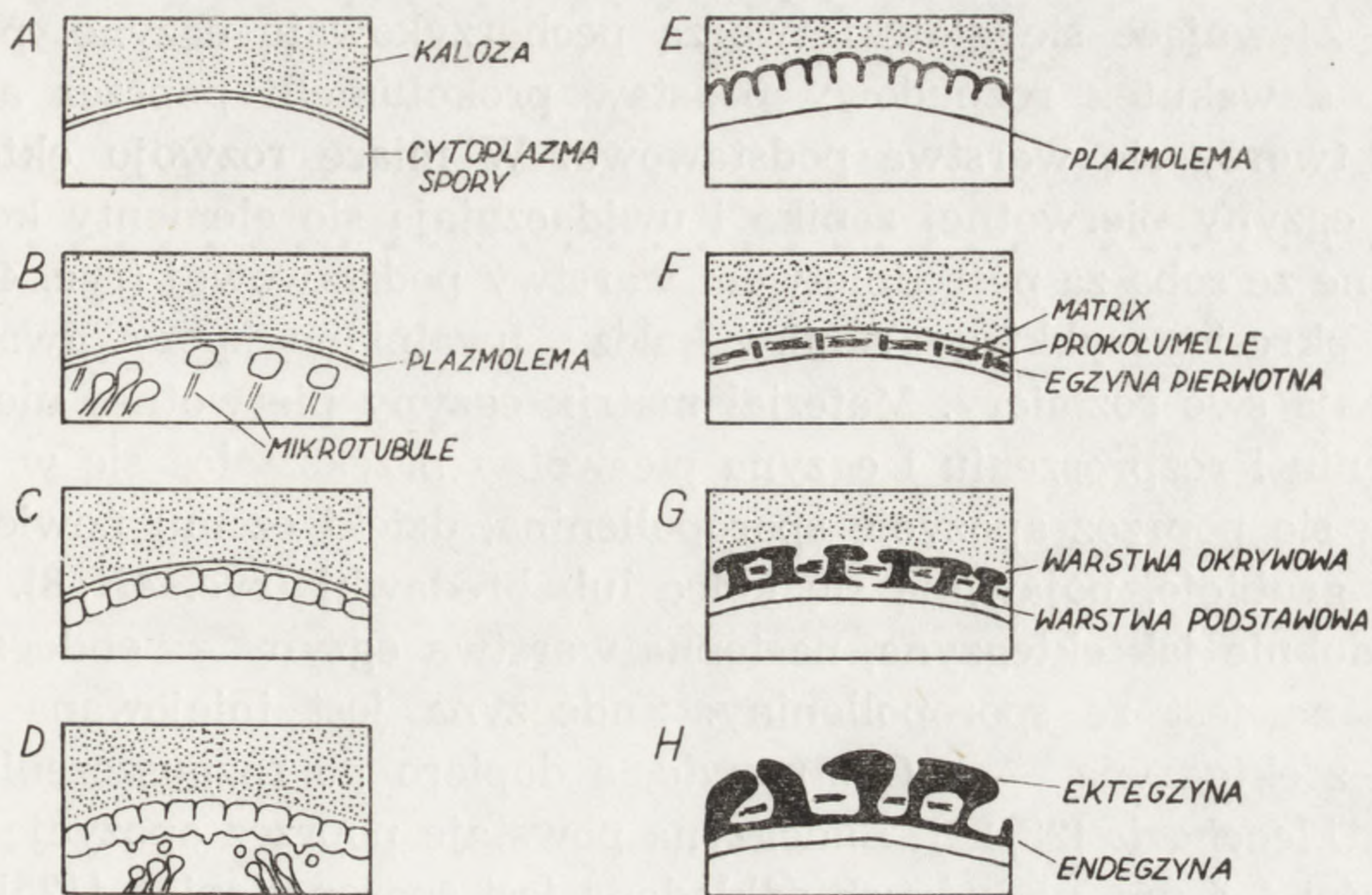
Pierwsza egzyna zbudowana z substancji fibrylarnej (matrix), w którą wtopione są elementy zawierające homogenny materiał, nosi nazwę primegzyny lub egzyny pierwotnej [64, 65] i pełni ona rolę wzorca dla egzyny [55]. U niektórych roślin brak jest substancji podstawowej (ryc. 6) i egzynę tworzą skupienia silnie osmofilnej substancji [49].

Egzyna pierwotna nie fluoryzuje z błękitem anilinowym, nie zawiera więc kalozy. Normalnie jest ona izotropowa, ale po barwieniu błękitem toluidynowym wykazuje wyraźne podwójne załamanie światła spolaryzowanego [151]. W egzynie pierwotnej wykazano obecność grup aldehydowych (Flynn, 1969, cyt. za [28]) a także jej wrażliwość na trawienie celulazą [67]. Na podstawie tych danych można przypuszczać, że w skład egzyny pierwotnej wchodzi polisacharydy, wśród których znajduje się celuloza [151].

Egzyna pierwotna pojawia się wokół każdej ze spor tetrady pomiędzy plazmolemą a ścianą kalozową (ryc. 4F, 5, 6); nie obserwowano jej jedynie u *Nuphar* [43].

Od samego początku rozwoju egzyny determinowane są dwa elementy przyszłego wzorca ściany: ustalenie rejonu przyszłej pory i lokalizacja przyszłej kolumelli. Istnieje wiele danych wskazujących na udział siateczki śródplazmatycznej w ustalaniu miejsca przyszłej pory [19, 32, 64]. Zaobserwowano, że w miejscu tworzenia się pory układają się elementy siateczki śródplazmatycznej zabezpieczając w ten sposób powierzchnię plazmolemy przed odkładaniem egzyny pierwotnej.

Młoda ściana ziaren pyłku składa się początkowo z materiału fibry-



Ryc. 4. Schemat stadiów rozwojowych ściany ziaren pyłku u roślin wyższych [150]
 A — ściana kalozowa wokół komórek tetrazy, B — ustalanie wzorca egzyny w cytoplazmie, C — przenoszenie wzorca na plazmolemę, D — wzrost zaczątków egzyny pierwotnej, E — grubienie zaczątków egzyny pierwotnej, F — egzyna pierwotna zbudowana z matrix i prokolumelli (BCDE — na przykładzie *Pinus* [23]), G — tworzenie warstwy powierzchniowej i podstawowej ze zlania się podstaw i szczytów prokolumelli, H — zlewanie się prokolumelli w ektegzynę, tworzenie endegzyny

larnego budującego matrix (ryc. 5). Wkrótce po pojawieniu się matrix egzyny pierwotnej na jej terenie formują się promieniście układające się prokolumelle — prekursorzy kolumelli — dzielące fibrylarną matrix na krótkie odcinki (ryc. 4F). U *Lilium longiflorum* prokolumelle mają charakter lipidowy [69, 150] i wydaje się, że zawierają niedojrzałą sporopolleninę, zwaną protosporopolleniną [67]. Rozpuszczają się one podczas acetolizy [67] i składają się ze sfałdowanych lamelli [24] lub z luźno ułożonego materiału z przejrzystą dla elektronów częścią centralną. Obserwowana powszechnie zmienność struktury prokolumelli (bezpostaciowa, ziarnista lub blaszkowata) wydaje się zależeć od techniki przygotowania materiału [[69, 150].

W okresie formowania prokolumelli u *Campanula rapunculoides* tuż pod plazmolemą pojawiają się polisomy [28, 29]. Podobnie u *Lilium* [66] obserwowany był związek między miejscem formowania prokolumelli i polisomami. Sugeruje to, że polisomy uczestniczą w tworzeniu prokolumelli. Wydaje się to tym bardziej prawdopodobne, że aż do stadium tetrad nie widać zmian w ułożeniu polisomów [69] w komórkach macierzystych pyłku.

Procesy rozwojowe prowadzące do uformowania ektegzyny polegają na tym, że powstają połączenia między główkami prokolumelli powyżej jak i poniżej substancji fibrylarniej matrix egzyny pierwotnej (ryc.

4G, 7). Zlewające się główki tworzą pęcherzykową egzynę, powstaje tectum, a wskutek rozbudowy podstaw prokolumelli poprzez apozycję lamelli tworzy się warstwa podstawowa. W miarę rozwoju ektegzyzny, matrix egzyny pierwotnej zanika i uwidaczniają się elementy kolumelli połączone ze sobą za pośrednictwem warstwy podstawowej (ryc. 4G, 6, 7).

W okresie szybkiego zaniku kalozy uwalniane spory gwałtownie zwiększają swe rozmiary. Materiał matrix egzyny pierwotnej ulega rozdrobnieniu i rozproszeniu i egzyna pierwotna przekształca się w egzynę, odkłada się poprzez apozycję sporopollenina, dzięki czemu powierzchnia egzyny grubieje, pojawiają się kolce lub brodawki (ryc. 4H, 8).

Podobnie jak ektegzyzna, następna warstwa egzyny — endegzyzna — zbudowana jest ze sporopolleniny. Endegzyzna jest inicjowana równocześnie z ektegzyną — u *Campanula*, a dopiero po rozpuszczeniu kalozy — u *Eleocharis* [28, 29]. Endegzyzna powstaje poprzez apozycję lamelli o grubości 4–5 nm, na których odkładana jest sporopollenina [125]. W taki sposób zachodzi również tworzenie kolumelli u *Lilium* [19, 25, 71]. Inaczej wygląda sytuacja u *Pinus banksiana* [20], gdzie ektegzyzna rozwija się ze zgrubienia pęcherzyków, które powstają na powierzchni spory w okresie tetrad. W tym czasie tworzy się intyna.

Pod koniec rozwoju ściany ziaren pyłku pojawiają się substancje powlekające typu lipidów czy żywic, zwane „Pollenkitt”, oraz tryfina [30, 101], które — jak wykazał Dickinson [21] — u *Lilium* i *Raphanus* są produkowane na terenie plastydów komórek tapetum. Należy jednak zaznaczyć, że Pollenkitt jest złożona całkowicie z produktów powstałych na terenie plastydów, a tryfina zawiera nie tylko lipidy z plastydów, ale i składniki cytoplazmatyczne i białka pochodzące z rozpadu tapetum [21]. Związki budujące Pollenkitt czy tryfinę pojawiają się w kanałach egzyny dopiero wówczas, gdy w ziarnach pyłku zachodzi podział mitotyczny, a rozwój egzyny jest zakończony przed rozpoczęciem mitozy, na krótko przed uwolnieniem pyłku.

TWORZENIE WZORCA EGZINY

Egzyna w postaci egzyny pierwotnej (primegzyny), spełniającej rolę wzorca dla egzyny, pojawia się gdy młode mikrospory są w stadium tetrad. Wzorzec ten tworzony jest przez cytoplazmę spory w okresie izolowania od sporofitu (ryc. 4A - F).

Mechanizm, za pomocą którego cytoplazma tworzy wzorzec ściany i ścianę komórkową, nie jest jasny. Już w 1963 r. Heslop - Harrison [64, 65] spostrzegł korelację między pozycją siateczki śródplazmatycznej i miejscem powstawania kolumelli w ektegzyźnie u *Silene*. Podobnie sia-

teczka śródplazmatyczna leżąca pod kątem prostym do powierzchni mikrospor wyznacza pozycję kolumelli u *Zea* [132]. Cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej uczestniczą w syntezie i sekrecji materiału egzyny pierwotnej również w komórkach mikrospor [48, 49]. Według Goss [58], po uformowaniu kalozy i odepchnięciu plazmolemy komórek tetrad od ściany kalozowej, siateczka śródplazmatyczna i pęcherzyki są układane w pobliżu powierzchni błony plazmatycznej i uczestniczą w tworzeniu egzyny.

Odmiennego zdania jest Vazart [146], który wykazał, że mitochondria, rozrzucone w cytoplazmie mikrospor *Linum*, w okresie tworzenia prokolumelli układają się ściśle pod plazmolemą; wydaje się więc, że odkładanie egzyny jest zdeterminowane pozycją mitochondriów w przylegającej cytoplazmie. U *Campanula rapunculoides* bardzo ścisły kontakt z plazmolemą w czasie tworzenia egzyny pierwotnej wykazują zarówno mitochondria, jak i plastydy [28, 29]. Nie można jednak na razie ustalić, czy te organella komórkowe uczestniczą w tworzeniu wzorca egzyny.

Całkiem inną koncepcję wysuwa Dunbar [27]; według tej autorki duża aktywność aparatu Golgiego obserwowana blisko powierzchni komórek w czasie formowania egzyny związana jest mniej lub bardziej z tworzeniem wzorca primegzyny. Aparat Golgiego mikrospor wydzielaliby prekursorzy materiału dla budowy młodej ściany [91].

Istnieje również pogląd, w myśl którego wzorzec dla ściany komórkowej powstaje w cytoplazmie młodej mikrospory z ułożenia pęcherzyków bądź wyrostków membranowych [20] na powierzchni komórki (ryc. 4A - E). Pęcherzyki te pochodzą z cystern membranowych przypominających diktiosomy (*Pinus*), z siateczki śródplazmatycznej (*Cosmos*) bądź są tworzone z diktiosomów per se (*Lilium*). Według Dickinsona [23] wzorzec egzyny jest ustalony najpierw w cytoplazmie i wynika z organizacji mikrotubul lub struktur diktiosomopodobnych i ich pęcherzyków. Następnie, wskutek interakcji między pęcherzykami i plazmolemą, wzorzec jest przenoszony na powierzchnię protoplastu w postaci wypukłości protoplazmatycznych lub też jako warstwa pęcherzyków. Wtórne odkładanie węglowodanów przez pęcherzyki pochodzące z diktiosomów powoduje przemieszczanie plazmolemy i wzrost grubości młodej ektegzyny.

Wydaje się, że mikrotubule pojawiające się w mikrosporze w okresie tworzenia egzyny mogą uczestniczyć częściowo w determinowaniu wzorca prokolumelli [23, 32], skoro te organelle są ściśle związane z inicjacją ściany komórkowej w dzielących się komórkach parenchymy [99, 104].

Dość powszechny jest pogląd, że dla tworzenia wzorca egzyny pierwotnej konieczna jest obecność ściany kalozowej. Zaobserwowano bo-

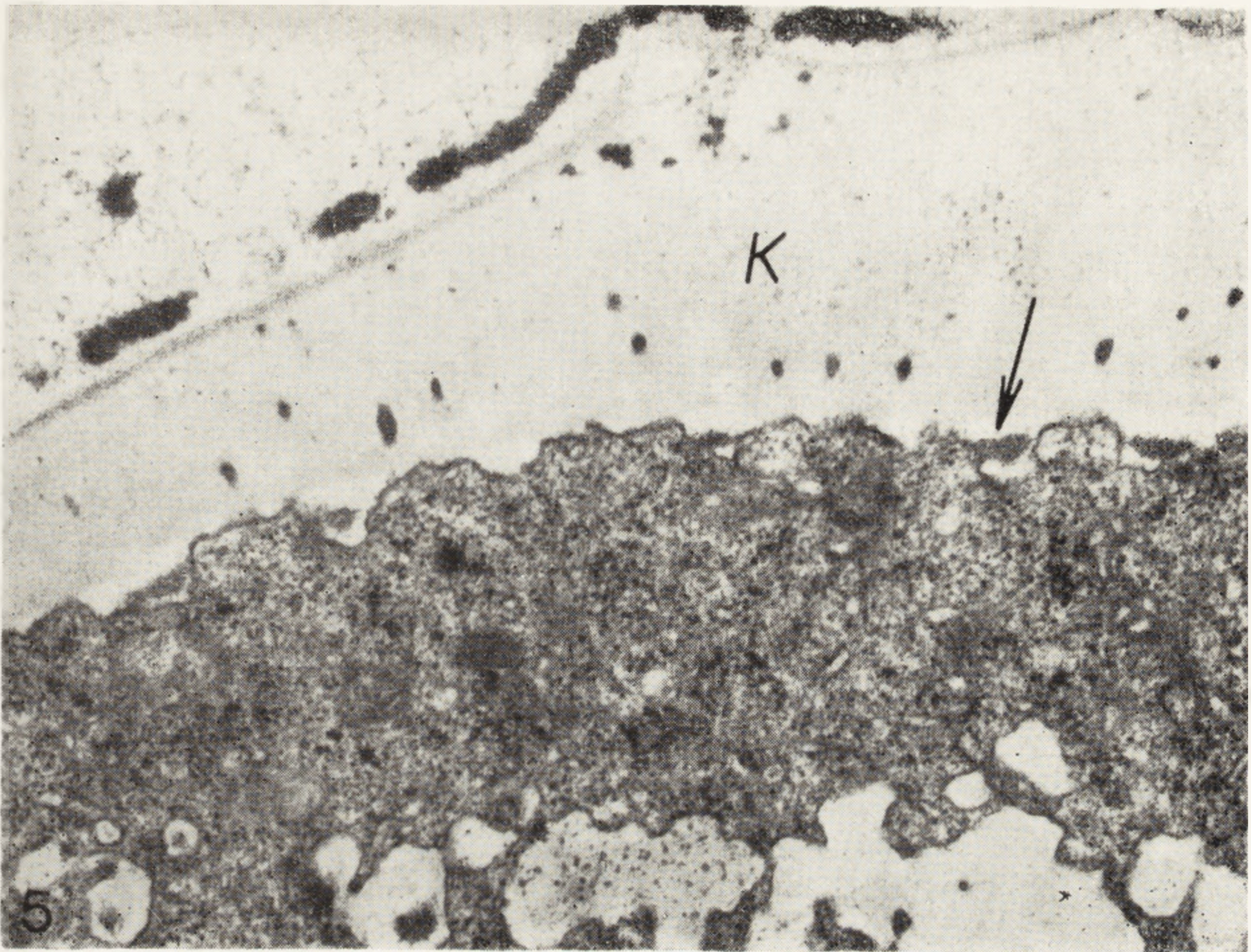
wiem, że u *Styphelia* (*Epacridaceae*) po normalnej mejozie w komórce macierzystej pyłku, gdzie trzy jądra wędrują do jednego końca komórki i degenerują, a kaloza nie przenika normalnie do rejonu przegrody pierwotnej, ektegzyna w tym rejonie nie pojawia się [44]. Podobny wniosek o udziale kalozy w tworzeniu wzorca primegzyny wynika z badań nad *Ipomea purpurea* [151], gdzie regularny wzór geometryczny widoczny w kontraście fazowym lub w mikroskopie fluorescencyjnym stanowi wzorzec dla primegzyny. Podobnie obecność kalozy u *Campanulaceae* wydaje się konieczna dla rozwoju egzyny pierwotnej, powstającej wkrótce po całkowitym uformowaniu kalozy; wzorzec egzyny pierwotnej jest formowany w postaci warstwy przylegającej do wewnętrznej strony ściany kalozowej [28, 29]. Kaloza sama wyznacza wzorzec primegzyny [151] bądź dopiero w powiązaniu z plazmolemą, której wpuklenia wydają się wpływać na tworzenie wzorca egzyny [27]. Z drugiej strony, wniosek o udziale kalozy może być kwestionowany, skoro primegzyna u *Sorghum* tworzy się dopiero po rozpuszczeniu kalozy [12]. W tej sytuacji kaloza mogłaby jedynie pośrednio wpływać na wzorzec primegzyny.

Z badań nad procesem mikrosporogenezy u *Ribes rubrum* wynika, że początkiem formowania egzyny jest pojawianie się blaszki polisacharydowej na powierzchni plazmolemy spor [52]. Blaszka ta widoczna jest później w egzynie.

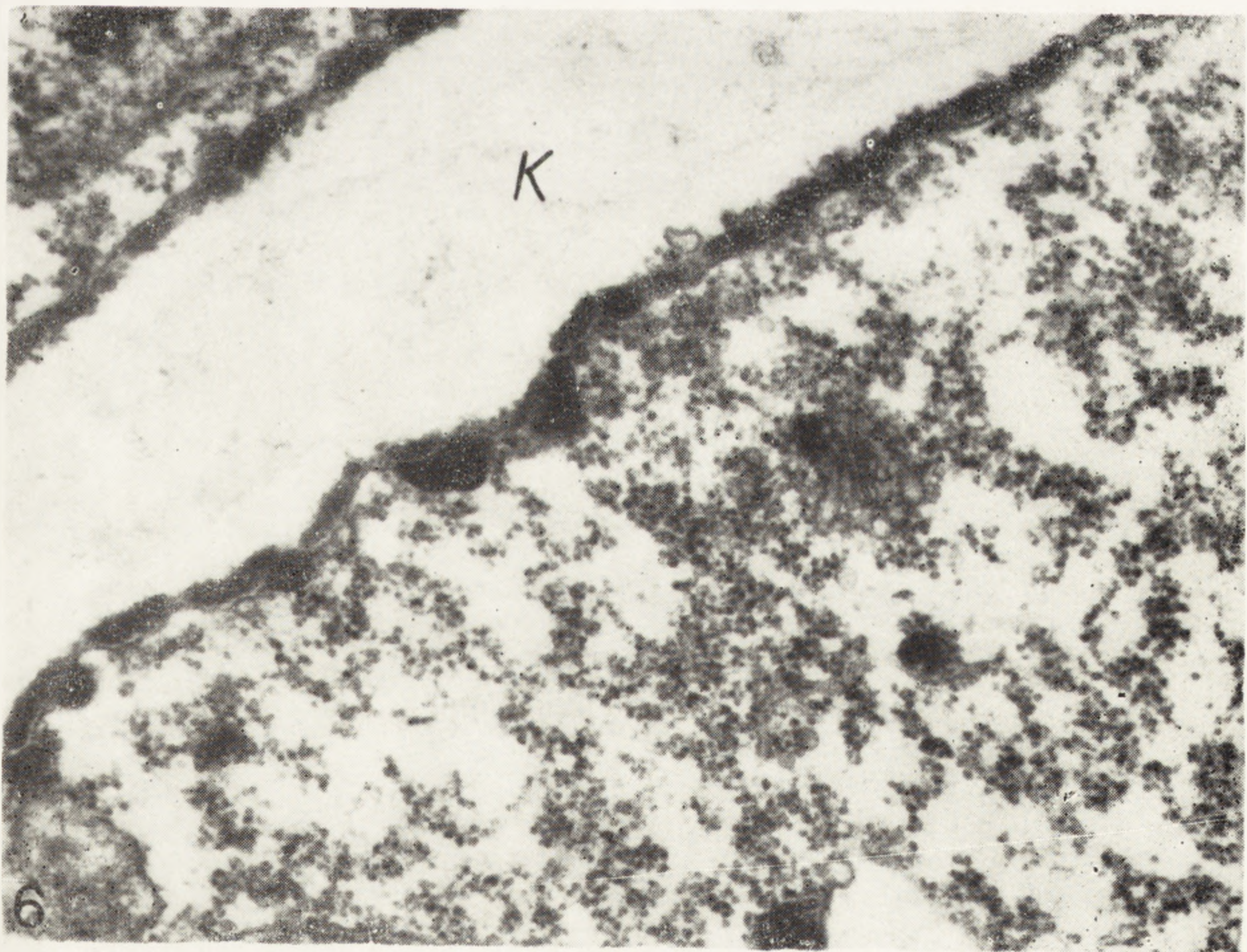
Rozwój wzorca egzyny znajduje się pod kontrolą cytoplazmy komórki macierzystej [69]. Zaobserwowano jednakże że pomimo degeneracji cytoplazmy ziaren pyłku u *Mirabilis jalapa* odwzorowanie egzyny zachodzi prawidłowo [141]. Wykazano także normalne urzeźbienie egzyny u męskosterylnej *Silene pendula* [73]. Podobnie u *Leschenaultia formosa* (*Goodeniaceae*), gdzie ziarna pyłku połączone są w tetrady ścianami promienistymi, tworząca się egzyna ma normalną strukturę niezależnie od stopnia sterylności ziaren. Knox i Frederick [82] zakładają, że mechanizm warunkujący syntezę materiału ściany ziaren pyłku może funkcjonować bez kontroli żywego protoplastu.

Wykazano ponadto, że małe komórki pyłku o znacznie zredukowanych i zmienionych genomach w wyniku krzyżówek di- i tetraploidalnych u *Linum* [109] posiadają taką samą ornamentację egzyny i formę por jak duże ziarna pyłku z kompletnym lub prawie kompletnym genomem. Specyficzny wzorzec egzyny powstający wokół małych komórek pyłku z niekompletnym zespołem chromosomów mógłby być determinowany przez plazmolemę bezpośrednio lub pośrednio dzięki informacji cytoplazmatycznej pochodzącej z komórki macierzystej pyłku.

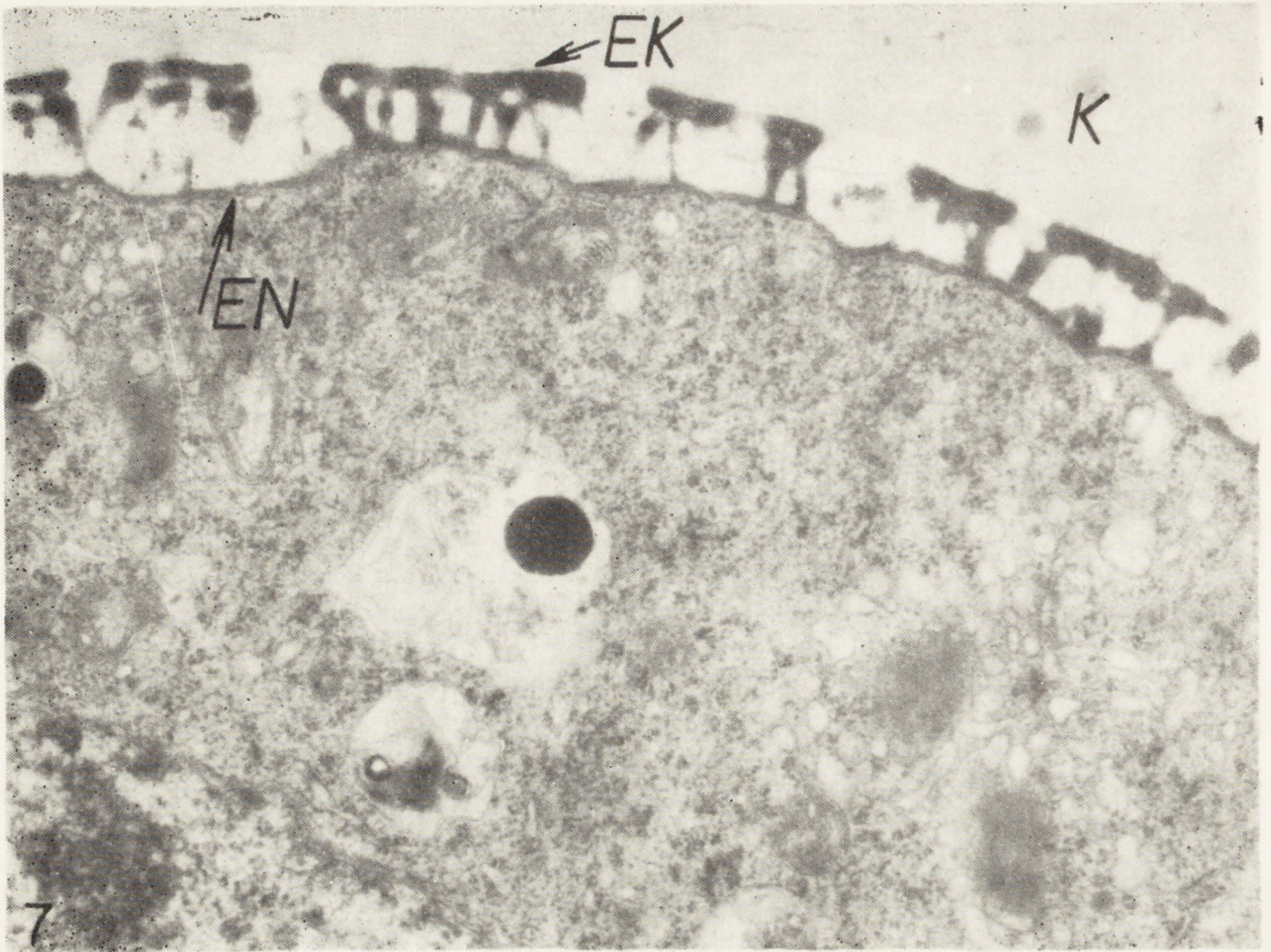
Istnieje jeszcze jeden pogląd, w myśl którego charakterystyczne dla poszczególnych gatunków urzeźbienie ściany ziaren pyłku wydaje się być wynikiem genetycznej kontroli kompleksu plazmolema-glycocalyx



Ryc. 5. *Muscari*, tetrada. $\times 19\ 920$
Formowanie egzyny pierwotnej, materiał fibrylarny (strzałka) widoczny we wgłębieniach plazmolemy między ścianą kalozową (K) i plazmolemą

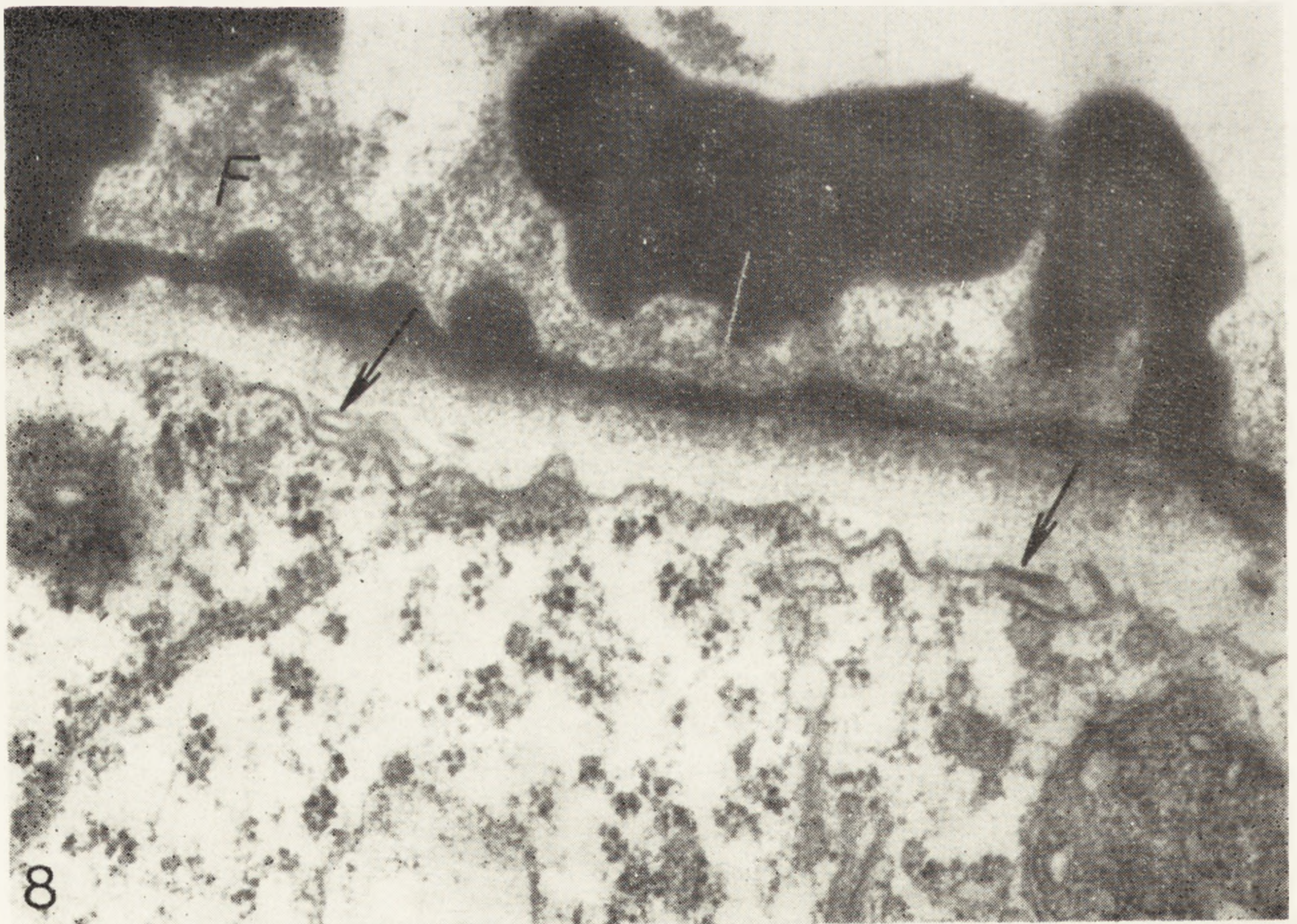


Ryc. 6. *Berberis*, tetrada. $\times 25\ 760$
Osmofilny materiał egzyny pierwotnej na powierzchni plazmolemy



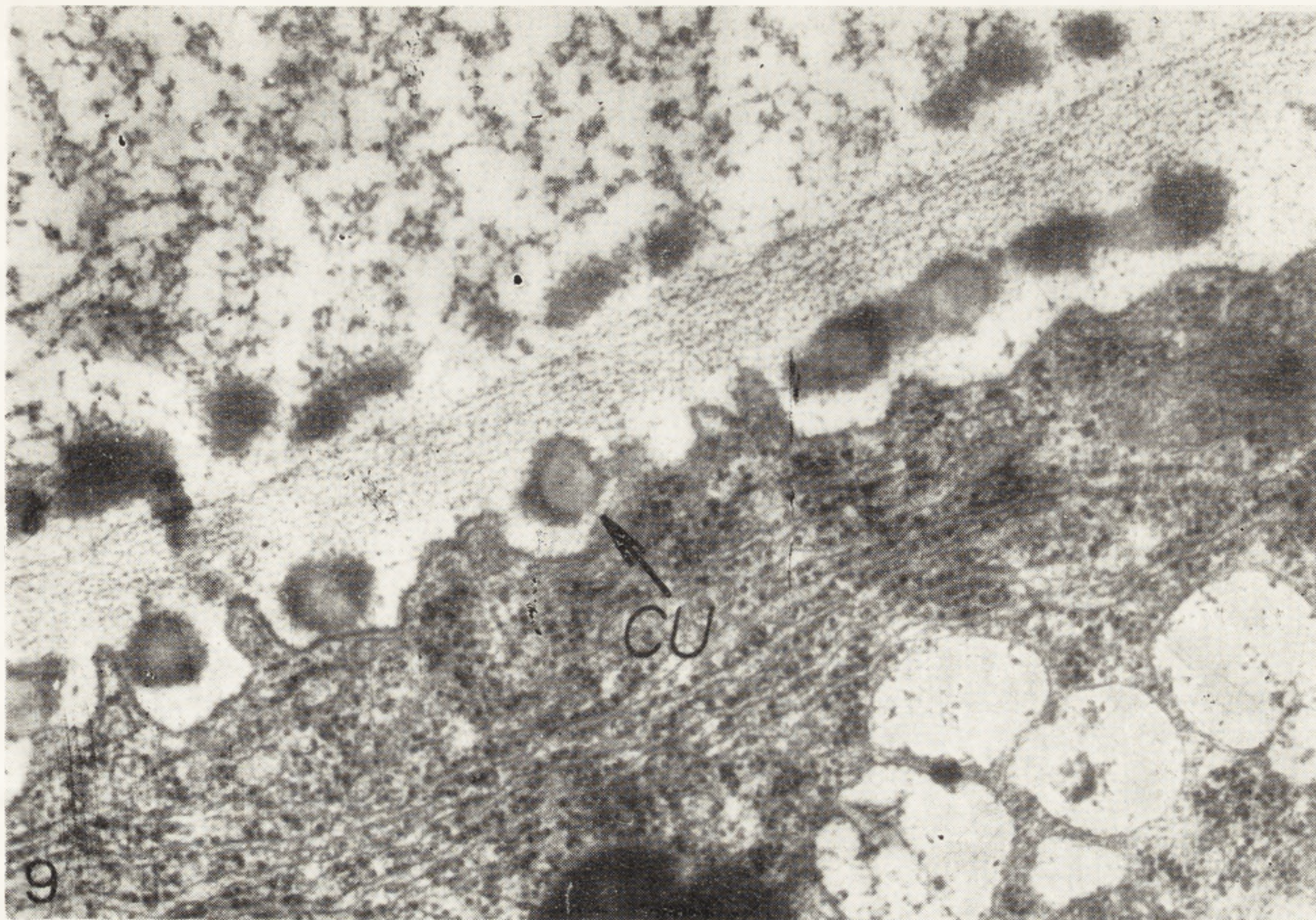
Ryc. 7. *Muscari*, późna tetrada. $\times 18\,480$

Wyraźnie widoczna warstwa powierzchniowa ektegminy (EK) oraz tworząca się endegmina (EN), por. ryc. 4F

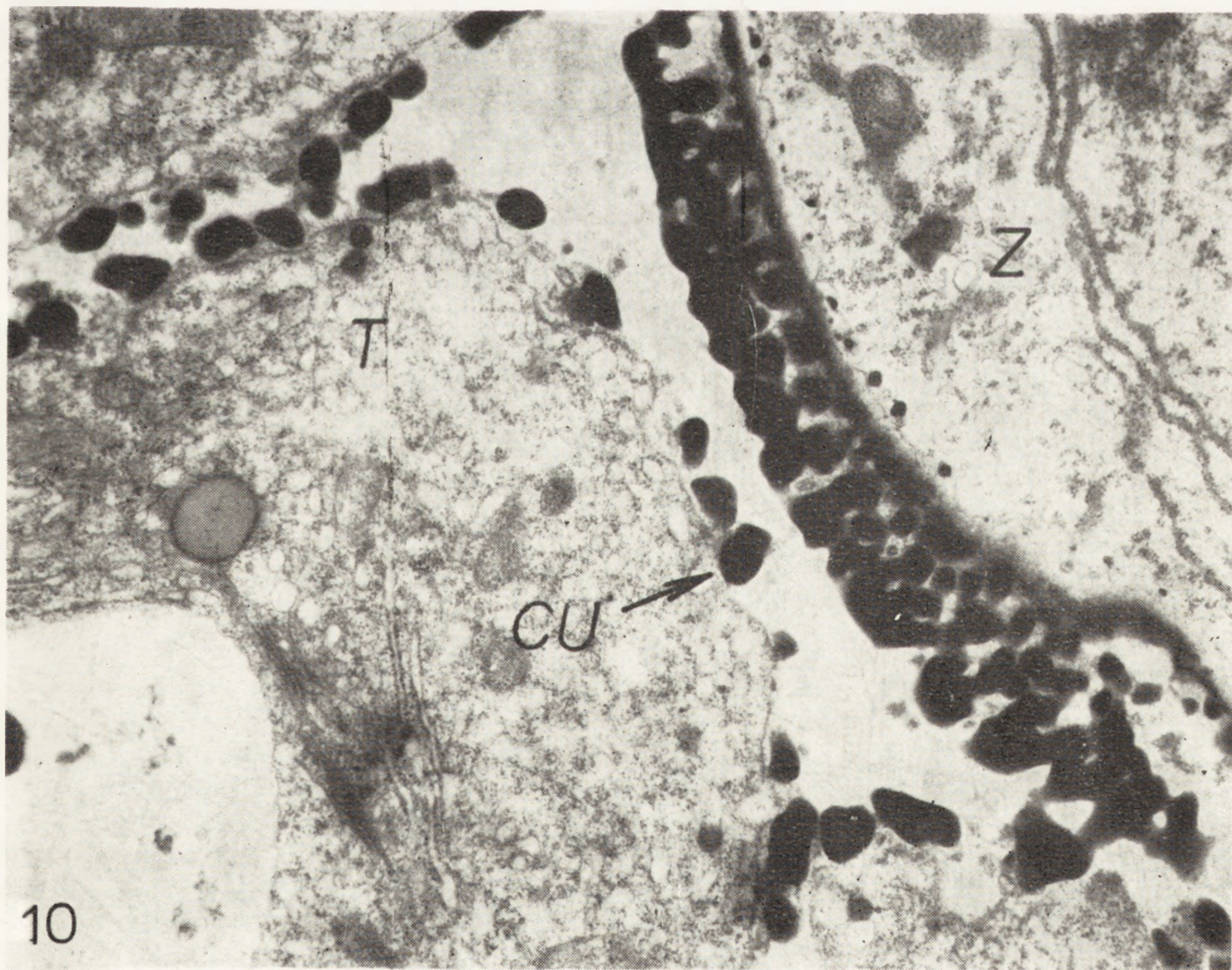


Ryc. 8. *Muscari*, ziarno pyłku w okresie rozbudowy egzyny. $\times 19\,600$

Między kolumellami ektegminy widoczny materiał fibrylarny (F). Na powierzchni plazmolemy elektronowoprzejrzyste lamelle (strzałki), które w miarę oddalania się od niej otaczają się sporopolleniną



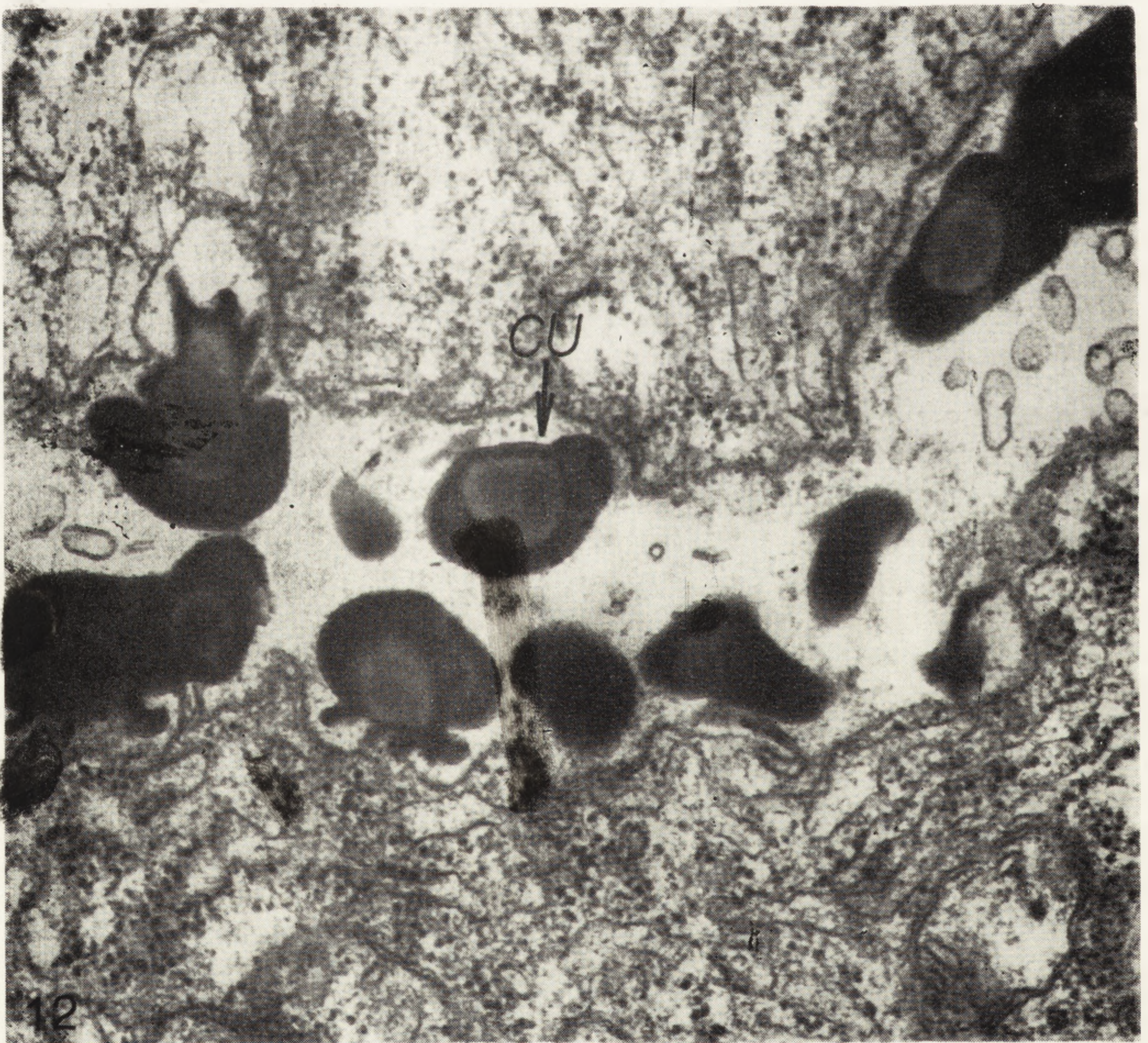
Ryc. 9. *Muscari*, tapetum w stadium tetrad komórki sporogennej. $\times 34\,800$
Widoczna część centralna i fibrylarnej natury część korowa młodocianych ciał Ubischa (CU)



Ryc. 10. Fragment tapetum (T) i ziarna pyłku (Z) *Muscari*. $\times 5\,300$
Dojrzałe ciała Ubischa (CU) na powierzchni komórek tapetum. Podobne struktury obserwuje się w obrębie egzyny

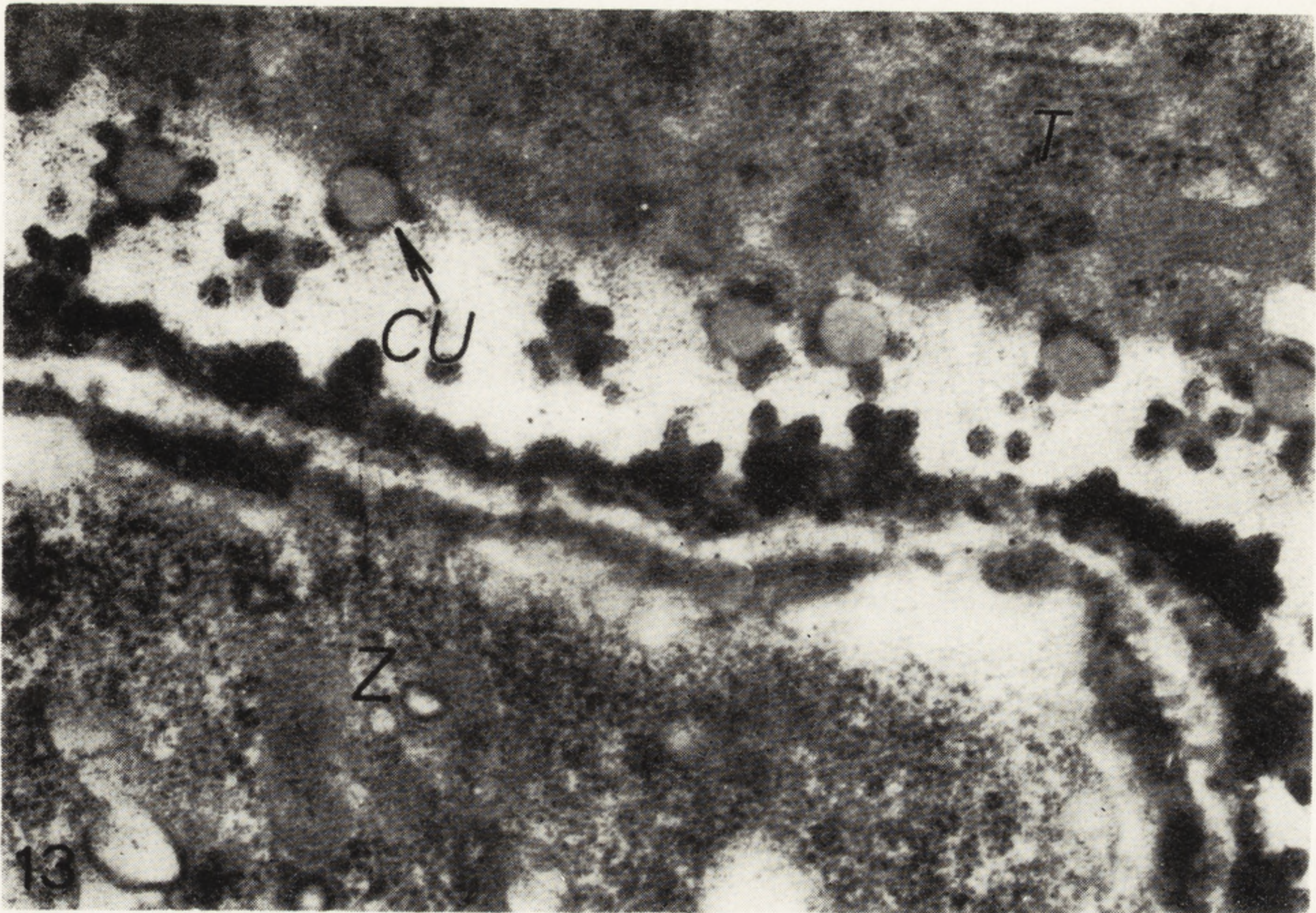


Ryc. 11. *Muscari*, przekrój przez pylnik, barwienie błękitem toluidynowym. $\times 160$
Ciała Ubischa zgromadzone wyłącznie w okolicy ziaren pyłku

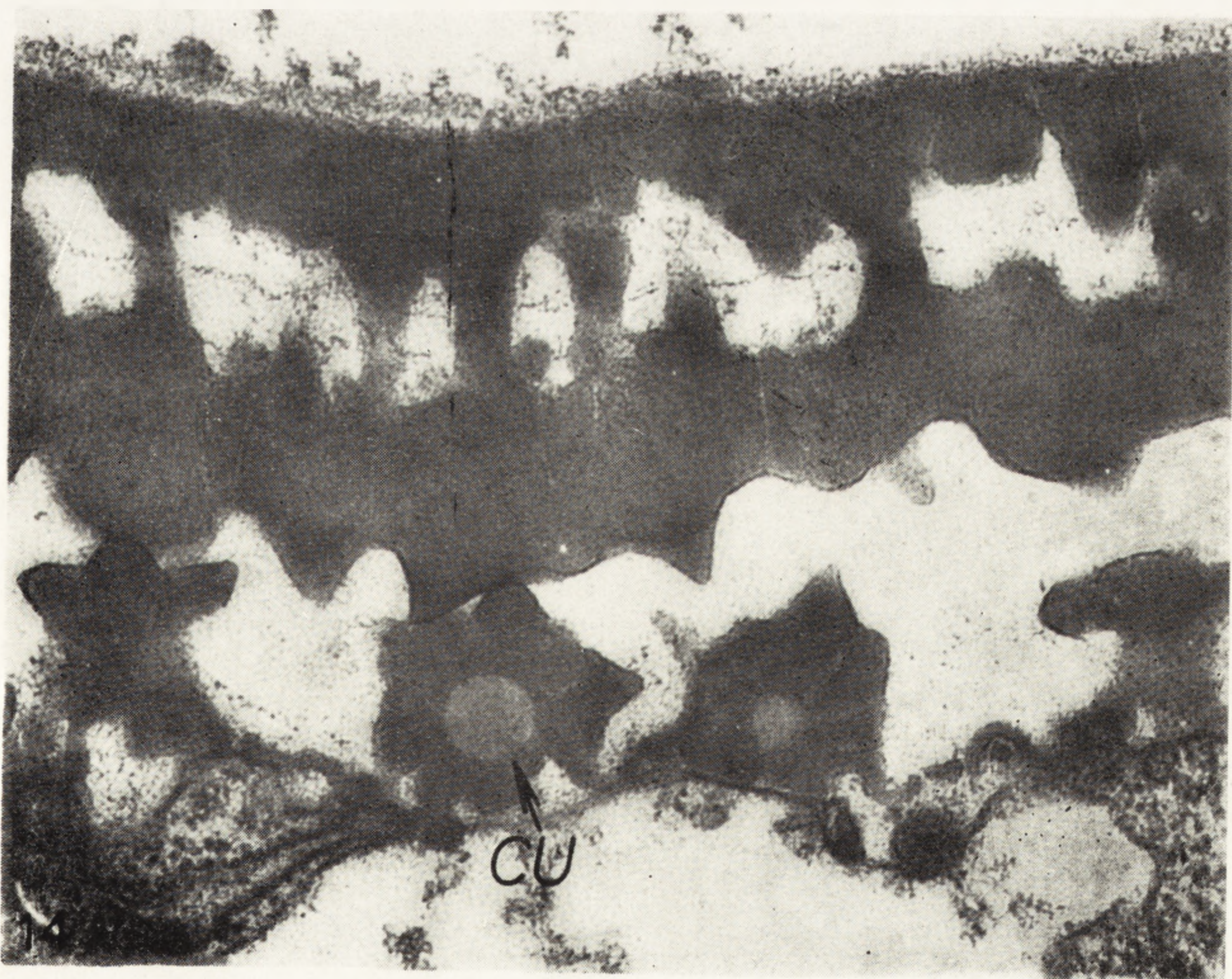


Ryc. 12. Fragment tapetum *Muscari* w okresie tworzenia egzyny wokół ziaren pyłku.
 $\times 20160$

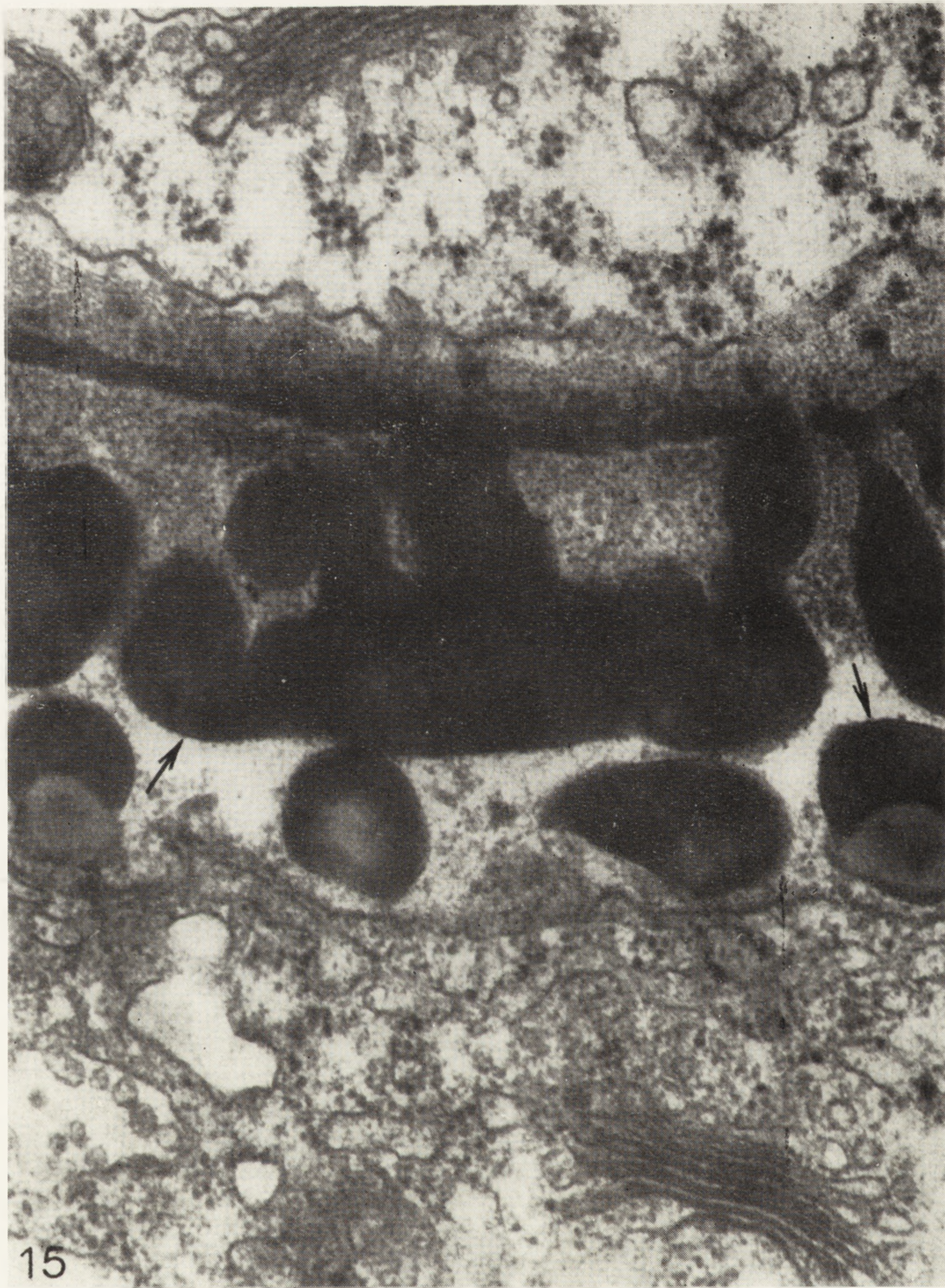
Pojedyncze ciała Ubischa (CU) z wyraźnie zaznaczoną korą i częścią centralną oraz ich zlewające się zespoły widoczne w okolicy plazmolemy



Ryc. 13. *Dactylis*, tworzenie egzyny wokół ziaren pyłku. Młode formy ciał Ubischa (CU) na powierzchni plazmolemy. $\times 28\ 000$
 Materiał egzyny i części korowej młodych ciał Ubischa wykazuje podobną strukturę



Ryc. 14. *Dactylis*, końcowe stadium tworzenia egzyny. $\times 52\ 200$
 Dojrzałe ciała Ubischa (CU) i egzyna wykazują obecność mikrokanalów



Ryc. 15. *Muscari*. $\times 67\ 280$

Ścisły kontakt ciała Ubischa z egzyną. Widoczne lamelle na powierzchni ciał Ubischa i egzyny (strzałki)

[124]. Ostatnie badania Rowleya i Dahla [118] wskazują jednakże, że glycoalyx mikrospor otoczonych ścianą kalozową jest jedynie prekursorom warstwy okrywowej.

ROLA TAPETUM W TWORZENIU EGZYNY

W badaniach nad ultrastrukturą tapetum szczególne zainteresowanie wywołuje ewentualny związek między tapetum i rozwojem ziaren pyłku [12, 30, 31, 72, 93, 95, 107]. Zaobserwowano mianowicie, że po zakończeniu mejozy, kiedy powstaje wzorzec egzyny wokół każdej komórki tetrady, na powierzchni komórek tapetum typu sekrecyjnego, we wpukleniach plazmolemy pojawiają się ciała kuliste o średnicy 0,2–0,3 μm . W ciałach tych wyróżnia się dwa elementy: (a) część centralną kulistego kształtu, zawierającą homogeny, słabo przepuszczalny dla elektronów materiał lipidowy, oraz (b) część korową zbudowaną z materiału fibrylarnego (ryc. 9), morfologicznie podobnego do pojawiającego się wcześniej we wgłębieniach plazmolemy jak i obecnego w płynie pylnika [49]. Taką budową charakteryzują się młodociane ciała Ubischa opisywane w komórkach tapetum sekrecyjnego u wielu okrytozalążkowych i niektórych nagozalążkowych [10, 27, 30, 31, 72, 107, 108, 113].

Termin „ciała Ubischa” pochodzi od nazwiska badacza, który wiele uwagi poświęcił tym strukturom [114], ale wykryte one zostały znacznie wcześniej (Rosanoff, 1865; Mascré, 1919, 1922; Kriatchenko, 1925, cyt. za [69]). Z tego względu niektórzy autorzy uważają termin „ciała Ubischa” za niewłaściwy i stosują inne nazwy dla określenia opisanych utworów, np. „granules” [93], „orbicules” [120], „plaques” [63, 64, 65, 113].

Ciała Ubischa powstają z prociał Ubischa tworzących się w cytoplazmie komórek tapetum. Prociała uwalniane do przestrzeni między plazmolemą i ścianą komórkową zostają natychmiast otoczone homogenym i elektronowogęstym materiałem podobnym do sporopolleniny [31] lub materiałem fibrylarnym (ryc. 9), który mógłby być protosporopolleniną [30, 31, 72].

W stosunkowo krótkim czasie wzrasta ilość młodocianych ciał Ubischa na powierzchni plazmolemy komórek tapetum. Ilość uwalnianych prociał Ubischa może być tak duża, że tworzą one zespoły złożone z 2–3 prociał, przylegających ściśle do siebie i wówczas jedynie niewielka ilość fibrylarnego materiału jest deponowana na ich powierzchni od strony najbardziej oddalonej od plazmolemy. Trawienie enzymatyczne wskazuje, że materiał części centralnej zawiera lipidy w połączeniu z pektynami [49]. Z badań Rowleya i Skvarli [123] wynika, że warstwa o strukturze fibrylarniej otaczająca część centralną ciał Ubischa zawiera kwaśne

polisacharydy. Obecność polisacharydów wykazano również w części korowej młodocianych ciał Ubischa oraz w materiale fibrylarnym zgromadzonym wewnątrz wpukleń plazmolemy [49]. Odkładanie sporopolleniny na powierzchni prociał Ubischa zachodzi w tym samym czasie co rozwój egzyny wokół ziaren pyłku (ryc. 10). W obu przypadkach późniejsze stadia odkładania sporopolleniny są związane z lamellami o wymiarach membrany elementarnej. Ciągłe odkładanie sporopolleniny prowadzi do tworzenia agregatu ciał Ubischa.

Po rozpuszczeniu ścian kalozowych, w okresie rozbudowy egzyny, ilość i wielkość ciał Ubischa wzrasta (0,2–0,5 μm). Barwią się one teraz błękitem toluidynowym, podobnie jak rozbudowująca się egzyna. Ciała Ubischa nie pojawiają się na tych powierzchniach komórek tapetum, które graniczą z tkanką endotecjum (ryc. 11). W miarę zwiększania odległości między komórkami tapetum i ziarnami pyłku ciała Ubischa maleją i kompletnie zanikają. Materiał części korowej ciał Ubischa w okresie rozbudowy egzyny jest elektronowogęsty, morfologicznie podobny do sporopolleniny budującej egzynę (ryc. 12). Można przypuszczać, że fibrylarny lub homogenny materiał polisacharydowy części korowej młodocianych ciał Ubischa reprezentuje prekursor sporopolleniny lub protosporopolleninę i dzięki wzbogacaniu w karotenoidy jest zamieniany w sporopolleninę, co powoduje zmianę struktury części korowej [49].

Obserwacje ciał Ubischa w mikroskopie elektronowym zwróciły uwagę na wyraźne podobieństwo ornamentacji egzyny i ciał Ubischa (ryc. 13, 14, 15). I tak np. u *Poa* oba składniki są pokryte kolcami, u *Degeneria* oba są całkowicie gładkie, a u *Cryptomeria* — pęcherzykowate [126]. Przypuszcza się, że część korowa ciał Ubischa powstaje w ten sam sposób jak egzyna [63].

Obserwowano również podobieństwo w strukturze materiału budującego część korową ciał Ubischa i egzyny (ryc. 14). U wielu gatunków roślin w końcowych etapach rozbudowy ściany ziaren pyłku występują mikrokanały [12, 49, 110, 113], analogiczne kanały przecinają promieniście otoczki ciał Ubischa. To podobieństwo ornamentacji egzyny i ciał Ubischa, jak i ich struktury, wydaje się wskazywać, że system kontrolujący tworzenie egzyny w gametoficie musi być zgodny z zawartą w sporoficie kontrolą genetyczną powstawania części korowej ciał Ubischa.

U *Muscari* na powierzchni bądź we wnętrzu części korowej niektórych ciał Ubischa obserwuje się często lamelle opisywane na powierzchni plazmolemy komórek pyłku i w egzynie [49]. Podobieństwo materiału ciał Ubischa i materiału egzyny widoczne jest wyraźnie w przypadku ich fluorescencji wywołanej primuliną [152]. Według Rowleya i Skvarli [123] specyficzna forma otoczki ciał Ubischa identyczna z powierzchnią egzyny jest zdeterminowana przez kompleks plazmolema–glycocalyx.

Z faktu, że egzyna rozbudowuje się najpierw od strony przylegającej do tapetum, wyciągnięto wniosek o roli tapetum w syntezie materiału egzyny [63].

Badania autoradiograficzne z włączaniem prekursorów lipidów (kwasu palmitynowego ^3H , mewalonowego ^3H i octanu sodu ^3H) do pylnika *Dactylis glomerata* i *Muscari comosum* wskazują na ich wbudowywanie do ściany ziaren pyłku jak i do komórek tapetum w czasie rozbudowy egzyny [49–51]. Wbudowywanie radioaktywnego octanu sodu do rozwijającej się ściany wykazano również w komórkach *Gerbera*. Skoro octan sodu ^3H włącza się do rejonów, które są związane z egzyną i sporopolleniną, można przyjąć, że jest on wykorzystywany do syntezy kwasów tłuszczowych i wbudowuje się do lipidów frakcji sporopolleniny [135]. W przeciwieństwie do komórek *Gerbera* [136], kwas mewalonowy włączający się do ściany ziaren pyłku *Muscari comosum* w czasie rozbudowy egzyny mógłby być wykorzystywany do syntezy karotenoidów [136].

Włączanie radioaktywnych prekursorów lipidów do komórek tapetum i ziaren pyłku sugeruje udział ciał Ubischa w rozbudowie egzyny. Wyniki badań autoradiograficznych nie pozwalają jednak stwierdzić z całą pewnością, czy ciała Ubischa wbudowują się w całości do ściany ziaren pyłku, czy też jedynie część korowa ulega wbudowaniu, a lipopolisacharydowa część centralna bierze udział w tworzeniu substancji zlepiającej, powstającej później [21, 68, 72].

Przypuszcza się, że egzyna składa się częściowo z ciał Ubischa [13, 107]. Jeżeli jednak ciała Ubischa uczestniczą w rozbudowie egzyny, nasuwa się pytanie, w jaki sposób następuje formowanie ściany ziaren pyłku w pylnikach z ameboidalnym tapetum, gdzie ciała Ubischa nie tworzą się wcale [30, 55, 95].

W rozważaniach nad udziałem ciał Ubischa w tworzeniu egzyny nie można pominąć koncepcji, w myśl której ciała Ubischa są zbędne w tym procesie [10, 54], powstawałyby one bowiem w wyniku nadmiernej produkcji sporopolleniny [113], jako produkt uboczny rozwoju ściany [20]. Ciała Ubischa tworząc ciągłą warstwę na powierzchni komórek tapetum mogą również stanowić rodzaj bezwodnej powierzchni, od której ziarna pyłku mogą łatwo się odrywać [66], bądź też są one materiałem klejącym ziarna pyłku w okresie ich uwalniania z pylnika [108].

Oprócz ciał Ubischa, tapetum produkuje (np. u *Eleocharis* [26]) tapetosomy (ciała o nieregularnych kształtach, 1–3 μm średnicy, zawierające lamelle lub nie wykazujące obecności struktur lamellarnych), które po uwolnieniu z cytoplazmy komórek tapetum, razem z ciałami Ubischa otaczają ziarna pyłku. Po mitozie w ziarnach pyłku tapetosomy przenikają do ściany ziaren pyłku i wiele z nich może być widocznych pomiędzy kolumellami egzyny. Obserwacje Dunbar [26] wskazują, że tapeto-

somy zawierają materiał chemicznie podobny do sporopolleniny, mogłyby więc uczestniczyć w tworzeniu egzyny.

Z przedstawionych danych wynika, że aktywność metaboliczna tapetum w końcowym okresie rozwoju ziaren pyłku związana jest z tworzeniem ciał Ubischa i tapetosomów, z syntezą sporopolleniny lub jej prekursorów [31, 54, 66, 67], a ponadto w końcowym okresie swej działalności z powstawaniem substancji lipidowej bogatej w karotenoidy, budującej warstwę powlekającą (Pollenkitt czy tryfinę).

LITERATURA

- [1] AFZELIUS B. M., ERDTMAN G., SJÖSTRAND F. S., On the fine structure of the outer part of the spore wall of *Lycopodium clavatum* as revealed by the electron microscope, Sv. Bot. Tidskr., **48**: 151–161, 1954.
- [2] AHOKAS H., Male sterile mutants of barley. II. Cytochemistry of non-mutant and msg 6 cf microspores and pollen, Hereditas, **81**: 33–46, 1975.
- [3] — Evidence of a pollen esterase capable of hydrolyzing sporopollenin, Experimentia, **32**: 175–177, 1976.
- [4] ANGOLD R. E., The ontogeny and fine structure of the pollen grain of *Endymion non-scriptus*, Rev. Paleobot. Palynol., **3**: 205–212, 1967.
- [5] ATKINSON A. W., GUNNING B. E. S., JOHN P. C. L., Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C - acetate, studied in synchronous cultures, Planta, **107**: 1–32, 1972.
- [6] BROOKS J., Some chemical and geochemical studies on sporopollenin, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 351–407.
- [7] BROOKS J., SHAW G., Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature, Nature, **219**: 532–533, 1968.
- [8] — Evidence for extraterrestrial life: identity of sporopollenin with the insoluble organic matter present in the orquiel and murray meteorities and also in some terrestrial microfossils, Nature, **223**: 754–756, 1969.
- [9] — Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry and post-tetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exines, [w] Pollen: Development and Physiology, red. J. Heslop-Harrison, Butterworths 1973, 99–114.
- [10] CARNIEL K., Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Ubi-schkörperentwicklung in der Gattung *Oxalis*, Österr. Bot. Zeit., **114**: 490–501, 1967.
- [11] CHRISTENSEN J. E., HORNER H. T., Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*, Amer. J. Bot., **61**: 604–623, 1974.
- [12] CHRISTENSEN J. E., HORNER H. T., LERSTEN N. R., Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor* (Gramineae), Amer. J. Bot., **59**: 43–58, 1972.
- [13] CLOWES F. A. L., JUNIPER B. E., Plant cells, red. J. H. Barnett, Oxford, Edinburg 1968.
- [14] DAMALSY-FELLER M. J., Gamétophytes et gamétogénèse dans le genre *Marsilea*, Cellule, **58**: 169–208, 1956.
- [15] DEAN B. B., KOLATTUKUDY P. E., DAVIS R. W., Chemical composition

- and ultrastructure of suberin from hollow heart tissue of potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Plant Physiol.*, **59**: 1008–1010, 1977.
- [16] DENIZOT J., Sur la présence d'ensembles exiniques élémentaires dans le sporoderme de quelques *Marchantiales* et *Sphaerocarpales*, *C. R. Acad. Sc. Paris*, **272**: 2166–2169, 1971.
- [17] — Recherches sur l'origine des ensembles exiniques élémentaires du sporoderme de quelques *Marchantiales* et *Sphaerocarpales*, *C. R. Acad. Sc. Paris*, **272**: 2305–2308, 1971.
- [18] — Recherches sur les formations callosiques au cours de la sporogénèse de quelques *Marchantiales* et *Sphaerocarpales*, *C. R. Acad. Sc. Paris*, **272**: 2679–2722, 1971.
- [19] DICKINSON H. G., Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*, *Cytobiology*, **1**: 437–449, 1970.
- [20] — The role played by sporopollenin in the development of pollen in *Pinus banksiana*, [w] *Sporopollenin*, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 31–65.
- [21] — The role of plastids in the formation of pollen grain coatings, *Cytobios*, **8**: 25–40, 1973.
- [22] — Post - meiotic stages in pollen development, 12th Intern. Bot. Congress, Leningrad 1975.
- [23] — Common factors in exine deposition, [w] *The Evolutionary Significance of the Exine*, red. I. K. Ferguson, J. Müller, 1976, 67–90.
- [24] DICKINSON H. G., HESLOP - HARRISON J., Common mode of deposition for sporopollenin of sexine and nexine, *Nature*, **220**: 926–927, 1968.
- [25] — The mode of growth of the inner layer of the pollen grain exine in *Lilium*, *Cytobios*, **4**: 233–243, 1971.
- [26] DUNBAR A., Tapetosomes. Some notes about the ontogeny of a partly lamellar structure of tapetal origin in anthers of *Eleocharis*, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**: 413, 1973.
- [27] — Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (*Cyperaceae*). I. Ultrastructure and ontogeny, *Bot. Notiser*, **126**: 197–254, 1973.
- [28] — A review of the ultrastructure and ontogeny of some angiosperm pollen, *Grana*, **13**: 85–92, 1973.
- [29] — Pollen ontogeny in some species of *Campanulaceae*. A study by electron microscopy, *Bot. Notiser*, **126**: 277–315, 1973.
- [30] ECHLIN P., The role of the tapetum during microsporogenesis of *Angiosperms*, [w] *Pollen: Development and Physiology*, red. J. Heslop - Harrison, Butterworth 1973, 41–61.
- [31] ECHLIN P., GODWIN H., The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and Ubisch bodies, *J. Cell Sci.*, **3**: 161–174, 1968.
- [32] — The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. II. Pollen grain development through the callose special wall stage, *J. Cell Sci.*, **3**: 175–186, 1968.
- [33] — The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. III. The function of the pollen grain wall, *J. Cell Sci.*, **5**: 459–477, 1969.
- [34] ELSIK W. C., Degradation of arci in a fossil *Alnus* pollen grain, *Nature*, **209**: 825, 1966.
- [35] — Microbiological degradation of sporopollenin, [w] *Sporopollenin*, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 480–511.

- [36] ERDTMAN G., The acetolysis method, Sv. Bot. Tidskr., **54**: 561–564, 1960.
- [37] — Notes on the resistance and stratification of the exine, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 248–255.
- [38] FAERGI K., Recent trends in palynology, Bot. Review, **9**: 639–644, 1959.
- [39] — The preservation of sporopollenin membranes under natural conditions, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 256–270.
- [40] FAEGRI K., IVERSEN. J., Textbook of pollen analysis, Hafner Publ. Co, New York 1964.
- [41] FAGERLIND F., MASSALSKI A., The development of cell walls and intercellulars in the root of *Lemna minor* L., Sv. Bot. Tidskr., **68**: 64–93, 1974.
- [42] FEDER N., O'BRIEN T. P., Plant microtechnique: some principles and new methods, Amer. J. Bot., **55**: 123–142, 1968.
- [43] FLYNN J., VOLLMER S., Early pollen wall of the yellow pond *Lily*, Abstr. Soc. Cell Biol., 77a, 1972.
- [44] FORD J. H., Ultrastructural and chemical studies of pollen wall development in the *Epacridaceae*, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 130–173.
- [45] FREY-WYSSLING A., Submicroscopic morphology of protoplasm, Elsevier Publ. Co, Amsterdam 1953.
- [46] — Die Pflanzliche Zellwand, Springer Verlag, Berlin 1959.
- [47] FREY - WYSSLING A., MÜHLETHALER K., Ultrastructural plant cytology, Elsevier Publ. Co, Amsterdam 1962.
- [48] GABARA B., A possible role for the endoplasmic reticulum in exine formation, Grana, **14**: 16–22, 1974.
- [49] — Udział organelli komórkowych w tworzeniu ścian podczas mikrosporogenezy, Acta Universitatis Lodz., 1976.
- [50] — A role of plastids in the formation of exine, Proc. XV Czech. Conference of EM, red. V. Vicklický, J. Ludvik, Praha, vol. A, 88–89, 1977.
- [51] — Radioautographic visualization of incorporation of lipid precursors in anthers of *Muscari comosum* (L.) Mill., Acta Soc. Bot. Pol., **46**: 295–302, 1977.
- [52] GENEVÈS L., Distribution des polysaccharides parietaux, en relation avec l'évolution de diverses cytomembranes, dans les méiocytes staminaux du *Ribes rubrum* (*Grossulariaceés*) et, principalement, au cours du cloisonnement, J. Microsc., **19**: 65–88, 1974.
- [53] GHERARDINI G. L., HEALEY P. L., Dissolution of outer wall of pollen grain during pollination, Nature, **224**: 218–219, 1969.
- [54] GODWIN H., The origin of the exine, New Phytol., **67**: 667–676, 1968.
- [55] GODWIN H., ECHLIN P., CHAPMAN B., The development of the pollen grain wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., Rev. Paleobot. Palynol., **3**: 181–195, 1967.
- [56] GOLDSTEIN S., Degradation of pollen by *Phycomycetes*, Ecology, **41**: 543–545, 1960.
- [57] GOODAY G. W., Sporopollenin formation in the ascospore wall of *Neurospora crassa*, Arch. Microbiol., **101**: 145–151, 1974.
- [58] GOSS J. A., Development, physiology and biochemistry of corn and wheat pollen, Bot. Rev., **34**: 333–358, 1968.
- [59] GULLVÅG B. M., The fine structure of some gymnosperm walls, Grana Palynol., **6**: 435–475, 1966.
- [60] HAVINGA A. J., An experimental investigation into the decay of pollen

- and spores in various soil types, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 446-479.
- [61] HECKMAN C. A., Spore wall structure in the *Jungermanniales*, Grana, **10**: 109-119, 1970.
- [62] HENNIPMAN E., Electron and light microscopical observations on the perine of the spores of some *Bolbitis species (Filices)*, Acta Bot. Neerl., **19**: 671-680, 1970.
- [63] HESLOP - HARRISON J., Origin of exine, Nature, **195**: 1069-1071, 1962.
- [64] — An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*, Grana Palynol., **4**: 7-24, 1963.
- [65] — Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue, Soc. Exp. Biol., **17**: 315-340, 1963.
- [66] — Pollen wall development, Science, **161**: 230-237, 1968.
- [67] — Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*, Can. J. Bot., **46**: 1185-1192, 1968.
- [68] — Anther carotenoids and the synthesis of sporopollenin, Nature, **220**: 605, 1968.
- [69] — The pollen wall: structure and development, [w] Pollen: Development and Physiology, red. J. Heslop - Harrison, Butterworth, 1973, 75-98.
- [70] — The physiology of the pollen grain surface, Proc. R. Soc. Lond. B., **190**: 275-299, 1975.
- [71] HESLOP - HARRISON J., DICKINSON H. G., A common mode of deposition for the sporopollenin of sexine and nexine, Nature, **220**: 926-927, 1968.
- [72] — Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*, Planta, **84**: 199-214, 1969.
- [73] HESLOP - HARRISON J., HESLOP - HARRISON Y., Long - day and auxin - induced male sterility in *Silene pendula*, Port. Acta Biol., **5**: 79-94, 1958.
- [74] HESLOP - HARRISON J., HESLOP - HARRISON Y., KNOX R. B., HOWLETT B., Pollen - wall proteins: "gametophytic" and "sporophytic" fractions in the pollen walls of the *Malvaceae*, Ann. Bot., **37**: 403-412, 1973.
- [75] HOEFERT L. L., Polychromatic strains for thin sections of *Beta* embedded in epoxy resin, Stain. Technol., **43**: 145-151, 1968.
- [76] HORNER H. T., Sporopollenin formation and secretion by tapetal cells, Amer. J. Bot., (Abstr.), **55**: 109, 1968.
- [77] HORNER H. T., LERSTEN N. R., BOWEN C. C., Spore development in the liverwort *Riccardia pinguis*, Amer. J. Bot., **53**: 1048-1064, 1966.
- [78] HOWLETT B. J., KNOX R. B., HESLOP - HARRISON J., Pollen - wall proteins: release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and cosmos, J. Cell Sci., **13**: 603-619, 1973.
- [79] JONES S. B., Scanning electron microscopy of pollen as an aid to the systematics of *Vernonia (Compositae)*, Bull. Torrey Bot. Club., **97**: 325-335, 1970.
- [80] KARAGYOZOVA M. D., KARAGYOZOV L. K., A method for specific destruction of pollen grain exine, Dokł. Bołg. Ak. Nauk. **28**: 117-120, 1975.
- [81] KNOX R. B., Pollen wall proteins: pollen stigma interactions in ragweed and cosmos (*Compositae*), J. Cell, Sci., **12**: 421-443, 1973.
- [82] KNOX R. B., FRIEDERICH E., Tetrad pollen grains development and sterility in *Leschenaultia formosa (Goodeniaceae)*, New Phytol., **73**: 251-258, 1974.
- [83] KNOX R. B., HESLOP - HARRISON J., Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain, Nature, **223**: 92-94, 1969.

- [84] — Pollen - wall proteins: localization and enzymic activity, *J. Cell Sci.*, **6**: 1-27, 1970.
- [85] — Pollen - wall proteins: the fate of the intine - held antigens on the stigma in compatible and incompatible pollinations of *Phalaris tuberosa* L., *Ibid.*, **9**: 239-251, 1971.
- [86] KNOX R. B., HESLOP - HARRISON J., HESLOP - HARRISON Y., Pollen - wall proteins: localization and characterisation of gametophytic and sporophytic fractions, *Biol. J. Linn. Soc.*, **7**: 177-187, 1975.
- [87] KNOX R. B., WILLING R. R., ASHFORD A. E., Role of pollen - wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars, *Nature*, **237**: 381-383, 1972.
- [88] KWIATKOWSKI A., LUBLINER - MIANOWSKA K., Badania składu chemicznego pyłku. II. Badania błon pyłkowych, *Acta Soc. Bot., Pol.*, **26**: 501-514, 1957.
- [89] LARSON D. A., LEWIS C. W., Fine structure of *Parkinsonia aculeata*. I. Pollen walls, *Amer. J. Bot.*, **48**: 934-943, 1961.
- [90] — Pollen wall development in *Parkinsonia aculeata*, *Grana Palynol.*, **3**: 21-28, 1963.
- [91] LARSON D. A., SKVARLA J. J., LEWIS C. W., An electron - microscope study of exine stratification and fine structure, *Pollen et Spores*, **4**: 233-246, 1962.
- [92] LINSKENS H. F., Pollen, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin 1967.
- [93] MARQUARDT H., BARTH O. M., von RAHDEN U., Zytometrische und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Tapetumzellen in den Antheren von *Paeonia tenuifolia*, *Protoplasma*, **65**: 407-421, 1968.
- [94] McClymont J. W., LARSON D. A., An electron - microscopic study of spore wall structure in the *Musci*, *Amer. J. Bot.*, **51**: 195-200, 1964.
- [95] MEPHAM R. H., LANE G. R., Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*, *Protoplasma*, **68**: 175-192, 1969.
- [96] MOLLENHAUER H. H., TOTTEN C., Studies on seeds. II. Origin and degradation of lipid vesicles in pea and bean cotyledons, *J. Cell Biol.*, **48**: 395-405, 1971.
- [97] MÜHLETHALER K., Die Struktur einiger Pollen Membranen, *Planta*, **46**: 1-13, 1955.
- [98] NABLI M. A., Ultrastructure de l'endexine et de la tryphine chez quelques espèces du genre *Teucrium* L. (*Labiées*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, **273**: 2075-2078, 1971.
- [99] NORTHCOTE D. H., PICKETT - HEAPS J. D., A function of the Golgi apparatus in polysaccharide synthesis and transport in the root - cap cells of wheat, *Biochem. J.*, **98**: 159-167, 1966.
- [100] OWENS J. N., MOLDER M., Pollen development in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*), *Can. J. Bot.*, **49**: 1263-1266, 1971.
- [101] PANKOW H., Über den Pollenkitt bei *Galanthus nivalis* L., *Flora*, **146**: 240-253, 1957.
- [102] PETRIS S. de, Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers, *J. Ultrastruct. Res.*, **19**: 45-83, 1967.
- [103] PETTITT J. M., A route for the passage of substances through the developing *Pteridophyta* exine, *Protoplasma*, **88**: 117-131, 1976.
- [104] PICKETT - HEAPS J. D., NORTHCOTE D. H., Relationship of cellular orga-

- nelles to the formation and development of the plant cell wall, *J. Exp. Bot.*, **17**: 20–26, 1966.
- [105] POJNAR E., WILLISON J. H. M., COCKING E. C., Cell wall regeneration by isolated tomato - fruit protoplasts, *Protoplasma*, **64**: 460–480, 1967.
- [106] POTONIE R., REHNELT K., Aspects of sporin. On the aromatisation of sporin and the hydrogen density of the sporin of carboniferous lycopsides, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 295–304.
- [107] RISUEÑO M. C., GIMÉNEZ - MARTIN G., LÓPEZ - SÁEZ J. F., GARCIA M. I. R., Origin and development of sporopollenin bodies, *Protoplasma*, **67**: 361–374, 1969.
- [108] ROBARDS A. W., Electron microscopy and plant ultrastructure, McGraw-Hill, London 1970.
- [109] ROGERS C. M., HARRIS B. D., Pollen exine deposition: a clue to its control, *Amer. J. Bot.*, **56**: 1209–1211, 1969.
- [110] ROLAND F., Différentiation du sporoderme chez *Ficaria ranunculoides* Moench. Observation et evolution de corps d'Ubisch, *Pollen et Spores*, **9**: 415–425, 1967.
- [111] — Étude de l'ultrastructure des apertures. III. Compléments fournis par le microscope électronique à balayage, *Pollen et Spores*, **11**: 475–498, 1969.
- [112] ROWLEY J., The fine structure of the pollen wall in the *Commelinaceae*, *Grana Palynol.*, **2**: 3–31, 1959.
- [113] — Ubisch body development in *Poa annua*, *Grana Palynol.*, **4**: 25–36, 1963.
- [114] — Fibrils, microtubules and lamellae in pollen grains, *Rev. Paleobot. Palynol.*, **3**: 213–226, 1967.
- [115] — Implications on the nature of sporopollenin based upon pollen development, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 174–219.
- [116] ROWLEY J. R., Lipopolysaccharide embedded within the exine of pollen grains, 33rd Ann. Proc. Electron Microscopy, Soc. Amer., Las Vegas, Nevada, red. G. W. Bailey, 1975.
- [117] — The permeability of the pollen grain wall to exogenous protein traces, *J. Ultrastruct. Res.*, **50**: 394, 1975.
- [118] ROWLEY J. R., DAHL A. O., Pollen development in *Artemisia vulgaris* with special reference to glycocalyx material, *Pollen et Spores*, **19**: 169–285, 1977.
- [119] ROWLEY J. R., DUNBAR A., Source of membranes for exine formation, *Sv. Bot. Tidskr.*, **61**: 49–67, 1967.
- [120] ROWLEY J. R., ERDTMAN G., Sporoderm in *Populus* and *Salix*, *Grana Palynol.*, **7**: 517–567, 1967.
- [121] ROWLEY J. R., FLYNN J. J., Single - stage carbon replicas for microspores, *Stain. Technol.*, **41**: 287–290, 1966.
- [122] — Migration of lanthanum through the pollen wall, *Cytobiologie*, **3**: 1–12, 1971.
- [123] ROWLEY J. R., SKVARLA J. J., Plasma membrane - glycocalyx origin of Ubisch body wall, *Pollen et Spores*, **16**: 441–448, 1974.
- [124] — The glycocalyx and initiation of exine spinules on microspores of *Canna*, *Amer. J. Bot.*, **62**: 479–485, 1975.
- [125] ROWLEY J. R., SOUTHWORTH D., Deposition of sporopollenin on lamellae of unit membrane dimensions, *Nature*, **213**: 703–704, 1967.
- [126] ROWLEY J. R., MÜHLETHALER K., FREY - WYSSLING A., A route for the

- transfer of materials through the pollen grain wall, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 537-538, 1959.
- [127] SAUGSTER A. G., DALE H. M., A preliminary study of differential pollen grain preservation, *Can. J. Bot.*, **39**: 35-43, 1961.
- [128] — Pollen grain preservation of underrepresented species in fossil spectra, *Can. J. Bot.*, **42**: 437-449, 1964.
- [129] SENGUPTA S., ROWLEY J. R., Re - exposure of tapes at high temperature and pressure in the *Lycopodium clavatum* spore exine, *Grana* **14**: 143-151, 1974.
- [130] SHAW G., The chemistry of sporopollenin, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, London 1971, 305-350.
- [131] SHAW G., YEADON A., Chemical studies on the constitution of some pollen and spore membranes, *Grana Palynol.*, **5**: 247-252, 1964.
- [132] SKVARLA J., LARSON D. A., Fine structural studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membrane and exine ontogeny, *Amer. J. Bot.*, **53**: 1112-1125, 1966.
- [133] SKVARLA J., ROWLEY J. R., The pollen wall of *Canna* and its similarity to the germinal apertures of other pollen, *Amer. J. Bot.*, **57**: 519-529, 1970.
- [134] SOUTHWORTH D., Ultrastructure of *Gerbera jamesonii* pollen, *Grana Palynol.*, **6**: 324-337, 1966.
- [135] — Cytochemical reactivity of pollen walls, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 73-80, 1973.
- [136] — Incorporation of radioactive precursors into developing pollen walls, [w] Pollen: Development and Physiology, red. J. Heslop - Harrison, Butterworths, 1973, 115-120.
- [137] — Solubility of pollen exines, *Amer. J. Bot.*, **61**: 36-44, 1974.
- [138] SOUTHWORTH D., BRANTON D., Freeze - etched pollen walls of *Artemisia pycnocephala* and *Lilium humboldtii*, *J. Cell Sci.*, **9**: 193-207, 1971.
- [139] STANLEY R. G., LINSKENS H. F., Pollen, biology biochemistry management, Springer Verlag, New York, 1974.
- [140] THOMAS A., LUGARDON M., Sur la structure fine des tétrades de deux Annonacées (*Asteranthe asterias* et *Hexalobus monopetalus*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, **275**: 1749-1752, 1972.
- [141] TISCHLER G., Zellstudien an sterilen Bastardpflanzen, *Arch. Zellforsch.*, **1**: 33-51, 1908.
- [142] TRAVERSE A., What is sporopollenin?, *Abstr. Amer. J. Bot.*, **55**: 722, 1968.
- [143] TSINGER N. V., PETROWSKAJA - BARANOWA T. P., The pollen grain wall, a living physiologicall active structure, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, **138**: 466-469, 1961.
- [144] UBISCH G. V., Zur Entwicklungsgeschichte der Antheren, *Planta*, **3**: 490-495, 1927.
- [145] VAN CAMPO M., Précisions nouvelles sur les structures comparées des pollens de Gymnospermes et d'Angiospermes, *C. R. Acad. Sc. Paris*, **272**: 2071-2075, 1971.
- [146] VAZART B., Morphogénèse du sporoderme et participation des mitochondries à la mise en place de la primexine dans le pollen de *Linum usitatissimum* L., *C. R. Acad. Sc. Paris*, **270**: 3210-3212, 1970.
- [147] WALKER J. W., Evolution of exine structure in the pollen of primitive *Angiosperms*, *Amer. J. Bot.*, **61**: 891-902, 1974.
- [148] WALKER J. W., SKVARLA J. J., Primitively columellaless pollen: a new

- concept in the evolutionary morphology of *Angiosperms*, *Science*, **187**: 445-447, 1975.
- [149] WANG W. S., KORCZYNSKI M. S., LUNDGREN D. G., Cell envelope of an iron-oxidizing bacterium: studies of lipo-polysaccharide and peptidoglycan, *J. Bacteriol.*, **104**: 556-565, 1970.
- [150] WATERKEYN L., *Pollen*, McGraw - Hill Yearbook Science and Technology, 1973.
- [151] WATERKEYN L., BIENFAIT A., On a possible function of the callose special wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *Grana*, **10**: 13-20, 1970.
- [152] — Primuline induced fluorescence of the first exine elements and Ubisch bodies in *Ipomoea* and *Lilium*, [w] *Sporopollenin*, red. J. Brooks i wsp., Academic Press, 1971, 108-129.
- [153] WATSON L., KNOX R. B., Pollen wall antigens and allergens: taxonomically - ordered variation among grasses, *Ann. Bot.*, **40**: 399-408, 1976.
- [154] WIERMANN R., WEINERT H., Untersuchungen zur Sporodermentwicklung bei *Corsinia coriandrina* (Sprengel) Lindb., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **82**: 175-1882, 1969.
- [155] ZETSCHKE F., Chemische Grundlagen der Pollenanalyse, *Mitteil. Naturf. Ges. Ber.*, **28**, 1928.
- [156] ZETSCHKE F., HUGGLER K., Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen. I. *Lycopodium clavatum*, *Lieb. Ann.* **461**: 89-108, 1928.
- [157] ZETSCHKE F., Kork und Cuticularsubstanzen, [w] *Handbuch der Pflanzenanalyse*, red. G. Klein, Springer Verlag, **3**: 205, 1932.
- [158] ZETSCHKE F., KAELIN O., Das thermische Verhalten der Sporopollenine, *Helv. Chim. Acta*, **15**: 670-675, 1932.
- [159] — Die Inkohlungstemperatur der Steinkohlen, *Helv. Chim. Acta*, **15**: 675, 1932.

Otrzymano: 21 lutego 1978.

Przyjęto: 10 marca 1978.

Adres autora: ul. Banacha 13/16 90 - 227 Łódź

- 1200 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1979) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **21**, 105-110.
- 1201 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1980) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **22**, 105-110.
- 1202 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1981) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **23**, 105-110.
- 1203 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1982) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **24**, 105-110.
- 1204 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1983) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **25**, 105-110.
- 1205 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1984) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **26**, 105-110.
- 1206 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1985) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **27**, 105-110.
- 1207 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1986) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **28**, 105-110.
- 1208 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1987) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **29**, 105-110.
- 1209 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1988) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **30**, 105-110.
- 1210 WARD, W. R. & KENNEDY, M. E. (1989) The effect of the position of the pollen receptor on the pollen tube growth rate in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Applied Botany*, **31**, 105-110.

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII I JEGO APARAT WICIOWY
W BADANIU MOLEKULARNYCH PODSTAW RÓŻNICOWANIA
I ROZWOJU ORGANIZMÓW

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII AND ITS FLAGELLA AS MODELS FOR THE
STUDY OF MOLECULAR BASIS OF DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT
OF ORGANISMS

Aleksander F. SIKORSKI

Zakład Biochemii, Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie. W artykule przedstawiono niektóre zalety *Chlamydomonas reinhardtii* jako organizmu modelowego do badań procesów biochemicznych i fizjologicznych w warunkach synchronizowanego wzrostu wegetatywnego i gametogenezy. W dalszej części pracy zajęto się strukturą wici i niektórymi zagadnieniami dotyczącymi ich różnicowania. Ze względu na udział wici w rozpoznawaniu gamet przeciwnego znaku badania ich błony mogą okazać się przydatne w wyjaśnieniu mechanizmu zjawisk swoistej adhezji komórek. W artykule dokonano również szczegółowego przeglądu badań nad błoną wici *Chlamydomonas* i jej udziałem w adhezji gamet.

Summary. Some advantages of *Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism for the study of biochemical and physiological events are discussed. The next part of this paper is connected with the structure of flagella and some aspects of their differentiation. Since the flagella participate in recognition of opposite mating type gametes the study of flagella membranes might represent a useful tool for elucidation of the mechanism of specific cell adhesion. Moreover, numerous reports on *Chlamydomonas* flagella and their participation in the gamete adhesion are reviewed in detail.

Poznanie molekularnych podstaw procesów różnicowania i rozwoju zależy w dużym stopniu od doboru odpowiedniego modelu doświadczalnego. Jednokomórkowe glony stanowią dogodny obiekt badawczy, ponieważ posiadają dobrze wykształcone jądro i inne organelle komórkowe oraz prosty cykl rozwojowy.

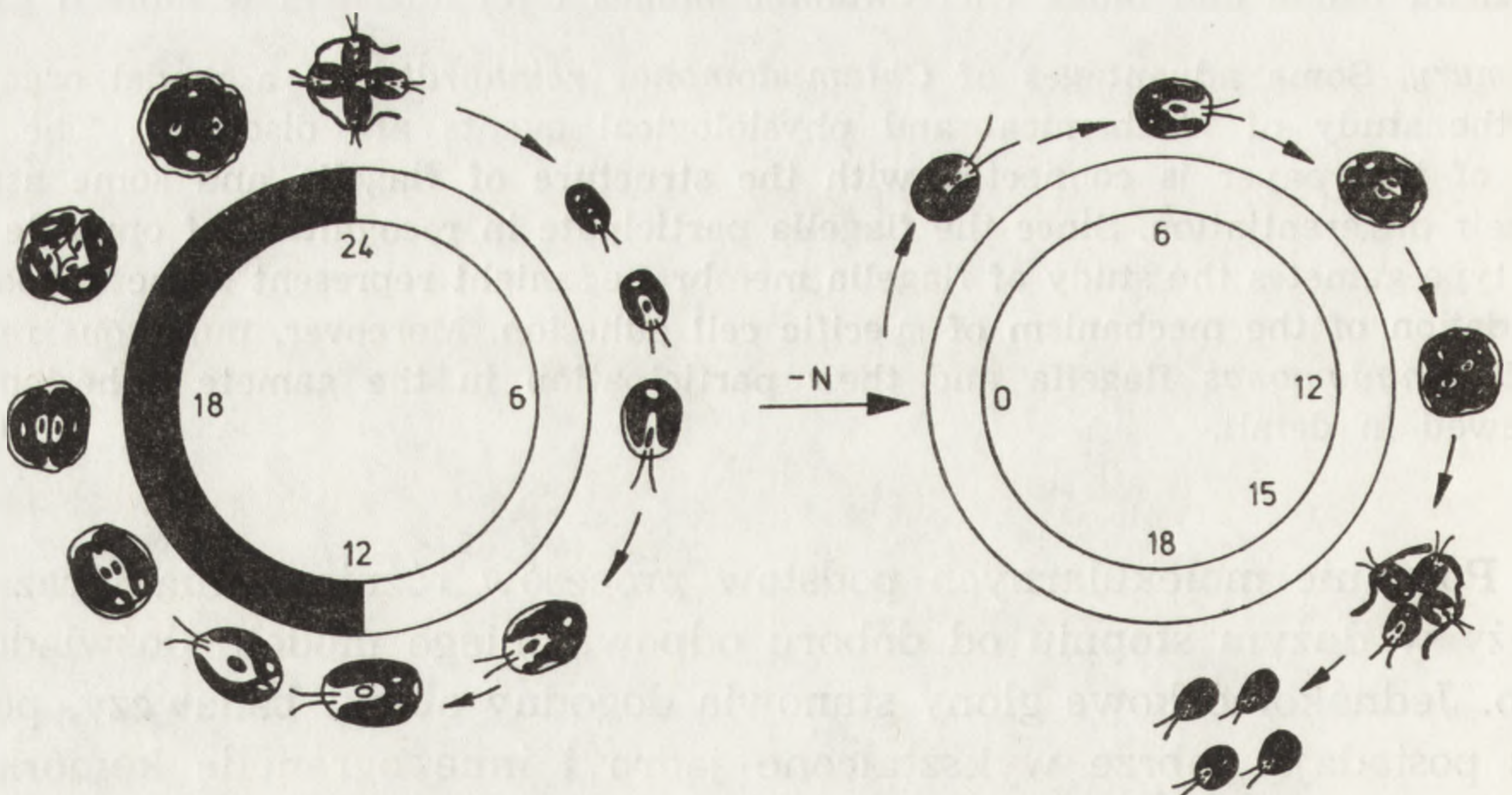
Rodzaj *Chlamydomonas* — Zawłotnie jest przedstawicielem Zielnic. Komórka tych glonów ma kształt eliptyczny, posiada cienką ściankę

celulozową, dwie wici, jądro, chloroplast oraz pirenoid. Rozmnażanie wegetatywne odbywa się przez podział. U przedstawicieli tego rodzaju występują wszystkie trzy typy rozmnażania płciowego, a mianowicie: izo-, hetero- i oogamia. Omawiany gatunek *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard) jest izogamiczny i heterotalliczny. Jego cykl życiowy przedstawia się następująco: haploidalne komórki wegetatywne dzieląc się mitotycznie dają populację komórek wegetatywnych [43]. W pewnych warunkach, np. niedoboru azotu w podłożu, w wyniku podziału powstają w zależności od szczepu obdarzone wiciami gamety „plus” lub „minus” [66].

Bernstein [5] oraz Kates i Jones [34, 36] wykazali, że cykl życiowy *Chlamydomonas reinhardtii* i *Chlamydomonas moewusii* daje się łatwo synchronizować przez umieszczanie hodowli na przemian w pełnym oświetleniu i w zupełnej ciemności.

I. SYNCHRONIZOWANY WZROST *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

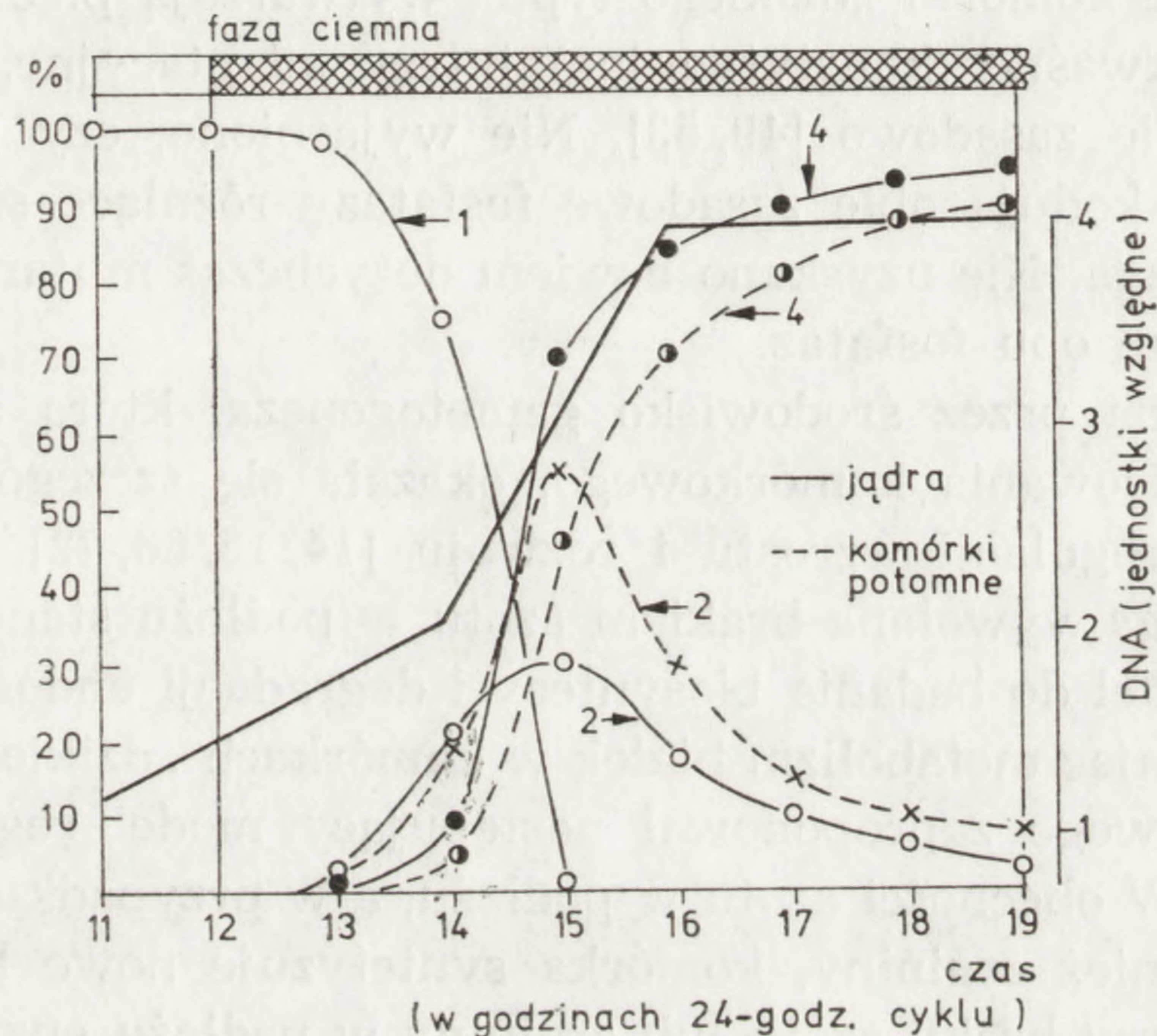
Gould i Jones [25] obserwując cykl życiowy *Chlamydomonas* wykazali, że podział komórki rozpoczyna się od chloroplastu w dziesiątej godzinie fazy świetlnej. Jądro dzieli się mitotycznie, a początek cytokinezy przypada na drugą godzinę fazy ciemnej. Komórki powstałe w wyniku pierwszego podziału nie wytwarzają ścian komórkowej. Drugi podział rozpoczyna się bezpośrednio po pierwszym. W efekcie powstają cztery komórki potomne, które na początku fazy świetlnej, dopiero po wytworzeniu własnych ścian komórkowych, oddzielają się pozostawiając ścianę komórki rodzicielskiej.



Ryc. 1. Schemat stadiów rozwojowych *Chlamydomonas reinhardtii* w czasie synchronicznego wzrostu i gametogenezy [30]

Zaciemnione pole przedstawia czas trwania fazy ciemnej

Johnson i Porter [28] stwierdzili, że *Chlamydomonas* ma „zamknięty” aparat mitotyczny, gdyż błona jądrowa nie zanika w czasie podziałów. Po pierwszym podziale jądro nie wraca do stanu „pełnej interfazy”. Na ryc. 1 przedstawiono schematycznie stadia rozwojowe *Chlamydomonas* w synchronizowanych hodowlach komórek wegetatywnych oraz podczas indukowanej gametogenezy. Na ryc. 2 przedstawiono podaną przez Jonesa i wsp. [30, 35] kolejność replikacji DNA, podziału jądra i podziału komórki.



Ryc. 2. Zależność między syntezą DNA, podziałem jądra i cytokinezą w czasie „ciemnej” fazy wegetatywnego wzrostu [30]

Zjawiska zachodzące podczas synchronizowanego wzrostu charakteryzują się ustaloną sekwencją poszczególnych stadiów oraz dużą ostrością przejść. Oznacza to, że w dowolnie wybranym czasie w większości komórek będą zachodzić takie same zjawiska biochemiczne i fizjologiczne. Jak wykazali Kates i Jones [33, 37, 39], w określonych stadiach rozwojowych *Chlamydomonas* znacznie wzrasta aktywność niektórych enzymów. Kuempel i wsp. [42], Masters i wsp. [51] oraz Gorman [24] również zaobserwowali cykliczną syntezę enzymów w hodowlach bakterii i drożdży o synchronicznym cyklu podziałów. Renke i Jones [61, 62] stwierdzili, że aktywność proteolityczna w komórkach wegetatywnych *Chlamydomonas* wzrasta podczas dwunastogodzinnej fazy świetlnej, osiągając maksimum w czasie inicjacji podziału. W dobowym cyklu hodowli podobnie zmienia się zawartość aminokwasów i peptydów [29]. Według Jonesa (doniesienie prywatne, 1976) główną proteazą tego organizmu jest katepsyna D, która występuje w dwóch formach molekularnych o masach cząsteczkowych

39 000 i 63 000 daltonów. Chen i Jones [12, 13] dostarczyli dalszych dowodów polimorfizmu enzymów, wykazując w komórkach wegetatywnych *Chlamydomonas* obecność dwóch izoenzymów karboksylazy fosfoenolopirogronianowej.

Lien i Knutsen [45] prowadząc badania nad syntezą enzymów stwierdzili, że komórki *Chlamydomonas* hodowane w nieorganicznej pożywce produkują kwaśną fosfatazę. W dwa lata później Lopez i wsp. [48, 49] oraz Matagne i wsp. [52] uzyskali mutanty z defektem w syntezie fosfataz. Okazało się, że komórki „dzikiego typu” wytwarzają pięć różnych fosfataz — dwie kwaśne (konstytucyjne) i trzy adaptacyjne, w tym jedną obojętną i dwie zasadowe [49, 53]. Nie wyjaśniono, czy jeden lub dwa odrębne geny kodują obie zasadowe fosfatazy różniące się ruchliwością elektroforetyczną. Nie uzyskano bowiem dotychczas mutantów pozbawionych jednej lub obu fosfataz.

Indukowana przez środowisko gametogeneza, która stanowi prosty przykład różnicowania komórkowego, okazała się szczególnie przydatna w badaniach regulacji wzrostu i rozwoju [14, 15, 68, 72]. Gametogeneza *Chlamydomonas* wywołana brakiem azotu w podłożu stanowi szczególnie przydatny model do badania biosyntezy i degradacji endogennego białka. Jones [33] badając metabolizm białek w komórkach „dzikiego typu” i mutantu argininowego zaproponował następujący model regulacji metabolizmu białek. W obecności azotu w podłożu, a w przypadku mutantu argininowego również argininy, komórka syntetyzuje nowe białka i kwasy nukleinowe. Przy braku azotu lub argininy w podłożu enzymy degradują istniejące białka do substratów wykorzystywanych w syntezie nowych białek i kwasów nukleinowych. W przypadku mutantu argininowego w obecności jonu amonowego i braku argininy w podłożu nie obserwuje się proteolizy, co wskazuje na represję syntezy enzymów proteolitycznych przez jony amonowe.

Martin i Goodenough [50] zaobserwowały, że podczas gametogenezy zmniejsza się ilość rybosomów, zmienia się morfologia chromatyny, organizacja błon jądra i chloroplastu oraz retikulum endoplazmatycznego. W komórkach gamet dodatnich pojawia się struktura „koniugacyjna”, która według Goodenough i Weiss [22] warunkuje tworzenie mostka cytoplazmatycznego podczas zlewania się gamet. Wici gamet pomimo braku zmian morfologicznych uzyskują właściwości adhezyjne, które wyrażają się swoistym wiązaniem wici gamet przeciwnego typu płciowego. Gamety charakteryzują się wzmożoną syntezą skrobi i kwasów organicznych, obniżoną aktywnością fotosyntetyczną, obniżoną syntezą aminokwasów z CO₂, a po dodaniu źródła azotu — wzrostem syntezy aminokwasów zasadowych [30, 32, 35, 38]. Po dodaniu źródła azotu do podłoża gamety ponownie różnicują się do komórek wegetatywnych [30].

Regulacja czasu wystąpienia podziału jak dotąd jest słabo poznana. W synchronizowanych hodowlach *Chlamydomonas* wielkość komórki nie jest jedynym czynnikiem decydującym o czasie podziału. Badania Jonesa [30] ujawniły, że „decyzja” dotycząca ilości podziałów obejmuje wiele zjawisk poprzedzających sam podział. Intensywnie naświetlane komórki już po sześciu godzinach osiągają wielkość komórek hodowanych przez dwanaście godzin przy słabszym oświetleniu. Na początku fazy świetlnej zarówno „duże”, jak i „małe” komórki zaczynają się dzielić — różnią się jednak ilością następujących po sobie podziałów. Komórki hodowane przy intensywnym oświetleniu dzielą się dwu- a nawet trzykrotnie, podczas gdy hodowane przy słabszym oświetleniu dzielą się tylko jeden raz. Według Jonesa [30] zachodzą tu dwa odrębne zjawiska. Jednym z nich jest sterowanie czasem inicjacji podziału przez środowiskowy cykl światłość-ciemność, a drugim — kontrola ilości podziałów przez ilość dostępnej energii.

II. APARAT WICIOWY

Fakt, że wici dają się względnie łatwo odłączać od komórek i izolować bez naruszania ich struktury, pozwolił na poznanie ich budowy submikroskopowej [60, 63, 64].

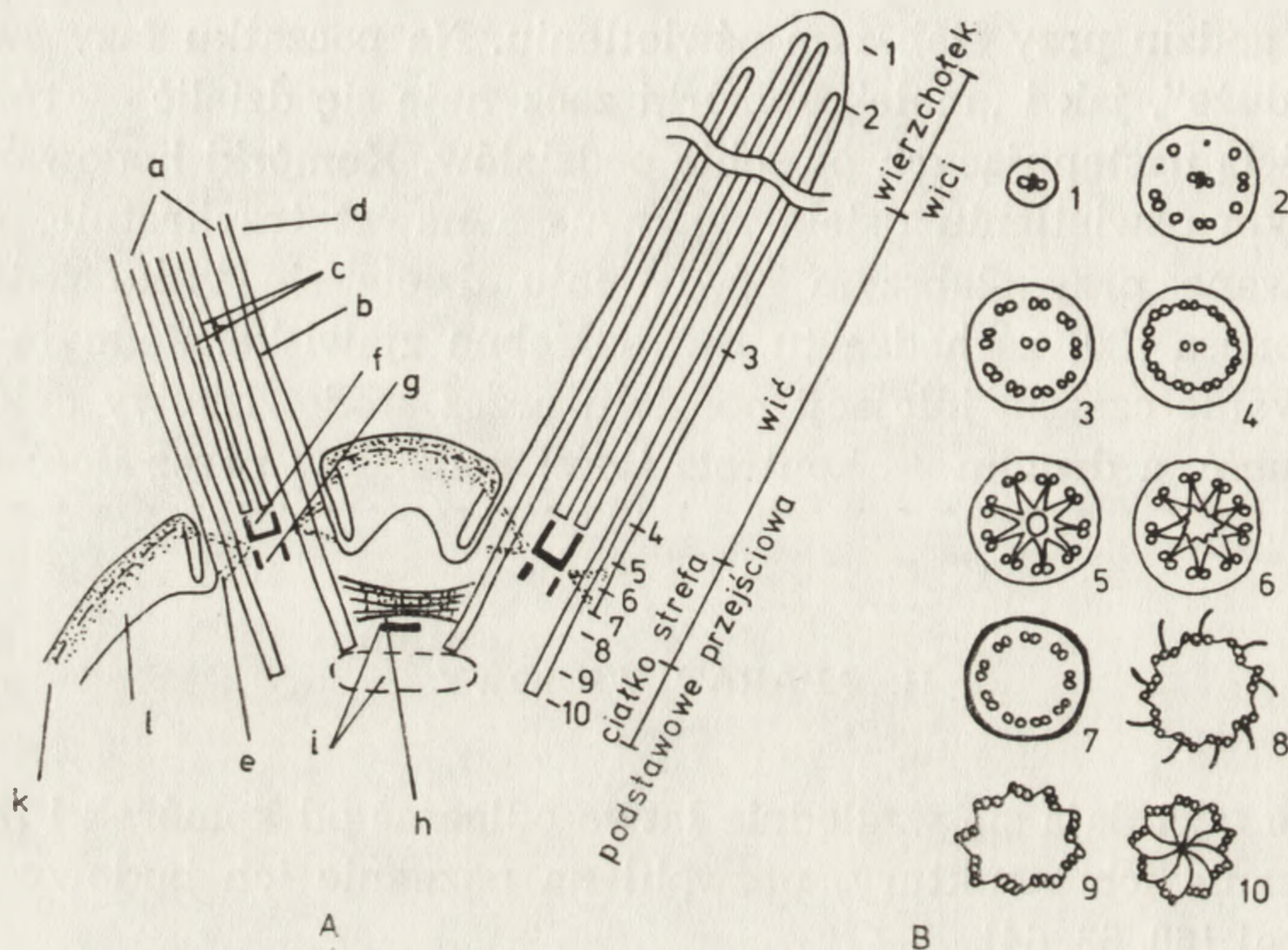
Aparat wiciowy *Chlamydomonas* zbudowany jest z dwóch identycznych struktur tubularnych położonych w wierzchołku komórki i ułożonych w kształcie litery V. W każdej z nich wyróżnia się ciało podstawowe, położone w powierzchniowej warstwie cytoplazmy, strefę przejściową zaczynającą się na poziomie komórki oraz wić i jej wierzchołek znajdujące się na zewnątrz błony komórki [63]. Wić okryta jest błoną. Schemat przekroju podłużnego aparatu wiciowego *Chlamydomonas* przedstawiono na ryc. 3A, a typowe przekroje poprzeczne w poszczególnych strefach na ryc. 3B, 1 - 10.

Ciała podstawowe łączą się przy wierzchołku dużym włóknem prążkowanym — dystalnym, a u podstawy — dwoma mniejszymi, proksymalnymi. Pod błoną cytoplazmatyczną znajdują się wiązki cytoplazmatycznych mikrotubuli wychodzących z obszaru pomiędzy ciałkami podstawowymi [63].

Ciała podstawowe składają się z dziewięciu mikrotubularnych tripletów (ryc. 3B, 8 - 10). W każdym z nich wyróżnia się trzy subtubule, położoną najbliżej osi — „a”, środkową — „b” i zewnętrzną — „c”. Przy dystalnym końcu ciała podstawowego (ryc. 3B, 8) triplety przechodzą w dublety strefy przejściowej (ryc. 3B, 7).

Strefa przejściowa zaczyna się na wysokości błony komórki, a koń-

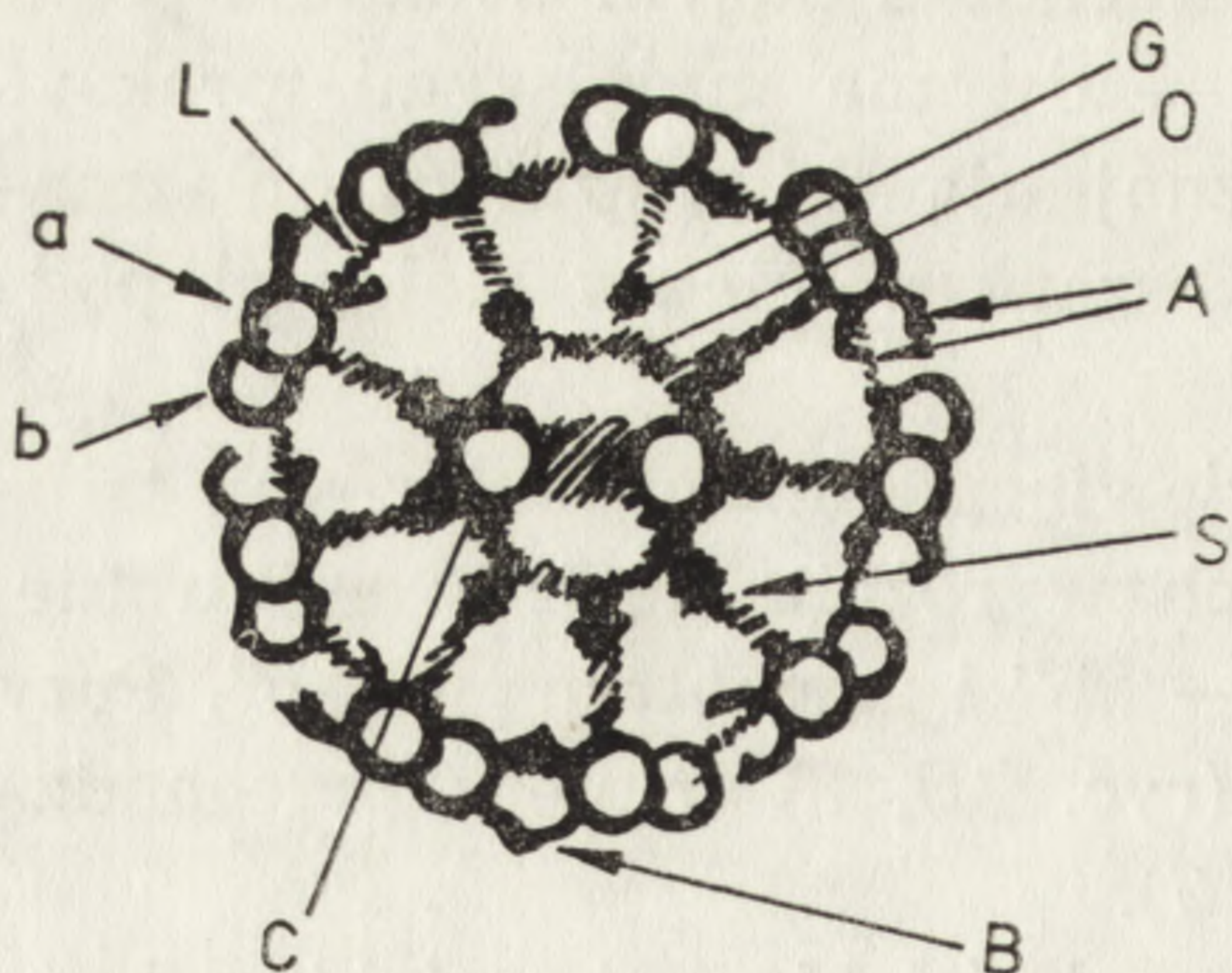
czy się przy powierzchni ściany komórki (ryc. 3B, 5-7). Na przekroju podłużnym (ryc. 3A) widać, że oś organellum ma w tej strefie strukturę dwóch cylindrów. Cylinder proksymalny jest z obu stron otwarty, dystalny zaś z jednej zamknięty i przechodzi w dwie centralne mikrotubule wici (ryc. 3B, 4 i 3B, 5).



Ryc. 3. Schemat aparatu wiciowego *Chlamydomonas* [63].

A — przekrój podłużny. Na rysunku zaznaczono cztery strefy aparatu wiciowego
 a — aksonema, b — dublet zewnętrzny, c — mikrotubule centralne, d — błona wici, e — diafragma poprzeczna, f — cylinder dystalny, g — cylinder proksymalny, h — włókno dystalne, i — dwa włókna proksymalne, k — ściana komórki, l — błona komórki
 B — przekroje poprzeczne w poszczególnych strefach aparatu wiciowego oznaczone numerami od 1 do 10

Pomiędzy błoną wici a dubletami zewnętrznymi, wchodząc pomiędzy nie klinowato, znajduje się materiał bezpostaciowy o większej gęstości elektronowej, nazywany diafragmą poprzeczną (ryc. 3A).



4. Struktura wici. Schemat zaczerpnięty od Summersa [78]

a i b — subtubule dubletów zewnętrznych.
 A — ramiona (arms), C — mikrotubule centralne, B — mostki trwałe pomiędzy sąsiednimi dubletami (permanent bridge), L — wiązania (links), S — promienie (spokes), O — otoczka (sheath), G — główki szprych (spoke heads)

Wici i rzęski, które w większości przypadków stanowią homologiczne organella, posiadają taką samą organizację włókna osiowego, czyli aksonemy. Włókno osiowe (ryc. 4) składa się z dziewięciu dubletów zewnętrznych mikrotubuli oraz dwóch pojedynczych mikrotubul stanowiących jej oś centralną. Dublety zewnętrzne składają się z subtubuli „a” położonej bliżej osi i subtubuli „b” znajdującej się bardziej na zewnątrz.

Mikrotubule centralne otacza struktura zwana „otoczką”, lub „osłonką centralną”, która przez „szprychy” łączy się z subtubulą „a” dubletów zewnętrznych. W miejscu przyczepu „szprych” do „otoczki” tworzą się zgrubienia „główki szprych”. Subtubule „a” sąsiednich dubletów łączą się ze sobą „wiązaniami”. Od subtubuli „a” biegną dwa „ramiona” w kierunku subtubuli „b” sąsiedniego dubletu. Połączenie sąsiednich dubletów za pomocą „ramion” istnieje tylko przejściowo. Trwałe „mostki” zaobserwować można tylko w przypadku dubletów położonych po przeciwnych stronach linii biegnącej prostopadle do osi mikrotubul centralnych.

Dublety mikrotubularne są charakterystycznymi strukturami włókien osiowych wici i rzęsek. Subtubule „a” składają się z 13, a subtubule „b” z 11 protofilamentów o średnicy 45 Å [64]. Trzy protofilamenty tworzą wspólną ścianę dubletu. Według Chaseya [11], podjednostki upakowane są w obydwu subtubulach tworząc spiralę lewoskrętną. Mikrotubule zbudowane są z tubuliny, białka złożonego z dwóch podobnych łańcuchów polipeptydowych α i β o masach cząsteczkowych około 55 000 daltonów. Dimer ten posiada dwa miejsca wiążące nukleotyd guaninowy, w tym jedno wiąże go odwracalnie, a drugie nieodwracalnie.

Mikrotubule wici, szczególnie dublety zewnętrzne, są bardziej stabilne niż mikrotubule cytoplazmatyczne i nie ulegają depolimeryzacji pod wpływem oziębienia, wysokiego ciśnienia i kolchicyny. W warunkach depolimeryzacji ich tubulina staje się mało stabilna [86], co znacznie utrudnia rekonstrukcję mikrotubul wici.

Witman i wsp. [88] zastosowali podwyższoną temperaturę lub wzrastające stężenia detergentu jonowego do frakcjonowania mikrotubul aksonu wici *Chlamydomonas*.

Olmsted i Borrisy [58] oraz Snyder i McIntosh [76] przedstawili szczegółowy przegląd badań mikrotubul, a Summers [78] — aktualny stan badań dotyczący mechanizmu ruchów wici i rzęsek.

Gibbons [20] stwierdził, że „ramiona” oddzielają się od subtubuli „a” podczas dializy oczyszczonych aksonem do roztworu EDTA lub KCl. W pewnych warunkach zachodzi reasocjacja ramion z subtubulą „a”. Jak wykazali Gibbons [20] oraz Gibbons i Rowe [21], ramiona zawierają większość aktywności ATP - azowej aksonemy. ATP - aza wici, znana jako dyneina, występuje w dwóch postaciach — 14S i 30S o różnej aktywności właściwej i innym zapotrzebowaniu na kationy. Frakcja 30S rozpada się

na kilka mniejszych podjednostek, które występują również we frakcji 14S. Jak wykazali Brokaw i Benedict [10], częstotliwość ruchów wici jest wprost proporcjonalna do aktywności dyneiny.

Według Bluma [6] „główki szprych” wykazują aktywność ATP - azo- wą różną od dyneiny. Watanabe i Flawin [80] oraz Piccini i Albergoni [59] stwierdzili występowanie niedyneinowej, Ca^{+2} - zależnej ATP - azy w wiciach *Euglena* i *Chlamydomonas*.

Bezpośrednio przed podziałem komórek *Chlamydomonas* wici ulegają regresji, a proces ten trwa około 30 minut. Można je również „amputować” w homogenizatorze. Stosując łagodną homogenizację uzyskuje się komórki pozbawione tylko jednej wici.

Po „amputacji” obydwu wici niemal natychmiast rozpoczyna się ich regeneracja, która trwa zwykle 70 do 90 minut [60, 66, 67]. Cykloheksomid w stężeniu wystarczającym do zahamowania syntezy białka znacznie ogranicza regenerację wici, kolchicina natomiast hamuje ją całkowicie. Rosenbaum i wsp. [16, 67] wykazali, że cykloheksomid w komórkach poddanych uprzednio działaniu kolchicyny słabiej hamuje regenerację wici.

Po „amputacji” jednej wici, nienaruszona wić stopniowo skraca się, podczas gdy amputowana regeneruje się. Po zrównaniu się długości obie wici rosną dalej z tą samą prędkością, aż do uzyskania długości początkowej. Pod wpływem kolchicyny skraca się wić nienaruszona, a amputowana nie regeneruje się. Cykloheksomid hamuje regenerację w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku braku obydwu wici. Doświadczenia te [16, 66, 67], jak również doświadczenia Gorovskiego i wsp. [23] wskazują na częściowe powstawanie aksonemy wici z istniejących już w cytoplazmie prekursorów białkowych. Weeks i Collis [81] badając syntezę tubuliny w gametach *Chlamydomonas* stwierdzili, że indukcja translacji tubuliny następuje po amputacji wici. Nie stwierdzili oni syntezy tubuliny w komórkach kontrolnych.

III. BŁONA WICI

Ringo [63] analizując ultrastrukturę wici *Chlamydomonas* stwierdził, że ich błonę pokrywa warstwa materiału bezpostaciowego tworzącego otoczkę. Na powierzchni wici obserwuje się także włókniste struktury, zwane mastigonemami [63, 87]. Witman i wsp. [87] wykazali, że mastigonemy są zbudowane z liniowo ułożonych podjednostek o okresie identyczności 200 Å. Autorzy ci stwierdzili w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym, że mastigonemy zbudowane są z glikoproteidu o masie cząsteczkowej 170 000 daltonów.

Dotychczas nie ustalono pochodzenia błony wici. Bouck [9] zaobserwował w komórkach *Ochromonas* mastigonemy w kanalikach aparatu Golgiego. McLean i Bosmann [55] zakładają, że na powierzchni błony wici *Chlamydomonas* występują glikozylotransferazy. Enzymy te są według Keenana [41] charakterystyczne dla błon aparatu Golgiego. Obecność glikozylotransferaz również przemawia za pochodzeniem błon wici z błon aparatu Golgiego.

Witman i wsp. [87] do izolacji błony wici używali roztworów detergentów lub mieszanki STEEP*, a także stosowali dializę w zbuforowanym roztworze o niskiej sile jonowej zawierającym EDTA i merkaptoetanol. Detergenty niejonowe — Triton X-100 i Nonidet P-40 — ekstrahują błony z zachowaniem struktury mastigonem i aksonem. Detergent jonowy — Sarkozyl w niskim stężeniu, STEEP oraz dializa pozwalają uzyskiwać błony bez ich rozpuszczenia. Gibbons [20] ekstrahował błony wici *Tetrahymena* roztworem digitoniny, a Snell [73] usuwał je mechanicznie stosując wytrząsanie zawiesiny wici *Chlamydomonas*.

Dane dotyczące bliższej charakterystyki błon wici *Chlamydomonas* są raczej skąpe. Z pracy Witmana i wsp. [87] wynika, że błony te zawierają jedną, główną, wysokocząsteczkową frakcję białkową oraz jedną lub dwie mniejsze frakcje. Jedna z mniejszych frakcji jest głównym składnikiem mastigonemy. Podobne wyniki uzyskali Snell [73] oraz Bergman i wsp. [3, 4]. Zarówno „główna” frakcja błony, jak i mastigonemy dają pozytywną reakcję z odczynnikiem Shiffa.

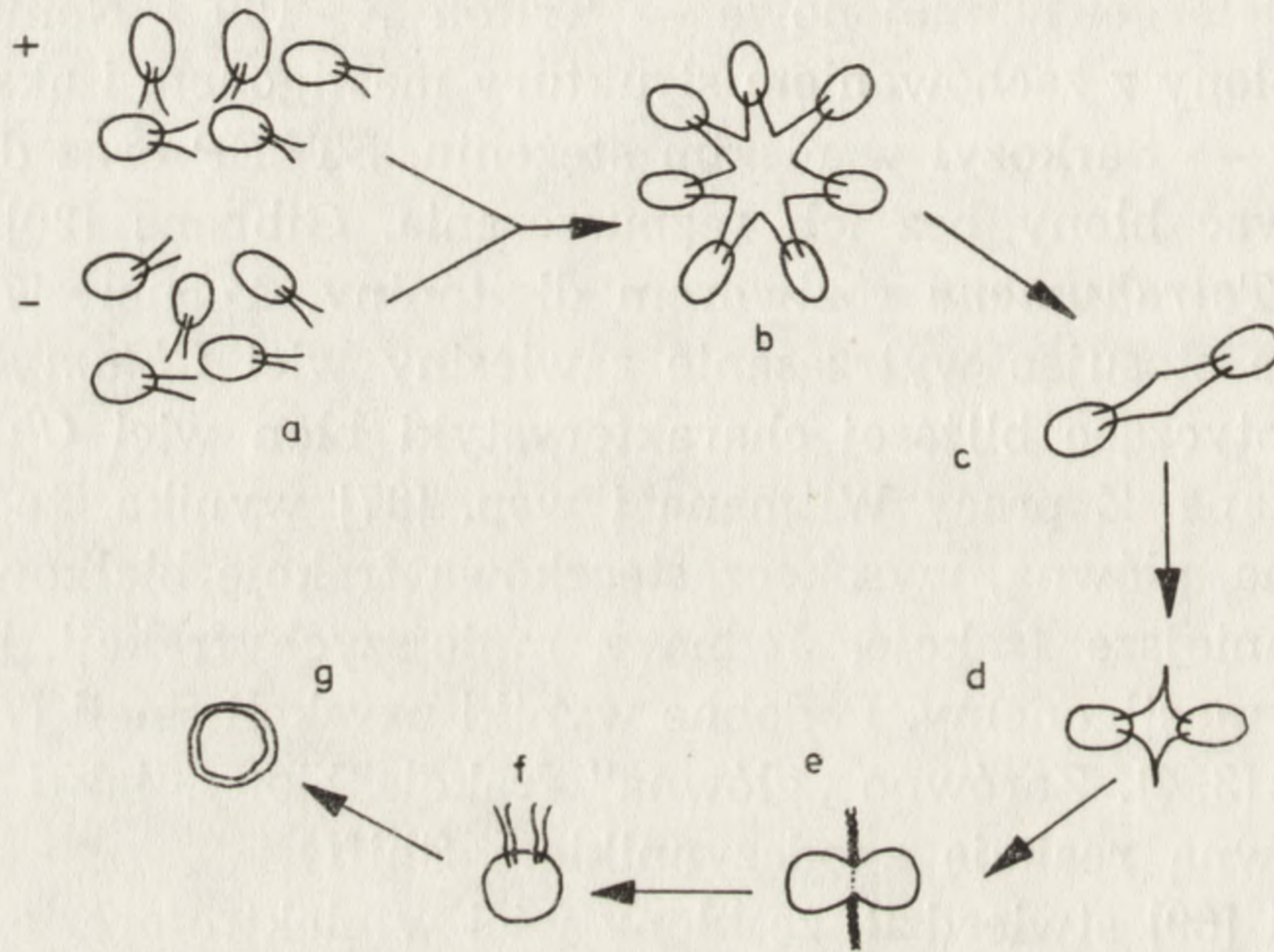
Sikorski [69] stwierdził, że błony wici w elektroforezie w 5,6% żelu poliakryloamidowym w obecności SDS dają 5 do 6 frakcji barwiących się błękitem Coomassie. Trzy frakcje dają pozytywną reakcję z odczynnikiem Shiffa. Jedna z nich nie barwi się na białko lub barwi się bardzo słabo. Najszybciej wędrującą frakcją reagującą z odczynnikiem Shiffa jest frakcja glikolipidowa. Analiza cukrów obojętnych [69] wykazała obecność glukozy, galaktozy, mannozy i ramnozy.

Ze względu na istotną rolę jaką w procesie płciowym *Chlamydomonas* odgrywa błona wici wykorzystuje się ją głównie w badaniach modelowych procesów rozpoznania i swoistej adhezji [19, 54, 72–75]. Schemat procesu płciowego *Chlamydomonas* przedstawiono na ryc. 5.

Po zmieszaniu gamet „plus” i „minus” zachodzi adhezja wierzchołków wici wielu komórek, po czym dwie komórki przeciwnych typów płciowych oddzielają się od całej grupy. Kontakt ich wici powiększa się tak, że wici układają się równolegle, a czasami zaobserwować można ich spiralizację. Przywiciowe części komórek stykają się ze sobą, nastę-

* STEEP — 0,15 M sacharoza; 15 mM Tris; 2,5 mM EDTA; 11% etanol; 30 mM KCl.

puje miejscowe rozpuszczenie ściany komórkowej i utworzenie mostka cytoplazmatycznego. Uwolnione wici nie wykazują już właściwości adhezyjnych [36]. Według Goodenough i Weiss [22] powstawanie mostka cytoplazmatycznego zapoczątkowuje pojawienie się struktury „koniugacyjnej”. Proces ten zależy od swoistej adhezji powierzchni wici. Potraktowanie wici konkanawaliną A nie wpływa na pojawianie się tej struktury. W wyniku cytogamii tworzy się czterowiciowa, ruchliwa zygota, po czym wici ulegają regresji i powstaje otoczona grubą ścianą zygospora.



Ryc. 5. Schemat procesu płciowego *Chlamydomonas reinhardtii*.

a — gamety „plus” i „minus”, b — po zmieszaniu gamet przeciwnych znaków następuje adhezja wierzchołków wici wielu komórek, c — dwie komórki przeciwnych znaków oddzielają się od całej grupy, d — kontakt wici powiększa się, e — plazmogamia, f — czterowiciowa, ruchliwa zygota (wici nie wykazują właściwości adhezyjnych), g — zygospora

Wiese i Jones [85] wykazali, że kationy dwuwartościowe Ca^{+2} i Mg^{+2} aktywują, a nadjodan hamuje pierwszy etap procesu koniugacji, jakim jest kontakt wici. Jak wykazał Wiese [84], trypsyna, subtilizyna i pronaza hamują adhezję, podczas gdy mannozydaza, galaktozydaza i neuraminidaza pozostają bez wpływu.

Forster i wsp. [18] oraz Wiese [82, 83] zaobserwowali, że gamety *Chlamydomonas* uwalniają do podłoża substancję aglutynującą gamety przeciwnego znaku. Nazwano ją „gamonem”, który Forster [18] uważał za glikoproteid o masie cząsteczkowej rzędu 1×10^8 daltonów. W dalszych badaniach McLean i wsp. [57] wykazali, że „gamon” zbudowany jest z pęcherzyków błoniastych pochodzących z błony wici. Uwolnione do podłoża fragmenty błony zachowują również mastigonemy. Jak wykazał Snell [73], również wici komórek wegetatywnych, nieaktywne w procesie „zapłod-

nienia", uwalniają pęcherzyki błoniaste do podłoża. Thompson i Baugh [79] stwierdzili w przypadku wici *Tetrahymena*, że wcielanie znakowanych kwasów tłuszczowych rozpoczyna się od postawy i postępuje w kierunku wierzchołka. Aaronson i wsp. [1] zaobserwowali uwalnianie błon wici do pożywki również w przypadku *Ochromonas*. Według McLeana i Browna [56] gamety *Chlamydomonas* stale odnawiają miejsca receptorowe w błonie wici. Snell [74] wykazał, że na regenerację tych miejsc w błonach wici poddanych działaniu trypsyny potrzeba przynajmniej dziewięciu godzin.

Badania nad ultrastrukturą błon wici *Chlamydomonas* prowadzone techniką „freeze cleaving” [4, 73, 75] wykazały, że błony gamet i komórek wegetatywnych różnią się ilością i rozmieszczeniem „cząstek wewnątrz-błoniastych”. W błonie wici gamet znajduje się ich znacznie więcej na powierzchni B niż na odpowiadającej powierzchni wici komórek wegetatywnych. Według Bergmana i wsp. [4] białka błon wici komórek wegetatywnych i gamet poddane elektroforezie w żelu poliakryloamidowym nie różnią się od siebie. Z drugiej strony, Snell [73] badając właściwości „gamonu” stwierdził, że daje on w elektroforezie siedem frakcji białkowych, wśród których znajdują się wszystkie białka błon wici. Gamon „plus” różni się od gamonu „minus” obecnością jednej, dodatkowej frakcji o masie cząsteczkowej około 70 000 daltonów. W badaniach własnych [69, 71] nad błonami wici komórek wegetatywnych i gamet szczepów 89 („plus”) i 90 („minus”) stwierdzono, że błony te różnią się zawartością białek, cukrów i fosfolipidów. Podczas gametogenezy zachodzą wyraźne zmiany w obrazie elektroforetycznym białek błon obydwu szczepów. W błonach wici gamet szczepu „90” zanika frakcja trzecia i pojawia się frakcja „3a” o zmienionej ruchliwości. W błonach wici gamet szczepu 89 spada ilość białka we frakcji czwartej, a wzrasta, we frakcji piątej. Dane te w połączeniu z badaniami dotyczącymi lokalizacji poszczególnych frakcji w błonie wici komórek wegetatywnych szczepu 89 [70] i wskazującymi na powierzchniową lokalizację frakcji piątej sugerują funkcję receptorową i udział tej frakcji w adhezji.

Ponadto okazało się, że błony wici gamet obydwu szczepów wykazują różnice w zawartości poszczególnych cukrów [69, 71]. Charakteryzują się one większą zawartością glukozy a mniejszą mannozy niż błony wici komórek wegetatywnych. Być może różnice te wiążą się z powstawaniem lub modyfikacją istniejących receptorów powierzchniowych podczas gametogenezy.

Mechanizmu swoistej adhezji jak dotąd nie wyjaśniono. Według McLeana i Browna [56] błona wici gamet posiada przynajmniej dwa miejsca receptorowe — jedno odpowiedzialne za swoistą adhezję, a drugie — za wiązanie konkanawaliny A. Wiese [84] uważa, że mechanizm

swoistej adhezji przypomina reakcję antygen-przeciwciała. Crandall i wsp. [17] wydzielili z drożdży glikoproteidy odpowiedzialne za swoistą adhezję gamet przeciwnych znaków i tworzące kompleks „in vitro”. Lloyd i Cook [46, 47] zaobserwowali, że izolowane i desializowane glikoproteidy błon fibroblastów aktywują agregację tych komórek.

Roseman [65] zakłada, że swoista adhezja opiera się na reakcji powierzchniowo usytuowanej glikozylotransferazy z glikolipidowym lub glikoproteidowym receptorem błony innej komórki.

Bosmann [7], badając reakcję kolagenu z płytkami krwi, znalazł na ich powierzchni glikozylotransferazy przenoszące glukozę, galaktozę i galaktozaminę. Receptorami dla tych enzymów jest kolagen, polipeptyd lub glikoproteid. Według Bosmanna [8] czas adhezji (reakcji enzym-receptor) zależy od obecności jonów metali dwuwartościowych i dwufosfonukleotydowych pochodnych monosacharydów. Po dysocjacji kompleksu jedna z komórek zawiera nieaktywny receptor z dołączoną resztą monosacharydową. Receptor może ulegać restytucji pod wpływem swoistej glikozydazy, np. neuraminidazy, jak to ma miejsce w przypadku płytek krwi.

McLean i Bosmann [55] analizowali aktywność glikozylotransferaz w komórkach *Chlamydomonas*. Stwierdzili oni, że na powierzchni komórek wegetatywnych i gamet występują glikozylotransferazy przenoszące galaktozę, glukozę, mannozę, fukozę, N-acetyloglukozaminę i kwas N-acetyloneuraminowy. Gamety posiadają dwu- do trzykrotnie wyższą aktywność transferazową. Po zmieszaniu gamet przeciwnych znaków następuje znaczny wzrost aktywności tych enzymów. Autorzy ci nie obserwowali tego zjawiska po zmieszaniu komórek wegetatywnych przeciwnych typów płciowych.

Ashwell i Morell [2] sugerują natomiast, że mechanizm zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkomórkowego rozpoznania wiąże się z istnieniem „lektyn zwierzęcych”, tzn. białek błon komórkowych o charakterze receptorów wiążących ligandy zawierające swoiste cukry. Hudgin i wsp. [27] wydzielili z hepatocytów receptor o naturze lektyny, który okazał się białkiem o masie cząsteczkowej 250 000 daltonów zawierającym podjednostki o masach 40 000 i 48 000 daltonów [40]. Białko to ma zdolność swoistego wiązania zakończonych resztami galaktozy asialoglikoproteidów. Posiada zdolność aglutynacji erytrocytów, szczególnie desializowanych [77], oraz stymulacji mitozy limfocytów [2]. Jakkolwiek Hudgin i Ashwell [26] nie stwierdzili aktywności glikozylotransferazowej w receptorze hepatocytów, to nie wykluczają oni udziału tych enzymów w regulacji oddziaływań powierzchniowych komórek.

W artykule nie poruszono zagadnień genetyki *Chlamydomonas*, gdyż obszerne dane na ten temat zawiera monografia pod redakcją Lewina [44].

Ponieważ *Chlamydomonas* pod względem zróżnicowania komórkowe-

go zajmuje miejsce pomiędzy bakteriami a wyższymi organizmami roślinnymi i zwierzęcymi, stanowi dogodny model do badania regulacji wzrostu i morfogenezy. Łatwość hodowli, synchronizacji podziałów, a także sterowania procesem różnicowania się gamet przyczyni się zapewne do szerszego zastosowania tego organizmu w praktyce badawczej.

LITERATURA

- [1] AARONSON S., BEHRENS U., ORNER R. i HAINES T. H., Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes and myelin figures produced by *Ochromonas danica*, J. Ultrastr. Res., **35**: 418-430, 1971.
- [2] ASHWELL G., MORELL A. G., Membrane glycoproteins and recognition phenomena, TIBS, **2**: 76-78, 1977.
- [3] BERGMAN K., GOODENOUGH U. W., A membrane bound agglutinating substance from the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii* gametes, J. Cell Biol., **63**: 23a (abstr.), 1974.
- [4] BERGMAN K., GOODENOUGH U. W., GOODENOUGH D. A., JAWITZ J., MARTIN H., Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Flagellar membranes and the agglutination, J. Cell Biol., **67**: 606-622, 1975.
- [5] BERNSTEIN E., Synchronous division in *Chlamydomonas moewusii*, Science, **13**: 1528, 1960.
- [6] BLUM J. J., ATP-ase activity of *Tetrahymena cilia* before and after extraction of dynein, Arch. Biochem. Biophys., **156**: 310-320, 1973.
- [7] BOSMANN H. B., Platelet adhesiveness and aggregation: The collagen: glycosyl polypeptide: galactosyl, polypeptide: N-galactosaminyl and glycoprotein: galactosyl transferases of human platelets, Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**: 1118-1124, 1971.
- [8] BOSMANN H. B., Platelet adhesiveness and aggregation. II. Surface sialic acid transferase and neuraminidase of human blood platelet, Biochem. Biophys. Acta, **279**: 456-474, 1972.
- [9] BOUCK G. B., The structure, origin, isolation and composition of the tubular mastigonemes of the *Ochromonas flagellum*, J. Cell Biol., **50**: 362-384, 1971.
- [10] BROKAW G. J., BENEDICT B., Mechanochemical coupling in flagella. I. Movement dependent dephosphorylation of ATP by glicerinated spermatozoa, Arch. Biochem. Biophys., **125**: 770-778, 1974.
- [11] CHASEY D., Left handed subunit helix in flagellar microtubules, Nature, **248**: 611-612, 1974.
- [12] CHEN J. H., JONES R. F., Multiple forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*, Plant Physiol. **43**: (suppl), 40 (abstr.), 1968.
- [13] — Molecular properties of multiple form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*, Biochim. Biophys. Acta, **220**: 208-215, 1971.
- [14] CHIANG K. S., KATES J. R., JONES R. F., SUEOKA N., On the formation of a homogenous zygotic population in *Chlamydomonas reinhardtii*, Dev. Biol., **22**: 655-669, 1970.
- [15] CLAES H., Autolyse der Zellwand bei den Gameten von *Chlamydomonas reinhardtii*, Arch. Microbiol., **78**: 180-188, 1971.

- [16] COYNE B., ROSENBAUM J. L., Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. II. Re-utilization of flagellar proteins, *J. Cell Biol.*, **47**: 777-781, 1970.
- [17] CRANDALL M., LAWRENCE L. M., SANDERS R. M., Molecular complementarity of yeast glycoprotein mating factors, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **71**: 26-29, 1974.
- [18] FORSTER H., WIESE L., BRAUMITZER G., Über das agglutinierend wirkende Gynogamon von *Chlamydomonas eugametes*, *Z. Naturforsch. Teil B. Anorg. Chem. Biochem. Biophys. Biol.*, **11**: 315-317, 1956.
- [19] FRIEDMAN I., COLWIN A. L., COLWIN L. H., Fine structural aspects of fertilization in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Sci.*, **3**: 115-128, 1968.
- [20] GIBBONS I. R., Chemical dissection of cilia, *Arch. Biol.*, **76**: 317-352, 1965.
- [21] GIBBONS I. R., ROWE A. I., Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia, *Science*, **149**: 424-426, 1965.
- [22] GOODENOUGH U. W., WEISS R., Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Cell wall lysis and microfilament-associated mating structure activation in wild-type and mutant strains, **67**: 623-637, 1975.
- [23] GOROVSKY M. A., CARLSON K. J., ROSENBAUM J. L., Simple method for quantitative densitometry of polyacrylamide gels using fast green, *Anal. Biochem.*, **35**: 359-370, 1970.
- [24] GORMAN J. P., TARNO M., LEBERGE M., HALVERSON H., Timing of enzyme synthesis during synchronous division in yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**: 43-49, 1964.
- [25] GOULD R. S., JONES R. F., Electron microscopic observation of microtubules during the synchronized vegetative cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Anat. Rec.*, **160**: 355-360, 1968.
- [26] HUDGIN R. L., ASHWELL G., Studies on the role of glycosyltransferases in the hepatic binding of asialoglycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **249**: 7364-7373, 1974.
- [27] HUDGIN R. L., PRICER W. S., ASHWELL G., STECKERT R. J., MORELL A. G., The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5536-5543, 1974.
- [28] JOHNSON V. G., PORTER K. R., Structure of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. Basal bodies and microtubules, *J. Cell Biol.*, **38**: 403-425, 1968.
- [29] JONES R. F. Variation in aminoacids peptides and soluble proteins during the synchronous development of *Chlamydomonas reinhardtii*, 10th Intern. Botan. Congress, Edinburgh, Scotland 1964, 394.
- [30-31]— Physiological and biochemical aspects of growth and gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ann. N. Y. Sci.* **175**: 648-659, 1970.
- [32] JONES R. F., CHEN J. H., Aminoacid stimulation of carbon dioxide fixation in cell-free extracts of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **46**: 761-762, 1970.
- [33] JONES R. F., KATES J. R., KELLER S. J., Protein turnover and macromolecular synthesis during growth and gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **157**: 589-598, 1968.
- [34] KATES J. R., Biochemical aspects of synchronized growth and differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, Ph. D. Thesis, Princeton University. Princeton N. J. US, 1965.
- [35] KATES J. R., CHIANG K. S., JONES R. F., Studies on DNA replication during

- synchronized vegetative development and gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, Exptl. Cell Res., **49**: 121-132, 1968.
- [36] KATES J. R., JONES R. F., The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas*, J. Cell Comp. Physiol., 157-164, 1964.
- [37] — Variation in alanine dehydrogenase and glutamate dehydrogenase during the synchronous development of *Chlamydomonas*, Biochim. Biophys. Acta, **86**: 438-447, 1964.
- [38] — Patterns of CO₂ fixation during vegetative development and gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, J. Cell Physiol., **67**: 101-118, 1966.
- [39] — Periodic increases in enzyme activity in synchronized cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*, Biochim. Biophys. Acta, **145**: 153-158, 1967.
- [40] KAWASAKI T., ASHWELL G., Carbohydrate structure of glycopeptides isolated from hepatic-binding protein specific for asialoglycoprotein, J. Biol. Chem., **251**: 5292-5300, 1976.
- [41] KEENAN T. W., MORRÉ D. J., BASU S., Ganglioside biosynthesis. Concentration of glycosphingolipid glycosyltransferases in Golgi apparatus from rat liver, J. Biol. Chem., **249**: 310-315, 1974.
- [42] KUEMPEL P. L., MASTERS M., PARDEE A. B., Burst of enzyme synthesis in the bacterial duplication cycle, Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**: 858-867, 1965.
- [43] LEVINE R. F., EBERSOLD W. T., The genetics and cytology of *Chlamydomonas*, Ann. Rev. Microbiol., **14**: 197-216, 1960.
- [44] LEWIN R. A. red., The genetics of algae, Bot. Monographs. Univ. Cal. Press., Berkeley, Los Angeles 1976.
- [45] LIEN T., KNUTSEN G., Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: properties and regulation of repressible phosphatases, Physiol. Plant., **28**: 291-298, 1973.
- [46] LLOYD C. W., COOK G. M. W., On the mechanism of the increased aggregation by neuraminidase of 16C malignant rat dermal fibroblasts in vitro, J. Cell Sci., **15**: 575-590, 1974.
- [47] — A membrane glycoprotein-containing fraction which promotes cell aggregation, Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**: 696-701, 1975.
- [48] LOPPEZ R., DELTOUR R., Changes in phosphatase activity associated with cell wall defects in *Chlamydomonas reinhardtii*, Arch. Microbiol., **103**: 247-250, 1975.
- [49] LOPPEZ R., MATAGNE R. F., Acid phosphatase in *Chlamydomonas*: isolation and characterization by biochemical, electrophoretic and genetic analysis, Genetics, **75**: 593-604, 1973.
- [50] MARTIN N. C., GOODENOUGH U. W., Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Production of gametes and their fine structure, J. Cell Biol., **67**: 587-605, 1975.
- [51] MASTERS M., KUEMPEL P. L., PARDEE A. B., Enzyme synthesis in synchronous cultures of bacteria, Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**: 38-42, 1964.
- [52] MATAGNE R. F., LOPPEZ R., DELTOUR R., Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical and cytochemical approach with specific mutants, J. Bacteriol., **126**: 937-950, 1976.
- [53] MATAGNE R. F., LOPPEZ R., Isolation and study of mutants lacking a de-

- repressible phosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, **80**: 239-250, 1975.
- [54] McLEAN R. J., Studies of gametic contact mechanism in *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **58**: 172a (abstr.), 1972.
- [55] McLEAN R. J., BOSMANN H. B., Cell-cell interactions: enhancement of glycosyltransferase ectoenzyme systems during *Chlamydomonas* gametic contact, *Proc. Natl Acad. Sci. US*, **72**: 310-313, 1975.
- [56] McLEAN R. J., BROWN R. M., Cell surface differentiation of *Chlamydomonas* during gametogenesis. I. Mating and concanavalin A agglutinability, *Dev. Biol.*, **36**: 279-285, 1974.
- [57] McLEAN R. J., LAURENDI C. J., BROWN R. M., The relationship of gamone to the mating reaction in *Chlamydomonas moewusii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **71**: 2610-2613, 1974.
- [58] OLMSTED J. R., BORRISY G. C., Microtubules, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**: 507-540, 1973.
- [59] PICCINNI R., ALBERGONI V., ATP-ase activity in isolated flagella from *Euglena gracilis*, *J. Protozool.*, **20**: 456-458, 1973.
- [60] RANDALL J., Flagellar apparatus as a model organelle for the study of growth and morphopoiesis, *Proc. Roy. Soc. B*, **173**: 31-62, 1969.
- [61] RENKE R., Studies on intracellular proteases during differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, Ph. D. Thesis, N. Y. State University, Stony Brook US, 1970.
- [62] RENKE R., JONES R. F., Proteolytic enzyme activity in *Chlamydomonas*, *Plant Physiol. (Suppl.)*, **43**: 31, 1968.
- [63] RINGO D. L., Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **33**: 548-571, 1967.
- [64] — The arrangement of subunits in flagellar fibers, *J. Ultrastr. Res.*, **17**: 266-277, 1967.
- [65] ROSEMAN S., Synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intracellular adhesion, *Chem. Phys. Lipids*, **5**: 270-287, 1970.
- [66] ROSENBAUM J. L., CHILD F. M., Flagellar regeneration in protozoan flagellates, *J. Cell Biol.*, **34**: 345-363, 1967.
- [67] ROSENBAUM J. L., MOULDER J. E., RINGO D. L., Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicine to study synthesis and assembly of flagellar proteins, *J. Cell Biol.*, **41**: 600-619, 1969.
- [68] SAGER R., GRANICK S., Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**: 831-838, 1953.
- [69] SIKORSKI A. F., dane nie publikowane.
- [70] — Surface iodination of *Chlamydomonas reinhardtii* flagella membranes, Abstr. A4 — 17, 662/3, 11th FEBS Meeting, Copenhagen 1977.
- [71] — Różnice własności błon wici komórek wegetatywnych i gamet *Chlamydomonas reinhardtii*, XV Zjazd P. T. Bioch. Gdańsk, Streszczenia str. 103, 1977.
- [72] SMEISSER E. T., Baumgartel D. H., HOWELL S. H., Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Cell cycle dependency and rates in attainment of mating competency, *Dev. Biol.*, **31**: 31-37, 1973.
- [73] SNELL W. J., Mating in *Chlamydomonas*: A system for the study of specific cell adhesion. I. Ultrastructural and electrophoretic analysis of flagellar surface components involved in adhesion, *J. Cell Biol.*, **68**: 48-69, 1976.

- [74] — Mating in *Chlamydomonas*: A system for the study of specific cell adhesion. II. A radioactive flagella-binding assay for quantitation of adhesion, *J. Cell. Biol.*, **68**: 70-79, 1976.
- [75] SNELL W. J., KROOP S. A., ROSENBAUM J. L., Characterization of adhesive substances on the surface of *Chlamydomonas* gamete flagella, *J. Cell Biol.*, **59**: 327a (abstr.), 1973.
- [76] SNYDER J. A., McINTOSH R., Biochemistry and physiology of microtubules, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**: 699-721, 1976.
- [77] STECKERT R. J., MORELL A. G., SCHEINBERG J. W., Mammalian hepatic lectin, *Science*, **186**: 365-369, 1974.
- [78] SUMMERS K., The role of flagellar structures in motility, *Biochim. Biophys. Acta*, **416**: 153-169, 1974.
- [79] THOPSON G. A., BAUGH L. C., Periodic variations in specific membrane synthesis during the division of *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **59**: 346a (abstr.), 1973.
- [80] WATANABE T., FLAWIN M., Two types of adenosine triphosphatase from flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 195-201, 1973.
- [81] WEEKS D. P., COLLIS P. S., Induction of microtubule synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* during flagellar regeneration, *Cell*, **9**: 15-27, 1976.
- [82] WIESE L., On sexual agglutination of mating type substances (gamones) in isogamous, heterotallic *Chlamydomonas*. I. Evidence of the identity of the gamone with the surface components responsible for sexual flagellar contact, *J. Phycol.*, **1**: 46-54, 1965.
- [83] — Algae, [w] Fertilization. Red. Metz C. B., Monroy A., Acad. Press. N. Y., **2**: 135-138, 1969.
- [84] — Nature of sex specific agglutination in *Chlamydomonas*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **234**: 383-394, 1974.
- [85] WIESE L., JONES R. F., Studies on gamete copulation in heterotallic *Chlamydomonas*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **61**: 265-274, 1963.
- [86] WILSON L., MEZA J., The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding properties of sea urchin sperm tail outer doublet tubulin, *J. Cell Biol.*, **58**: 709-719, 1973.
- [87] WITMAN G. B., CARLSON K., BERLINER J., ROSENBAUM J. L., *Chlamydomonas* flagella. I. Isolation and electrophoretic analysis of microtubules, matrix, membranes, and mastigonemes, *J. Cell Biol.*, **54**: 507-539, 1972.
- [88] WITMAN G. B., CARLSON K., ROSENBAUM J. L., *Chlamydomonas* flagella. II. The distribution of tubulin 1 and 2 in outer doublet microtubules, *J. Cell Biol.*, **54**: 540-555, 1972.

Otrzymano: 19 stycznia 1978.

Przyjęto: 10 marca 1978.

Adres autora: Zakład Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Instytut Biochemii,
ul. Tamka 2, 50 - 137 Wrocław.

KOMUNIKAT

Redakcja Kwartalnika „Folia Histochemica et Cytochemica” oraz Komitet Cytobiologii przy II Wydziale PAN uprzejmie zawiadamiają o rozszerzeniu profilu czasopisma na prace doświadczalne z zakresu cytobiologii i biologii molekularnej komórki. Zapraszamy do nadsyłania oryginalnych prac z tego zakresu pod adresem Redakcji, Kraków 1, skr. poczt. 843.

Treść poszczególnych zeszytów „Folia” jest indeksowana w Current Contents, Life Sciences.

MECHANIZMY I EFEKTY DZIAŁANIA ZWIĄZKÓW TIOLOWYCH NA KOMÓRKI

THE MECHANISMS AND EFFECTS OF THIOL COMPOUNDS ACTION ON CELLS

Krzysztof KRZYSTYNIAK

Zakład Patofizjologii, Instytut Reumatologiczny, Warszawa

Streszczenie. W artykule omówiono fizjologiczną rolę niebiałkowych związków tiolowych oraz rolę układu oksydoredukcyjnego tiole/dwusiarczki w metabolizmie komórkowym. Omówiono efekty działania związków tiolowych na odpowiedź immunologiczną ustroju typu komórkowego oraz typu humoralnego, modulację reaktywności limfocytów w różnych ich stanach czynnościowych, w badaniach in vitro oraz in vivo.

Zaburzenia układu oksydoredukcyjnego $-SH/SS$ w komórkach, zwłaszcza w przypadku podawania нефизjologicznie wysokich dawek związków tiolowych, prowadzą do szeregu zmian metabolicznych i strukturalnych określanych niekiedy jako „szok biochemiczny”. Badania supresji bądź aktywacji odpowiedzi immunologicznej limfocytów pod wpływem związków tiolowych przyczyniają się do poznania mechanizmów regulacji aktywności komórek immunologicznie kompetentnych, jak i poznania biologicznej roli związków tiolowych.

Summary. Physiology of nonprotein thiol compounds and the role of thiols/di-sulphides redox potential in cell metabolism are described. The effects of thiols on immunological cellular and humoral response, as well, as the modulation of lymphocyte reactivity of different functional states of cells in the in vivo and in vitro systems are discussed.

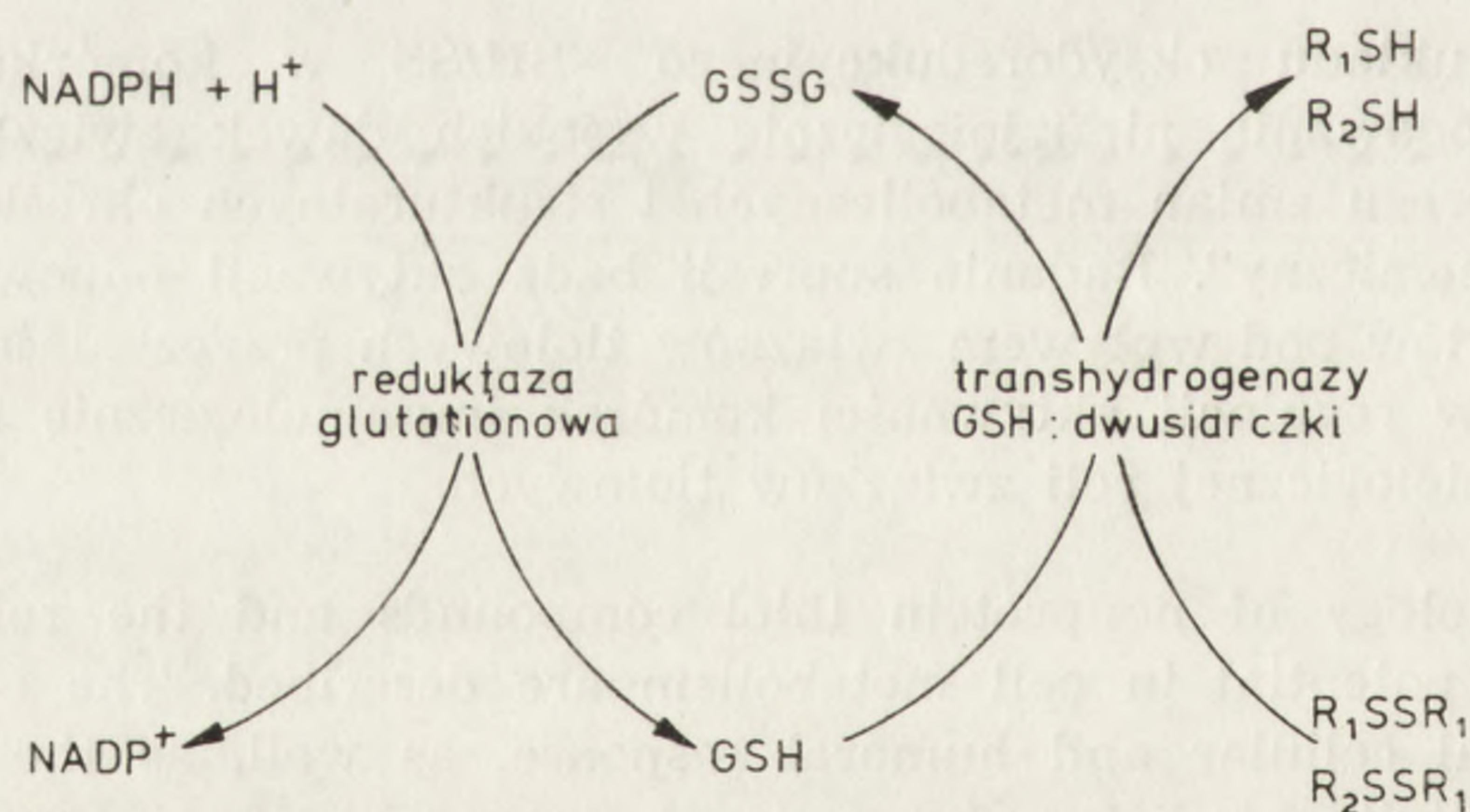
The disorders of $-SH/SS$ redox potential in cells, especially during the application of non-physiological doses of thiol compounds cause many metabolic and structural changes described as “biochemical shock”. Studies of suppression or activation of lymphocyte immunological response influenced by thiols, shed new light on the regulation mechanisms of the immunological competent cells activity and explain more precisely the biological functions of thiol compounds.

W organizmach żywych występują głównie trzy typy siarkowych związków organicznych. Reszty metioninowe białek komórkowych zawierają niezbyt reaktywną, stabilną w roztworach alkalicznych grupę

-S-CH₃. Grupy siarczanowe spotyka się głównie w związkach polisacharydowych i sterydowych. Trzecią frakcją stanowią grupy sulfhydrylowe (-SH) i dwusiarczkowe (SS), tworzące w komórce swoisty układ oksydoredukcyjny. Związki sulfhydrylowe, takie jak zredukowany glutation (GSH), cysteina, homocysteina, kwas liponowy, koenzym A, cysteamina, łatwo ulegają odwracalnemu utlenianiu (odwodorowaniu), przechodząc w formę dwusiarczkową. W organizmach żywych wzajemna proporcja składników tego układu oksydoredukcyjnego jest ściśle określona i kontrolowana enzymatycznie. W mechanizmie regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu grup sulfhydrylowych dominuje reduktaza glutationowa [66, 77], która katalizuje reakcję



W warunkach fizjologicznych glutation stanowi ponad 90% całkowitej zawartości drobnocząsteczkowych związków sulfhydrylowych [50] i występuje w komórkach głównie w postaci zredukowanej, z uwagi na wysoką wartość stałej równowagi katalizowanej reakcji oksydoredukcyjnej, wynoszącej 10⁹ [80]. Redukcja pozostałych związków dwusiarczkowych i wiązań dwusiarczkowych białek zależy w znacznym stopniu od stężenia GSH i może przebiegać w sposób samorzutny [50] lub być katalizowana przez nieswoiste transhydrogenazy GSH : dwusiarczki (ryc. 1),



Ryc. 1. Enzymatyczna regulacja zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG) formy glutationu przy udziale reduktazy glutationowej, współdziałającej z fosforanem dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP⁺) oraz przy udziale niespecyficznych transhydrogenaz GSH: dwusiarczki RSSR

jak to opisał Tietze [102]. Wykazano również bezpośrednią redukcję wiązań dwusiarczkowych białek i związków niebiałkowych przez fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) [46, 102].

Istnienie mechanizmu regulującego poziom grup sulfhydrylowych, w którym dominuje reduktaza glutationowa, powoduje, że w układach

biologicznych przeważają ilościowo związki sulfhydrylowe [14, 28, 50]. Przewaga formy zredukowanej określa jednocześnie zasadnicze funkcje biologiczne tego układu polegające na „ochronianiu” grup sulfhydrylowych szeregu białek enzymatycznych i strukturalnych, których konformacja, struktura trzecio- i czwartorzędowa, stereospecyficzność substratowa oraz wiązanie przez nie koenzymu i substratu zależą w istotny sposób od grupy $-SH$ [3, 35, 50].

FIZJOLOGICZNA ROLA DROBNOCZĄSTECzkOWYCH ZWIĄZKÓW TIOLOWYCH W KOMÓRCIE

Ostatnio, wraz z gromadzeniem nowych danych, coraz powszechniejszy staje się pogląd, że wzajemna przemiana związków sulfhydrylowych i dwusiarczkowych, prowadząca do ustalenia określonej proporcji pomiędzy ich stężeniami, stanowi ważny, dynamiczny mechanizm regulujący liczne procesy metaboliczne i fizjologiczne. Udokumentowano udział oksydoredukcyjnych przemian typu tiole - dwusiarczki jako mechanizmu zmian strukturalnych i funkcji błon biologicznych [38, 91, 98, 99]. Haest i wsp. [38] sugerują, że tworzenie się wiązań dwusiarczkowych w obrębie grup $-SH$ białek błonowych prowadzi do zmiany oddziaływań białkowo - fosfolipidowych i w konsekwencji zmienia przestrzenną orientację fosfolipidów w zewnętrznej, jak i wewnętrznej warstwie lipidowej błony. Obserwowane zaburzenia transportu przez błonę, działanie pompy sodowo - potasowej i ogólnej przepuszczalności błon, wywołane utlenianiem błonowych grup $-SH$ w wyniku działania promieniowania jonizującego lub blokowania odczynnikami rtęcioorganicznymi, dowodzi istotnej roli grup $-SH$ w funkcjonowaniu błon komórkowych [91, 98, 99]. W badaniach tych okazało się, że białkowe grupy sulfhydrylowe, zwłaszcza w przypadku białek enzymatycznych i błonowych, można różnicować na kilka typów [3, 35, 91, 99] na podstawie ich różnej reaktywności w reakcjach z odczynnikami blokującymi grupy $-SH$. Bitny - Szlachto [3] scharakteryzował 3 typy grup $-SH$ heksokinazy III z drożdży, na podstawie kinetyki reakcji z dwusiarczkiem β - hydroksyetylo2,4 - dwunitrofenylowym. Gutman i wsp. [35] określili 5 typów grup sulfhydrylowych dehydrogenazy NADH na podstawie warunków tworzenia merkaptydów z odczynnikami rtęcioorganicznymi oraz wpływu tych reakcji na własności enzymu. Shapiro i wsp. [91] opisali występowanie przynajmniej 3 typów grup $-SH$ błon erytrocytów na podstawie różnej charakterystyki wiązania odczynników rtęcioorganicznych i różnych efektów blokowania błonowych grup sulfhydrylowych, uwidaczniających się jako zaburzenia transportu przez błony, przepuszczalności błon i szybkości he-

molizy erytrocytów. Wykazano również istnienie mechanizmu pozwalającego na redukcję błonowych dwusiarczków w warunkach aktywnego metabolizmu erytrocytów [98, 99].

Postulowany jest udział przemian tiole: dwusiarczki w obrębie błon w transporcie aminokwasów zależnym od Na^+ oraz interakcja insuliny z błonowymi grupami sulfhydrylowymi [59, 60, 61]. Błonowe grupy $-\text{SH}$ okazały się istotne w agregacji i adhezji embrionalnych komórek wątroby i nerki kurcząt, co wykazali George i wsp. [30], stosując blokowanie błonowych grup $-\text{SH}$ kwasem 6,6' - dwutiodwunikotynowym.

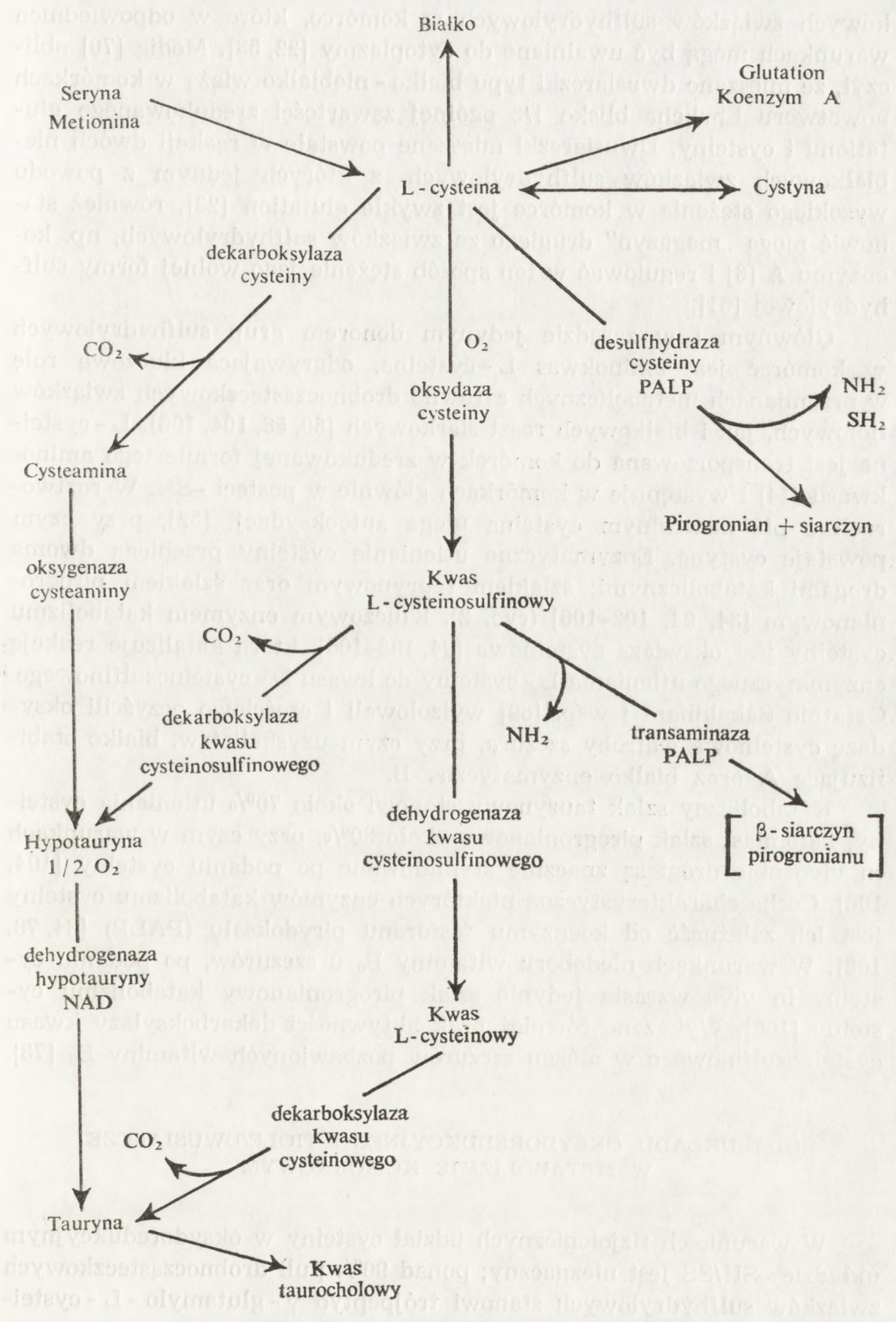
Od szeregu lat znane jest radioprotekcyjne działanie związków sulfhydrylowych, ochraniające komórki przed skutkami promieniowania jonizującego. Radioprotekcyjne działanie tioli i niektórych dwusiarczków obserwuje się jedynie w przypadku uprzedniego ich podania, poprzedzającego napromieniowanie [50]. Naturalnie występujące związki tiolowe o działaniu radioprotekcyjnym to L - cysteina, GSH, i homocysteina, natomiast egzogenne tiole to merkaptoetanol, ditiotreitól i najbardziej aktywna cysteamina.

Ogólnie rzecz biorąc, absorpcja promieniowania jonizującego powoduje inaktywację komórek w wyniku powstawania i toksycznego działania produktów radiolizy. Zdaniem Greenstocka i wsp. [32], w ochronnym działaniu związków sulfhydrylowych istotną rolę odgrywa translokacja atomów wodoru z grup sulfhydrylowych związków tiolowych do produktów radiolizy, posiadających potencjalnie niszczące właściwości. Odwrotnie, związki powodujące utlenienie produktów radiacji lub ich „utrwalenie” wzmagają wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące [32]. Należy przy tym zaznaczyć, że obserwowane radioprotekcyjne właściwości niektórych związków dwusiarczkowych, jak np. cystaminy [50], sugerują istnienie innego mechanizmu ochrony struktur komórkowych przed skutkami promieniowania. Jocelyn [50] wysuwa przypuszczenie, że ochronna rola cystaminy może polegać na reakcji tego dwusiarczku z białkowymi grupami sulfhydrylowymi, z wytworzeniem mieszanych dwusiarczków.



Wytworzenie takich mieszanych dwusiarczków ochraniałoby grupy $-\text{SH}$ białek i zapobiegałoby destrukcyjnemu działaniu produktów radiolizy. Tak „osłonięte” białkowe grupy $-\text{SH}$ mogłyby następnie powoli ulegać redukcji w enzymatycznych reakcjach oksydoredukcyjnych [50].

W mechanizmach regulacji wzajemnych proporcji związków sulfhydrylowych i dwusiarczkowych w komórce istotne znaczenie ma zdolność tworzenia tzw. dwusiarczków mieszanych [39, 46, 70], tworzących się pomiędzy dwoma różnymi związkami sulfhydrylowymi. Mieszane dwusiarczki typu białko - niebiałko mogą spełniać rolę „magazynu” niskocząstecz-



Ryc. 2. Drogi metaboliczne przemian L-cysteiny

kowych związków sulfhydrylowych w komórce, które w odpowiednich warunkach mogą być uwalniane do cytoplazmy [22, 53]. Modig [70] obliczył, że mieszane dwusiarczki typu białko - niebiałko wiążą w komórkach nowotworu Ehrlicha blisko 1/3 ogólnej zawartości zredukowanego glutationu i cysteiny. Dwusiarczki mieszane powstałe w reakcji dwóch niebiałkowych związków sulfhydrylowych, z których jednym z powodu wysokiego stężenia w komórce jest zwykle glutation [23], również stanowiąc mogą „magazyn” drugiego ze związków sulfhydrylowych, np. koenzymu A [6] i regulować w ten sposób stężenie jego wolnej formy sulfhydrylowej [51].

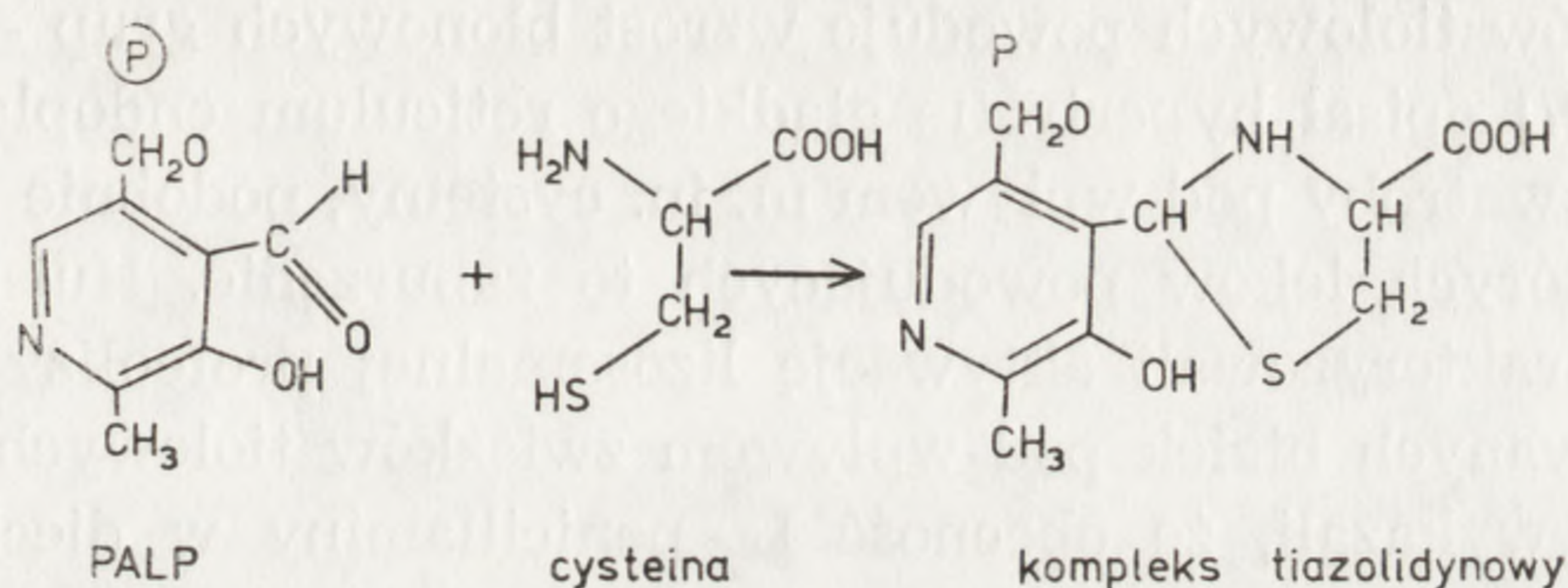
Głównym i w zasadzie jedynym donorem grup sulfhydrylowych w komórce jest aminokwas L - cysteina, odgrywająca kluczową rolę w przemianach metabolicznych zarówno drobnocząsteczkowych związków tiolowych, jak i białkowych reszt siarkowych [50, 58, 104, 106]. L - cysteina jest transportowana do komórek w zredukowanej formie tego aminokwasu [14] i występuje w komórkach głównie w postaci -SH. W roztworach o pH neutralnym cysteina ulega autooksydacji [52], przy czym powstaje cystyna. Enzymatyczne utlenianie cysteiny przebiega dwoma drogami katabolicznymi; szlakiem taurynowym oraz szlakiem pirogronianowym [34, 94, 103-106] (ryc. 2). Kluczowym enzymem katabolizmu cysteiny jest oksydaza cysteinowa [94, 103-106], która katalizuje reakcję enzymatycznego utleniania L - cysteiny do kwasu L - cysteiniosulfinowego. Ostatnio Sakakibara i wsp. [89] wyizolowali i częściowo oczyścili oksydazę cysteinową wątroby szczura, przy czym uzyskali tzw. białko stabilizujące A oraz białko enzymatyczne B.

Kataboliczny szlak taurynowy stanowi około 70% utleniania cysteiny, natomiast szlak pirogronianowy około 30%, przy czym w warunkach *in vivo* obie drogi są znacznie stymulowane po podaniu cysteiny [104, 106]. Cechą charakterystyczną niektórych enzymów katabolizmu cysteiny jest ich zależność od koenzymu fosforanu pirydoksalu (PALP) [34, 78, 106]. W warunkach niedoboru witaminy B₆ u szczurów, po podaniu cysteiny *in vivo* wzrasta jedynie szlak pirogronianowy katabolizmu cysteiny [106]. Wykazano również brak aktywności dekarboksylazy kwasu cysteiniosulfinowego w mózgu szczurów pozbawionych witaminy B₆ [78].

ROLA UKŁADU OKSYDOREDUKCYJNEGO TIOLE/DWUSIARCZKI W METABOLIZMIE KOMÓRKOWYM

W warunkach fizjologicznych udział cysteiny w oksydoredukcyjnym układzie -SH/SS jest nieznaczny; ponad 90% puli drobnocząsteczkowych związków sulfhydrylowych stanowi trójpeptyd γ - glutamyl - L - cystei-

nyloglicyna, czyli glutation [50, 54]. Glutation jest endogennym niskocząsteczkowym związkiem tiolowym występującym w komórkach wszystkich badanych organizmów, nieraz w wysokich stężeniach, rzędu 5–10 mM [50]. Zdaniem Jocelyna [50], najistotniejszą różnicą pomiędzy glutationem a cysteiną jest zdolność tworzenia związków tiazolidynowych; cysteina tworzy stabilny kompleks tiazolidynowy z grupami aldehydowymi, jak np. w reakcji z fosforanem pirydoksalu, natomiast glutation takich połączeń nie tworzy (ryc. 3). Wolna grupa aminowa



Ryc. 3. Reakcja fosforanu pirydoksalu (PALP) z cysteiną, z utworzeniem kompleksu tiazolidynowego

glutationu jest znacznie przesunięta w porównaniu z grupą aminową cysteiny, co uniemożliwia utworzenie pierścienia tiazolidynowego. W cząsteczce glutationu występują natomiast dwa ważne ugrupowania chemiczne: grupa sulfhydrylowa oraz wiązanie γ -glutamylowe. Glutationowi przypisuje się rolę głównego składnika układu oksydoredukcyjnego –SH/SS tioli drobnocząsteczkowych w komórce oraz składnika cyklu γ -glutamylowego, związanego z translokacją aminokwasów przez błonę [7, 65].

Zaburzenia układu oksydoredukcyjnego tiole/dwusiarczki w komórkach, zwłaszcza w przypadku podawania nefizjologicznie wysokich dawek związków tiolowych, prowadzą do szeregu zmian metabolicznych i strukturalnych, określanymi niekiedy jako „szok biochemiczny” [28]. Niezależnie od aktywującego działania związków tiolowych na wiele enzymów, w niektórych przypadkach związki sulfhydrylowe działają hamująco na wewnątrzkomórkowe procesy enzymatyczne [15, 43, 47, 85]. D’Agostino i wsp. [15] wykryli prawie całkowite zahamowanie biosyntezy mitochondrialnego DNA pod wpływem związków tiolowych, takich jak merkaptoetanol, ditiotretitol, cysteina, przy czym mechanizm tego efektu nie został dotąd wyjaśniony. Postuluje się, że zaburzenie składników układu oksydoredukcyjnego –SH/SS może prowadzić do daleko idących zmian; przykładowo, niewielka zmiana stężenia glutationu (GSS) może pociągnąć za sobą dużą zmianę utlenionego glutationu (GSSG)

z uwagi na proporcje stężeniowe tych składników, jak to opisali Kosower i wsp. [54]. Zwiększenie stężenia GSSG, zdaniem autorów, powoduje zahamowanie biosyntezy białka, prawdopodobnie na poziomie inicjacji [54].

Lorber i wsp. [63] wykazali znaczny wzrost białkowych i niebiałkowych grup $-SH$ surowicy krwi, erytrocytów jak i badanych tkanek po podaniu N-acetylocysteiny. Fillipowich i wsp. [28] wykazali znaczny wzrost poziomu cysteiny w tkankach grasicy, śledziony i wątroby szczurów po podaniu dootrzewnowo cysteiny. Inkubacja limfocytów w roztworach związków tiolowych powoduje wzrost błonowych grup $-SH$ [55, 85]. Meldolesi [67] opisał hipertrofię gładkiego reticulum endoplazmatycznego komórek wątroby pod wpływem m. in. cysteiny, podobnie jak w przypadku niektórych leków powodujących to zaburzenie. Huisman i wsp. [43, 44] scharakteryzowali aktywację lizosomalnej proteolizy natywnych i zdenaturowanych białek pod wpływem związków tiolowych. Kuchinsas i wsp. [57] wykazali, że obecność L-penicillaminy w diecie szczurów prowadzi do niedoboru witaminy B_6 u zwierząt. Hamowanie wzrostu zwierząt spowodowane podawaniem L-penicillaminy może być zniesione przez podawanie fosforanu pirydoksalu. Interakcja fosforanu pirydoksalu z aminotiolami, takimi jak penicillaminą, cysteiną, została potwierdzona w badaniach chemicznych [5, 19]. Kompleks fosforanu pirydoksalu i aminotiolu pozostaje w równowadze z nie przereagowanym aminotiolem, spontanicznie utlenianym do formy dwusiarczkowej. Kompleks tiazolidynowy zanika całkowicie dopiero w momencie, gdy cała ilość związku tiolowego zostanie utleniona do formy dwusiarczkowej [19].

Istotnych danych dotyczących mechanizmów wewnątrzkomórkowej regulacji układu oksydoredukcyjnego tiole/dwusiarczki dostarczyły badania genetycznych defektów powodujących w konsekwencji zaburzenia tego układu, jak również schorzeń związanych z obniżeniem poziomu grup sulfhydrylowych [24, 26, 31, 64, 107]. Young i wsp. [107] oznaczyli potencjał oksydoredukcyjny glutation zredukowany/glutation utleniony w erytrocytach odmian genetycznych owiec Finnish Landrace i Tasmanian Merino, posiadających obniżony poziom glutationu w krwinkach czerwonych. Okazało się, że zarówno komórki zawierające obniżoną zawartość glutationu, jak i erytrocyty normalne charakteryzują się podobnym potencjałem oksydoredukcyjnym GSH/GSSG. W tych odmianach genetycznych owiec stwierdza się obniżenie zarówno poziomu GSH, GSSG, jak i całkowitej zawartości niebiałkowych grup $-SH$ w erytrocytach.

Thoene i wsp. [101] zbadali wpływ podawania cysteaminy na zawartość cystyny w fibroblastach, w przypadku patologicznego odkładania się znacznych ilości tego aminokwasu w komórkach. Po upływie 1 godz.

ków przeciwzapalnych istotne znaczenie ma współdziałanie grup sulfhydrylowych błon lub białek plazmatycznych z efektem rozprzegania oksydatywnej fosforylacji pod wpływem tych leków. Jak wykazał Famaey i wsp. [26], mersalyl (inhibitor tiolowy) blokuje stymulację konsumpcji tlenu indukowaną przez niesterydowe leki przeciwzapalne, przy czym efekt ten jest znoszony przez cysteinę. Ten sam inhibitor podwyższa efekt pęcznienia mitochondriów wywołanego niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi [26].

Przedstawione dane określają i potwierdzają istnienie układu oksydoredukcyjnego -SH/SS w komórkach jako ważnego czynnika regulującego metabolizm komórki. Krytycznie natomiast rozważane są hipotezy dotyczące regulatorowej roli tego układu oksydoredukcyjnego w podziałach komórek normalnych i zmienionych nowotworowo [25, 54, 74]. Ostatnio Fahey i wsp. [25] stwierdzili brak korelacji pomiędzy zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia GSH i GSSG a procesami podziału komórkowego w jajach jeżowca morskiego.

MODULACJA REAKTYWNOŚCI LIMFOCYTÓW POD WPLYWEM ZWIĄZKÓW TIOLOWYCH

Znakomita większość badań immunologicznych prowadzonych w ostatnich latach koncentruje się wokół problemu regulacji odpowiedzi immunologicznej ustroju oraz poznania własności komórek immunologicznie kompetentnych, limfocytów. Udoskonalenie metod badawczych *in vitro*, a zwłaszcza techniki hodowli limfocytów *in vitro* z zastosowaniem roślinnych mitogenów, jak fitohemaglutynina (PHA) czy konkanawalina A, pozwoliło na przebadanie wielu czynników supresorowych i stymulujących odpowiedź limfocytów. W ostatniej dekadzie szeroko udokumentowano działanie związków tiolowych na odpowiedź immunologiczną ustroju typu komórkowego, modulację reaktywności limfocytów w różnych ich stanach czynnościowych, w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*. Supresję typu humoralnego wywołaną podawaniem DL - penicillaminy opisali Altman i wsp. [1], którzy zaobserwowali hamowanie syntezy przeciwciał u myszy. D - penicillamina stosowana jako czynnik chelatujący oraz redukujący w schorzeniach reumatoidalnego zapalenia stawów, w warunkach *in vitro* powoduje również obniżenie chemotaksji leukocytów wielojądrowych [8]. Silnym supresorem przebiegu i powstania podajwantowego zapalenia stawów wywołanego u szczurów jest cysteina, jak to wykazał Ryżewski [82]. Jak się wydaje, cysteina nie zmienia odpowiedzi ustroju typu humoralnego [83], natomiast moduluje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego [16, 82, 88]. Ry-

zewski i wsp. [88] wykazali hamowanie choroby allogenicznej oraz reakcji „graft versus host” u szczurów traktowanych cysteiną [84]. Stwierdzono hamujące działanie cysteiny na zmienione nowotworowo komórki grasicy u myszy [13] oraz immunosupresyjne działanie tioglikolanu na powstawanie leukemii u myszy [96]. Chwaliński i wsp. [9, 10] szczegółowo opisali znaczne obniżenie liczby komórek i hamowanie syntezy DNA w grasicy szczurów po podaniu cysteiny.

Badania *in vitro*, jakkolwiek dostarczyły wielu danych dotyczących supresji lub stymulacji komórek immunologicznie kompetentnych, pod wpływem związków tiolowych, w zależności od rodzaju i warunków stosowania tioli, nie wyjaśniają dostatecznie mechanizmów działania związków tiolowych [11, 33, 42, 79]. Niejasna jest rola 2 - merkaptoetanolu w modulacji odpowiedzi typu komórkowego i humoralnego limfocytów. Jackson i wsp. [48] obserwowali m. in. pod wpływem 2 - merkaptoetanolu zaburzenia chromosomalne prowadzące do powstawania poliploidów w hodowlach limfocytów ludzkich stymulowanych roślinnymi mitogenami. Z kolei Click i wsp. [11, 12] oraz Heber - Katz i wsp. [42] opisali podwyższenie syntezy przeciwciał *in vitro* pod wpływem 2 - merkaptoetanolu oraz stymulację reakcji mieszanych limfocytów (MLC) po podaniu 2 - merkaptoetanolu, a w mniejszym stopniu cysteiny i dithiothreitolu. Zdaniem Metcalfa [68], 2 - merkaptoetanol jest niezbędny w tworzeniu kolonii limfocytów B w środowisku półpłynnego agaru, przy czym autor postuluje wydzielanie czynnika wzrostowego przez komórki pod wpływem tego związku tiolowego. Natomiast Harris i wsp. [40, 41] przypisują działaniu 2 - merkaptoetanolu wzrost aktywności cytolitycznych limfocytów T w reakcji mieszanych limfocytów. Podobną hipotezę wysuwają Soullilou i wsp. [93] oraz Lee i wsp. [62], którzy stwierdzili, że 2 - merkaptoetanol wpływa na rekonstrukcję odpowiedzi komórek poddanych immunosupresyjnemu działaniu kortyzonu.

Dane z piśmiennictwa wskazują na istotną rolę cysteiny i jej pochodnych na odpowiedź immunologiczną ustroju [72, 73, 82, 83, 88]. Wykazano selektywne, znacznie stymulujące działanie cysteiny w immunologicznym mechanizmie wydzielania wolno reagujących substancji w anafilaksji (tzw. SRS - A) z fragmentów płuc oraz limfocytów, przy jednoczesnym braku tego efektu pod wpływem zalkilowanych pochodnych cysteiny [72, 73]. Stwierdzono podwyższenie transformacji blastycznej limfocytów ludzkich i króliczych indukowanej fitohemaglutyniną, pod wpływem cysteiny i glutationu [27]. Broome i wsp. [4] badali wpływ 30 związków tiolowych i ich pochodnych na transformację blastyczną limfocytów normalnych i zmienionych nowotworowo, indukowanych mitogenami roślinnymi, jak również wpływ tioli na hodowle limfocytów. Z przebadanych związków tiolowych i dwusiarczków 9 stymulowało

wzrost i transformację blastyczną hodowanych limfocytów, w tym również cysteina. Natomiast w niektórych przypadkach tiole i dwusiarczki działały hamująco [4].

Cysteina hamuje transformację blastyczną limfocytów stymulowanych nadjodanem [79], przy czym przypisuje się ten efekt zdolności blokowania grup aldehydowych w obrębie błon przez cysteinę z utworzeniem pierścienia tiazolidynowego. Inni autorzy odkryli antagonistyczny wpływ nadjodanu i cysteiny na wewnątrzkomórkowy poziom cyklicznego GMP w mysich splenocytach [37] i na tej podstawie sugerują supresorowe działanie cysteiny via cGMP.

Dodanie cysteiny do hodowli szczurzych limfocytów, w zależności od warunków powoduje wzrost lub znaczne zahamowanie inkorporacji ^3H -tymidyny, przy czym możliwa jest zależność tego efektu od stanu funkcjonalnego limfocytów [17, 86, 87]. W odpowiednich warunkach, jak wykazano, można uzyskać zahamowanie reakcji mieszanych limfocytów pod wpływem cysteiny [16]. Jak wykazali Ryzewski i wsp. [86, 87], w zależności od czasu ekspozycji limfocytów na działanie L-cysteiny następuje stymulacja, przesunięcie w czasie lub zahamowanie odpowiedzi komórek na fitohemaglutyninę. Ciągła obecność 2 mM L-cysteiny w medium hodowlanym lub 2-godzinna preinkubacja komórek powoduje inhibicję wbudowywania ^3H -urydyny, ^3H -tymidyny oraz ^{14}C -leucyny, zarówno w hodowlach kontrolnych, jak i brak odpowiedzi limfocytów na fitohemaglutyninę [86, 87].

Mechanizmy biologicznego działania związków sulfhydrylowych na reaktywność limfocytów w różnych ich stanach czynnościowych nie zostały dotąd w pełni wyjaśnione. Wielu autorów postuluje wpływ podawania związków tiolowych na układ oksydoredukcyjny tiole/dwusiarczki [27, 28, 54, 63]. Wykazano znaczny wzrost poziomu cysteiny i utrzymywanie się wysokiego wewnątrzkomórkowego stosunku cysteina/cystyna w limfocytach szczurzych poddanych krótkim inkubacjom *in vitro* w roztworze cysteiny [56], co w powiązaniu ze stwierdzoną nieznaczną zawartością wolnej cysteiny w puli drobnocząsteczkowych związków tiolowych [50] sugeruje zaburzenie proporcji składników tego układu oksydoredukcyjnego. Wydaje się, że supresja odpowiedzi limfocytów po podaniu cysteiny nie jest spowodowana ewentualnym nagromadzeniem się i toksycznym działaniem katabolitów cysteiny [47, 56]. Przeciwnie, kwas cysteinosulfonowy okazał się czynnikiem stymulującym odpowiedź komórek na fitohemaglutyninę [56].

Wśród hipotez tłumaczących mechanizmy biologicznych efektów związków tiolowych interesujące są sugestie Ravida i wsp. [79], tłumaczących działanie cysteiny jako związku kompleksującego grupy aldehydowe w obrębie błon limfocytów, oraz spostrzeżenie Haddoxa i wsp. [37],

dotyczące obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu cGMP pod wpływem cysteiny. Należy również wymienić sugestie Brooma i wsp. [4], których zdaniem obserwowane efekty biologiczne tioli i dwusiarczków związane są raczej ze stereospecyficznością tych związków niż z ich działaniem redukującym. Odrębnym zagadnieniem, jak się wydaje, jest mechanizm działania L-penicillaminy, a zwłaszcza D-penicillaminy, z uwagi na specyficzne własności tego trudno metabolizowanego leku. Stwierdzona dosyć dawno interakcja penicillaminy z witaminą B₆ [57] w badaniach *in vivo* może mieć istotne znaczenie w obniżeniu reaktywności komórek immunologicznie kompetentnych. Ostatnio Robson i wsp. [80, 81] zwrócili uwagę na supresję odpowiedzi immunologicznej limfocytów charakteryzujących się obniżeniem zawartości witaminy B₆.

Omówione hipotezy dotyczące działania związków tiolowych na limfocyty należy uzupełnić sugestią bezpośredniego działania tioli na błonę limfocytów, popartą faktami doświadczalnymi [20, 21, 55, 85]. Z jednej strony stwierdzono podwyższenie zawartości błonowych grup -SH [55, 85] zmiany aktywności cyklazy adenyłowej pod wpływem związków tiolowych [85] w badaniach chemicznych, z drugiej natomiast strony stwierdzono destrukcyjne działanie tioli na błonę limfocytów, powodujące utratę receptora C3b [21] oraz lizę leukemicznych limfocytów pod wpływem cysteiny i innych tioli [20].

WSPÓLZALEŻNOŚCI POMIĘDZY ZWIĄZKAMI TIOLOWYMI A CYKLICZNYMI NUKLEOTYDAMI W MECHANIZMACH REGULACJI KOMÓRKOWEJ

Wraz z rozwojem badań mechanizmów regulacji czynności komórek na poziomie cyklicznych nukleotydów, również w badaniach regulacji odpowiedzi immunologicznej zwrócono szczególną uwagę na rolę cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) oraz cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) w indukcji różnicowania i proliferacji limfocytów oraz modulacji tych procesów przez czynniki hormonalne [36, 37, 75, 85]. Dotychczasowe odkrycia hamującego efektu cAMP we wczesnej fazie indukcji proliferacji oraz działania wielu czynników hormonalnych podwyższających stężenie cGMP w limfocytach pozwoliły na stworzenie hipotezy przeciwstawnego działania cAMP i cGMP w regulacji funkcji limfocytów [36, 37, 75]. Ogólnie stwierdzono, że szereg czynników hormonalnych, jak epinefryna, prostaglandyna PGE₁ i histamina, które podwyższają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, jednocześnie hamują proliferację limfocytów stymulowanych mitogenami roślinnymi oraz wykazują działanie immunosupresyjne i antyproliferatywne *in vivo* [36, 37]. Natomiast wzrost poziomu cGMP obserwowany we wczesnej fazie dzia-

łania mitogenów roślinnych skorelowany jest, jak się wydaje, z indukcją proliferacji limfocytów [36, 37, 75].

Spośród wielu zbadanych czynników modulujących mechanizmy regulacji procesów komórkowych na poziomie cyklicznych nukleotydów w limfocytach, pewną rolę odgrywają również związki tiolowe. W 1973 r. Mitznegg [69] stwierdził wzrost poziomu cAMP w wątrobie myszy pod wpływem cysteaminy. Istnieją dane sugerujące współdziałanie układu cyklazy adenyłowej i cysteaminy w mechanizmie radioprotekcji [69, 76, 92]. Radioprotekcyjne działanie cysteaminy jest znacznie podwyższone w wyniku podawania czynników podwyższających poziom cAMP w komórkach lub podawania egzogenego cGMP [76]. Stwierdzono ponadto addytywny efekt napromieniowania komórek śledziony promieniami X oraz podania cysteaminy, podwyższający aktywność cyklazy adenyłowej [92].

Wcześniejsza hipoteza istotnej roli grup $-SH$ będących bezpośrednio w obrębie miejsca receptorowego w odpowiedzi alfa-adrenergicznej jest obecnie rozważana krytycznie. Mottram [71] sugeruje, że grupy $-SH$ w obrębie receptorów alfa-adrenergicznych odgrywają drugorzędną rolę, występując „obok” miejsca receptorowego. Inhibicja alfa-adrenergicznej odpowiedzi komórki wywołana czynnikami blokującymi grupy $-SH$ jest bowiem niespecyficzna [71]. Z kolei Suarez-Isla i wsp. [97] sugerują, że grupy sulfhydrylowe receptora acetylocholinowego nie są istotne w wiązaniu ligandów i znajdują się w miejscu jedynie częściowo zależnym od miejsca przyłączenia ligandów i mogą służyć jako markery zmian konformacyjnych białka receptorowego.

Inkubacja limfocytów szczyrczych w roztworze cysteiny w stężeniu wywołującym inhibicję odpowiedzi komórek na fitohemaglutyninę powoduje jednocześnie zniesienie odpowiedzi cyklazy adenyłowej mierzonej wewnątrzkomórkowym poziomem cAMP [85], jakkolwiek nie zmienia podstawowego poziomu cAMP. Stwierdzono natomiast, że podstawowe aktywności cyklazy adenyłowej, tzn. stymulowana hormonalnie i stymulowana przez NaF, są całkowicie hamowane przez związki reagujące z grupami SH, co sugeruje, że wrażliwe grupy $-SH$ są związane z katalityczną podjednostką cyklazy adenyłowej [95]. Cyklaza guanyłowa również jest szczególnie wrażliwa na zatrucie ciężkimi metalami bądź odczynnikami rtęcioorganicznymi powodującymi inhibicję aktywności tego enzymu, przy czym związki ochraniające grupy $-SH$, jak dithiothreitol, zapobiegają tej inaktywacji [29]. Natomiast w przypadku rozpuszczalnych preparatów cyklazy guanyłowej stwierdza się wzrost aktywności cyklazy, hamowany w tym wypadku związkami tiolowymi. Biorąc pod uwagę oba te zjawiska, Garbers i wsp. [29] sugerują udział zarówno utlenionych, jak i zredukowanych grup $-SH$ w obrębie cyklazy guanyłowej, odpowiedzial-

nych za utrzymywanie optymalnej aktywności enzymatycznej tego enzymu. Wykryto również, że związki tiolowe, takie jak ditiotreitol, zredukowany glutation i cysteina, powodują zniesienie stymulacji cyklazy guanylowej wywołanej nitrozaminami [18]. Jednak w tym przypadku stymulujące, Ca^{+} -niezależnie działanie nitrozamin na układ cyklazy guanylowej różni się od działania fizjologicznych agonistów cGMP, jak np. stymulatorów cholinergiczych. Hormonalna stymulacja układu cyklazy guanylowej zachodzi jedynie w obecności egzogenego jonu Ca^{+} , w komórkach nienaruszonych. Wydaje się, że stymulacja układu cyklazy guanylowej nitrozaminami, znoszona w wyniku działania związków tiolowych, wiąże się przypuszczalnie z kompetycyjnym działaniem tioli i nitrozamin w stosunku do grup $-SH$ białkowych, istotnych w procesie aktywacji cyklazy guanylowej [18]. Byłoby to zgodne z postulowaną ostatnio hipotezą procesu oksydoredukcyjnego jako podstawowego mechanizmu aktywacji układu cyklazy guanylowej [18, 37]. Hipotezę tę popierają m. in. wyniki Haddoxa i wsp. [37], którzy stwierdzili aktywację cyklazy guanylowej limfocytów pod wpływem nadjodanu oraz obniżenie endogennego poziomu cGMP pod wpływem cysteiny. Działanie cysteiny zdaniem tych autorów wyraża się jednocześnie obniżeniem wewnątrzkomórkowego poziomu cGMP jak i zahamowaniem stymulacji wywołanej nadjodanem [37].

Stwierdzono również bezpośrednią współzależność pomiędzy endogennym poziomem zredukowanego i utlenionego glutationu oraz cysteiny a cyklicznym adenozynomonofosforanem [45, 100]. Podawanie dwubutyrylo - cAMP powoduje z jednej strony wzrost mieszanych dwusiarczków typu białko-glutation oraz obniżenie zawartości zredukowanego glutationu i białkowych grup $-SH$ w wątrobie szczura [45]. Isaacs i wsp. [45] tłumaczą to zjawisko hamującym działaniem dwubutyrylo - cAMP na aktywność katalazy, w wyniku czego zwiększony poziom nadtlenku wodoru powoduje utlenienie glutationu. Natomiast Tateishi i wsp. [100] stwierdzili obniżenie się poziomu zredukowanego glutationu, jak również wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cysteiny po podaniu zarówno dwubutyrylo - cAMP jak i teofiliny, przy jednoczesnym wzroście gama-glutaryltransferazy.

W podsumowaniu rozdziału należy zaznaczyć, że uzyskane dotychczas dane dotyczące wzajemnych zależności pomiędzy cyklicznymi nukleotydami a związkami tiolowymi mają charakter fragmentaryczny. Niemniej interesujące jest stwierdzenie obniżenia endogennego poziomu cGMP w limfocytach poddanych działaniu cysteiny przy jednoczesnym zahamowaniu aktywacji komórek [37] w świetle znanych faktów podwyższenia poziomu endogennego poziomu cGMP skorelowanego z indukcją proliferacji limfocytów.

LITERATURA

- [1] ALTMAN K., TABIN M. S., Suppression of the primary immune response induced by DL - penicillamine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **118**: 554-560, 1965.
- [2] AYLWARD M., A review of possible mechanisms of action of the anti-rheumatic drug, alcofenac, *Curr. Med. Res. Opin.*, **3**: 249-263, 1975.
- [3] BITNY - SZLACHTO S., Charakterystyka grup -SH preparatów białkowych na podstawie ich reakcji z dwusiarczkiem β - hydroksyetylo2,4 - dwunitrofenylowym. I. Charakterystyka preparatu heksokinazy drożdżowej, *Acta Polon. Pharm.*, **29**: 431-437, 1972.
- [4] BROOME J. D., JENG M. W., Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides in vitro. Effects on mouse lymphoma cells in comparison with splenic lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 574-592, 1973.
- [5] BUELL M. V., HANSEN R. E., Reaction of pirydoxal - 5 - phosphate with aminothiols, *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**: 6042-6049, 1960.
- [6] CHANG S. H., WILKEN D. R., Participation of the unsymmetrical disulfide of coenzyme A and glutathione in enzymic sulfhydryl - disulfide interchange. I. Partial purification and properties, of the bovine kidney enzyme, *J. Biol. Chem.*, **241**: 4251-4260, 1966.
- [7] CHRISTENSEN H. N., De CESPEDES C., HANDLOGTEN M. E., RONGUIST G., Energisation of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **300**: 487-522, 1973.
- [8] CHWALIŃSKA - SADOWSKA H., BAUM J., The effect of D - penicillamine on polymorphonuclear leukocyte function, *J. Clin. Invest.*, **58**: 871-879, 1976.
- [9] CHWALIŃSKI S., RYŻEWSKI J., The effect of DL - cysteine hydrochloride on in situ thymus cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **22**: 181-192, 1974.
- [10] — Mouse thymus involution under the influence of DL - cysteine hydrochloride, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **23**: 91-104, 1975.
- [11] CLICK R. E., BENCK L., ALTER B. J., Enhancement of antibody synthesis in vitro by mercaptoethanol, *Cell. Immunol.*, **3**: 156-160, 1972.
- [12] CLICK R. E., BENCK L., ALTER B. J., LOVCHIK J. C., Immune responses in vitro. VI. Genetic control of the in vivo — in vitro discrepancies in 19S antibody synthesis, *J. Exp. Med.*, **136**: 1241-1255, 1972.
- [13] CONNORS T. A., JONES M., Cysteine and survival of transplanted thymoma. *Nature*, **258**: 458-459, 1975.
- [14] CRAWHALL J. C., SEGAL S., The intracellular ratio of cysteine and cystine in various tissues. *Biochem. J.*, **105**: 891-896, 1967.
- [15] D'AGOSTINO M. A., LOWRY K. M., KALF G. F., DNA - biosynthesis in rat liver mitochondria. Inhibition by sulfhydryl compounds and stimulation by cytoplasmic proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**: 400-416, 1975.
- [16] DĄBROWSKA B. K., RYŻEWSKI J., DĄBROWSKI M. P., RYŻEWSKA A. G., Suppression of MLC - reactivity of rat lymphocytes by L - cysteine hydrochloride, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**: 287-291, 1974.
- [17] — Changes in vitro phytohemagglutinin reactivity of rat lymphocytes influenced by cysteine, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**: 281-286, 1974.
- [18] De RUBERTIS F. R., CRAVEN P. A., Activation of hepatic guanylate cyclase by N - methyl - N' - nitro - N - nitrosoguanidine, *J. Biol. Chem.*, **252**: 5804-5814, 1977.
- [19] De MARCO C., BAGNOLO D., The reaction between cysteamine and pirydoxal phosphate, *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**: 526-527, 1962.

- [20] DIX D. E., Leukemia cell lysis by sulfhydryl reagents and thiols, *Life Sci.*, **19**: 973-978, 1976.
- [21] DIERICH M., FERRONE S., PELLEGRINO M. A., REISFELD R. A., Chemical modulation of cell surfaces by sulfhydryl compounds: effect on C3b receptors, *J. Immunol.*, **113**: 940-947, 1974.
- [22] ELDJARN L., PIHL A., On the mode of action X-rays protective agents. I. Fixation in vivo of cysteamine and cystamine to proteins, *J. Biol. Chem.*, **223**: 341-352, 1956.
- [23] — The equilibrium constant and oxidation/reduction potentials of some thiol/disulfide systems, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**: 4589-4593, 1957.
- [24] EVANS P. H., Serum sulphhydryl levels in rheumatoid patients treated with alclofenac, *Curr. Med. Res. Opin.*, **3**: 268-273, 1975.
- [25] FAHEY R. C., MIKOLAJCZYK S. D., MEIER G. P., EPEL D., CARROL E. J., The glutathione thiol - disulfide status in the sea urchin egg during fertilisation and the first cell division cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **437**: 445-453, 1976.
- [26] FAMAHEY J. P., MOCKEL J., Importance of sulfhydryl groups for the uncoupling activity of non-steroidal acidic anti-inflammatory drugs and valinomycin in oxidative phosphorylation, *Biochem. Pharmacol.*, **22**: 1487-1498, 1973.
- [27] FANGER M. W., HART D. A., WELLS J. V., NISONOFF A., Enhancement by reducing agents of the transformation of human and rabbit peripheral lymphocytes, *J. Immunol.*, **105**: 1043-1045, 1970.
- [28] FILIPPOVICH I. V., KOSHCHENKO N. N., ROMANTZEV E. F., The mechanism of "biochemical shock". I. The correlation between the accumulation of some thiol radioprotectors in rat tissues and biochemical changes induced by them, *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 2533-2540, 1970.
- [29] GARBERS D. L., CHRISMAN T. D., HARDMAN J. G., Guanylate cyclase, [w] *Eucariotic Cell Function and Growth*, red. J. E. Dumont, B. C. Brown, N. J. Marshall, Plenum Press, New York and London 1974, 155-193.
- [30] GEORGE J. V., RAO K. V., The role of sulphhydryl groups in cellular adhesiveness, *J. Cell. Physiol.*, **85**: 547-556, 1974.
- [31] GERBER D. A., COHEN N., GIUSTRA R., The ability of nonsteroid anti-inflammatory compounds to accelerate a disulfide interchange reaction of serum sulphhydryl groups and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), *Biochem. Pharmacol.*, **16**: 115-123, 1967.
- [32] GREENSTOCK C. I., CHAPMAN J. A., RALEIGH J. A., SHERMAN E., PREUVERS A. P., Competitive radioprotection and radiosensitisation in chemical systems, *Radiat. Res.*, **59**: 556-571, 1974.
- [33] GREGERSON D. S., KELLY B., LEVY J. G., Responses of guinea-pig lymphocytes to mitogens, an antigen and mixed leucocyte culture in media with and without mercaptoethanol and foetal calf serum, *Immunology*, **29**: 237-246, 1975.
- [34] GUION - RAIN M. C., PORTEMER C., CHATAGNER F., Rat liver cysteine-sulfinate decarboxylase: purification, new appraisal of the molecular weight and determination of catalytic properties, *Biochim. Biophys. Acta.*, **384**: 265-276, 1975.
- [35] GUTMAN M., MERSMAN H., LUTHY J., SINGER P., Action of SH inhibitors on different forms of the respiratory chain linked reduced nicotinamide - adenine dinucleotide dehydrogenase, *Biochemistry*, **9**: 2678-2687, 1970.

- [36] HADDEN J. W., HADDEN E. M., JOHNSON L. D., JOHNSON E. M., Cyclic nucleotides in lymphocytes function and metabolism [w] *Lymphocytes and Their Interactions*, red. R. C. Williams, Jr., Raven Press, New York, 1975, 27-55.
- [37] HADDOX M. K., FURCHT L. T., GENTRY S. R., MOSER M. E., STEPHENSON J. H., GOLDBERG N. D., Periodate - induced increase in cyclic GMP in mouse and guinea - pig splenic cells in association with mitogenesis, *Nature*, **262**: 146-148, 1976.
- [38] HAEST C. M. W., DEUTICKE B., Possible relationship between membrane proteins and phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane, *Biochim. Biophys. Acta.*, **436**: 353-365, 1976.
- [39] HARRAP K. R., JACKSON R. C., RICHES P. G., SMITH C. A., HILL B. T., The occurrence of protein - bound mixed disulfides in rat tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, **310**: 104-110, 1973.
- [40] HARRIS J., ENGERS H., MacDONALD R., CERROTINI J. C., BRUNNER K. T., Mechanism of action of 2 - mercaptoethanol on the generation of cytotoxic T lymphocytes in mouse MLC, *Europ. Immunol. Meeting*, Amsterdam, September 17-19 (1975), abstracts.
- [41] HARRIS J. W., MacDONALD H. R., ENGERS H. D., FITCH F. W., CERROTINI J. C., Increased cytolytic T lymphocyte activity induced by 2 - mercaptoethanol in mixed leucocyte cultures: kinetics and possible mechanism of action, *J. Immunol.*, **116**: 1076-1077, 1976.
- [42] HEBER - KATZ E., CLICK R. E., Immune response in vitro. Role of mercaptoethanol in the mixed leucocyte reaction, *Cell Immunol.*, **3**: 410-418, 1972.
- [43] HUISMAN W., BOUMA J. M. W., GRUBER M., Influence of thiols, ATP and CoA on protein breakdown by subcellular fractions from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **297**: 93-97, 1973.
- [44] — Involvement of thiol enzymes in the lysosomal breakdown of native and denaturated proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **297**: 98-109, 1973.
- [45] ISSACS J. T., BINKLEY F., Cyclic AMP - dependent control of the rat hepatic glutathione disulfide - sulfhydryl ratio, *Biochim. Biophys. Acta*, **498**: 29-38, 1977.
- [46] JACKSON R. C., HARRAP K. R., SMITH C. A., Binding of glutathione and cysteine to cellular protein by mixed disulphide bonds, *Biochem. J.* **110**: 37-39, 1968.
- [47] JACKSON J. F., Toxicity of sulfhydryl compounds to cultured human lymphocytes, *Exp. Cell Res.*, **61**: 468-469, 1970.
- [48] JACKSON J. F., KILLANDER D., DNA synthesis in phytohemagglutinin - stimulated human leucocyte cultures treated with β - mercaptoethanol, *Exp. Cell Res.*, **33**: 459-467, 1964.
- [49] JACKSON J. F., LINDAHL - KIESSLING K., Action of sulphhydryl compounds on human leucocyte mitosis in vitro, *Exp. Cell Res.*, **34**: 515-524, 1964.
- [50] JOCELYN P. C., *Biochemistry of the SH group*, Academic Press, London - New York 1973.
- [51] KING T. P., On the sulphhydryl groups of human plasma albumin, *J. Biol. Chem.*, **236**: PC5, 1961.
- [52] KIRKPATRICK A., MACLAREN J. A., Thiol solutions — inhibition and autooxidation, *Anal. Biochem.*, **56**: 137-139, 1973.
- [53] KOLLMAN G., SHAPIRO B., The mechanism of action of AET. VI. The

- protection of proteins against ionising radiation by GED, *Radiat. Res.*, **27**: 474-486, 1976.
- [54] KOSOWER N. S., VANDERHOFF G. A., KOSOWER E. M., Glutathione. VII. The effects of GSSG on initiation of protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 625-637, 1972.
- [55] KRZYSTYNIAK K., ROSZKOWSKI - ŚLIŻ W., RYŻEWSKI J., Interaction of 6,6'-dithiodinicotinic acid with rat thymocytes pretreated with thiol compounds, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **24**: 109-114, 1976.
- [56] KRZYSTYNIAK K., RYŻEWSKI J., Effect of cysteine catabolites on blastic transformation of rat lymphocytes caused by phytohemagglutinin, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **6**: 545-549, 1976.
- [57] KUCHINSAS E. J., Du VIGNEAUD V., An increased vitamin B₆ requirement in the rat on a diet containing L-penicillamine, *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**: 1-9, 1957.
- [58] KUN E., Selected aspects of sulfur metabolism, [w] *Metabolic Pathways*, red. D. M. Greenberg, t. III, Academic Press, New York and London 1969, 375-404.
- [59] KWOCK L., WALLACH D. F. H., The effect of ionising radiation on amino acid transport systems in thymocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **352**: 135-145, 1974.
- [60] KWOCK L., WALLACH D. F. H., HEFTER K., Involvement of sulfhydryl groups in the action of insulin and radiation on thymocyte Na⁺-dependent amino acid transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **419**: 93-103, 1976.
- [61] LAVIS V. R., WILLIAMS R. H., Studies of the insulin-like action of thiols upon isolated fat cells, *J. Biol. Chem.*, **245**: 23-31, 1970.
- [62] LEE K. C., LANGMAN R. E., PAETKAN V. H., DIENER E., The cellular basis of cortisone-induced immunosuppression of the antibody response studied by its reversal in vitro, *Cell. Immunol.*, **17**: 405-417, 1975.
- [63] LORBER A., CHANG C. C., MASUOKA D., MEACHAM I., Effect of thiols in biological systems on protein sulfhydryl content, *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 1551-1560, 1969.
- [64] LORBER A., LEEB J., CARROL P., BAUMGARTENER W., HILL V., Protein sulphhydryl depression during adjuvant arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, **34**: 346-349, 1975.
- [65] LUTZ W., Przemiana glutationu i transport aminokwasów. Cykl γ -glutatio-nowy, *Post. Biochem.*, **22**: 387-400, 1976.
- [66] MASSEY V., WILLIAMS C. H., On the reaction mechanism of Yeast glutathione reductase, *J. Biol. Chem.*, **240**: 4470-4480, 1965.
- [67] MELDOLESI J., On the significance of the hypertrophy of the smooth endoplasmic reticulum in liver cells after administration of drugs, *Biochem. Pharmacol.*, **16**: 125-129, 1967.
- [68] METCALF D., Role of mercaptoethanol and endotoxin in stimulating B lymphocyte colony formation in vitro, *J. Immunol.*, **116**: 635-638, 1976.
- [69] MITZNEGG P., Effect of cysteamine on cAMP level in mouse liver, *Int. J. Radiat. Biol.*, **24**: 339-345, 1973.
- [70] MODIG H., Cellular mixed disulphides between thiols and proteins and their possible implication for radiation protection, *Biochem. Pharmacol.*, **17**: 177-186, 1967.
- [71] MOTTRAM D. R., Non-specificity of sulfhydryl inhibition of the alfa adrenergic response, *Biochem. Pharmacol.*, **25**: 2104-2105, 1977.

- [72] ORANGE R. P., CHANG P. L., The effect of thiols on immunologic release of slow reacting substance of anaphylaxis. I. Human lung, *J. Immunol.*, **115**: 1072-1077, 1975.
- [73] ORANGE R. P., MOORE E. G., The effect of thiols on the immunologic release of slow reacting substance of anaphylaxis. II. Other in vitro and in vivo models, *J. Immunol.*, **116**: 392-397, 1976.
- [74] ORD M. G., STOCKEN L. A., Variation in the phosphate content and thiol/disulfide ratio of histone during the cell cycle, *Biochem. J.*, **107**: 403-410, 1968.
- [75] PARKER C. W., Control of lymphocyte function, *New Eng. J. Med.*, **295**: 1180-1186, 1976.
- [76] PAZDERNIK T. L., UYEKI E. M., Radioprotection of bone marrow cells by cysteamine, *Int. J. Radiat. Biol.*, **26**: 331-341, 1974.
- [77] RALL T. W., LEHNINGER A. L., Glutathione reductase of animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **194**: 119-130, 1952.
- [78] RASSIN D. K., STURMAN J. A., Cysteine sulfinic acid decarboxylase in rat brain: effect of vitamin B₆ deficiency on soluble and particulate components, *Life Sci.*, **16**: 875-882, 1975.
- [79] RAVID A., NOVOGRODSKY A., Kinetics of the induction of DNA synthesis in lymphocytes by periodate, *Exp. Cell. Res.*, **97**: 1-5, 1976.
- [80] ROBSON L. C., SCHWARZ M. R., Vitamin B₆ deficiency and the lymphoid system. I. Effects on cellular immunity and in vitro incorporation of ³H - uridine by small lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **16**: 35-144, 1975.
- [81] — Vitamin B₆ deficiency and the lymphoid system. II. Effect of vitamin B₆ deficiency in utero on the immunological competence of the offspring, *Cell Immunol.*, **16**: 145-152, 1975.
- [82] RYŻEWSKI J., Wpływ cysteiny na powstawanie i przebieg podajuwantowego wielostawowego zapalenia u szczurów, *Reumatologia*, **4**: 227-234, 1966.
- [83] RYŻEWSKI J., KOSSOWSKA E., The effect of cysteine on early type immune response in rats, *Ann. Immunol.*, **4**: 25-29, 1972.
- [84] RYŻEWSKI J., ROSZKOWSKI - ŚLIŻ W., Competence of lymphoid cells treated with cysteine in the graft - versus - host reaction, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **22**: 45-49, 1974.
- [85] RYŻEWSKI J., ROSZKOWSKI - ŚLIŻ W., KRZYSTYŃIAK K., The action of thiols on lymphocyte membranes. *Immunology*, **31**: 146-149, 1976.
- [86] — The action of cysteine on PHA - stimulation of lymphocytes. I. Influence on DNA synthesis, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **25**: 377-383, 1977.
- [87] — The action of cysteine on PHA - stimulation of lymphocytes. II. Influence on incorporation of ³H - uridine and ¹⁴C - leucine, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **25**: 385-391, 1977.
- [88] RYŻEWSKI J., RYŻEWSKA A. G., BRAJCZEWSKA W., The effect of cysteine on immune response in draining lymph nodes in rats with post - adjuvant polyarthritis, *Ann. Immunol.*, **3**: 119-127, 1971.
- [89] SAKAKIBARA S., YAMAGUCHI K., HOSOKAWA Y., KOHASI N., UEDA I., SAKAMOTO Y., Purification and some properties of rat liver cysteine oxidase (dioxigenase), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**: 273-279, 1976.
- [90] SCOTT E. M., DUNCAN I. W., EKSTRAND V., Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **238**: 3928-3933, 1963.

- [91] SHAPIRO B., KOLLMAN G., ASNEN J., Mechanism of the effect of ionising radiation on sodium uptake by human erythrocytes, *Radiat. Res.*, **27**: 139-158, 1966.
- [92] SOŁTYSIAK - PAWLUCZUK D., BITNY - SZLACHTO S., Effects of ionising radiation and cysteamine (MEA) on activity of mouse spleen adenyl cyclase, *Int. J. Radiat. Res.*, **29**: 549-553, 1976.
- [93] SOULILLOU J. P., CARPENTER C. B., LUNDIN A. P., STROM T. B., Augmentation of proliferation and in vitro production of cytotoxic cells by 2 - ME in the rat, *J. Immunol.*, **115**: 1566-1571, 1975.
- [94] SÖRBO B., EWETZ L., The enzymatic oxidation of cysteine to cysteinesulfinate in the rat liver, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **18**: 359-363, 1965.
- [95] STORM D. R., DOLGINOW Y. D., Glucagon stimulation of adenylate cyclase sulfhydryl reactivity. Evidence for hormone - induced conformational changes, *J. Biol. Chem.*, **248**: 5208-5210, 1973.
- [96] STRAUSS R. R., FRIEDMAN H., MILLA H., ZAYON G., Suppression of murine virus leukaemogenesis by thioglycollate, a bacteriological culture medium that affects macrophage peroxidase, *Nature*, **255**: 343-344, 1975.
- [97] SUAREZ - ISLA B. A., HUCHO F., Acetylcholine receptor: -SH group reactivity as indicator of conformational changes and functional states, *FEBS Letters*, **75**: 65-69, 1977.
- [98] SUTHERLAND R. M., PIHL A., Repair of radiation damage to membrane sulphhydryl groups of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 568-570, 1967.
- [99] — Repair of radiation damage to erythrocyte membranes: The reduction of radiation - induced disulfide groups, *Radiat. Res.*, **34**: 300-314, 1968.
- [100] TATEISHI N., HIGASAKI T., NARUSE A., NAKASHIMA K., SHIOZAKI H., SAKAMOTO Y., Rat liver glutathione. Possible role as a reservoir of cysteine, *J. Nutr.*, **107**: 55-60, 1977.
- [101] THOENE J. G., OSHIMA R. G., CRAWHALL J. C., OLSON D. L., SCHNEIDER J. A., Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.*, **58**: 180-189, 1976.
- [102] TIETZE F., Disulfide reduction in rat liver. I. Evidence for the presence of nonspecific nucleotide - dependent disulfide reductase and GSH - disulfide transhydrogenase activities in the high - speed supernatant fraction, *Arch. Bioch. Biophys.*, **138**: 177-188, 1970.
- [103] WAINER A., Mitochondrial oxidation of cysteine, *Biochim. Biophys. Acta*, **141**: 466-472, 1967.
- [104] YAMAGUCHI K., SAKAKIBARA S., ASAMIZU J., UEDA J., Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver in the measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **297**: 48-59, 1973.
- [105] YAMAGUCHI K., SAKAKIBARA S., KOGA K., UEDA J., Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. I. The effects of cysteine, hydrocortisone and nicotinamide injection on hepatic cysteine oxidase and tyrosine transaminase activities of intact and adrenalectomized rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **237**: 502-512, 1971.
- [106] YAMAGUCHI K., SHIGEHISA S., SAKAKIBARA S., HOSOKAWA Y., UEDA J., Cysteine metabolism in vivo of vitamin B₆ - deficient rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **381**: 1-8, 1975.

- [107] YOUNG J. D., NIMMO T. A., HALL J. G., The relationship between GSH, GSSG and non-GSH thiol in GSH-deficient erythrocytes from Finnish Landrace and Tasmanian Merino sheep, *Biochim. Biophys. Acta*, **404**: 124-131, 1975.

Otrzymano: 20 stycznia 1978.

Przyjęto: 11 marca 1978.

Adres autora: Zakład Patofizjologii Instytutu Reumatologicznego, ul. Spartańska 1, 02 - 637 Warszawa.

ULTRASTRUKTURA PLEMNIKA SSAKA

ULTRASTRUCTURE OF MAMMALIAN SPERMATOZOON

Franciszek KACZMARSKI

Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Instytut Pediatrii Akademii Medycznej
im. Mikołaja Kopernika w Krakowie

Streszczenie. W artykule przedstawiono ultrastrukturę plemnika ssaka, jednej z najbardziej wyspecjalizowanych i zróżnicowanych morfologicznie komórek *Metazoa*. W ostatnich latach nowe metody badawcze (obserwacje powierzchni błon zamrożonych i rozłupanych, znakowanie powierzchni, frakcjonowanie komórkowe) umożliwiły dokładniejszy opis wielu znanych już wcześniej struktur oraz wyodrębnienie nowych. Stosunkowo najwięcej nowych danych zebrano o plazmolemie plemnika charakteryzującej się specyficznymi regionalnymi specjalizacjami właściwości powierzchniowych oraz w organizacji białek integralnych. W jądrach plemników niektórych gatunków opisano budowę blaszkowatą zawartości. Dokładniej określono funkcję substancji wokółjądrowej odpowiedzialnej najprawdopodobniej za spajanie akrosomu z przednią częścią jądra oraz usztywnienie szczytowej części główki. Zawartość akrosomu wykazuje w niektórych rejonach zagęszczenia lub strefy o organizacji parakrystalicznej, co może być związane z przestrzennie ekonomicznym upakowaniem enzymów. Szyjka wyodrębnia się wyraźnie od główki i witki poprzez m. in. niektóre cechy morfologiczne plazmolemy, ostre zaznaczenie górnej granicy pierścieniem dolnym czy brakiem ciągłości pomiędzy kolumnami segmentalnymi a włóknami obwodowymi gęstymi witki. Otoczka włókien obwodowych gęstych witki nie jest zdolna do skurczu, lecz nadaje dużej części witki sprężystość niezbędną dla zdolności plemnika ssaka do zmian położenia w środowisku o dużej lepkości. Sprężystość włókien obwodowych gęstych zapewniać mają budujące je specyficzne białka (panerginy).

Summary. The article presents the ultrastructure of the mammalian spermatozoon, one of the most specialized and morphologically complex cells of *Metazoa*. In recent years, the applications of new research techniques (freeze-fracture and freeze-etching, surface labeling cell fractionation) has made it possible to describe in more detail many previously known structures and to detect new ones. The new data refer largely to the spermatozoon plasmalemma which is characterized by specific regional specializations of the surface properties and of the organization of integral proteins. A lamellar structure of the nucleoplasm has been reported in the spermatozoa of certain mammals. According to recent concepts, the perinuclear

substance most likely functions in cementing the acrosome with the anterior part of the nucleus and in stiffening the apical portion of the head. The contents of the acrosome show electron-dense areas or zones of paracrystalline structure, which may reflect the compact spatial arrangement of enzymes. The neck differs clearly from both the head and tail in, among other things, certain morphological features of the plasmalemma, a sharp demarcation of its upper limit by the posterior ring, and lack of continuity between the segmental columns and the outer dense fibres of the tail. The latter are not capable of contraction but add to the elasticity of the tail which permits the mammalian spermatozoon to change its position in an environment of high viscosity. The elasticity of peripheral fibres seems to be derived from specific proteins (panergins) which make up these fibres.

WSTĘP

W bieżącym roku mija 300 lat od opublikowania pierwszego doniesienia o obserwacji plemników ludzkich i plemników psa. W 1678 r. Leeuwenhoeck przedstawił (w *Philosophical Transactions*, vol. 12, nr 142, str. 1040–1043) wyniki obserwacji swojego studenta Johana Hama i własnych nad spermą psa i człowieka. Leeuwenhoeck uważał, że plemnik jest naturalnym składnikiem spermy normalnej. Poglądem tym w znacznym stopniu wyprzedził swoją epokę, bowiem dopiero w 1875 r. Hartwig, przedstawiając wnikanie plemnika do komórki jajowej i zlanie się ich jąder, dowiódł zasadniczej roli plemnika w inicjacji rozwoju jaja. W latach następnych, w okresie stosowania mikroskopu świetlnego do badań morfologii plemnika, liczni autorzy, a szczególnie Benda, Retzius, Jensen, Bowen, Gatenby i Beams, opisali tę komórkę na tyle dokładnie, iż Steve w 1930 r. w schematycznym rysunku plemnika ludzkiego mógł wyróżnić i nazwać 12 struktur [6].

Zastosowanie mikroskopu elektronowego do badań morfologii plemnika spowodowało bardzo intensywny rozwój wiedzy o tej komórce. Świadczą o tym kolejnie monografie plemnika ssaka opublikowane w ostatnich 20 latach [6, 23–25]. W języku polskim najszerszym opracowaniem ultrastruktury plemnika ssaka jest jak dotychczas artykuł Krzysztofiwicz [47]. Wiedza o morfologii plemnika i funkcjonalnym znaczeniu jego struktur stale narasta. Dzięki morfologicznym obserwacjom plemników innych niż najczęściej uprzednio badanych plemników ssaków hodowanych lub laboratoryjnych, opisuje się coraz to nowe struktury [50, 53], a także nadaje się znaczenie funkcjonalne poszczególnym, wcześniej opisanym organellom tej komórki. Znaczenie funkcjonalne organelli określa się coraz dokładniej dzięki postępowi metod pozwalających analizować powierzchnie błon [39, 61] oraz przez udoskonalenie metod frakcjonowania, wskutek czego uzyskuje się stosunkowo czyste frakcje, wzbogacone w wybrane organelle komórkowe plemnika, analizowane następnie bio-

chemicznie i pod mikroskopem elektronowym [7, 8, 11, 51, 52]. Plemnik był i jest komórką nadzwyczaj interesującą i skupia na sobie uwagę badaczy wielu specjalności. Jak najdokładniejsze poznanie tej komórki jest istotne dla hodowców, biologów i lekarzy. Analiza morfologiczna plemnika, jako najbardziej wyspecjalizowanej komórki w obrębie *Metazoa* [37], jest dla morfologa unikalną okazją do badania powiązań między morfologią organelli komórkowych a ich funkcją. Na przykładzie morfologii plemnika ssaka można najpełniej zilustrować zależność określoną przez Franzèn [30] pomiędzy morfologią plemnika a biologią rozrodu. W związku z wewnętrznym sposobem zapłodnienia; koniecznością pokonania długiej drogi w ciele samicy, bariery immunologicznej, niekorzystnego pH, lepkości środowiska, nadzwyczaj złożonej topografii powierzchni jajowodu, plemnik podlega w procesie dojrzewania daleko idącym przemianom. W stosunku do początku spermiogenezy — w dojrzałym plemniku zanikają niektóre struktury, inne zmieniają kształt i lokalizację, a także powstają zupełnie nowe struktury. Zanikają tak ważne dla funkcjonowania komórki organelle, jak gładkie i szorstkie retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, jąderko, prawie zupełnie zanikają pory otoczki jądrowej, a w niektórych przypadkach (plemnik szczura) zanikają też obie centriole. Modyfikacjom ulegają centriole, mitochondria i otoczka jądrowa. Zupełnie nowymi strukturami są: 9 włókien gęstych (dense fibres, accessory fibres), pierścień dolny (posterior ring), czapeczka dolna (post nuclear cup), pierścień Jensena (pierścień dalszy) i otoczka włóknista [24]. Przedstawione przemiany prowadzą w efekcie do bogatego zróżnicowania morfologicznego plemników, staje się on tak bardzo charakterystyczny dla danego gatunku, iż gdyby był łatwiej dostępny dla analizy, mógłby spełniać podobną rolę w taksonomii zwierząt jak ziarna pyłu w taksonomii roślin [1].

PLAZMOLEMA

Jak wykazały badania w ostatnich latach, plazmolema plemnika ssaka różni się od plazmolemy komórek somatycznych tworzeniem mniej więcej stale zlokalizowanych regionalnych specjalizacji zarówno powierzchni, jak i budowy wewnętrznej [73].

Analizując sposób wędrówki plemników w polu elektrycznym, wykazano nierównomierny rozkład ładunków na jego powierzchni. Plemniki w polu elektrycznym wędrowały w kierunku anody witką do przodu. Wskazywało by to na przewagę ładunków ujemnych na powierzchni witki. Taki wzór rozmieszczenia ładunków na powierzchni potwierdza barwienie koloidalnym wodorotlenkiem żelaza oparte na powinowactwie

jonowym między dodatnio naładowanymi jonami żelazowymi a ładunkami rozmieszczonymi na powierzchni plemnika [20, 73]. Stopień wysycenia powierzchni plemnika żelazem, obserwowany pod mikroskopem elektronowym, był niejednolity i charakterystyczny dla gatunku. W plemnikach królików plazmolema pokrywająca akrosom była słabo wysycona, natomiast w plemnikach świnki morskiej akrosomalny rejon plazmolemy był wysycony znacznie silniej. Przy próbach funkcjonalnej interpretacji takiego sposobu rozmieszczenia żelaza koloidalnego należy być jednakowoż ostrożnym, ponieważ w omawianych doświadczeniach barwiono plemniki uprzednio utrwalone [25].

Na powierzchni plazmolemy plemników z ejakulatu, podobnie jak na powierzchni komórek somatycznych, stwierdzono cienką warstwę glikoproteidową (surface coat, glycocalyx), która zawiera punkty receptorowe dla konkanawaliny A [34]. Wykazano, że rozmieszczenie tych punktów jest niejednolite i np. w plemniku królika powierzchnia główki posiada znacznie więcej punktów receptorowych niż powierzchnia wici [34]. Rezultaty analiz rozmieszczenia punktów receptorowych konkanawaliny A i wysycenia żelazem koloidalnym także wskazują, że powierzchnia plazmolemy, szczególnie tej pokrywającej główkę plemnika, jest mozaikowata [20, 46]. Badania określające rozmieszczenie antygenów [46], receptorów dla prostaglandyn [35], na powierzchni plazmolemy główki wykazały, że plazmolema ponad akrosomem różni się od plazmolemy pokrywającej inne części główki.

Powierzchnia plazmolemy, badana metodą wyznaczania punktów receptorowych konkanawaliny A, podlega przemianom w ciągu życia plemnika. Sekwencję tych przemian prześledzono dosyć dokładnie na plazmolemie plemników królika [35]. Plemniki królika, wydobyte z najądrza i świeżego ejakulatu i przemywane następnie buforem fosforanowym przed przeprowadzeniem reakcji, wykazują obecność licznych punktów receptorowych konkanawaliny A na główce, całkowity brak w rejonie szyjki i nieliczne punkty na wicie. Plemniki pochodzące z tych samych źródeł nie przemywane przed reakcją buforem nie wykazują obecności punktów receptorowych konkanawaliny A, co wskazuje na to, że mycie w buforze odsłania znajdujące się na powierzchni punkty receptorowe. Taka reakcja przeprowadzona na plemnikach wydobytych z dróg rodnych samicy, po pewnym okresie przebywania w nich, także wykazała brak lub tylko niewielką ilość punktów receptorowych konkanawaliny A na przodzie główki, a nieznacznie więcej u podstawy. W czasie przebywania plemników w drogach rodnych samicy ma miejsce najprawdopodobniej ubywanie materiału powierzchniowego zawierającego punkty receptorowe konkanawaliny A i w ten sposób plazmolema staje się coraz bardziej podobna do zewnętrznej błony akrosomalnej. Upodabnianie się plazmolemy do zewnętrznej błony akrosomu może ułatwiać zlanie się tych

błon w procesie reakcji akrosomalnej [35] i może stanowić jedną z kilku zapewne składowych procesu kapacytacji.

W typowej trójwarstwowej błonie elementarnej (unit membrane) — plazmolemie plemnika, warstwa zewnętrzna jest najgrubsza — 50Å, środkowa jasna ma 30 Å, a wewnętrzna — 20 Å [6]. Metody polegające na rozłupaniu zamrożonych plemników i obserwacji powierzchni rozłamu błon bez sublimacji lub z sublimacją (freeze - fracture, freeze - etching) pozwalają na analizę rozmieszczenia cząsteczek integralnie związanych z błonami. Dotychczas opublikowano wiele prac wykazujących obecność w plazmolemie i w innych błonach ssaków układów cząsteczek różnych rozmiarów [25, 28, 31, 42, 43, 58, 64]. Wykazano obecność licznych cząsteczek o średnicy 50–90Å ulokowanych w plazmolemie pokrywającej główkę, a szczególnie licznie w plazmolemie pokrywającej akrosom. Cząsteczki te zorganizowane są parakrystalicznie w plazmolemie główek plemników świnki morskiej i szczura [25, 31], nieregularne zaś zespoły cząsteczek stwierdzono w plazmolemie główek plemników myszy [64] i królika [28]. W plazmolemie pokrywającej główkę u podstawy, w rejonie pierścienia dolnego (posterior ring), cząsteczki uporządkowane są w szeregi [25, 28, 42]. Plazmolema, pokrywająca rejon szyjki i wstawki, ma mniejszą ilość cząsteczek niż plazmolema pokrywająca główkę, zorganizowanych niekiedy, na poziomie wstawki, w zespoły parakrystaliczne [64] albo bardzo charakterystyczne, liniowo rozmieszczone cząsteczki o przebiegu zależnym od niżej położonych mitochondriów spirali mitochondrialnych [25, 31, 44]. W plazmolemie pokrywającej środkową część witki na wysokości włókna nr 1, otoczki włókien gęstych, cząsteczki ułożone są w długim szeregu [25, 31, 64]. Takie zespoły cząsteczek zlokalizowane w plazmolemie nie zajmują stałej pozycji, zmieniają ją pod wpływem czynników kapacycyjnych [45]. Przypuszcza się, że przedstawione zespoły cząsteczek są białkami enzymatycznymi i że mogą one zmieniać położenie w różnych warunkach fizjologicznych, jak np. podczas działania na plemniki czynnikami kapacycyjnymi [45].

Plazmolema plemników wykazuje ponadto różnicowanie międzygatunkowe co do odporności na działanie czynników osmotycznych. Jest to według Lunga [48] związane z ilością wiązań dwusiarczkowych, np. plazmolema plemników buhaja jest znacznie bardziej odporna na szok osmotyczny niż plazmolema plemnika barana i świni [38]. Wiadomo również, że różne rejony plazmolemy rozmaicie reagują na działanie detergentów. Plazmolema pokrywająca główkę plemnika w rejonie akrosomu jest znacznie mniej na nie odporna (np. na Triton - X - 100) niż plazmolema z poziomu czapeczki dolnej [68]. Na odporność plazmolemy obok odpowiedniej budowy molekularnej może wpływać sieć włókienek rozpostarta bezpośrednio pod plazmolemą witki plemnika torbacza (*Trichosurus vulpecula*) [50].

GŁÓWKA

1. **Jądro.** Jądro plemnika podlega zasadniczym przemianom w procesie spermiogenezy: ustaje całkowicie synteza DNA i RNA, zanika jąderko, ma miejsce odwodnienie i kondensacja chromatyny. W wyniku tych przemian jądro plemnika wykazuje charakterystyczny obraz pod mikroskopem elektronowym: zwartą, gęstą elektronowo i homogenną zawartość oraz bardzo małe rozmiary (ryc. 1). Małe rozmiary jądra plemnika są następstwem haploidalnej ilości DNA i stopnia kondensacji chromatyny. Różnice w stopniu kondensacji powodują, iż pomimo podobnych ilości DNA w jądrach, objętość jądra plemnika człowieka ($7 \mu\text{m}^3$) jest o połowę mniejsza niż jąder plemników buhaja i królika [43]. Rozmiary jąder plemników ssaków nie są związane z wielkością zwierzęcia. Najwyraźniej dokumentuje to fakt, iż największy plemnik znaleziono u niewielkiego chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*), podczas gdy najmniejszy — u wieloryba (*Physaster macrocephalus*) [15]. Jądro plemników ssaków jest wydłużone, ku przodowi zwężone i najszersze u podstawy. W transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) jednolicie gęsta elektronowo zawartość jądra prawie wszystkich ssaków w niektórych jednak miejscach ma niewielkie, jasne, owalne strefy (wakuole jądrowe) (ryc. 1, 3). Są to najprawdopodobniej miejscowe zaburzenia kondensacji chromatyny. Wakuole bardzo dużych rozmiarów znane są tylko w normalnie sprawnych plemnikach człowieka, gdzie są one tak duże, że powodują nawet deformację kształtu główki plemnika [70]. Czasami przy bardzo cienkich skrawkach i niepełnym kontrastowaniu udaje się wykazać w TEM blaszkowatą budowę zawartości jądra [42]. Taką budowę potwierdzono także w badanych metodą kryorytowania jądrach plemników królika [42] i buhaja [58].

2. **Otoczka jądrowa.** Najbardziej uderzającą cechą morfologiczną otoczki jądrowej plemnika ssaka jest brak por jądrowych oraz bardzo znaczne zbliżenie się do siebie obu błon otoczki jądrowej, co w efekcie daje zanik cystern wokółjądrowych [24].

W plemniku człowieka i zwierząt [24, 55] na poziomie tylnej części czapeczki dolnej zewnętrzna błona otoczki jądrowej zlewa się z plazmolemą poprzez substancję homogenną (ryc. 2). Otoczka jądrowa pozbawiona jest całkowicie por jądrowych wokół całego jądra plemnika poza jednym rejonem, tj. u podstawy jądra, poniżej pierścienia dolnego, gdzie otoczka jądrowa w plemnikach niektórych gatunków odstaje od jądra i tworzy wypuklenie (ryc. 3). Ta część otoczki jądrowej to zbywająca otoczka jądrowa, a większa lub mniejsza przestrzeń zamknięta przez to wypuklenie nazywa się przestrzenią jądrową tylną (ryc. 3). W plemniku

buhaja w przestrzeni tej znajdują się wypukłości podstawowe (bazal knobs) (ryc. 3) zbudowane z mniej spójnie zorganizowanego materiału niż gęsta elektronowo treść wypełniająca jądro [16]. W zbywającej otoczce jądrowej występują typowe pory jądrowe, a obie błony otoczki zachowują normalną odległość.

Zagadkowo, duże ilości zbywającej otoczki jądrowej występują w plemnikach niektórych ssaków [24]. Otoczka jądrowa wchodzi ponownie w ścisły kontakt ze skondensowaną chromatyną na dolnej powierzchni jądra i tutaj por znowu nie ma, a obie błony otoczki bardzo do siebie zbliżają się.

3. S u b s t a n c j a w o k ó ł j ą d r o w a. W ciągu kilkunastu lat stosowania mikroskopu elektronowego do obserwacji plemników ssaków w tzw. przestrzeni podakrosomalnej, położonej pomiędzy zewnętrzną błoną otoczki jądrowej a akrosomem lub czapeczką dolną, przedstawiano na elektronogramach warstewkę substancji o średniej gęstości elektronowej. Badacze albo nie przypisywali jej jakiejś określonej funkcji [27], albo nie opisywali jej [26]. Tylko Jones [38] opisał kontynuację subakrosomalnego materiału, znanego od dawna jako perforatorium albo ciało szczytowe (apical body), z materiałem zawartym poniżej akrosomu pod czapeczką dolną. Wnikliwa analiza strefy bezpośrednio wokół otoczki jądrowej wykazuje, że zawsze występuje tam materiał o średniej gęstości elektronowej (ryc. 4, 5), określony ostatnio jako substancja wokółjądrowa (perinuclear substance) [17, 19]. Substancja wokółjądrowa jest białkiem bogatym w lizynę z licznymi stabilizującymi wiązaniami dwusiarczkowymi. Substancja wokółjądrowa ma cementować otoczkę jądrową z błoną akrosomalną oraz poprzez swoją sztywność ułatwiać plemnikowi mechaniczne przenikanie przez otoczki jajowe [71].

4. A k r o s o m. Zróżnicowanie morfologiczne plemników ssaka wyraża się w największym stopniu różnorodnością kształtów i wielkością akrosomów. Szczególnie dużą część szczytową akrosomu, najbardziej charakterystyczną gatunkowo, posiadają plemniki świnki morskiej, szynszyla i wiewiórki. Jest to zastanawiające, ponieważ budowa otoczek jajowych u tych spokrewnionych ze sobą gatunków jest zbliżona [24]. Fakt ten każe zastanowić się, czy akrosomowi mogą być przypisane jeszcze inne funkcje niż tylko najlepiej obecnie poznana, tj. ułatwianie przenikania plemnika przez otoczki jajowe. Rozpatrując funkcjonalną morfologię akrosomu należy wziąć pod uwagę, że na akrosom jak i na cały plemnik oddziałuje środowisko dróg rodnych samic, tj. bariera immunologiczna, lepkość, pH, bardzo złożona topografia dróg rodnych.

Ze względu na położenie względem jądra wyróżnia się trzy zasadnicze części akrosomu (ryc. 4, 5). Ponad wierzchołek jądra wystaje część

szczytowa akrosomu, najbardziej charakterystyczna pod względem kształtu, poniżej jest część zasadnicza pokrywająca większą część jądra od przodu i z boku, poniżej części zasadniczej jest część równikowa (equatorial segment), charakteryzująca się dużym zbliżeniem obu błon akrosomalnych i równoległym ich przebiegiem. Część równikowa akrosomu nie uczestniczy w reakcji akrosomalnej [10, 29, 71].

Błona otaczająca akrosom ma typową budowę, charakterystyczną dla błony aparatu Golgiego [6], co wyraża się heksagonalnym ułożeniem wewnątrz błony cząsteczek średnicy 90Å. W obrębie akrosomu znajdują się strefy o wyższej gęstości elektronowej [6] lub rejony o organizacji parakrystalicznej [56]. Substrukturę zawartości akrosomu opisano w plemnikach buhaja [58, 69], królika [28] i świni [49].

5. **Cz a p e c z k a d o l n a.** Bezpośrednio poniżej dolnej krawędzi części równikowej akrosomu znajduje się czapeczka dolna (post nuclear cup). Jest ona strukturą wyraźnie wyodrębniającą się morfologicznie (ryc. 1, 5) oraz szczególnie interesującą, ponieważ plemnik przylega do jaja plazmolemą pokrywającą czapeczkę dolną [9, 65, 70, 71]. Dlatego skupia ona uwagę badaczy starających się dokładniej określić jej morfologię i wyjaśnić funkcję [6, 24, 25, 58]. We wcześniejszych morfologicznych opisach czapeczki dolnej ukazywano ją jako strukturę o wysokiej gęstości elektronowej i jednorodnej budowie [24]. Zastosowanie metody kryorytowania ujawniło, że czapeczka dolna plemników, np. buhaja, zbudowana jest z jednej warstwy rureczek ułożonych palisadowato [58]. Występowanie rureczek w czapeczce dolnej potwierdzają badania nad działaniem szoku termicznego na plemniki ogiera [14] oraz doświadczenia nad działaniem detergentu Triton - X - 100 na plemniki buhaja [68]. Czapeczka dolna razem z plazmolemą i regularnie rozmieszczonymi mostkami łączącymi te dwie struktury [24, 26] tworzy bardzo zwarty i odporny na różne czynniki kompleks. Odpowiednia płaszczyzna przekroju uwidacznia na przykładzie plemników ludzkich, iż mostki pomiędzy plazmolemą a czapeczką mogą być przekrojami poprzecznymi żeberk przebiegających równoległe i obwodowo wokół czapeczki dolnej [55].

6. **P i e r ś c i e ń d o l n y** (posterior ring). Bezpośrednio poniżej czapeczki dolnej plazmolema na całym obwodzie wokół podstawy jest silnie wpuklona i ma postać rowka, tworząc tzw. pierścień dolny (ryc. 2) wyznaczający granicę pomiędzy główką a szyjką. Pierścień dolny, opisany po raz pierwszy przez Greesona i Zlotnika [36], jest strukturą typową w plemniku ssaka [24, 41, 44, 67]. Plazmolema w rejonie pierścienia dolnego, analizowana metodą zamrożenia i rozłupania, wykazuje obecność uszeregowanych cząstek (w odstępach co 100 Å) w plemnikach szczura [32], królika [28], myszy [64] oraz małpy i człowieka [54].

7. **Podstawa główki.** Podstawa główki jest wpuklona (tworząc zagłębienie implantacyjne), a powierzchnia zewnętrzna zewnętrznej błony otoczki jądrowej jest pogrubiała (tworząc płytę podstawową) (ryc. 2, 6, 8). Pomiędzy płytką podstawową a poniżej leżącym capitulum (ryc. 2, 6) opisywano cienkie filamenty, które można wybiórczo rozpuścić, w zależności od gatunku, trypsyną, chymotrypsyną, pronazą lub subtylizyną, co powoduje oddzielenie główek od witek [21]

SZYJKA

Poniżej pierścienia dolnego znajduje się pośredni odcinek pomiędzy witką a główką, tj. szyjka (neck) (ryc. 2, 6, 8, 9). Szyjkę budują przede wszystkim: centriola, kolumny segmentalne i capitulum. Opisywano je już wielokrotnie [6, 24, 25, 27, 47]. Capitulum jest homogenną nieciągłą warstwą zazwyczaj podzieloną na trzy części. Położone jest ono pomiędzy płytką podstawową a dziewięcioma kolumnami segmentalnymi (ryc. 2, 6-8). Każdy z segmentów kolumn wykazuje delikatne prążkowanie, a jasną przestrzeń pomiędzy kolumnami rozdziela delikatny ciemny prążek (ryc. 7) [24]. Dziewięć kolumn segmentalnych przylega skośnie dolnym końcem do dziewięciu włókien gęstych, lecz nie zlewają się z nimi (ryc. 8), jak uprzednio opisywano [24, 47]. W skład szyjki wchodzi jeszcze centriola bliższa ułożona poprzecznie do długiej osi plemnika (ryc. 2, 6) oraz pozostałości centrioli dalszej, występujące w postaci elektronowo gęstych pasm ułożonych na wewnętrznej powierzchni dziewięciu podwójnych mikrotubul zespołu włókien osiowych (ryc. 2, 7). W szyjce znajdują się ponadto struktury charakterystyczne dla witki, tj. pionowe mitochondria spirali mitochondrialnej wstawki (ryc. 9), oraz środkowa mikrotubula podwójna zespołu włókien osiowych (ryc. 7). Struktury szyjki powinny wykazywać dużą odporność na wyginanie, ponieważ jest to strefa bardzo intensywnej ruchliwości podczas poruszania się plemnika. Odporność tę, obok celowej budowy upodabniającej kontakt capitulum i płytki podstawowej do stawu panewkowego (ryc. 2, 6, 8), zapewniają według Bedforda i Calvina [12] liczne stabilizujące wiązania dwusiarczkowe powstające podczas dojrzewania plemników w najądrzu.

WITKA

WSTAWKA

1. **Mitochondria.** Pierwszy odcinek witki (wstawka) wyróżnia się przede wszystkim spiralnie ułożonymi mitochondriami (ryc. 10). Obecność mitochondriów w tej części plemnika jest oczywista, ponieważ wia-

domo, że plemnik poruszając bardzo intensywnie witką wymaga nakładu energii dostarczanej przez mitochondria. Jednakże porównanie ilości mitochondriów i ilość zwojów spirali mitochondrialnej we wstawce pomiędzy plemnikami różnych gatunków, niekiedy blisko ze sobą spokrewnionych [57], wykazuje, że brak jest prostej korelacji pomiędzy ilością mitochondriów a potrzebami plemnika dla poruszania się i dotarcia do jaja w drogach rodnych samicy [11, 25]. Rozbieżność ta skłania do rozważania innych jeszcze możliwych funkcji mitochondriów w plemniku. Może to być np. przenoszenie informacji genetycznej (wiadomo, że plemnik wchodzi do jaja razem z mitochondriami). Premkhumar i Phargava [59] stwierdzili, że dojrzałe plemniki pobrane ze świeżego ejakulatu buhaja syntetytują w mitochondriach RNA i białka. Świadczy to, że zależna od DNA mitochondrialnego transkrypcja i translacja ma miejsce, pomimo iż działanie jądra w tym zakresie wcześniej ustało całkowicie. W plemnikach ssaków mitochondria ulegają w procesie spermiogenezy modyfikacjom [30]. W wyniku tego różnią się od mitochondriów komórek somatycznych ilością, wielkością, kształtem i układem grzebieni. Przemianom ulega również błona zewnętrzna mitochondriów, grubiejąc z 70 do 100Å i stając się pięciowarstwową [22].

Według Bedforda i Calvina [12, 13] zewnętrzna błona mitochondrialna plemnika ssaków łożyskowych stabilizowana jest wiązaniami dwusiarczkowymi. Zauważono również, że zewnętrzna błona mitochondrialna jest znacznie odporniejsza na warunki hypotoniczne [40] i działanie detergentów niż plazmolema leżąca ponad nią [57]. Pogrubienie i wzmocnienie zewnętrznej błony mitochondrialnej może wynikać z konieczności odpowiedniej adaptacji tego rejonu wstawki, narażonego przecież na silne deformacje podczas bicia witki. Z czym również łączyć się może spiralny układ mitochondriów [57].

2. Włókna obwodowe gęste witki (outer dense fibres, accesory fibres). Włókna gęste pojawiają się i wyodrębniają coraz wyraźniej w miarę rozwoju zapłodnienia wewnętrznego. Stopień rozwoju tych włókien osiąga najwyższy poziom u ssaków [6, 24, 25]. Dziewięć włókien gęstych zaczyna się w górnym rejonie wstawki skośnym stykiem z kolumnami segmentalnymi i biegnie przez całą wstawkę oraz przez dużą część odcinka środkowego witki, pozostając w położeniu zewnętrznym względem każdej z dziewięciu podwójnych mikrotubul zespołu włókien osiowych (ryc. 11). W odróżnieniu od dziewięciu zewnętrznych włókien zespołu włókien osiowych, włókna obwodowe gęste różnią się między sobą wielkością i kształtem. Włókna pierwsze, piąte i szóste są zazwyczaj wyraźnie większe (ryc. 11). Wielkość i kształt włókien gęstych bywa cechą charakterystyczną gatunkowo [24, 25]. Włókna obwodowe

gęste są najgrubsze na poziomie wstawki i stopniowo cienieją w odcinku środkowym witki z tym, że włókna trzecie i ósme zaczynają cienieć wcześniej niż pozostałe. Ku końcowi swojego przebiegu włókna gęste stają się coraz cieńsze i zbliżają się coraz bardziej do odpowiadających im mikrotubul podwójnych, tak iż tuż przed zanikiem wydają się je dotykać (ryc. 11). Równoległe do włókien obwodowych gęstych we wtkach w większości ssaków przebiegają cienkie włókna satelitarne, jakkolwiek u niektórych gatunków, wyróżniających się szczególnie grubymi wtkami na poziomie wstawki, włókna satelitarne mogą być dosyć grube [18, 24]. Położenie włókien gęstych w bezpośrednim sąsiedztwie włókien aksonemy, odpowiedzialnych za ruch witek, sugerowało badaczom ich ewentualne zdolności do skurczu [7, 8]. Wyniki badań biochemicznych i morfologicznych wskazują jednak wyraźnie, iż włókna gęste są elementami biernymi, zwiększającymi tylko sztywność i elastyczność witki [7, 8, 25], pomimo iż wykazano w nich metodami histochemicznymi aktywność ATP - azy [3, 4]. Włókna gęste wykazują wysoką gęstość elektronową, chociaż na przekrojach poprzecznych widać, że zewnętrzna strefa włókien ma niższą gęstość elektronową (ryc. 2, 8). W barwieniu negatywowym i w metodzie replik powierzchniowych uwidacznia się ponadto poprzeczne prążkowanie włókien obwodowych gęstych [7, 8, 25].

Dzięki udoskonaleniu metody izolacji włókien gęstych udało się je ostatnio poddać dokładniejszej analizie biochemicznej i mikroskopowo elektronowej. Baccetti i wsp. [7, 8] wykazali, że włókna te zawierające prawie cały cynk plemnika posiadają też liczne grupy $-SH$, co autorzy wiążą z mniejszą niż w innych strukturach plemnika ilością stabilizujących wiązań dwusiarczkowych. Duża ilość grup $-SH$ oznacza, iż proces ich utlenienia do $-S-S-$ nie nastąpił całkowicie, cynk zaś występujący tam tak obficie byłby związany z grupami $-SH$. Niepełny rozwój wiązań dwusiarczkowych we włóknach gęstych powoduje, według autorów, iż włókna te są mniej sztywne niż inne struktury plemnika z pełnym wysyceniem $-SH$ do $-S-S-$. Dzięki temu zachowały one elastyczność nie hamującą bicia witki. Biochemiczna analiza białek budujących włókna gęste wykonana przez Baccettiego i wsp. wykazała, że białka te zbudowane są z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Pierwszy łańcuch polipeptydowy ma wysoki ciężar cząsteczkowy (42000–72 000 daltonów), jest bogaty w kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i leucynę, pozbawiony zaś jest całkowicie siarki. Drugi łańcuch polipeptydowy o niskim ciężarze cząsteczkowym (28 000–31 000 daltonów) bogaty jest w cysteinę i w siarkę. Białko to autorzy zaliczają do keratyn, a ze względu na specyficzne cechy i lokalizację proponują nazwać je pererginy (po grecku $\pi\acute{\alpha}\rho\epsilon\rho\gamma\omicron\zeta$), co znaczy dodatkowy zgodnie z nazwą angielską włókien gęstych (accessory fibres — włókna dodatkowe).

**Ryc. 1. Przekrój podłużny (strzałkowy) przez główkę plemnika ogiera z ejakulatu.
× 60 000**

Plazmolema (P) odstaje, w następstwie utrwalania, od akrosomu (A), lecz przylega do czapeczki dolnej (CDol). Punkty o niskiej gęstości elektronowej w jądrze to wakuole jądrowe (NV).

Ryc. 2. Przekrój podłużny (równoległy) podstawy główki i szyjki plemnika ogiera z ejakulatu. × 70 000

Z obu stron podstawy główki plazmolema jest silnie wpuklona (strzałki). Obwodowe wpuklenie plazmolemy tworzy pierścień dolny. Kolumna segmentalna (KS) styka się z kilkuczęściowym kapitulum (C). Dwa zgrubienia u podstawy jądra odpowiadają płytce podstawowej (PP). Poniżej prawej części płytki podstawowej znajduje się skośnie położona centriola bliższa w przekroju podłużnym (CP). W dolnej części szyjki resztki centrioli dalszej (CD). Pomiedzy poszczególnymi częściami szyjki plemnika ogiera występują liczne mikrotubule (MT).

Ryc. 3. Przekrój podłużny (równoległy) podstawy główki plemnika buhaja z ejakulatu. × 56 000

Wśród gęstej elektronowo zawartości jądra jasne wakuole jądrowe (NV). Podstawa jądra zawiera strefę o niższej gęstości elektronowej; wypukłość podstawowa (WP) charakterystyczna dla plemnika buhaja. Wypukłość podstawowa znajduje się w przestrzeni jądrowej tylnej utworzonej przez wypuklenie zbywającej otoczki jądrowej (NL).

Ryc. 4. Przekrój podłużny (strzałkowy) przedniej części główki plemnika myszy z najądrza. × 40 000

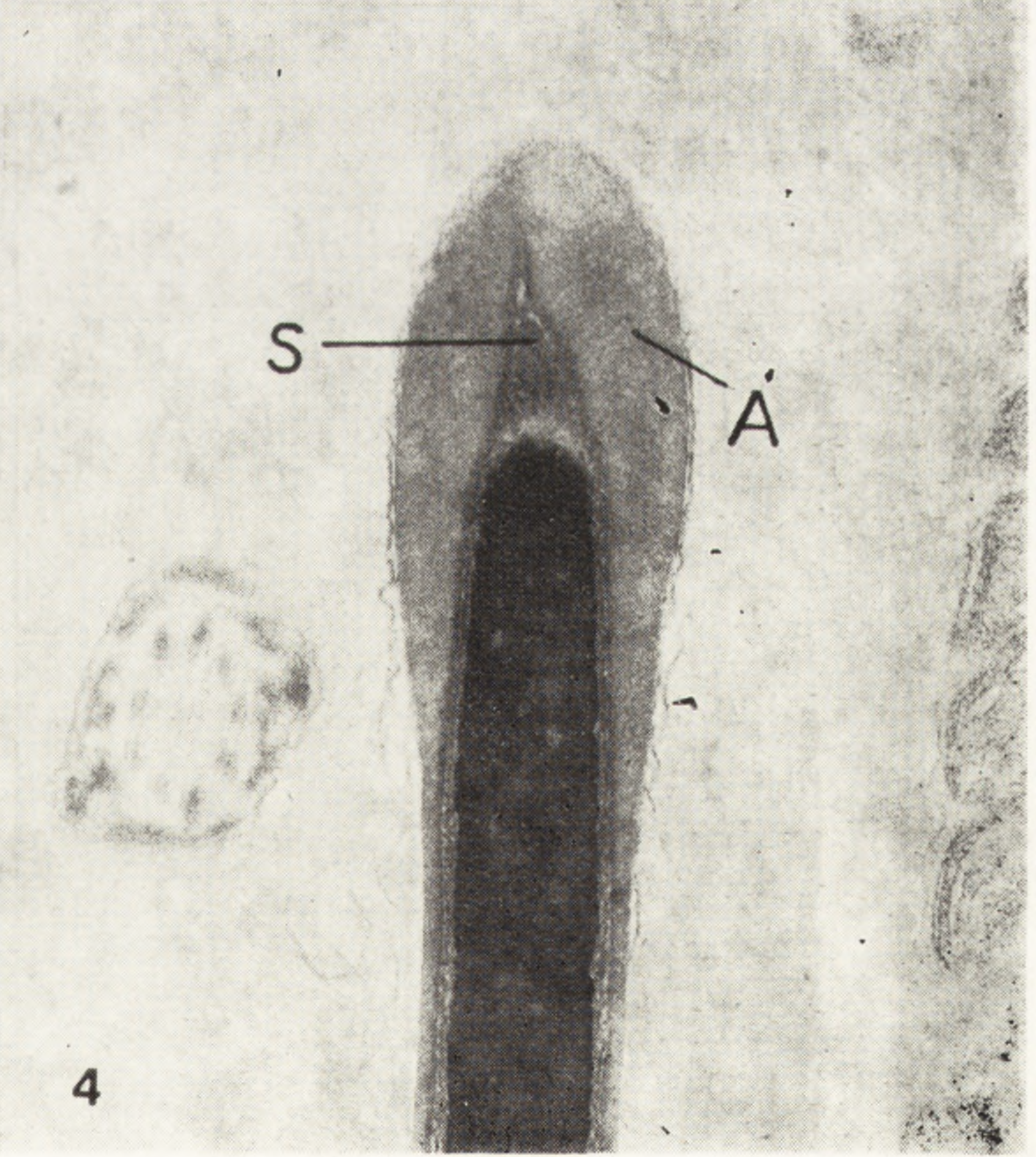
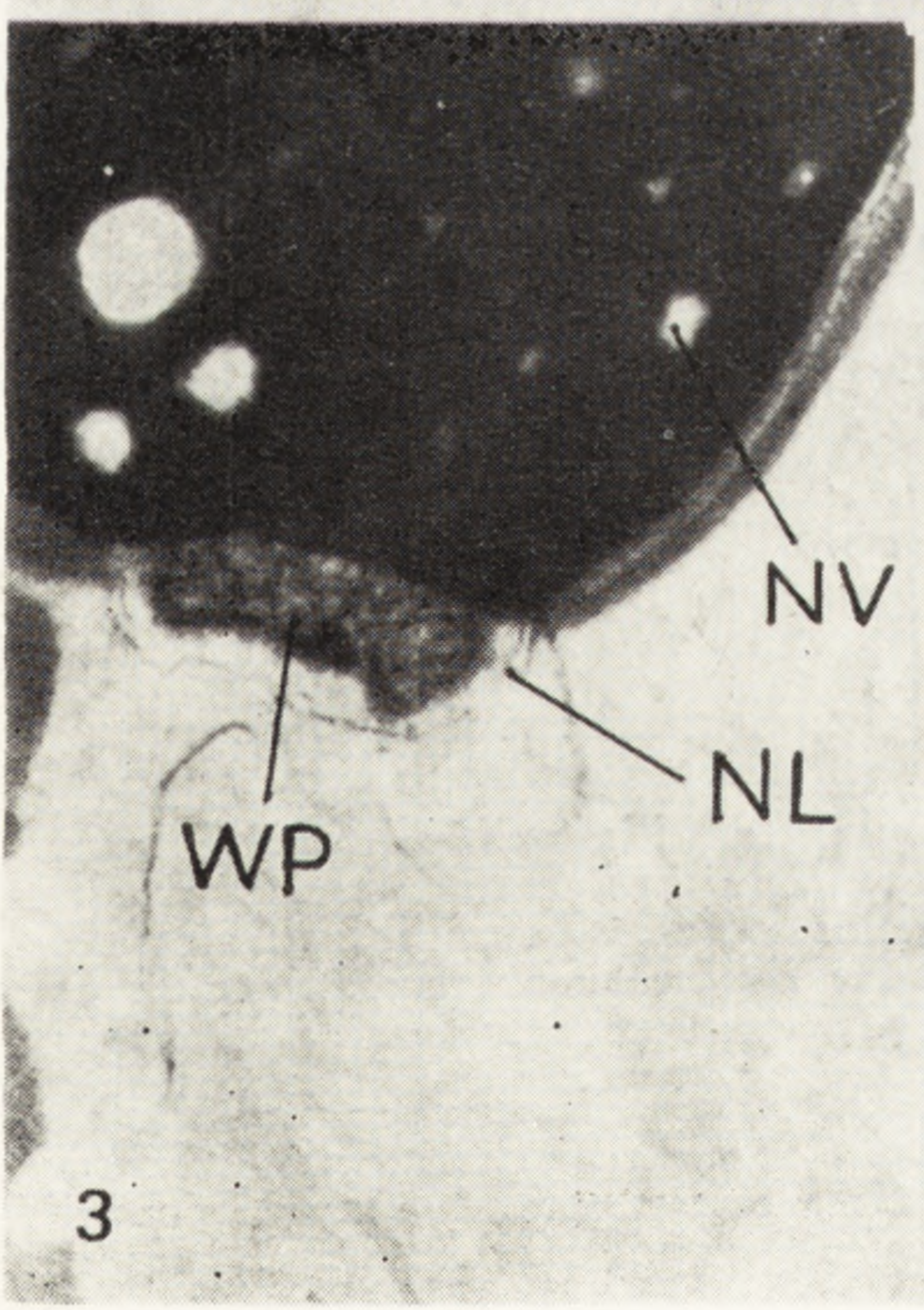
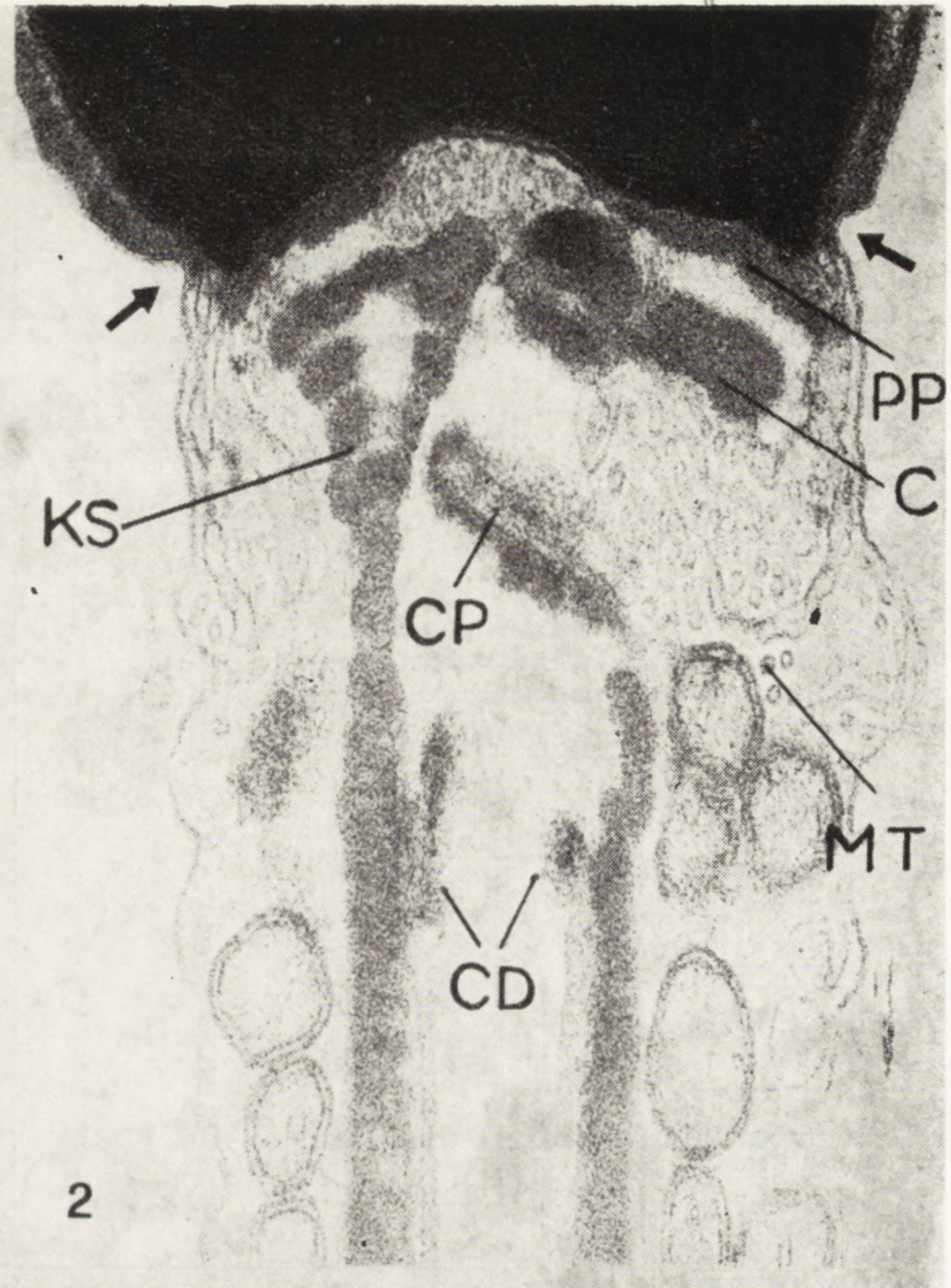
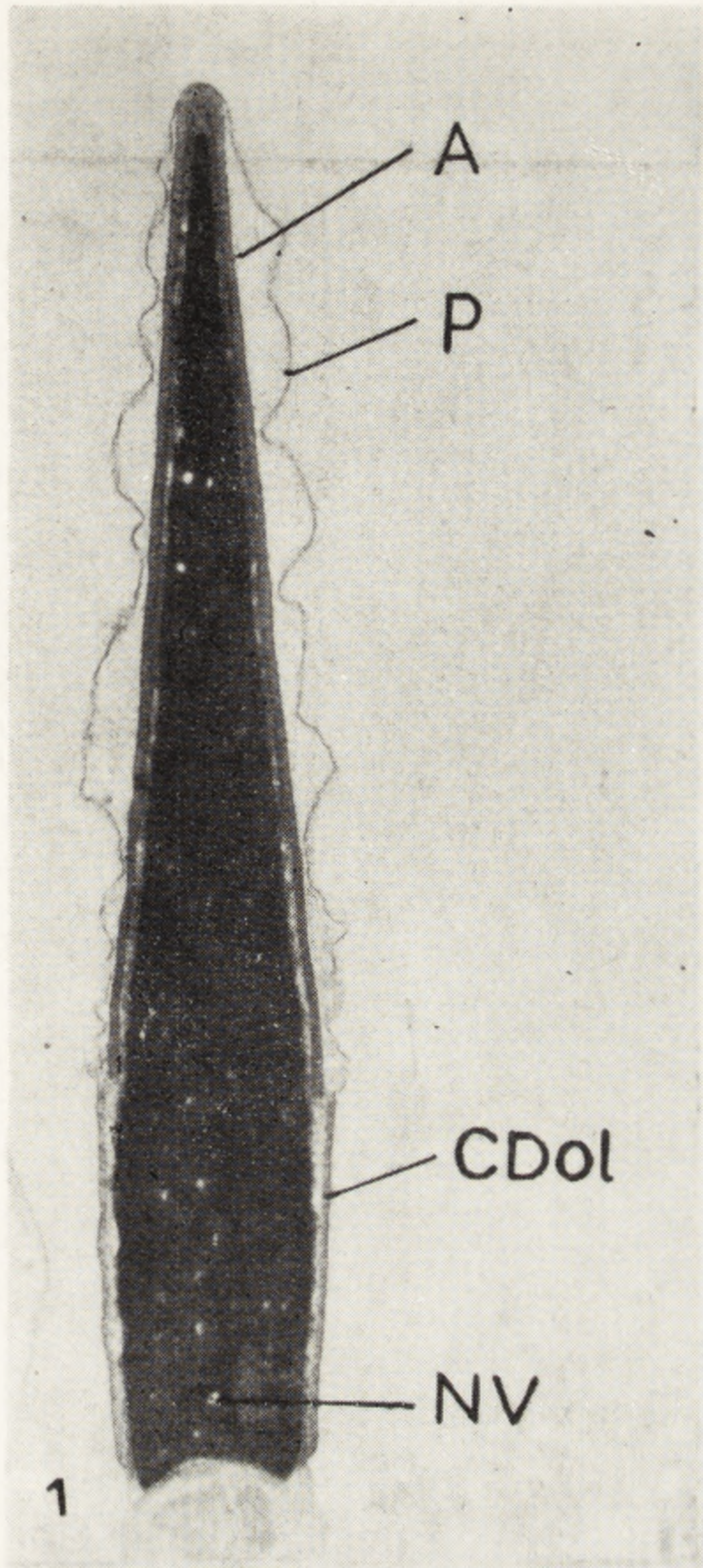
Gęste elektronowo jądro z góry i z boków otacza akrosom (A). Ponad wierzchołek jądra wystaje część szczytowa akrosomu. Poniżej części szczytowej akrosomu znajduje się charakterystyczne dla plemników gryzoni nagromadzenie substancji wokółjądrowej (perforatorium) (S).

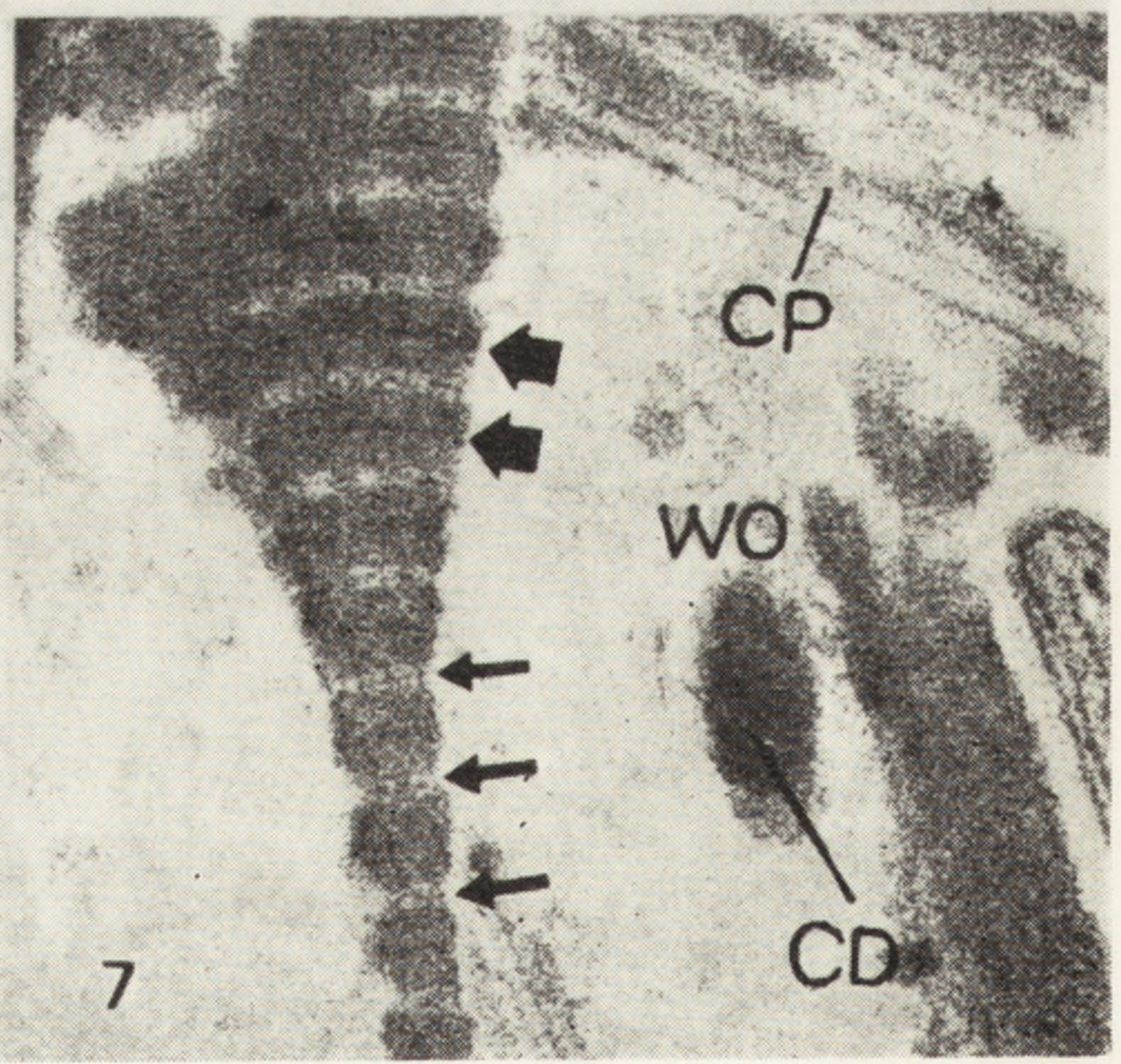
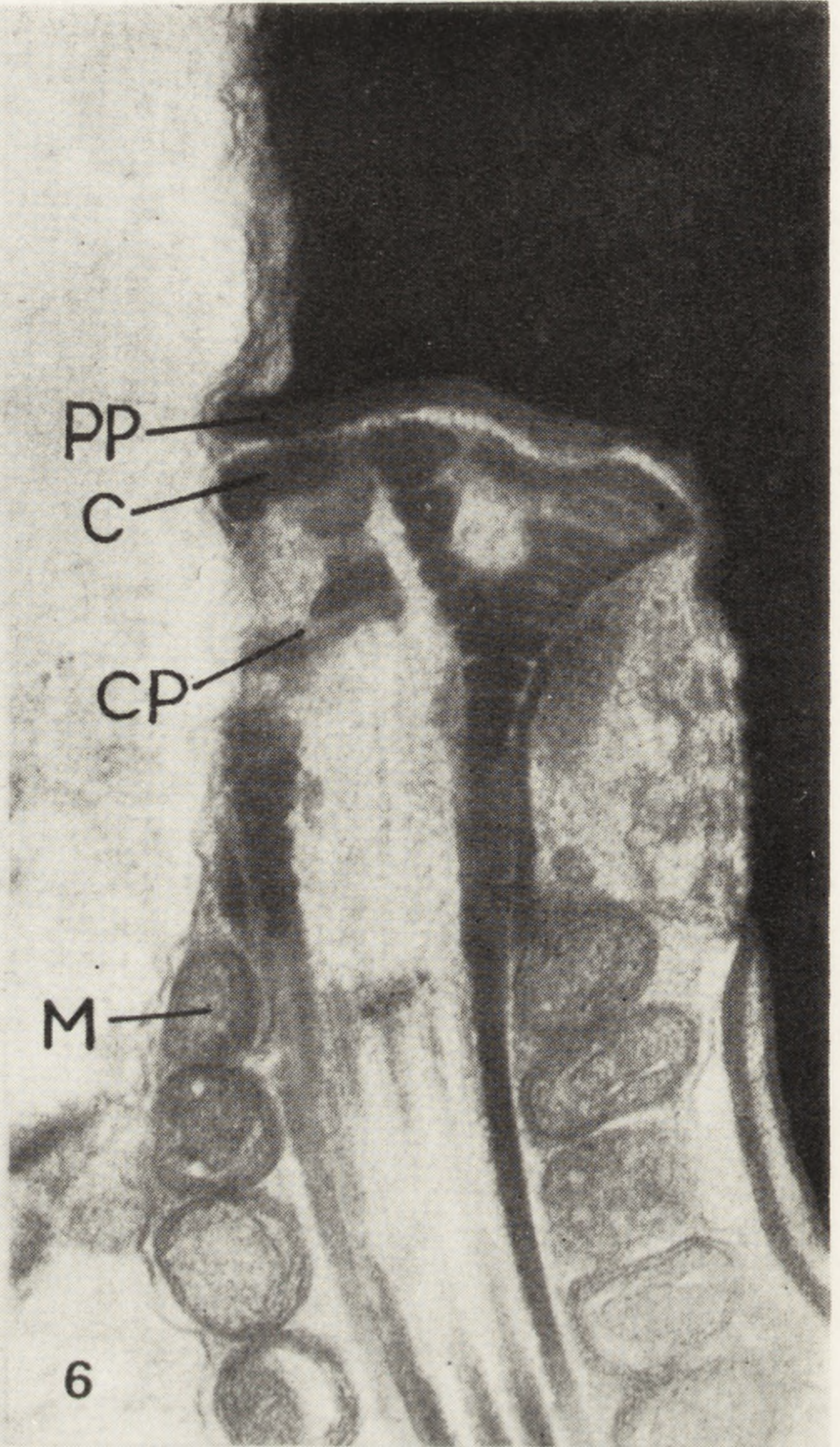
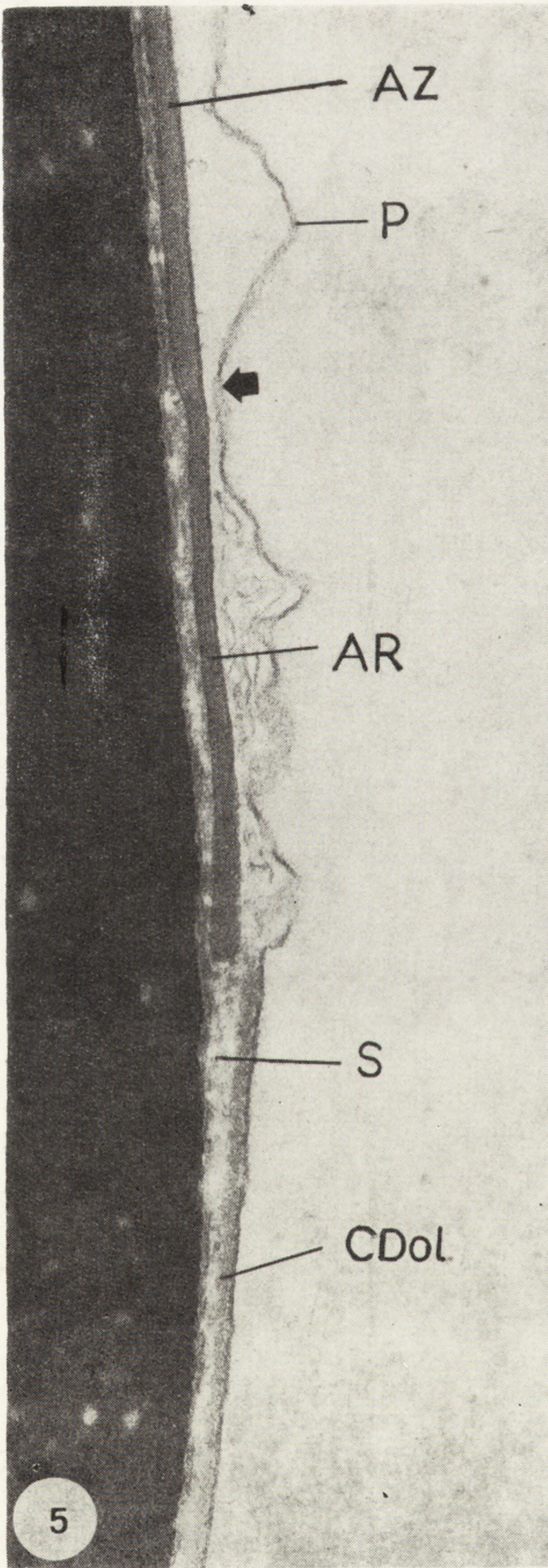
Ryc. 5. Przekrój podłużny (strzałkowy) fragmentu środkowej części główki plemnika ogiera z ejakulatu. × 70 000

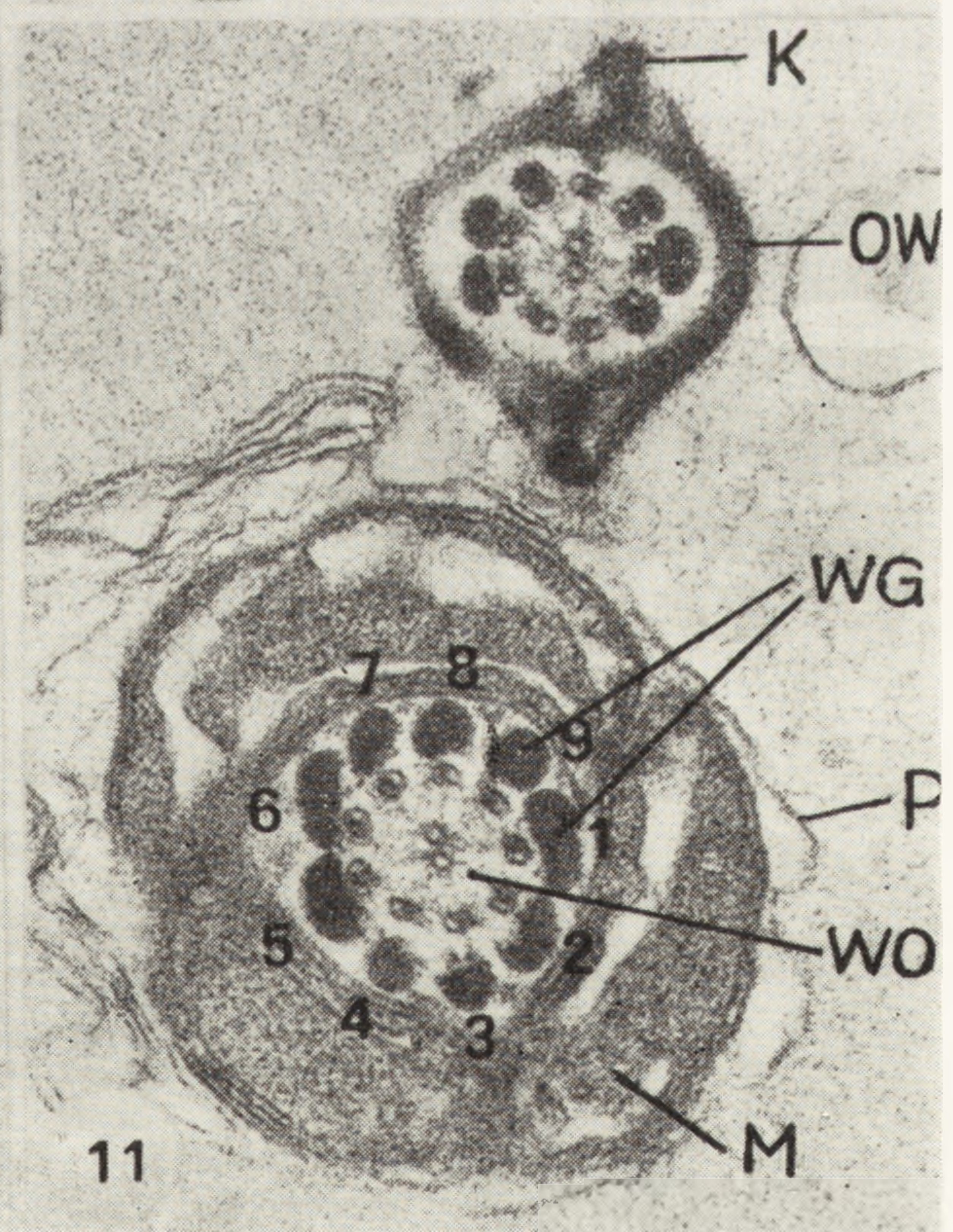
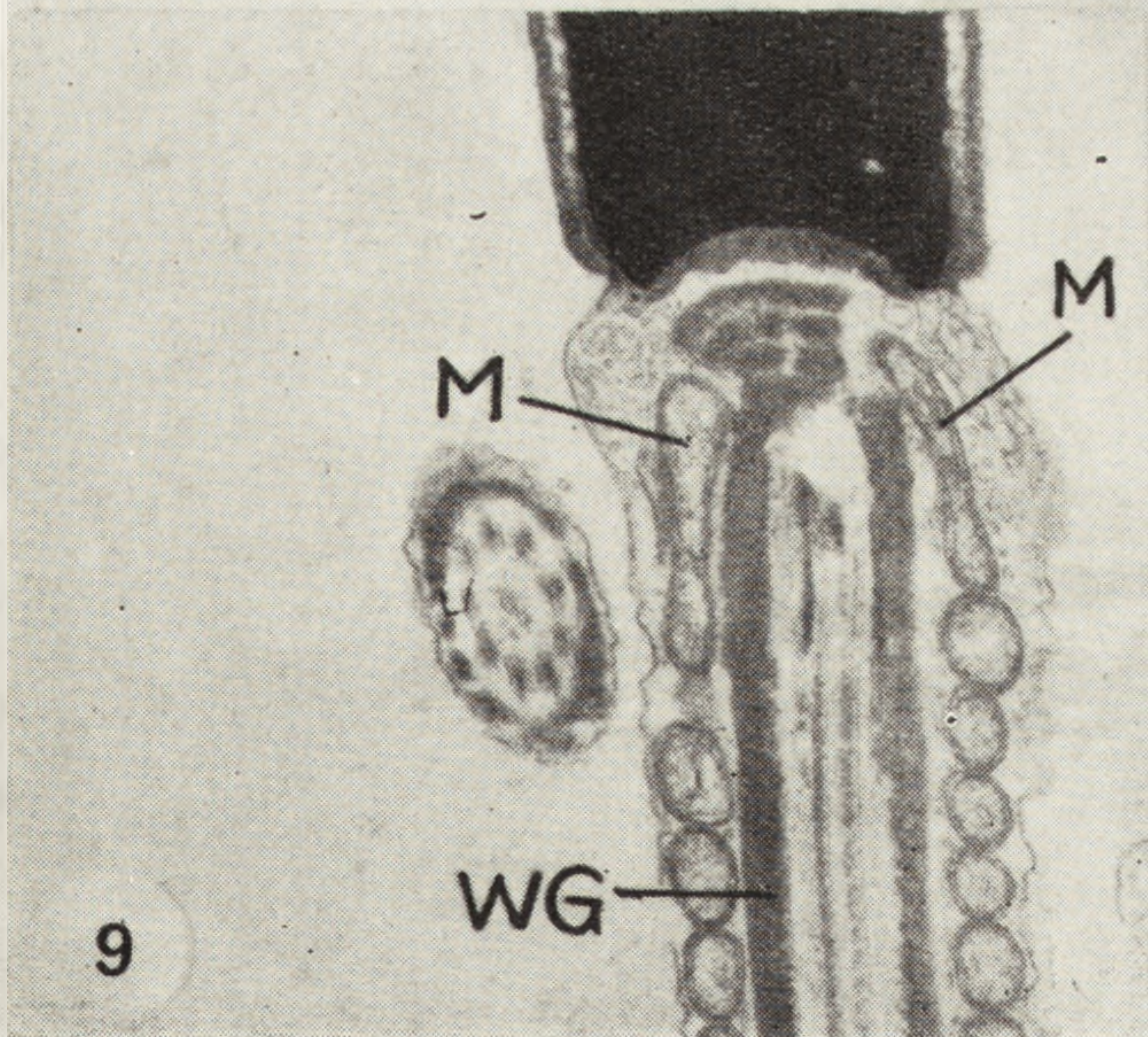
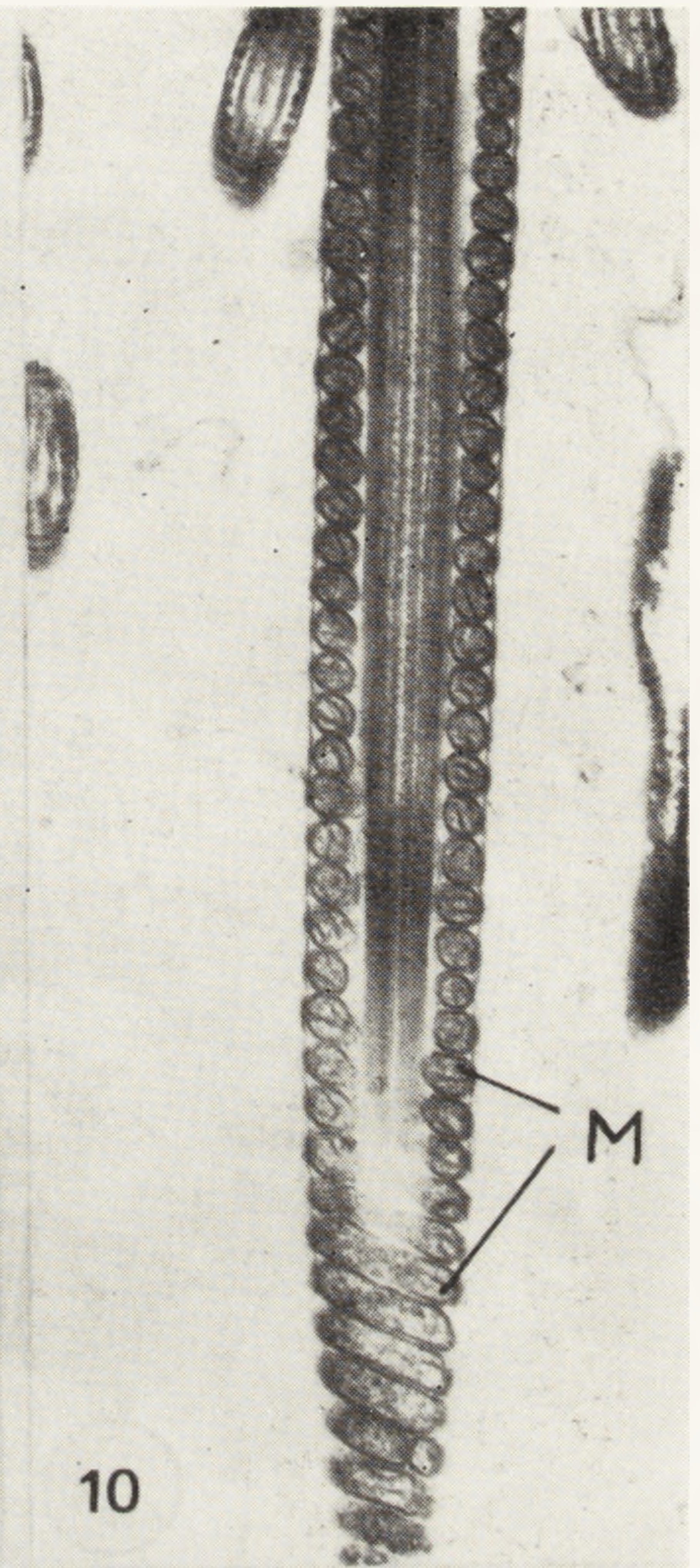
Plazmolema (P) odstaje od akrosomu, a silnie przylega do czapeczki dolnej (CDol). Strzałka wskazuje przejście części zasadniczej akrosomu (AZ) w część równikową (AR). Nieciągła warstewka substancji o średniej gęstości elektronowej pomiędzy czapeczką dolną i akrosomem a otoczką jądrową to substancja wokółjądrowa (S).

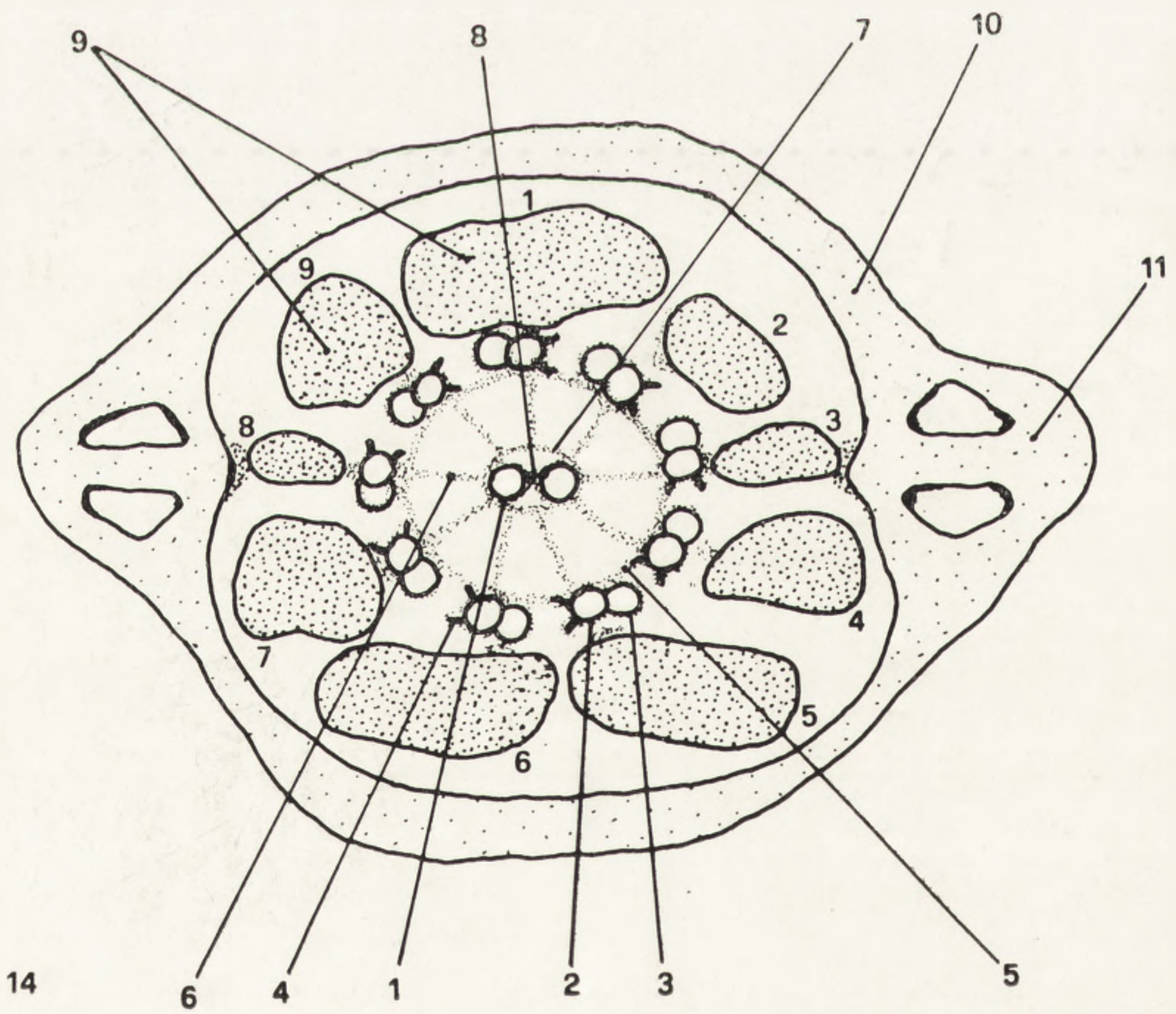
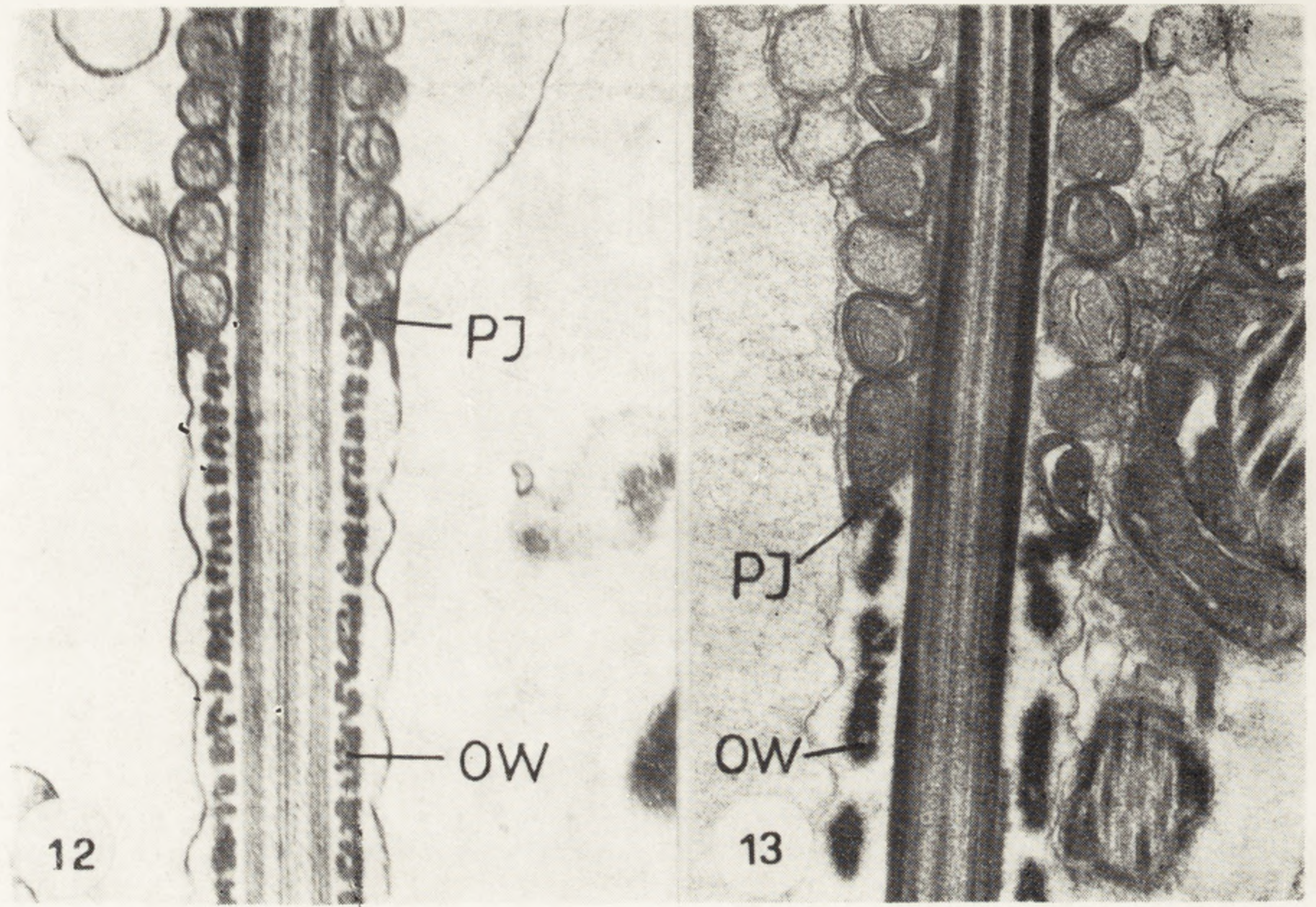
Ryc. 6. Przekrój podłużny (równoległy) podstawy główki, szyjki i górnej części wstawki plemnika myszy z najądrza. × 48 000

Poniżej płytki podstawowej (PP) położone jest 3-częściowe kapitulum (C). Pod pierwszą, od lewej, częścią kapitulum znajduje się skośnie ułożona centriola bliższa (CP). Pod drugą i trzecią częścią kapitulum kolumna segmentalna. Mitochondria wstawki (M).









Ryc. 7. Fragment szyjki i plemnika buhaja. $\times 88\ 000$

Kolumna segmentalna z prążkami w środku segmentów (strzałki grubsze) i w środku jasnej przestrzeni oddzielającej segmenty (strzałki cieńsze). Resztki centrioli dalszej (CD), powyżej skośnie do kolumny, fragment centrioli bliższej (CP). W górne rejony kolumny dochodzą mikrotubule centralne zespołu włókien osiowych (WO)

Ryc. 8. Przekrój podłużny (równoległy) podstawy główki, szyjki i początku wstawki plemnika ogiera z ejakulatu. $\times 80\ 000$

U podstawy jądra rozciąga się niejednolitej grubości płytka podstawowa (PP). Strzałki wskazują na przerwę i brak ciągłości pomiędzy kolumną segmentalną a włóknem gęstym (WG)

Ryc. 9. Przekrój podłużny (równoległy) podstawy główki, szyjki i początku wstawki plemnika ogiera z ejakulatu. $\times 30\ 000$

Pionowo ustawione mitochondria (M) podwójnej spirali mitochondrialnej wstawki wnika głęboko w obręb szyjki. Włókna gęste w przekroju podłużnym (WG)

Ryc. 10. Przekrój podłużny witki plemnika barana na poziomie wstawki. $\times 30\ 000$

Mitochondria spirali (M) w górnej części elektronogramu są przekrojone poprzecznie, w dolnej zaś części płaszczyzna przekroju jest styczna do spirali mitochondrialnej

Ryc. 11. Przekroje poprzeczne witek plemnika myszy. $\times 56\ 000$

U dołu przekrój witki na poziomie wstawki z: plazmolemą (P), mitochondriami (M), otoczką 9 włókien gęstych (WG 1-9) i zespołem włókien osiowych (9+2) (WO). U góry: przekrój witki na poziomie części głównej witki, gdzie obok otoczki włókien gęstych występuje otoczką włóknista (OW) z dwoma kolumnami (K)

Ryc. 12 i 13. Przekroje podłużne witek plemników barana (12) i myszy (13) przedstawiające dolną część wstawki i początek części głównej witki, rozgraniczone pierścieniem Jensena (PJ). Otoczką włóknista (OW) $\times 30\ 000$

Ryc. 14. Częściowo schematyczny przekrój części głównej witki plemnika ssaka. (według Krzysztofowicz [47], opis uzupełniony według [51])

1 — mikrotubula centralna, 2 — mikrotubula A, 3 — mikrotubula B, 4 — ramię zewnętrzne mikrotubuli A, 5 — mostek łączący podstawy mikrotubul A (nexin bridge), 6 — łącznik promienisty (radial link), 7 — otoczką pary mikrotubul centralnych, 8 — mostek łączący parę mikrotubul centralnych, 9 — otoczką włókien gęstych (1-9), 10 — otoczką włóknista, 11 — kolumna otoczki włóknistej

3. Pierścień Jensena (pierścień dalszy). Dolny koniec wstawki wyznacza pierścień Jensena (ryc. 12, 13). W mikroskopie elektronowym ma on budowę homogenną i dosyć charakterystyczną dla gatunku [25]. W plemnikach królika w pierścieniu Jensena wykazano wysoką aktywność ATP - azy [74]. Plazmolema na wysokości pierścienia Jensena przylega całkowicie do jego zewnętrznej powierzchni (ryc. 12, 13).

CZĘŚĆ GŁÓWNA WITKI (PRINCIPAL PIECE)

1. Otoczka włóknista. Bezpośrednio poniżej pierścienia Jensena rozpoczyna się otoczka włóknista (ryc. 12, 13) rozciągająca się przez całą długość części głównej witki, najdłuższego odcinka u większości plemników ssaków. Wczesniejsze badania ME sugerowały, że otoczkę włóknistą tworzy jedno spiralnie zwinięte włókno wokół wstawki [5, 60, 63]. Badania późniejsze wykazały, że otoczka włóknista zbudowana jest z dwóch strukturalnie odrębnych komponent: dwóch zewężających się ku końcowi witki kolumn, położonych w stosunku do siebie naprzeciwległe w płaszczyźnie wyznaczonej przez środkową parę mikrotubul zespołu włókien osiowych oraz żeberk zorientowanych poprzecznie do długiej osi plemnika i zlewających się z kolumnami [23, 24]. Dzięki udoskonaleniu metod izolacji [52] uzyskano ostatnio z plemników szczurów stosunkowo czystą frakcję, w wysokim stopniu wzbogaconą w struktury otoczki włóknistej. Analiza biochemiczna składu białek tej frakcji wykazała, że otoczka włóknista zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o ciężarze cząsteczkowym 80 000 daltonów.

W mikroskopie elektronowym po zastosowaniu metody barwienia negatywowego stwierdzono, że żeberka otoczki włóknistej składają się z równoległe przebiegających włókien o średnicy 50–60Å (posiadających paciorkowate zgrubienia) i że filamenty żeberk kontynuują się w kolumnach. Oznacza to, że opisywana odrębność strukturalna nie łączy się z odmienną budową molekularną.

2. Zespół włókien osiowych. Skoordynowany, falisty ruch plemnika ssaka odbywa się dzięki skurczom ślizgowym 9 podwójnych mikrotubul obwodowych przy współdziałaniu pary mikrotubul centralnych i innych elementów matriks zespołu włókien osiowych (9 + 2) [2, 51]. Każda z dziewięciu podwójnych mikrotubul obwodowych składa się z cylindrycznej mikrotubuli A (subfibre A) i przyległego do niej niepełnego cylindra mikrotubuli B (subfibre B) (ryc. 14). Mikrotubula A posiada ponadto dwa ramiona (zewewnętrzne i wewnętrzne) sterczące w kierunku mikrotubuli B sąsiedniego dubletu. Do podstawy mikrotubul A przylega pasmo substancji (radial link), o gęstości elektronowej wyższej niż matriks zespołu włókien osiowych, końcem doosiowym przylegające do otocz-

ki mikrotubul centralnych (central sheath). Podstawy mikrotubul A są połączone obwodowo mostkami (nexin bridges) (przeгляд piśmiennictwa według [25]). Ostatnio, głównie dzięki metodzie barwienia negatywnego, opisano dosyć dokładnie wzajemne stosunki topograficzne poszczególnych elementów zespołu włókien osiowych, co w niniejszym przeglądzie przedstawione będzie na przykładzie witki plemnika szczura [51].

W parze mikrotubul centralnych, obserwowanych metodą barwienia negatywnego, jedna ma powierzchnię gładką, a druga jest opłaszczona cząsteczkami ułożonymi w niektórych rejonach w regularnych odstępach. Mikrotubule centralne w całej długości połączone są mostkami odległymi od siebie o 160 Å. Mikrotubule centralne analizowane w TEM w przekrojach poprzecznych również połączone są mostkami treści o wyższej gęstości elektronowej. Mostek ten ma 70 Å szerokości, a przestrzeń oddzielająca mikrotubule — 60 Å. Wokół mikrotubul centralnych opisuje się otoczkę mikrotubul centralnych utworzoną przez jedno lub kilka spiralnie przebiegających włókien [25, 33]. Olson i Linck [51] analizując plemnik szczura opisują w tym samym rejonie inną jeszcze otoczkę utworzoną przez dwa przeciwległe położone rzędy równomiernie rozmieszczonych łukowatych wyrostków (ryc. 14). Według Olsona i Lincka [51] otoczka utworzona przez łukowate wyrostki może występować obok spirali.

Otoczkę włókien centralnych i 9 podwójnych mikrotubul obwodowych spajają szprychowate łączniki promieniste (radial spokes). Łączniki te występują wzdłuż całej witki parami lub w tripletach [62, 66]. W plemnikach szczura łączniki promieniste występują w tripletach odległych od siebie o 320 Å. W obrębie tripletu łączniki 1 i 2 odległe są od siebie o 320 Å, a łączniki 2 i 3 — o 240 Å. Tripletów łączników promienistych są ułożone skośnie w stosunku do mikrotubul. Pomiedzy końcami łączników 1 i 2 tripletu przylegającymi do każdej z 9 podwójnych mikrotubul obwodowych widoczne są owalne cząsteczki rozmieszczone co 960 Å. Na podstawie periodyczności występowania i położenia tych cząsteczek autorzy sugerują, iż są to mostki obwodowo łączące podstawy mikrotubul A dubletów (nexin bridges, nexin filaments), widoczne też na przekrojach poprzecznych witek plemników.

Podwójne mikrotubule obwodowe na dużej części swojej długości przebiegają wspólnie z zewnątrznie względem nich położonymi obwodowo włóknami gęstymi. W barwieniu negatywowym izolowanych fragmentów witek plemnika szczura stwierdza się [51], że dublety włókien obwodowych i odpowiadające im włókna gęste utrzymują się razem pomimo działania czynników fragmentujących. Za utrzymanie tej łączności mogą być odpowiedzialne włókniste mostki rozmieszczone co 960 Å, każdorazowo na wysokości łącznika nr 1 tropletu łączników promienistych [51].

3. Odcinek końcowy witki (end piece). Ostatni odcinek witki, pozbawiony zupełnie otoczek, zawiera tylko mikrotubule zespołu włókien osiowych kończące się na różnych poziomach, przez co na przekrojach poprzecznych tego odcinka witki występuje niepełny zestaw mikrotubul.

LITERATURA

- [1] AFZELIUS B. A., Sperm morphology and fertilization biology, [w] Edinburgh Sympozjum on the genetics of the spermatozoon, red. R. A. Beatty i S. Glucksohn-Waelsch, Edinburgh 1971, 131-143.
- [2] AFZELIUS B. A., ELIASSON R., JOHNSON O., LINDHOLMER C., Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa, *J. Cell Biol.*, **66**: 225-233, 1975.
- [3] ANDERSON W. A., Cytochemistry of sea urchin gametes. I. Intramitochondrial localization of glycogen, glucose - 6 - phosphatase, and adenosine triphosphatase activity in spermatozoa of *Paracentrotus lividus*, *J. Ultrastr. Res.*, **24**: 398-411, 1968.
- [4] ANDERSON W. A., PERSONNE P., The fine structure of the neck region of spermatozoa of *Helix aspera*, *J. Microsc.*, (Paris) **6**: 1033-1045, 1967.
- [5] ANNBERG A., The ultrastructure of the human spermatozoa, *Acta Obstr. Gynecol. Scand.*, **36**: 1-133 (Suppl. 2), 1957.
- [6] BACCETTI B., AFZELIUS B. A., The biology of the sperm cell, Karger, Basel, New York 1976.
- [7] BACCETTI B., PALLINI V., BURRINI A. G., The accessory fibers of the sperm tail. II. Their role in binding zink in mammals and cephalopods, *J. Ultrastr. Res.*, **54**: 261-275, 1976.
- [8] — The accessory fibers of the sperm tail. III. High-sulfur and low-sulfur components in mammals and cephalopods, *J. Ultrastr. Res.*, **57**: 289-308, 1976.
- [9] BARROS C., FRANKLIN L., Behavior of the gamete membrane during sperm entry into the mammalian egg, *J. Cell Biol.*, **37**: C13-C18, 1968.
- [10] BARROS C., BEDFORD J. M., FRANKLIN L. E., AUSTIN C. R., Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction, *J. Cell Biol.*, **34**: C1-C5, 1967.
- [11] BARTOOV B., MESSER G. Y., Isolation of mitochondria from ejaculated ram spermatozoa, *J. Ultrastr. Res.*, **57**: 68-76, 1976.
- [12] BEDFORD J. M., CALVIN H. I., Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species, *J. Exp. Zool.*, **187**: 181-203, 1974.
- [13] — The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals, *J. Exp. Zool.*, **188**: 137-156, 1974.
- [14] BIELAŃSKI W., KACZMARSKI F., Ultrastructure changes in the heads of stallion spermatozoa after freezing in liquid nitrogen, *Bull. Polon. Acad. Sci., Ser. Biol.*, **19**: 139-144, 1971.
- [15] BISHOP M. W. H., WALTON A., Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa, [w] Parkes Marshall's Physiology of Reproduction, Longmans, Green, London 1960, 1-129.

- [16] BLOM E., BIRCH-ANDERSEN A., The ultrastructure of the bull sperm. II. The sperm head, *Nord. Vet-Med.*, **17**: 193-212, 1965.
- [17] BUSTOS-OBREGON E., COUROT M., FLÈCHON J. E., HOCHEREAU de REVIERS M. J., HOLSTEIN A. F., Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man, *Andrologia*, **7**: 141-163, 1975.
- [18] CLELAND K. W., ROTHSCCHILD L., The bandicoat spermatozoon. An electron microscopic study of the tail, *Proc. Roy. Soc., (London) B*, **150**: 24-42, 1959.
- [19] COURTENS J. L., COUROT M., FLÈCHON J. E., The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa, *J. Ultrastr. Res.*, **57**: 54-64, 1976.
- [20] COOPER G. W., BEDFORD J. M., Acquisition of surface charge by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididymal maturation, *Anat. Rec.*, **169**: 300-303, 1971.
- [21] EDELMAN G. M., MILETTE C. F., Molecular probes of spermatozoon structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **68**: 2436-2440, 1971.
- [22] ELFVIN L. G., An ultrastructural difference between the outer and inner membrane of the middle piece mitochondria in rat spermatozoa, *J. Ultrastr. Res.*, **24**: 259-268, 1968.
- [23] FAWCETT D. W., The structure of the mammalian spermatozoa, *Int. Rev. Cytol.*, **7**: 195-235, 1958.
- [24] — A comparative view of sperm ultrastructure, *Biol. Reprod.*, **2**: 90-127, 1970.
- [25] — The mammalian spermatozoon, *Develop. Biol.*, **44**: 394-436, 1975.
- [26] FAWCETT D. W., ITO S., The fine structure of bat spermatozoa, *Amer. J. Anat.*, **116**: 567-610, 1965.
- [27] FAWCETT D. W., PHILLIPS D. M., Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis, *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 6)*; 405-418, 1969.
- [28] FLÈCHON J. E., Freeze - fracturing of rabbit spermatozoa, *J. Micros. (Paris)*, **19**: 59-64, 1974.
- [29] FRANKLIN L. E., BARROS C., FUSSELL E. N., The acrosome region and the acrosome reaction in sperm of the golden hamster, *Biol. Reprod.*, **3**: 180-200, 1970.
- [30] FRANZEN A., Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis [w] *Comparative Spermatology*, red. B. Baccetti, Acad. Press, New York 1970, 29-46.
- [31] FRIEND D. S., FAWCETT D. W., Particle aggregates in the plasma membrane of the guinea pig sperm tail, *J. Cell Biol.*, **59**: 105 A, 1973.
- [32] — Membrane differentiations in freeze - fractured mammalian sperm, *J. Cell Biol.*, **63**: 641-664, 1974.
- [33] GIBBONS I. R., GRIMSTONE A., On flagellar structure in certain flagellates, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 697-715, 1960.
- [34] GORDON M., DANKER P. V., BARTOSZEWICZ W., Ultrastructural localization of surface receptors for concanavalin -A on rabbit spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **36**: 211-214, 1974.
- [35] — The surface coat of epididymal, ejaculated and capacitated sperm, *J. Ultrastr. Res.*, **50**: 199-207, 1975.
- [36] GRESON R. A. R., ZLOTNIK I., A comparative study of the cytoplasmic components of the germ - cells of certain mammals, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect., B*, **62**: 137-142, 1945.
- [37] JOEL C. A., Historical survey of research on spermatozoa from antiquity to

- the present, [w] Fertility Disturbances in Men and Women, red. C. A. Joël, Karger, Basel, 1971, 3-47.
- [38] JONES R. C., The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa, J. Reprod. Fert., **33**: 179-183, 1973.
- [39] KAWIAK J., Metody znakowania powierzchni komórek, Post. Biol. Kom., **3**: 265-286, 1976.
- [40] KEYHANI E., STOREY B. T., Conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa, Biochim. Biophys. Acta, **305**: 557-569, 1973.
- [41] KOEHLER J. K., Fine structure observations in frozen - etched bovine spermatozoa, J. Ultrastr. Res., **16**: 359-366, 1966.
- [42] — A freeze - etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structure, J. Ultrastr. Res., **33**: 598-614, 1970.
- [43] — Human sperm head ultrastructure: a freeze - etching study, J. Ultrastr. Res., **39**: 520-539, 1972.
- [44] — Studies on the structure of the postnuclear sheath of water buffalo spermatozoa, J. Ultrastr. Res., **44**: 355-368, 1973.
- [45] KOEHLER J. K., GADDUM - ROSSE P., Media induced alterations of the membrane associated particles of the guinea pig sperm tail, J. Ultrastr. Res., **51**: 106-108, 1975.
- [46] KOO G. C., STACKPOLE G. W., BOYSE E. A., HÄMMERLING U., LARDIS M. P., Topographical localization of H - Y antigen of mouse spermatozoa in immunoelectromicroscopy, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **70**: 1502-1505, 1973.
- [47] KRZYSZTOFOWICZ A., Ultrastruktura plemnika, [w] Ultrastruktura i Funkcja Komórki, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przyłęcka, PWN, Warszawa 1973, 210-226.
- [48] LUNG B., Whole - mount electron microscopy of chromatin and membranes in bull and human sperm heads, J. Ultrastr. Res., **22**: 485-493, 1968.
- [49] MORRÈ D. Y., CLEGG E. D., LUNSTRA D. D., MOLLENHAUER H. H., An electron dense stain for isolated fragments of plasma and acrosome membranes from porcine sperm, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **145**: 1-6, 1974.
- [50] OLSON G., Observations on the ultrastructure of a fiber network in the flagellum of sperm of the brush tailed phalanger, *Trichosurus vulpecula*, J. Ultrastr. Res., **50**: 193-198, 1975.
- [51] OLSON G., LINCK R. W., Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm, J. Ultrastr. Res., **61**: 21-43, 1977.
- [52] OLSON G., HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., Isolation and characterization of the fibrous sheath of rat epididymal spermatozoa, Biol. Reprod., **14**: 517-530, 1976.
- [53] OLSON G., LIFSICS M., FAWCETT D. W., HAMILTON D. W., Structural specialization in the flagellar plasma membrane of opossum spermatozoa, J. Ultrastr. Res., **59**: 207-221, 1977.
- [54] PEDERSEN H., The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Maccaca arctoide*, J. Ultrastr. Res., **40**: 366-377, 1972.
- [55] — The human spermatozoon, Costers Bogtrykkeri, Copenhagen 1974.
- [56] PHILLIPS D. M., Substructure of the mammalian acrosome, J. Ultrastr. Res., **38**: 591-604, 1972.
- [57] — Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa, J. Ultrastr. Res., **58**: 144-154, 1977.

- [58] PLATTNER H., Bull spermatozoa: A re - investigation by freeze - etching using widely different cryofixation procedure, *J. Submicrosc. Cytol.*, 3: 19-32, 1971.
- [59] PREMKUMAR E., BHARGAVA P. M., Transcription and translation of bovine spermatozoa, *Nature New Biology*, 240: 139-143, 1972.
- [60] RANDALL J. T., FRIEDLANDER H. H. G., The microstructure of ram spermatozoa, *Exp. Cell Res.*, 1: 1-32, 1950.
- [61] ROTH J., Lectins as molecular probes in morphological investigations on architecture and dynamics of cell surface, *Post. Biol. Kom.*, 3: 235-264, 1976.
- [62] SATIR P., WERNER F. D., The structural basis of ciliary bend formation, *J. Cell Biol.*, 59: 304A, 1973.
- [63] SCHULTZ - LARSEN J., The morphology of the human sperm: electron microscopic investigations of the ultrastructure, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Suppl., 128: 1-121, 1958.
- [64] STACKPOLE C. W., DEVORKIN D., Membrane organization in mouse spermatozoa revealed by freeze - etching, *J. Ultrastr. Res.*, 49: 167-187, 1974.
- [65] STEFANINI M., OURA C., ZAMBONI I., Ultrastructure of fertilization in the mouse. 2. Penetration of sperm into the ovum, *J. Submicrosc. Cytol.*, 1: 1-23, 1969.
- [66] WERNER F. D., New observations on flagellar fine structure. The relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme, *J. Cell Biol.*, 47: 159-182, 1970.
- [67] WOOLLEY D. M., A "posterior ring" in the spermatozoa of muridae, *J. Reprod. Fert.*, 23: 361-363, 1970.
- [68] WOODING F. B. P., The effect of Triton - X - 100 on the ultrastructure of ejaculated bovine sperm, *J. Ultrastr. Res.*, 42: 502-516, 1973.
- [69] WOODING F. B. P., O'DONNELL J. M., A detailed ultrastructural study of the head membranes of ejaculated bovine sperm, *J. Ultrastr. Res.*, 35: 71-85, 1971.
- [70] ZAMBONI L., ZEMJANIS R., STEFANINI M., The fine structure of monkey and human spermatozoa, *Anat. Rec.*, 169: 129-155, 1971.
- [71] YANAGIMACHI R., NODA Y. D., Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization, *J. Ultrastr. Res.*, 31: 465-485, 1970.
- [72] YANAGIMACHI R., NODA Y., Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg, *Amer. J. Anat.*, 128: 429-462, 1970.
- [73] YANAGIMACHI R., NODA Y. D., FUJIMOTO M., NICOLSON G. L., The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa, *Amer. J. Anat.*, 135: 497-501, 1972.
- [74] YASUZUMI G., TSUBO I., The fine structure of mammalian spermatozoon and its nomenclature, [w] *Proceeding Tom. V International Congress of animal reproduction and artificial insemination, Kraków 1976*, 1208-1214.

Otrzymano: 20 lutego 1978.

Przyjęto: 17 marca 1978.

Adres autora: Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Pediatrii AM, ul. Wielicka 265, 30 - 663 Kraków.

K O M U N I K A T

Instytut Reumatologiczny wspólnie z Sekcją Tkanki Łącznej Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz z Polskim Towarzystwem Reumatologicznym organizują w dniach 28-29 V 1979 r. Sympozjum Osteologiczne w Ustroniu-Zawodziu (w Śląskim Szpitalu Reumatologicznym).

Tematy Sympozjum:

1. Biologia tkanki kostnej (biochemia, histochemia, struktura i metabolizm)
2. Patologia tkanki kostnej (aspekty patomorfologiczne i kliniczne oraz metaboliczne).

Referaty na Sympozjum proszę zgłaszać do dnia 31 I 1979 r. na ręce Przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego Sympozjum:

Doc. dr hab. med. Zbigniew Gburek
Dyrektor Śląskiego Szpitala Reumatologicznego
43 - 450 Ustroń - Zawodzie

Przewidywany jest udział uczestników z Czechosłowacji, NRD i Węgier.

RECENZJE

CHARLES JEFFREY, *Biological Nomenclature*.

Wydanie drugie. Broszura. Edward Arnold Ltd., Londyn, 1977. Str. 72, funtów ang. 1,95.

Książka Ch. Jeffreya, dyrektora naukowego Królewskiego Ogrodu Botanicznego w Kew, wydana została po raz pierwszy w 1973 r. dzięki staraniom Komisji Towarzystwa Systematyków (Anglia). Broszura ta wyjaśniała wszystkie tajniki nomenklatury systematycznej oraz technikę i metody w stosowanym nazewnictwie biologicznym. Wydanie drugie stało się logiczną koniecznością po opublikowaniu w 1974 r. materiałów dotyczących zmian w nazewnictwie zoologicznym, jakie zostały powzięte w czasie 16 Międzynarodowego Kongresu Zoologicznego w 1963 r. To samo dotyczyło również nazewnictwa botanicznego (Kongres Botaniczny w Leningradzie, 1975) oraz mianownictwa wirusologicznego (Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów, 1976).

Autor w sposób niezwykle jasny wprowadza nie obznajomionych z regułami taksonomicznymi przyrodników w metody nadawania nazw i ich poprawnego cytowania. Czytelnik znajdzie w tej książce wiele przykładów, zarówno botanicznych, jak i zoologicznych, poprawnego cytowania nazw różnych gatunków, które ulegały różnym zmianom lub modyfikacjom. Książka ta jest przydatnym nabytkiem w bibliotece każdego naturalisty.

Wincenty Kilarski

A. W. GRIMSTONE, *The Electron Microscope in Biology*.

Wydanie drugie. Edward Arnold Ltd., Londyn, 1977. Str. 65, funtów ang. 1,50.

Książka ma charakter broszurowy i jest wydana w ramach serii wydawniczej „*Studies in Biology*”. Celem tej serii jest szybkie informowanie czytelników o wszelkich nowościach z dziedziny biologii, jakie pojawiają się z roku na rok, a które nie mogą być ujęte w całości w wyda-

niach książkowych ze względu na ich długi cykl produkcyjny. Książka Grimstona została po raz pierwszy wydana w 1968 r., a następnie przedrukowana w 1970 i 1972 r. Ostatnie wydanie zostało uzupełnione rozdziałem, w którym autor omawia zasady działania mikroskopu skaningowego i jego zastosowanie w biologii.

W pierwszym rozdziale autor w sposób elementarny wprowadza czytelnika w zasady działania mikroskopu elektronowego. Następne dwa rozdziały poświęcone są technice obserwacji wirusów oraz komórek i tkanek. Rozdział ostatni daje czytelnikowi przegląd możliwości zastosowania mikroskopu skaningowego w biologii.

Książka Grimstona stanowi zapewne bardzo dobre uzupełnienie wiedzy tych wszystkich przyrodników, którzy jeszcze nie zetknęli się z tą techniką badawczą.

Wincenty Kilariski

R. H. LOWE - McCONNELL, *Ecology of Fishes in Tropical Waters*.

Wydanie pierwsze. Broszura. Edward Arnold Ltd., Londyn, 1977. Str. 64, funtów ang. 1,80.

Ryby są jednym z głównych źródeł białka, z którego zasobów naturalnych korzysta cała ludzkość. Liczebny wzrost populacji ludów afrykańskich i ludów innych krajów tropikalnych nasilił intensyfikację połowów ryb morskich i słodkowodnych. Dla wyrównania niedoborów białka zwierzęcego w krajach afrykańskich i azjatyckich, ich rządy kładą szczególny nacisk na zakładanie sztucznych hodowli ryb, głównie z rodziny pielęgnicowatych (*Cichlidae*). Znajomość ekologii ryb ma zatem, poza aspektem czysto poznawczym, również aspekt utylitarny.

Autor recenzowanej książki zebrał liczne informacje rozproszone w rozmaitych publikacjach i przedstawił w sposób zwarty cały szereg problemów ekologicznych ryb zamieszkujących wody tropikalne. Przeczytanie tej książki zaznajomi czytelnika z podstawami ekologii ryb tropikalnych, co nie oznacza ryb akwariowych i tutaj należy ostrzec tę grupę czytelników, która może szukać w tej książce informacji o hodowli ryb akwariowych. W kolejnych rozdziałach autor omawia warunki środowiska, w jakim bytują ryby tropikalne i rozmieszczenie geograficzne podstawowych grup ryb, które wchodzą w skład populacji odpowiednich nisz ekologicznych. W rozdziałach 1 - 4 zostały omówione ryby pelagicz-

ne, ryby szelfowe żyjące przy dnie oraz ryby raf koralowych. W rozdziale 5 przedstawiono problemy ekologiczne ryb żyjących w wodach słodkich: w dużych jeziorach afrykańskich oraz w sztucznych jeziorach zaporowych. W rozdziale ostatnim czytelnik znajdzie informacje o sposobach eksploatacji i o zasobach wód tropikalnych. Książka jest ilustrowana licznymi rysunkami i schematami.

Wincenty Kilarski

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach — zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, ryc. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell. Res., 73: 41-488, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] Histone and Nucleohistones, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 60-64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne, składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00 - 958 Warszawa, konto PKO nr 1531 - 71, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00 - 901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00 - 068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 10001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00 - 067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

E. WILAND, Rola niehistonowych białek chromatyny (NHP) w kontroli transkrypcji podczas cyklu komórkowego	217
B. GABARA, Egzyna: struktura, chemizm i ontogeneza	233
A. F. SIKORSKI, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> i jego aparat wiciowy w badaniu molekularnych podstaw różnicowania i rozwoju organizmów	261
K. KRZYSTYNIAK, Mechanizmy i efekty działania związków tiolowych na komórki	279
F. KACZMARSKI, Ultrastruktura plemnika ssaka	301
Recenzje	321