

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 8 · NR 2**  
**1981 (87-138)**

# **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 586 + 104 egz. Ark. wyd. 4,25. Ark. druk 3,25 + 0,25 wkł. Papier druk. sat. III kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lutym 1981 r. Podpisano do druku w czerwcu 1981 r. Druk ukończono w czerwcu 1981 r. Zam. 82/81 · · Cena zł 20,--

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>



## IMMUNOCYTOCHEMICZNA LOKALIZACJA GONADOLIBERYNY (GnRH) W PODWZGÓRZU

### IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GONADOLIBERINE (GnRH) IN THE HYPOTHALAMUS

Jolanta POLKOWSKA

Zakład Neurofizjologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN

*Streszczenie.* W artykule omówiono wiadomości związane z lokalizacją hormonu podwzgórzowego gonadoliberyny (GnRH) metodami immunocytochemicznymi w podwzgórzach ssaków. Na wstępie przedstawiono rodzaje metod immunocytochemicznych oraz problemy związane z otrzymywaniem przeciwciał przeciwko GnRH. Omówiono także pokrótce wyniki badań nad lokalizacją tego hormonu metodą radioimmunologiczną. Opierając się na obszernych danych literaturowych przedstawiono obecny stan badań na temat: obecności gonadoliberyny w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców; trudności w lokalizowaniu perykarionów zawierających GnRH; przebiegu dróg nerwowych przenoszących GnRH do narządów neurohemalnych podwzgórza — wyniosłości pośrodkowej i narządu naczyniowego blaszki krańcowej; rozmieszczenia, pochodzenia i funkcji zakończeń nerwowych zawierających gonadoliberynę we wspomnianych narządach.

*Summary.* In the article, the immunocytochemical localization of gonadoliberine (GnRH) in the hypothalamus of the mammals was presented. First, the various modifications of the method and problems concerning the production of the antibodies anti-GnRH were described. Some radioimmunological results on the localization of GnRH in the nervous tissue were put in addition. On the basis of the current references, the following data were presented: the presence of GnRH in the central nervous system of various species; the localization of GnRH in pericarya and controversies related to their estimation; the course of nervous tracts carrying GnRH to the neurohemal organs of the hypothalamus — median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis; and finally, the data concerning the distribution, origin and function of the GnRH-nerve terminals in the above-mentioned organs.

#### WSTĘP

W 1952 r. Harris i Jacobson [42] wysunęli hipotezę, że funkcja przedniego płata przysadki jest kontrolowana przez podwzgórze. W latach sześćdziesiątych uzyskano konkretne dowody stwierdzające, że wy-



ciągi z podwzgórzy bydłych, szczurzych i owczych zawierają aktywny czynnik powodujący uwolnienie hormonu luteinizującego (LH) [30, 33, 68, 84], a także follitropinę (FSH) [47, 60, 70]. Czynnik ten został wyizolowany i oczyszczony w laboratoriach Schally'ego i Guillemina [85, 86, 71] i nazwany hormonem uwalniającym hormon luteinizujący (luteinizing hormone-releasing hormone — LH-RH). Ustalono, że jest to deka-peptyd o następującej sekwencji aminokwasów: pyro/GLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY-NH<sub>2</sub> [5, 66]. Naturalny hormon, a także zsyntetyzowany deka-peptyd [65] w jednakowo wysokim stopniu uwalniają zarówno LH, jak i FSH u szczura i wielu innych gatunków [86, 87]. W związku z podwójną aktywnością tego związku, Schally i wsp. [85] zaproponowali nazwę LH/FSH-RH. Ostatnio Komisja Biochemicznej Nomenklatury zaleciła stosowanie nazwy „gonadoliberyna” lub „hormon uwalniający gonadotropiny — GnRH” [79, 102].

Zsyntetyzowanie gonadoliberyny pozwoliło na opracowanie metod prowadzących do ilościowego oznaczenia tego hormonu oraz do jego lokalizacji w tkance. Dwie z tych metod, radioimmunologiczna i immunocytochemiczna, opierają się na reakcji „antygen-przeciwciało”. Posługując się radioimmunologią można ilościowo określić stężenie hormonu w osoczu krwi, a także w homogenatach tkankowych. Metody immunocytochemiczne służą do lokalizowania hormonu w tkance. Dotychczasowe wyniki doświadczeń potwierdziły przypuszczenie, że można tym sposobem odszukać elementy nerwowe syntetyzujące GnRH, a także struktury, w których jest on gromadzony i uwalniany do krwi.

#### METODY IMMUNOCYTOCHEMICZNE STOSOWANE DO LOKALIZACJI GONADOLIBERYNY

Jak już wspomniano, metoda immunocytochemiczna opiera się na wysoce swoistej reakcji antygen-przeciwciało. Zasady metody opracował Coons w 1958 r. [32]. Od tego czasu jest ona sukcesywnie rozwijana i obecnie istnieje szereg jej wariantów. Do lokalizacji hormonów przysadkowych i podwzgórzowych stosuje się najczęściej technikę fluorescencyjną lub immunoenzymatyczną, gdzie w roli markera używana jest peroksydaza chrzanowa [75] (tabela). W 1969 r. Mason i wsp. [64] oraz Sternberger i wsp. [98] wprowadzili do oznaczania antygenów tkankowych modyfikację metody peroksydazowej, która okazała się 100-1000 razy bardziej czuła od metody fluorescencyjnej. W literaturze angielskiej znana ona jest pod nazwą „unconjugated” lub „immunoglobulin-enzyme bridge technique”. W metodzie tej wykorzystano właściwości antygenowe peroksydazy i wprowadzono ją do procedury immunocytochemicznej



TABELA

Modyfikacje i schemat działania metody immunocytochemicznej  
(w nawiasach podano nazwy używane w literaturze angielskiej)

Metoda immunofluorescencyjna (immunofluorescence technique)	Metoda immunoenzymatyczna (immunoenzymatic, immunoperoxidase technique)	
	metoda oznakowanej peroksydazy (conjugated peroxidase tech., peroxidase labelled antibody tech.)	metoda nieoznakowanej peroksy- dazy (unlabelled antibody enzyme tech., immunoglobulin- enzyme bridge tech.)
1. Przeciwciało I, anty-GnRH		
2. Przeciwciało II, anty- $\gamma$ -globulina ozna- kowana fluoresceiną 3. Obserwacja w mikro- skopie fluorescencyj- nym	2. Przeciwciało II, anty- $\gamma$ -globulina oznakowana peroksydazą chrzanową 3. DAB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4. Obserwacja w mikroskopie światlnym 5. Czterotlenek osmu 6. Obserwacja w mikroskopie elektronowym	2. Anty- $\gamma$ -globulina 3. Kompleks PAP 4. DAB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5. Obserwacja w mikroskopie światlnym 6. Czterotlenek osmu 7. Obserwacja w mikroskopie elektronowym

jako kompleks z własnym przeciwciałem, tzw. PAP (peroxidase-antipe-  
roxidase complex). Ma on kształt pentagonalny i jest rozpoznawalny  
w mikroskopie elektronowym.

Jednoczesne oznaczenie więcej niż jednego antygenu w tym samym  
skrawku tkankowym jest możliwe przez zastosowanie substratów dają-  
cych produkty reakcji o odmiennych kolorach [74] lub użycie różnych  
enzymatycznych markerów w dwóch następujących po sobie procedu-  
rach [29].

#### RODZAJE PRZECIWCIAŁ ANTYGONADOLIBERYNY

Powodzenie reakcji immunocytochemicznej zależy od użycia swo-  
istego i dobrze oczyszczonego przeciwciała. Procedury otrzymywania  
przeciwciał w szeregu laboratoriach różnią się znacznie i wydaje się, że  
jest to jedna z przyczyn uzyskiwania kontrowersyjnych wyników w ba-  
daniach nad lokalizacją GnRH metodami immunocytochemicznymi. De-  
kapeptyd GnRH ma właściwości haptenu prostego. Aby związek ten  
uczynić immunogennym adsorbuje się go na węglu drzewnym lub poli-  
winylopyrolidonie. Inną, najczęściej stosowaną metodą jest chemiczne  
sprzęganie GnRH z cząsteczkami białkowymi: ludzką lub bydlęcą albu-  
miną, gamma-globuliną świnki morskiej oraz ludzką alfa-globuliną.  
Właściwości uzyskanego przeciwciała są w dużym stopniu zależne od  
tego, w jakiej pozycji aminokwasowej haptenu następuje sprzężenie



z cząsteczką białka. Okazało się, że wyniki uzyskane z badań nad immunocytochemiczną lokalizacją GnRH przy użyciu różnych przeciwciał anty-GnRH nie zawsze są ze sobą zgodne. Szczególnie kontrowersyjny okazał się problem dotyczący lokalizacji hormonu w perykarionach, gdzie prawdopodobnie odbywa się jego synteza. Stwierdzono, że np. przeciwciała anty-GnRH, otrzymane z deka-peptydu sprzężonego z bydlęcą albuminą w pozycji tyrozyny, nie były zdolne do ujawnienia GnRH w perykarionach, w żadnych warunkach doświadczalnych [6 - 8, 38, 41]. Natomiast sprzężenie w tej samej pozycji z inną cząsteczką białka — peroksydazą chrzanową [54] lub tyroglobuliną [2] — dawało w rezultacie przeciwciała ujawniające gonadoliberynę w perykarionach. Pozytywną reakcję w perykarionach dawały również przeciwciała uzyskane z GnRH sprzężonej z cząsteczką białka w pozycji histydyny [14, 16, 18, 20, 25, 43, 95] i w pozycji końcowej glicyny [92]. Sternberger i Hoffman [99] uważają, że w wiązaniu GnRH z przeciwciałem istotną rolę odgrywa C-końcowa glicyna, natomiast N-końcowa glutamina nie bierze udziału w reakcji.

#### LOKALIZACJA GONADOLIBERYNY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM METODĄ RADIOIMMUNOLOGICZNĄ

Pierwsze dane na temat występowania gonadoliberyny w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców uzyskano za pomocą metody radioimmunologicznej na kilka lat przed zastosowaniem techniki immunocytologicznej. W homogenatach tkanki nerwowej oznaczano stężenie GnRH używając przeciwciał wytworzonych przeciwko syntetycznej GnRH [4, 76], która wykazywała ściśle podobieństwo struktury u różnych gatunków kręgowców [37, 48, 103]. Gonadoliberynę oznaczono w wyciągach podwzgórzy ssaków [34, 51, 53, 77, 106], ptaków [48] oraz płazów [103]. Znaleziono ją również w szyszynce niektórych ssaków [107], a także w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura [52].

Stwierdzono, że strukturą zawierającą największe stężenie radioimmunologicznej GnRH jest wyniosłość pośrodkowa, a także jądro lejka [77, 106]. Kizer i wsp. [53] zmierzili stężenie GnRH w poszczególnych częściach wyniosłości pośrodkowej i stwierdzili, że w części przedniej gonadoliberyna znajduje się w głębszych warstwach tego narządu, natomiast w jego części środkowej — w bocznej zewnętrznej strefie. Znaczne ilości GnRH znaleziono w okolicach skrzyżowania wzrokowego, która to struktura pokrywała się prawdopodobnie z regionem narządu naczyniowego blaszki krańcowej [51, 53, 106].

Dokładniejszych danych wskazujących na cykliczne zmiany w zawartości gonadoliberyny w różnych obszarach podwzgórza dostarczyły



badania przeprowadzone na samicach szczura w różnych fazach cyklu płciowego. Badano okolicę brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza (okolica guzowa) wraz z częścią szypuły przysadki i wyniosłością pośrodkową oraz przednie podwzgórze pokrywające się z polem przedwzrokowym. W brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu maksymalne wartości obserwowano w proestrus rano i w estrus [3, 49], a także w okresie późnego proestrus [50], wartości minimalne od godz. 12<sup>00</sup> estrus do godz. 12<sup>00</sup> diestrus II [3]. W polu przedwzrokowym najwyższe stężenie GnRH występowało w okresie diestrus II i proestrus [49], a następnie następował gwałtowny spadek w estrus między godz. 8<sup>00</sup> a 12<sup>00</sup> [3].

#### IMMUNOCYTOCHEMICZNA LOKALIZACJA GONADOLIBERYNY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Metoda immunocytochemiczna w przeciwieństwie do radioimmunologicznej pozwala na precyzyjną lokalizację hormonu w poszczególnych elementach komórki nerwowej, w jądrach podwzgórza, a także na przesledzenie dróg nerwowych przewodzących hormon do zakończeń nerwowych w wyniosłości pośrodkowej i narządzie naczyniowym blaszki krańcowej. Do chwili obecnej gonadoliberynę znaleziono w podwzgórzu następujących gatunków: człowieka [11, 22, 25, 27, 78], małp naczelnych i małpy rebus [12 - 15, 43, 97], psa i kota [17, 18, 26], królika [9, 91], świnki morskiej [7, 16, 20, 26, 59, 62, 67, 96], chomika [62, 81], owcy [58, 83], szczura [7, 38, 43, 46, 50, 56, 62, 72, 80, 89] oraz myszy [7, 41, 43, 44, 58, 62, 109]. Poza wymienionymi gatunkami ssaków, GnRH badano również u nielicznych przedstawicieli innych kręgowców, jak ptaki [23, 28], ryby [39, 94] oraz płazy [2, 40]. We wszystkich tych doniesieniach, z małymi wyjątkami, gonadoliberynę reagującą immunologicznie ze swoistym przeciwciałem zlokalizowano za pomocą mikroskopu elektronowego w aksonach [28, 38, 80, 96]. Hormon występuje w postaci ziaren o średnicy około 75 - 95 nm [80]. Tylko Kozłowski i Zimmerman [58] oraz Kozłowski i wsp. [109] uważają, że u myszy gonadoliberyna wykazująca aktywność immunologiczną jest zlokalizowana głównie w wypustkach komórek ependymy wyścielających III komorę mózgu.

Najintensywniejsza reakcja immunocytochemiczna z przeciwciałem anty-GnRH jest obserwowana w części podwzgórza zwanej wyniosłością pośrodkową, która ma bezpośrednie połączenie z przysadką przez krążeniowy układ wrotny. Hormon widoczny w mikroskopie świetlnym w postaci brązowo wybarwionych ziaren (technika peroksydazowa) występuje w zakończeniach nerwowych tworzących tzw. zewnętrzną warstwę palisadową, usytuowaną w bezpośrednim kontakcie z naczyniami



włosowatymi układu wrotnego, oraz w proksymalnej części szypuły przysadki przylegającej do części guzowej przysadki. Zgodnie z badaniami Szentághothai i wsp. [101] układ ten stanowi końcowy fragment tzw. drogi guzowo-lejkowej (tubero-infundibular tract), który jest częścią systemu drobnokomórkowego opisanego przez Szentághothai w 1964 r. [100]. Autor ten przypuszczał, że droga guzowo-lejkowa rozpoczyna się w perykarionach jądra lejka, jednakże późniejsze badania wykazały, że w jego skład wchodzi również aksony pochodzące i z innych jąder podwzgórza. Obecnie uważa się, że droga guzowo-lejkowa jest jednym z ważniejszych układów neurosekrecyjnych, w którym są produkowane transportowane i uwalniane hormony podwzgórzowe. Wyniosłość pośrodkowa pełni w tym układzie rolę narządu neurohemalnego, w którym hormony są gromadzone i uwalniane do krwi naczyniowego układu wrotnego. Synteza hormonów odbywa się prawdopodobnie w perykarionach, których lokalizacja, w przypadku gonadoliberyny, do tej pory jest sprawą nie całkiem wyjaśnioną i kontrowersyjną.

#### TRUDNOŚCI W WYKRYWANIU PERYKARIONÓW GnRH

O ile wykazanie obecności czynnego immunologicznie GnRH w wyniosłości pośrodkowej nie sprawia trudności w większości przebadanych gatunków, o tyle uwidocznienie GnRH w perykarionie, gdzie odbywa się synteza hormonu, jest bardzo trudne. Pierwsze i najobszerniejsze badania lokalizacji GnRH metodą immunocytochemiczną przeprowadzone były na śwince morskiej i szczurze. Okazało się, że u tych dwóch gatunków niemożliwe jest uwidocznienie perykarionów syntetyzujących GnRH bez uprzedniego podania zwierzętom pewnych środków farmakologicznych. Nie stosując tej dodatkowej procedury, uzyskiwano reakcję immunologiczną z przeciwciałem anti-GnRH tylko w aksonach i w zakończeniach nerwowych wyniosłości pośrodkowej i blaszki krańcowej [7, 50, 56]. Natomiast w ciałach neurocytów, gdzie jak sądzono hormon jest syntetyzowany, reakcja nie zachodziła. U świnki morskiej uzyskano reakcję immunologiczną w perykarionach GnRH dopiero po podaniu kolchicyny i po kastracji [19, 20] oraz po dokomorowej infuzji serotoniny lub sulpirydu [61, 63]. Łączne podanie sulpirydu, środka hamującego owulację, wraz z kolchicyną, środkiem blokującym przepływ aksoplazmatyczny, zwiększało liczbę perykarionów, w których zachodziła reakcja z przeciwciałem przeciwko GnRH [63]. U szczura także nie udało się wykryć perykarionów GnRH u normalnych osobników, jak również u tych, którym podano kolchicynę [89]. Dopiero zastosowanie narkozy nembutalowej u samic w okresie owulacyjnym oraz cięć frontalnych podwzgórza



w obszarze okołowzrokowym pozwoliło na ujawnienie perykarionów GnRH u tego gatunku [92].

Na podstawie wyników doświadczeń stwierdzono, że ciała neurocytów, w których zlokalizowano GnRH, występują najliczniej w przednim podwzgórzu, a mianowicie: w okolicach skrzyżowania wzrokowego, w polu okołowzrokowym, a także koło przegrody. W 1975 r. Naik [73] badając podwzgórze szczura spostrzegł obecność perykarionów reagujących pozytywnie z przeciwciałem anty-GnRH nie tylko na obszarze przedniego podwzgórza, ale również w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu, w jądrach lejka i suteczkowatym. Taką samą lokalizację podała Hoffman [44]. Jednakże prace Naika poddane zostały krytyce przez Sétáló i wsp. [92]. Zarzucono temu badaczowi stosowanie zbyt stężonego roztworu przeciwciała oraz brak odpowiednich kontroli. Wyniki pracy Hoffman zostały wkrótce przez nią samą odwołane [31].

Istnieje kilka hipotez wyjaśniających przyczyny niepowodzenia w wykrywaniu perykarionów syntetyzujących GnRH u świnki morskiej, szczura, a także niektórych innych gatunków. Szereg autorów uważa, że stężenie hormonu syntetyzowanego w ciele neurocytu jest zbyt małe, aby można je było wykryć metodami immunocytochemicznymi. Dopiero zahamowanie przepływu aksoplazmatycznego poprzez interwencję eksperymentalną zwiększa stężenie hormonu i pozwala na jego ujawnienie. Kordon [55] dowodzi, że biologiczna i immunologiczna aktywność gonadoliberyny nie istnieje poza frakcją synaptosomalną. Domański i Kochman [35] przedstawiają dowody na to, że w biosyntezę GnRH włączone są rybosomy cytoplazmatyczne. W związku z tym autorzy ci sugerują, że dekapeptyd jest syntetyzowany w perykarionie w postaci prohormonu, który poprzez enzymatyczną aktywację w czasie transportu i magazynowania przekształca się w czynny immunologicznie hormon. Na podstawie licznych doniesień wiadomo, że immunologiczna reakcja GnRH ze swoistym przeciwciałem łatwiej zachodzi w aksonie niż w ciele komórkowym. Sugeruje to, że forma hormonu zawartego w aksonie posiada więcej miejsc wiążących przeciwciało niż hormon znajdujący się w perykarionie. Hipoteza ta została potwierdzona przez Millara i wsp. [69] na ostatnim Kongresie Endokrynologicznym w Melbourne. Autorzy ci oczyścili i scharakteryzowali prohormonalną formę GnRH w wyciągach podwzgórza bydlęcego. Sugerują oni, że forma ta dominuje w perykarionie, natomiast w aksonie jest ona stopniowo rozszczepiana przez enzym proteolityczny typu trypsyny do dekapeptydu.

Trudności w wykrywaniu perykarionów GnRH są tłumaczone także przyczynami natury technicznej. Goldsmith i Ganong [38] podają, że w ich doświadczeniu aż 98% GnRH było tracone podczas różnych etapów obróbki histologicznej. Sternberger i Hoffman [99], na podstawie



prac innych autorów, dochodzą do wniosku, że czułość metody peroksydazowej zależy od rodzaju utrwalacza i sposobu podania go do tkanki. Stwierdzono różną intensywność reakcji immunocytologicznej przy użyciu takich utrwalaczy, jak Bouin-Holland bez kwasu octowego, Bouin czy płyn Zamboniego [108]. Podanie utrwalacza drogą naczyniową (do serca) może w znacznym stopniu zintensyfikować reakcję w różnych elementach komórki nerwowej.

#### LOKALIZACJA PERYKARIONÓW I DRÓG GnRH

Ośrodki nerwowe zawierające gonadoliberynę stosunkowo dobrze zostały zbadane u takich gatunków, jak człowiek, małpa, królik, pies i kot. Na podstawie prac pochodzących z laboratoriów Barry'ego, Sétáló i Hoffman wyłania się obraz dający pewne wyobrażenie o rozmieszczeniu perykarionów GnRH oraz o drogach nerwowych przenoszących ten hormon do wyniosłości pośredkowej lub do narządu naczyniowego blaszki krańcowej. U wspomnianych gatunków perykariony zawierające GnRH można odnaleźć stosunkowo łatwo bez dodatkowej interwencji eksperymentalnej. U małp naczelnych, małpy rebus, psa i kota [14, 17, 43] większość perykarionów GnRH obserwowano w okolicach guza popielatego, a szczególnie w jądrach lejka i suteczkowatym. Druga grupa komórek stanowiąca około 25% wszystkich obserwowanych perykarionów GnRH rozmieszczona była w polu okołowzrokowym, w części naczyniowej blaszki krańcowej oraz w okolicach przegrody. Stwierdzono, że komórki mają około 10 - 40  $\mu\text{m}$  średnicy, kilka dendrytów i akson widzialny w mikroskopie świetlnym w postaci paciorków różańca. Liczba obserwowanych perykarionów GnRH u jednego osobnika wahała się od kilkunastu do około 100. Występowały one w stanie rozproszonym, rzadko tworząc grupy składające się z 4 - 5 komórek. U królika [91] większość perykarionów GnRH zlokalizowano w okolicy przedwzrokowej podwzgórze i w części nadskrzyżowaniowej. Taka sama lokalizacja występowała u szczura i świnki morskiej (jak już wspomniano w poprzednim rozdziale). Natomiast u człowieka komórki te występowały prawie wyłącznie w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórze, w jądrze lejka i jądrze przed-suteczkowatym [10, 11, 25].

Aksony, które biorą początek w perykarionach syntetyzujących gonadoliberynę, tworzą drogi nerwowe kończące się w wyniosłości pośredkowej lub narządzie naczyniowym blaszki krańcowej [9]. Barry, opierając się na wynikach swoich prac przeprowadzonych na małpach, króliku i człowieku, zakłada istnienie trzech takich dróg. Pierwsza, to wspomniana już uprzednio droga guzowo-lejkowa, zawierająca aksony



wychodzące z przednich, bocznych i tylnych regionów brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza, kończy się w wyniosłości pośrodkowej. Druga, droga przedwzrokowo-lejkowa (preoptico-infundibular tract), opisana u gryzoni [21], bierze początek w perykarionach usytuowanych w przednim podwzgórzu, poza obszarem podwzgórza brzuszno-przyśrodkowego, kończy się również w wyniosłości pośrodkowej. U małp naczelnych istnienie tej drogi jest raczej hipotetyczne. Barry włącza ją do drogi guzowo-lejkowej jako jej przednie skrzydło. Trzecia droga, nazwana podwzgórzowo-krańcowa (hypothalamo-terminal tract), rozpoczyna się prawdopodobnie w perykarionach rozmieszczonych w polu przedwzrokowym, a kończy w narządzie naczyniowym blaszki krańcowej. Odrębność tej drogi była potwierdzona przez wyniki doświadczeń na szczurach, którym przecinano drogi nerwowe (tzw. deafferentacje\*) [49, 104]. Stwierdzono mianowicie, że jeżeli dokona się cięcia poza skrzyżowaniem wzrokowym w kierunku donosowym, to w zakończeniach nerwowych blaszki krańcowej nie obserwuje się reakcji z przeciwciałem anty-GnRH.

Oprócz wymienionych obszarów podwzgórza, gonadoliberynę zlokalizowano również w strukturach pozapodwzgórzowych mózgu, głównie u królika, naczelnych i świnki morskiej. Taka lokalizacja może sugerować, że GnRH oprócz pośrednictwa w uwalnianiu LH i FSH z przysadki spełnia jakieś inne funkcje w organizmie.

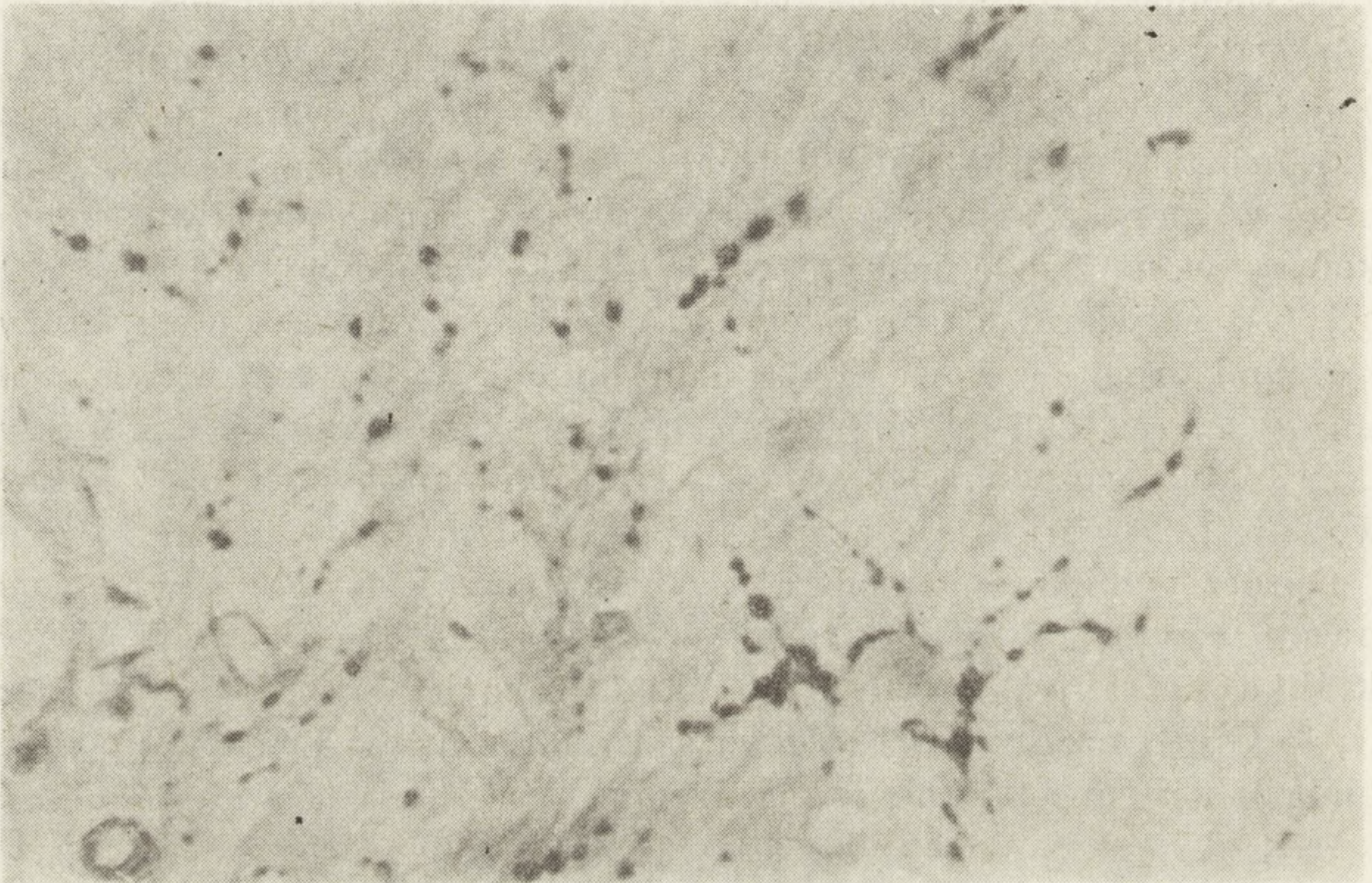
#### ROZMIESZCZENIE I POCHODZENIE NEURYTÓW ZAWIERAJĄCYCH GONADOLIBERYNĘ W WYNIOSŁOŚCI POŚRODKOWEJ

Jak już wspomniano, gonadoliberyna jest magazynowana w zakończeniach nerwowych tworzących zewnętrzną warstwę palisadową wyniosłości pośrodkowej. Topografia tych zakończeń najdokładniej została opracowana u szczura [8, 45]. Włókna nerwowe zawierające GnRH mają przebieg strzałkowy. Na przekrojach czołowych podwzgórza, w części donosowej wyniosłości pośrodkowej skupiają się one przyśrodkowo w warstwie usytuowanej tuż poniżej III komory mózgu (ryc. 2). Trochę bardziej ku tyłowi, gdzie szypuła przysadki zaczyna oddzielać się od wyniosłości pośrodkowej, włókna GnRH zbierają się w dwa zwoje rozmieszczone symetrycznie przy brzdach guzowo-lejkowych. Bardziej doogonowo, po oddzieleniu szypuły od podwzgórza, włókna te mają ponownie układ przyśrodkowy, w warstwie usytuowanej poniżej zachyłka su-

\* Deafferentacja (termin angielski „deafferentation”) zabieg chirurgiczny polegający na przecięciu określonych dróg nerwowych (tzw. partial deafferentation) lub odizolowaniu całych obszarów podwzgórza (tzw. total deafferentation) wykonywany za pomocą specjalnie skonstruowanego w tym celu „noża Halasza”.



teczkowego. Na obszarze całej wyniosłości widoczne są aksony kolateralne tworzące zakończenia podobne do gron w pobliżu naczyń włosowatych spłotu pierwotnego. Aksony takie widoczne są również wśród perykarionów jądra lejka i jądra przedsuteczkowego (ryc. 1). Pochodzenie



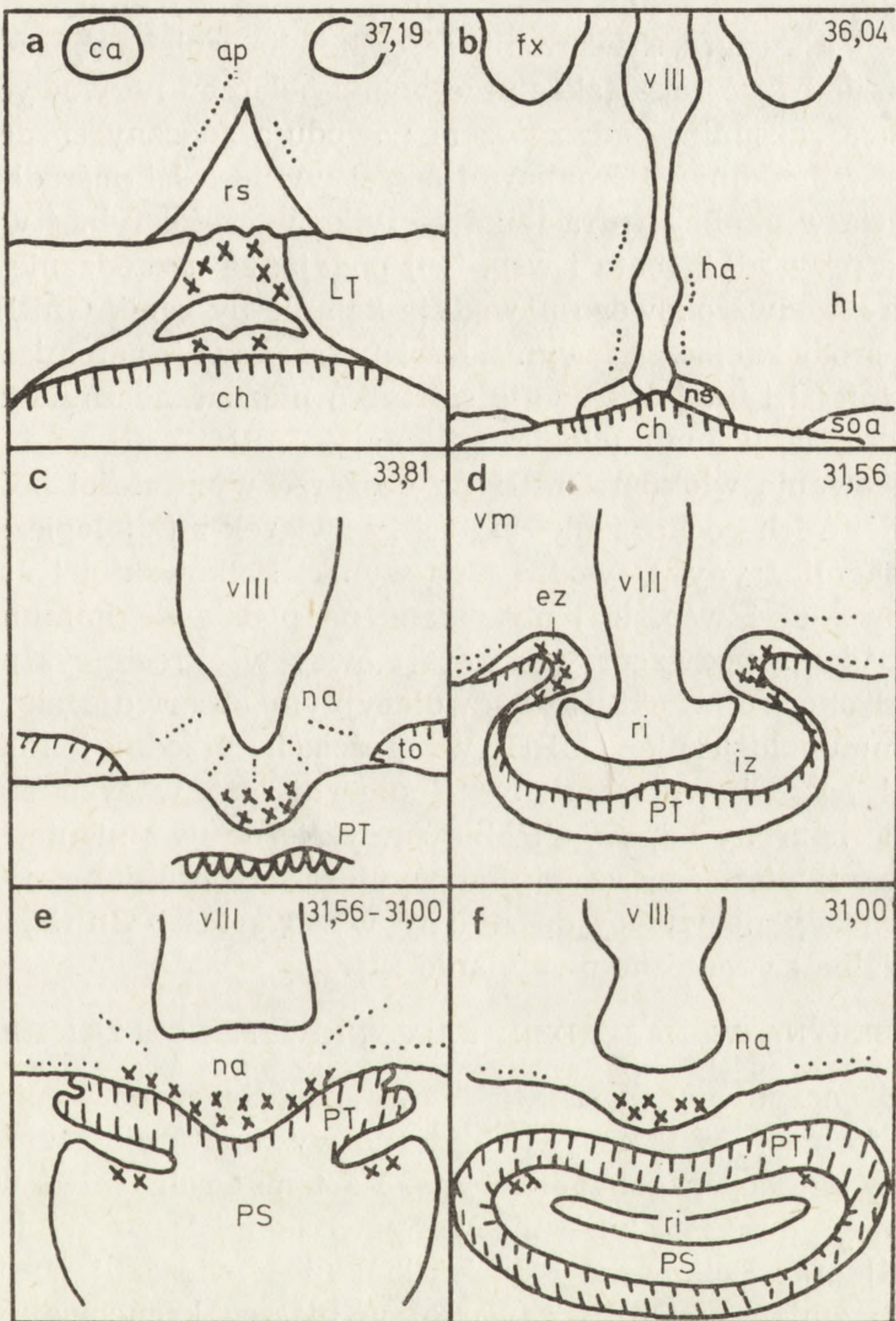
Ryc. 1. Neuryty zawierające GnRH w jądrze lejka u owcy

Preparat wykonano metodą znakowanej peroksydazy. Użyto przeciwciała anty-GnRH nr 8531, wytworzonego przez dr M-P. Dubois. Powiększenie 240X

włókien GnRH, obserwowanych w tym regionie podwzgórza u szczura, w głównej mierze przypisywane jest raczej ośrodkom przedniego podwzgórza a nie jądom brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza. Wskazują na to wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach z deaferentacjami podwzgórza. Browstein i wsp. [24] używając metody radioimmunologicznej stwierdzili, że gonadoliberyna zniknęła z obszarów brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza po całkowitym odizolowaniu tej struktury od reszty podwzgórza. Podobne rezultaty uzyskał Kalra [49]. Wcześniej, Sétáló i wsp. [90] stwierdzili, że taki sam rodzaj cięć powoduje zatrzymanie tonicznego uwalniania gonadotropin. Ajika i Hökfeld [1], po dokonaniu frontalnych deaferentacji w doogonowej części skrzyżowania nerwów wzrokowych, stwierdzili występowanie zmian degeneracyjnych w zakończeniach nerwowych zewnętrznej warstwy palisadowej wyniosłości pośrodkowej.

Wiele wyników doświadczeń sugeruje, że pochodzenie zakończeń nerwowych GnRH w poszczególnych częściach wyniosłości pośrodkowej





Ryc. 2. Schematy przekrojów czołowych podwzgórza owcy, na których zaznaczono rozmieszczenie włókien GnRH (kropki) i zakończeń nerwowych GnRH (krzyżyki)

a i b — przednie podwzgórze, c — przednia, d — środkowa, e i f — tylna część wyniosłości pośredniej. Według Polkowskiej i wsp. [83]

Wykaz skrótów ap — pole przedwzrokowe; ca — spoidło przednie; ch — skrzyżowanie wzrokowe; ez — zewnętrzna warstwa palisadowa wyniosłości pośredniej; fx — sklepienie; hl — pole dobowe podwzgórza; iz — wewnętrzna warstwa wyniosłości pośredniej; LT — blaszka krańcowa; na — jądro lejka; ha — jądro przednie podwzgórza; ns — jądro skrzyżowania; PS — szypuła przysadki; PT — część guzowa przysadki; ri — zachyłek lejka; rs — zachyłek nadwzrokowy; soa — część przednia jądra nadwzrokowego; to — droga wzrokowa; vm — jądro dobrzusznoprzyśrodkowe



nie jest jednorodne. Kordon i Rotsztejn [57], po dokonaniu różnego typu deaferentacji u szczura, stwierdzili, że całkowita izolacja brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza, a także przerwanie połączeń nerwowych między tą formacją a przednim podwzgórzem powodują znaczny spadek zawartości GnRH w przedniej i środkowej części wyniosłości pośrodkowej, natomiast cięcia w okolicy jądra lejka — tylko w części tylnej wyniosłości i w szypule przysadki. Ibata i wsp. [46] podają, że uszkodzenie elektrolityczne pola przedwzrostkowego powoduje kompletny zanik GnRH w bocznej strefie środkowej części wyniosłości pośrodkowej, natomiast w częściach przedniej i tylnej obserwuje się tylko nieznaczne zmniejszenie intensywności reakcji immunologicznej z anty-GnRH.

Zróznicowanie włókien GnRH na obszarze wyniosłości pośrodkowej (jeżeli chodzi o ich pochodzenie) ma ścisły związek z fizjologicznym działaniem gonadoliberyny. Dowodzą tego wyniki Polkowskiej i Jutisza [82] oraz Polkowskiej i wsp. [83] otrzymane na podstawie immunocytochemicznego badania podwzgórzy szczura i owcy w okresie cyklu płciowego. Stwierdzono, że w okresie poowulacyjnym obserwuje się zanikanie czynnej immunologicznie GnRH w częściach przedniej i środkowej wyniosłości pośrodkowej. Zmiany te sugerują, że w tych strukturach znajdują się neurony odpowiedzialne za cykliczne uwalnianie LH. Przyпуска się również, że część tylna wyniosłości pośrodkowej, w której nie występowały poowulacyjne zmiany w zawartości GnRH, może być odpowiedzialna za toniczne uwalnianie LH.

#### GONADOLIBERYNA W NARZĄDZIE NACZYNIOWYM BLASZKI KRAŃCOWEJ

Narząd naczyniowy blaszki krańcowej jest drugą po wyniosłości pośrodkowej formacją, w której stwierdzono występowanie zakończeń nerwowych zawierających gonadoliberynę. Na temat roli GnRH w tym narządzie istnieje dość istotna kontrowersja. Baker i Dermody [6], Weiner i wsp. [104] oraz Polkowska i Jutisz [82] nie stwierdzili występowania cyklicznych zmian w GnRH zawartej w blaszce krańcowej w okresie cyklu płciowego u szczura. Natomiast Sétáló i wsp. [93] oraz Wenger [105] obserwowali takie zmiany u szczura, a Barry — u małpy [13]. Barry stwierdził występowanie maksymalnej zawartości GnRH w blaszce krańcowej w okresie fazy lutealnej i pęcherzykowej jajnika, a minimalnej — w fazie owulacyjnej. Uważa on, że u małpy droga podwzgórzo-krańcowa, kończąca się w narządzie naczyniowym blaszki krańcowej, bierze udział w modulowaniu wrażliwości komórek gonadotropowych na GnRH. Ponieważ w narządzie tym istnieje bariera krew-mózg, przychyła się on do hipotezy Duvenroya i wsp. [36], że krew z blaszki krańcowej płynie na obwód przez przednią żyłę mózgową i tą drogą może przedostać się do przysadki.



## PODSUMOWANIE

1. Za pomocą przeciwciał wytwarzanych przeciwko syntetycznej GnRH możliwe jest zlokalizowanie gonadoliberyny w ośrodkowym układzie nerwowym wielu gatunków kręgowców.
2. Zlokalizowano perykariony, w których najprawdopodobniej odbywa się synteza hormonu lub jego formy prohormonalnej. Komórki te występują w stanie rozproszonym na obszarze przedniego podwzgórza — nad skrzyżowaniem wzrokowym i w polu przedwzrokowym — przede wszystkim u gryzoni, oraz na obszarze brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza — u małych naczelników i człowieka.
3. Hormon jest przenoszony drogami nerwowymi do narządów neurohemalnych podwzgórza (wyniosłości pośredkowej i narządu naczyniowego blaszki krańcowej), gdzie jest magazynowany i uwalniany do krwi.
4. Zakończenia nerwowe zawierające GnRH, znajdujące się w wyniosłości pośredkowej, mają różne pochodzenie i prawdopodobnie spełniają różną funkcję.
5. Obecność GnRH w ośrodkach pozapodwzgórzowych sugeruje, że hormon ten oprócz działania na przysadkę może pełnić inne funkcje fizjologiczne.

## LITERATURA

- [1] AJIKA K., HÖKFELD T., Projections to the median eminence and arcuate nucleus with special reference to monoamine systems. Effects of lesions, *Cell Tiss. Res.*, **158**: 15 - 35, 1975.
- [2] ALPERT L. C., BRAWER J. R., JACKSON I. M. D., REICHLIN S., Localization of LHRH in neurons in frog brain, *Endocrinology*, **98**: 910 - 921, 1976.
- [3] ARAKI S., FERIN M., ZIMMERMAN E. A., VANDE WIELE R. L., Ovarian modulation of immunoreactive gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the rat brain; evidence for a differential effect on the anterior and mid hypothalamus, *Endocrinology*, **96**: 644 - 650, 1975.
- [4] ARIMURA A., SATO H., KUMASKA T., WOROBEK R. B., DEBELJUK L., DUNN J., SCHALLY A. V., Production of antiserum to LH releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits; development of radioimmunoassay for LH-RH, *Endocrinology*, **93**: 1092 - 1103, 1973.
- [5] BABA Y., MATSUO H., SCHALLY A. V., Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by the conventional sequential analyses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**: 459 - 463, 1971.
- [6] BAKER B. L., DERMODY W. C., Effect of hypophysectomy on immunocytochemically demonstrated gonadotropin-releasing hormone in the rat brain, *Endocrinology*, **98**: 1116 - 1122, 1976.



- [7] BAKER B. L., DERMODY W. C., REEL J. R., Localization of luteinizing hormone releasing hormone in the mammalian hypothalamus, *Am. J. Anat.*, **139**: 129 - 134, 1974.
- [8] — Distribution of gonadotropin releasing hormone in the rat brain as observed with immunocytochemistry, *Endocrinology*, **97**: 125 - 135, 1975.
- [9] BARRY J., Characterization and topography of LH-RH neurons in the rabbit, *Neurosci. Letters*, **2**: 201 - 205, 1976.
- [10] — Characterization and topography of LH-RH neurons in the human brain, *Neurosci. Letters*, **3**: 287 - 291, 1976.
- [11] — Immunofluorescence study of LRF neurons in man, *Cell Tiss. Res.*, **181**: 1 - 14, 1977.
- [12] — Septo-epithalamo-habenular LRF-reactive neurons in the monkeys, *Brain Res.*, **151**: 183 - 187, 1978.
- [13] — Immunofluorescence study of the preoptico-terminal LRF tract in the female squirrel monkey during the estrous cycle, *Cell Tiss. Res.*, **198**: 1 - 13, 1979.
- [14] BARRY J., CARETTE B., Immunofluorescence study of LRF neurons in primates, *Cell Tiss. Res.*, **164**: 163 - 178, 1975.
- [15] BARRY J., CROIX D., Immunofluorescence study of the hypothalamo-infundibular LRH tract and serum gonadotropin levels in the female squirrel monkey during the estrous cycle, *Cell Tiss. Res.*, **192**: 215 - 226, 1978.
- [16] BARRY J., DUBOIS M.-P., Étude en immunofluorescence de la différenciation de la voie neurosécrétoire préoptico-infundibulaire chez le cobaye, *Brain Res.*, **67**: 103 - 113, 1974.
- [17] — Immunofluorescence study of LRF producing neurons in the cat and dog, *Neuroendocrinol.*, **18**: 290 - 298, 1975.
- [18] — Immunoreactive LRF neurosecretory pathways in mammals, *Acta Anat.*, **94**: 497 - 503, 1976.
- [19] BARRY J., DUBOIS M.-P., POULAIN P., LEONARDELLI J., Caractérisation et topographie des neurones hypothalamoimmunoréactifs avec des anticorps anti LRF de synthèse, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **276**: 3191 - 3193, 1973.
- [20] BARRY J., DUBOIS M.-P., POULAIN P., LRF producing cells of the mammalian hypothalamus, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **146**: 351 - 366, 1973.
- [21] BARRY J., DUBOIS M.-P., CARETTE B., Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LH-RH neurosecretory pathway in the normal, castrated or testosterone treated male guinea pig, *Endocrinology*, **95**: 1416 - 1423, 1974.
- [22] BLOCH B., Les neurones producteurs de LH-RH chez l'homme ou cours de la vie foetale, *Ann. Sci. de l'Université de Franche-Comté—Besançon*, **1** - 210, 1980.
- [23] BONS N., KERDELHUÉ B., ASSENMACHER I., Présence de neurones élaborateurs de LH-RH dans l'hypothalamo antérieur du canard (*Anas platyrhynchos*), *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **285**: 1327 - 1330, 1977.
- [24] BROWSTEIN M. J., ARIMURA A., SCHALLY A. V., PALKOWITS M., KIZER J., The effect of surgical isolation of the hypothalamus on its luteinizing hormone-releasing hormone content, *Endocrinology*, **98**: 662 - 665, 1976.
- [25] BUGNON C., BLOCH B., FELLMAN D., Mise en évidence cytoimmunologique de neurones à LH-RH chez le fœtus humain, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **282**: 1625 - 1628, 1976.



- [26] BUGNON C., BLOCH B., FELLMAN D., GOUGET A., Étude comparative chez le cobaye, le chat et le chien des fibres nerveuses hypothalamo-infundibulaires immunoréactives à immun-sérum anti-LH-RH, C. R. Séanc. Soc. Biol., **170**: 83 - 89, 1976.
- [27] BUGNON C., BLOCH B., LENYS D., FELLMAN D., Ultrastructural study of the LH-RH containing neurons in the human fetus, Brain Res., **137**: 155 - 180, 1977.
- [28] CALAS A., KERDELHUÉ B., ASSENMACHER I., JUTISZ M., Étude ultrastructurale chez le canard par une technique immunocytochimique, C. R. Acad. Sci. (Paris), **278**: 2557 - 2560, 1974.
- [29] CAMPBELL G. T., BHATNAGAR A. S., Simultaneous visualisation by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods, J. Histochem. Cytochem., **24**: 448 - 453, 1976.
- [30] CAMPBELL H. J., FEUER G., GARCIA J., HARRIS G. W., The infusion of brain extracts into the anterior pituitary gland and the secretion of gonadotropic hormones, J. Physiol. (London), **157**: 30P, 1961.
- [31] CLAYTON C. J., HOFFMAN G. E., Immunocytochemical evidence for anti-ACTH activity in the "F" antiserum, Amer. J. Anat., **155**: 139 - 145, 1979.
- [32] COONS A. H., Fluorescent antibody methods, [w] General Cytochemical Methods, red. J. F. Danielli, New York, Academic Press, 1958, 399 - 422.
- [33] COURRIER R., JUTISZ M., SAKIZ E., ASCHHEIM P., Présence dans un extrait d'hypothalamus d'une substance qui stimule la sécrétion de l'hormone antéhypophysaire de lutéinisation, C. R. Acad. Sci. (Paris), **253**: 922 - 927, 1961.
- [34] DEERY D. J., Determination by radioimmunoassay of the luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of the hypothalamus of the rat and some lower vertebrates, Gen. Comp. Endocrinol., **24**: 280 - 285, 1974.
- [35] DOMAŃSKI E., KOCHMAN K., Biosynthesis of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in the rat hypothalamus, [w] Hormones and Brain Development, red. G. Dörner, M. Kawakami, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, New York, Oxford 1978, 455 - 465.
- [36] DUVENROY H., KORITKÉ J. G., MONNIER G., Sur la vascularisation de la lame terminale humaine, Z. Zellforsch., **102**: 49 - 77, 1969.
- [37] FURR B. J. A., ONUORA G. I., BONNEY R. C., CUNNINGHAM F. J., The effect of synthetic hypothalamic releasing factors on plasma levels of luteinizing hormone in the cockerel, J. Endocrinol., **59**: 495 - 502, 1973.
- [38] GOLDSMITH P. C., GANONG W. F., Ultrastructural localization of luteinizing hormone releasing hormone in the median eminence of the rat, Brain Res., **97**: 181 - 193, 1975.
- [39] GOOS H. J., MURATHANOGLU O., Localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the fore brain and neurohypophysis of the trout (*Salmo gairdneri*). An immunofluorescence study, Cell Tiss. Res., **181**: 163 - 168, 1977.
- [40] GOOS H. J., LIGTENBERG P. J. M., VAN OORDT P. G. W. J., Immunofluorescence studies on gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the fore brain and the neurohypophysis of the green frog (*Rana esculenta* L.), Cell Tiss. Res., **168**: 325 - 333, 1976.
- [41] GROOS D. S., Distribution of gonadotropin-releasing hormone in the mouse brain revealed by immunocytochemistry, Endocrinology, **98**: 1408 - 1417, 1976.
- [42] HARRIS G. W., JACOBSON D., Functional grafts of the anterior pituitary gland. Proc. Roy. Soc. (London) B, **139**: 263 - 276, 1952.



- [43] HOFFMAN G. E., Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in murine and primate brain, *Anat. Rec.*, **184**: 30 - 41, 1976.
- [44] HOFFMAN G. E., KNIGGE K. M., MOYNIHAN J. A., MELNYK V., ARIMURA A., Neuronal fields containing luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in mouse brain, *Neuroscience*, **3**: 219 - 231, 1978.
- [45] IBATA Y., WATANABE K., KIMURA H., SANO Y., SIN S., HOSHIMURA E., IMAGAWA K., Distribution of LH-RH nerve endings in the median eminence of proestrous female rats: Fluorescence and peroxidase anti-peroxidase (PAP) immunohistochemistry, *Endocrinol. Jap.*, **25**: 142 - 148, 1978.
- [46] IBATA Y., WATANABE K., KINOSHITA H., KUBO S., SANO Y., The location of LH-RH neurons in the rat hypothalamus and their pathways to the median eminence, *Cell Tiss. Res.*, **198**: 381 - 395, 1979.
- [47] IGRASHI M., McCANN S. M., A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor, *Endocrinology*, **74**: 446 - 452, 1964.
- [48] JEFFCOATE S. L., SHARP P. J., FRASER H. M., HELLAND D. J., GUNN A., Immunochemical and chromatographic similarity of rat, rabbit, chicken and synthetic luteinizing releasing hormone, *J. Endocrinol.*, **62**: 85 - 91, 1974.
- [49] KALRA S. P., Circadian rhythm in LH-RH content of preoptic area during the rat estrous cycle, *Brain Res.*, **104**: 354 - 358, 1976.
- [50] KING J. C., PARSONS J. A., ERLANDSEN S. L., WILLIAMS T. H., Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) pathway of the rat hypothalamus revealed by the unlabelled antibody peroxidase method, *Cell Tiss. Res.*, **153**: 211 - 217, 1974.
- [51] KING J. C., WILLIAMS T. H., ARIMURA A., Localization of luteinizing hormone releasing hormone in rat hypothalamus using radioimmunoassay, *J. Anat.*, **120**: 275 - 288, 1975.
- [52] KIZER J. S., PALKOWITS M., BROWSTEIN M. J., Releasing factors in the circumventricular organs of the rat brain, *Endocrinology*, **98**: 311 - 317, 1976.
- [53] KIZER J. S., PALKOWITS M., TAPPEZ M., KEBÉBIAN J., BROWSTEIN M. J., Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence, *Endocrinology*, **98**: 685 - 695, 1976.
- [54] KNIGGE K. M., HOFFMAN G. E., SCOTT D. E., SLADEK J. R. jr., Identification of catecholamine and LH-RH containing neurons in primary cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus, *Brain Res.*, **120**: 393 - 405, 1977.
- [55] KORDON C., New data on hormone-neurotransmitter interaction in gonadotropic regulation, [w] *Neuroendocrine Regulation of Fertility*, International Symp. Simla 1974, Karger Basel 1976, 180 - 188.
- [56] KORDON C., KERDELHUÉ B., PATTOU E., JUTISZ M., Immunocytochemical localization of LH-RH in axons and nerve terminals of the rat median eminence, *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.*, **47**: 122 - 127, 1974.
- [57] KORDON C., ROTSZTEJN W., Subcellular distribution and neurotransmitter control of hypophysiotropic factors in the median eminence, [w] *Advances in Biochem. Psychopharmac.*, red. E. Costa G. L. Gessa, Raven Press, New York, **16**: 89 - 97, 1977.
- [58] KOZLOWSKI G. P., ZIMMERMAN E. A., Localization of Gn-RH in sheep and mouse brain, *Anat. Rec.*, **178**: 396 (abstr.), 1974.
- [59] KREY L. C., SILVERMAN A. J., The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain. II. The regulation on



- gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence, *Brain Res.*, **157**: 247 - 255, 1978.
- [60] KUROSHIMA A., ISHIDA Y., BOWERS C. Y., SCHALLY A. V., Stimulation of release of follicle stimulating hormone by hypothalamic extracts in vitro and in vivo, *Endocrinology*, **76**: 614 - 619, 1965.
- [61] LEONARDELLI J., DUBOIS M.-P., Commandes aminergique et cholinergique des cellules hypothalamiques élaboratrices de LH-RH chez le cobaye, *Ann. Endocrinol.*, **35**: 639 - 645, 1974.
- [62] LEONARDELLI J., BARRY J., DUBOIS M.-P., Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant immunologiquement apparenté au LH-RH dans l'hypothalamus et l'éminence médiane chez les mammifères, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **276**: 2043 - 2046, 1973.
- [63] LEONARDELLI J., HERMAND E., TRAMU G., Action du sulpiryde sur les neurones hypothalamiques élaborateurs de LH-RH, *C. R. Séanc. Soc. Biol.*, **167**: 1815 - 1820, 1973.
- [64] MASON T. E., PHIFER R. F., SPICER S. S., SWALLOW R. A., DRESKIN R. B., An immunoglobulin-enzyme bridge method for localization tissue antigens, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 563 - 569, 1969.
- [65] MATSUO H., ARIMURA A., NAIR R. M. G., SCHALLY A. V., Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid phase method, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 822 - 827, 1971.
- [66] MATSUO H., BABA Y., NAIR R. M. G., ARIMURA A., SCHALLY A. V., Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. The proposed amino acid sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**: 1334 - 1339, 1971.
- [67] MAZZUCA M., DUBOIS M.-P., Detection of luteinizing hormone releasing hormone in the guinea pig median eminence with an immunoenzymatic technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 993 - 996, 1974.
- [68] McCANN S. M., TALEISNIK S., FRIEDMANN H. M., LH-releasing activity in hypothalamic extracts, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**: 432 - 434, 1960.
- [69] MILLAR R. P., WEGENER J., SCHALLY A. V., Characterization and purification of putative prohormonal luteinizing hormone releasing hormone. Program and abstracts of the Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne 10 - 16 luty, 1980, 293.
- [70] MITTLER J. C., MEITES J., In vitro stimulation of pituitary follicle stimulating hormone release by hypothalamic extract, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**: 309 - 313, 1964.
- [71] MONAHAN M., RIVIER J., BURGUS R., AMOSS M., BLACKWELL R., VALE W., GUILLEMIN R., Synthèse totale par phase solide d'un decapeptide qui stimule la sécrétion des gonadotropines hypophysaires LH et FSH, *C. R. Acad. Sci (Paris) D*, **273**: 508, 1971.
- [72] NAIK D. V., Immuno-electron microscopic localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the arcuate nuclei and the median eminence of the rat, *Cell Tiss. Res.*, **157**: 437 - 455, 1975.
- [73] — Immunoreactive LH-RH neurons in the hypothalamus identified by light and fluorescent microscopy, *Cell Tiss. Res.*, **157**: 423 - 436, 1975.
- [74] NAKANE P. K., Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase labelled antibody method: a study on pituitary glands of the rat, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 557 - 560, 1968.
- [75] NAKANE P. K., PIERCE G. B. jr., Enzyme labelled antibodies for the light



- and electron microscopic localization of tissue antigens, *J. Cell. Biol.*, **33**: 307 - 318, 1967.
- [76] NETT T. M., AKBAR A. M., NISWENDER G. D., HEDLUNG M. T., WHITE W. F., A radioimmunoassay for gonadotropin releasing hormone (GnRH), *J. Clin. Endocr. Metab.*, **36**: 880 - 885, 1973.
- [77] PALKOWITS M., ARIMURA A., BROWSTEIN M. J., SCHALLY A. V., SAAVEDRA J. M., Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content in the hypothalamic nuclei in rat, *Endocrinology*, **96**: 554 - 558, 1974.
- [78] PAULIN C., DUBOIS M.-P., BARRY J., DUBOIS P. M., Immunofluorescence study of LH-RH producing cells in the human fetal hypothalamus, *Cell Tiss. Res.*, **182**: 341 - 345, 1977.
- [79] PAWLIKOWSKI T., Informacja w sprawie mianownictwa hormonów peptydowych, *Endocrinol. Polska XXIX*, **5**: 427 - 429, 1978.
- [80] PELLETIER G., LABRIE F., PUVIANI R., ARIMURA A., SCHALLY A. V., Electron microscope immunohistochemical localization of luteinizing hormone releasing hormone in the rat median eminence, *Endocrinology*, **95**: 314 - 317, 1974.
- [81] PICKARD G. E., SILVERMAN A. J., Distribution of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in the brain of the adult golden hamster, *Soc. for Neurosci. Abstr.*, **975**: 679, 1976.
- [82] POLKOWSKA J., JUTISZ M., Local changes in immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the rat median eminence during the estrous cycle. Correlation with the pituitary luteinizing hormone (LH), *Neuroendocrinology*, **28**: 281 - 288, 1979.
- [83] POLKOWSKA J., DUBOIS M.-P., DOMAŃSKI E., Immunocytochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the sheep hypothalamus during various reproductive stages. Correlation with the pituitary gonadotropic hormones, *Cell Tiss. Res.*, **208**: 327 - 341, 1980.
- [84] SCHALLY A. V., BOWERS C. Y., Purification of luteinizing hormone releasing hormone from bovine hypothalamus, *Endocrinology*, **75**: 608 - 614, 1964.
- [85] SCHALLY A. V., ARIMURA A., KOSTIN A. J., MATSUO H., BABA Y., REDDING T. W., NAIR R. M. G., DEBELJUK L., WHITE W. F., Gonadotropin releasing hormone: a polypeptid that regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones, *Science*, **173**: 1036 - 1038, 1971.
- [86] SCHALLY A. V., ARIMURA A., BABA Y., NAIR R. M. G., MATSUO H., REDDING T. W., DEBELJUK L., WHITE W. F., Isolation and properties of FSH and LH-releasing hormone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**: 393 - 399, 1971.
- [87] SCHALLY A. V., NAIR R. M. G., REDDING T. W., ARIMURA A., Isolation of the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone releasing hormone from porcine hypothalamus, *J. Biol. Biochem.*, **246**: 7230 - 7236, 1971.
- [88] SCHALLY A. V., REDDING T. W., MATSUO H., ARIMURA A., Stimulation of FSH and LH release in vitro by natural and synthetic LH and FSH releasing hormone, *Endocrinology*, **90**: 1561 - 1568, 1972.
- [89] SETALÓ G., VIGH S., SCHALLY A. V., ARIMURA A., FLERKO B., LH-RH-containing neural elements in the rat hypothalamus, *Endocrinology*, **96**: 135 - 142, 1975.
- [90] — Immunohistological investigations on the LH-RH synthetizing neuron



- system of the rat, [w] Cellular and Molecular Bases of Neuroendocrine Processes, red. E. Endröczy, Akadémiai Kiadó, Budapest 1975, 77 - 78.
- [91] — Immunohistological investigation of the LH-RH system in rabbits. Symposium "Regulation of Pituitary Functions", Štrbske Pleso, 13 - 14 październik 1976.
- [92] — Immunohistological study of LH-RH containing nerve fibers of the rat hypothalamus, Brain Res., **103**: 597 - 602, 1976.
- [93] — Changing immunoreactivity of LHRH containing nerve terminals in the OVLT, Acta Biol. Acad. Sci. Hung., **27**: 75 - 77, 1976.
- [94] SHARP P. J., HAASE E., FRASER H. M., Immunofluorescent localization of sites binding anti-synthetic LH-RH serum in the median eminence of the green fish (*Chloris chloris* L.), Cell Tiss. Res., **162**: 83 - 91, 1975.
- [95] SILVERMAN A. J., Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the guinea pig brain, Endocrinology, **99**: 30 - 41, 1976.
- [96] SILVERMAN A. J., DESNOYERS P., Ultrastructural immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the median eminence of the guinea pig, Cell Tiss. Res., **169**: 157 - 166, 1976.
- [97] SILVERMAN A. J., ANTUNES J. L., FERIN M., ZIMMERMAN E. A., The distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the hypothalamus of the rhesus monkey. Light microscopic studies using immunoperoxidase technique, Endocrinology, **101**: 134 - 142, 1977.
- [98] STERNBERGER L. A., HARDY P. H., CUCULIS J. J., MEYER H. G., The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, J. Histochem. Cytochem., **18**: 315 - 333, 1970.
- [99] STERNBERGER L. A., HOFFMAN G. E., Immunocytology of luteinizing hormone-releasing hormone, Neuroendocrinology, **25**: 111 - 128, 1978.
- [100] SZENTÁGHOTHAI J., The parvicellular neurosecretory system, Progr. Brain Res., **5**: 135 - 146, 1964.
- [101] SZENTÁGHOTHAI J., FLERKO B., MESS B., HALASZ B., Hypothalamic control of the anterior pituitary, Akadémiai Kiadó, Budapest 1968.
- [102] — The nomenclature of peptide hormones, IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Recommendations (1964), Endocrinology, **97**: 1606 - 1607, 1975.
- [103] THORNTON V. F., GESCHWIND I. I., Hypothalamic control of gonadotropin release in amphibia. Evidence from studies of gonadotropin release in vitro and in vivo, Gen. Comp. Endocrinol., **23**: 294 - 301, 1974.
- [104] WEINER R. I., PATTOU E., KERDELHUÉ B., KORDON C., Differential effects of hypothalamic deafferentation upon luteinizing hormone releasing hormone in the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis, Endocrinology, **97**: 1597 - 1600, 1975.
- [105] WENGER T., Ultrastructural changes in the nerve terminals of the vascular organ of the lamina terminalis in the rat during the estrous cycle, Neurosci. Letters, **3**: 29 - 32, 1976.
- [106] WHEATON J. E., KRULICH L., McCANN S. M., Localization of luteinizing hormone releasing hormone in the preoptic area and hypothalamus of the rat using radioimmunoassay, Endocrinology, **97**: 30 - 38, 1975.
- [107] WHITE W. F., HEDLUNG M. T., WEBER G. F., RIPPEL R. H., JOHNSON



- E. S., WILBER J. F., The pineal gland, a supplement source of hypothalamic releasing hormones, *Endocrinology*, **94**: 1422 - 1426, 1974.
- [108] ZAMBONI L., De MARTINO C., Buffered picric acid formaldehyde, a new rapid fixative for electron microscopy, *J. Cell. Biol.*, **35**: 148A, 1967.
- [109] ZIMMERMAN E. A., HSU K. C., FERIN M., KOZLOWSKI G. P., Localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of the mouse by immunoperoxidase technique, *Endocrinology*, **95**: 1 - 8, 1974.

*Otrzymano: 12 kwietnia 1980.*

*Przyjęto: 11 listopada 1980.*

*Adres autora: 05 - 110 Jabłonna k. Warszawy.*



## KOMPLEKS CHLOROFIL A/B-BIAŁKO ZBIERAJĄCY ENERGIĘ ŚWIETLNA

### LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL A/B-PROTEIN COMPLEX

Ewa WŁOCH

Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ

*Streszczenie.* Z przytoczonych w tym artykule danych wynika, że w błonach tylakoidów glonów i roślin wyższych obok barwników pierwszego i drugiego układu fotosyntezy występuje zespół barwników w kompleksie z białkiem, którego główną funkcją jest absorpcja kwantów energii świetlnej i przekazywanie energii wzbudzenia na centra reakcji. Barwniki tego zespołu uczestniczą również w przekazywaniu energii wzbudzenia z drugiego układu fotosyntezy na pierwszy układ fotosyntezy, przy czym efektywność przekazywania jest regulowana stężeniem kationów dwu- i jednowartościowych. Ten zbierający energię kompleks jest zlokalizowany głównie na terenie gran i przyczynia się także do „cementowania” sąsiadujących ze sobą tylakoidów.

*Summary.* As results from the data presented in the paper, in thylakoid membranes of algae and higher plants, apart from pigments of photosystems I and II, pigment-protein complex (light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex) occurs. Its main function is to absorb light energy and to transfer excitation energy into reaction centers. Pigments of this complex take part also in spillover of excitation energy from PS II to PS I and the efficiency of this process is controlled by monovalent or divalent cation concentration. This light-harvesting complex is located mainly in lamellae of granum region and it contributes to appression of adjacent thylakoids.

#### Wykaz skrótów

PS I, PS II — I i II układ fotosyntezy  
LHC — kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię  
EF, PF — powierzchnie błon tylakoidów (patrz ryc. 5)  
SDBS — dodecylobenzo-sulfonian sodowy  
SDS — dodecyłu siarczan sodowy  
DCMU — 3-(3,4-dichlorofenylo)1,1-dietylmocznik



## WSTĘP

Struktury lamelarne chloroplastów roślin wyższych zbudowane są głównie z lipidów i białek; w skład frakcji lipidowej wchodzi również barwniki fotosyntetyczne (chlorofile i karotenoidy). Stosując wirowanie lub chromatografię, wyodrębniono z błon tylakoidów traktowanych detergentami niejonowymi (Triton X-100, digitonina) dwa zespoły barwników. Nazwano je I i II układem fotosyntezy (odpowiednio PSI i PSII) [63]. W skład każdego z nich wchodzi centra reakcji (P700 w PSI i P680 w PSII) biorące bezpośredni udział w transporcie elektronów i barwniki tworzące, czyli anteny energetyczne, które przekazują zaabsorbowaną energię na centra reakcji [25]. Oba układy fotosyntezy różnią się między sobą składem barwników antenowych: PSI jest wzbogacony w chlorofil *a* i karoteny, a PSII — w chlorofil *b* i ksantofile [14, 48, 53].

Wyniki badań z ostatnich kilku lat wskazują, że barwniki fotosyntetyczne w obrębie jednostki fotosyntetycznej tworzą nie dwa, ale trzy zespoły: poza wymienionymi układami fotosyntezy występuje jeszcze tzw. kompleks chlorofil *a/b* zbierający energię (ang. light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex, LHC). W jego skład wchodzi około 50% [39, 47] wszystkich barwników chlorofilowych liści, przy czym stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b* wynosi 1:1 [57, 58, 59], co wskazuje na to, że chlorofil *b* jest zlokalizowany głównie, jeżeli nie wyłącznie, w tym zespole barwników. LHC uczestniczy w absorpcji energii świetlnej i przekazywaniu zaabsorbowanej energii głównie na centra reakcji PSII. Chlorofil zawarty w LHC pośredniczy również w przekazywaniu energii wzbudzenia z PSII na PSI [21, 23], a składnik białkowy pełni istotną funkcję w procesie tworzenia gran [3, 7, 8]. Kompleks zbierający energię stał się w ostatnich latach przedmiotem licznych badań. Zdaniem Butlera i wsp. [21, 32] LHC tworzy odrębną jednostkę funkcjonalną i strukturalną w systemie lamelarnym chloroplastów.

## SKŁAD BARWNIKOWY I POLIPEPTYDOWY LHC

Stosując metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS wyizolowano z błon tylakoidów rozpuszczonych w roztworze SDS lub SDBS trzy zawierające chlorofil pasma: CI, CII i CIII [47, 57 - 59]. Tylko w dwóch z nich (CI i CII) znajdowało się również białko, a w pasmie CIII znajdował się wolny chlorofil\* (tab. 1). Prace wykona-

\* Należy zauważyć, że stosując elektroforezy w gradiencie gęstości żelu poliakrylamidowego w obecności SDS można wydzielić 6 frakcji zawierających kompleksy chlorofil-białko ([2] i in., patrz również tab. 2). Wolny chlorofil prawdopodobnie nie występuje *in vivo*, lecz uwalnia się w czasie izolacji kompleksów.



TABELA 1

Skład barwnikowy i charakterystyka spektralna kompleksów CI, CII, CIII wyizolowanych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z błon tylakoidów rozpuszczalnych w roztworze SDS lub SDBS

Nazwa kompleksu	Zawartość chlorofilu w %	Stosunek chla/chlb	Maksima absorpcji (wg [51])	Maksima fluorescencji w 77K (wg [51])	Zawartość			
					karotenu	luteiny	violaksantyny	neoksantyny
CI	15-20 [51]	12,0 [14] 7,0 [47]	677	702	14*	5	0	0
			490	693				
			470	687				
			437	681	8,8**	0,9	0	0,1
			420	677				
			669					
			662					
CII	32-35 [60]	1,2 [14] 1,9 [47] 1,25 [51]	672	677	5*	16	8	5
			650	670				
			437	662	3,6**	6,7	0,3	1,7
			470	654				
			650					
CIII	30-40 [51] 64-66 [60] 0 [41] zmodyfikowana		670	675	17*	11	9	5
			480 [60]	669				
				667				
				650				

\* mole/mol chlorofilu [14], \*\* mole/mg białka [47],

ne do 1974 r. sugerowały, że kompleksy CI i CII pochodzą odpowiednio z pierwszego i drugiego układu fotosyntezy, a brak aktywności fotochemicznej wiązano z inaktywującym działaniem SDS [7]. Thornber [60], porównując rozdziały elektroforetyczne otrzymane z jęczmienia typu dzikiego i mutantu pozbawionego chlorofilu b (mutant ten wykazywał normalną aktywność fotosyntetyczną), stwierdził, że forma niezmutowana nie zawierała kompleksu CII. Dlatego zaproponował dla CII nazwę kompleks chlorofilowo-białkowy zbierający energię wzbudzenia, podkreślając tym samym, że nie jest on elementem niezbędnym w procesie fotosyntezy, lecz pełni tylko rolę pomocniczą.

Błony tylakoidów rozpuszczone w roztworze SDS można także rozdzielić na kompleksy CI i LHC (CII) za pomocą kolumnowej chromatografii na hydroksypatycie, stosując bufor fosforanowy o różnej molarności [34]. Po naniesieniu materiału na zrównoważoną 10 mM buforem fosforanowym (pH = 7,0) kolumnę, kompleks CI ulega wymyciu w 0,2 - 0,3 M buforze fosforanowym (pH = 7,0). Natomiast CII zostaje



TABELA 2

Charakterystyka monomeru, dimeru i oligomeru LHC

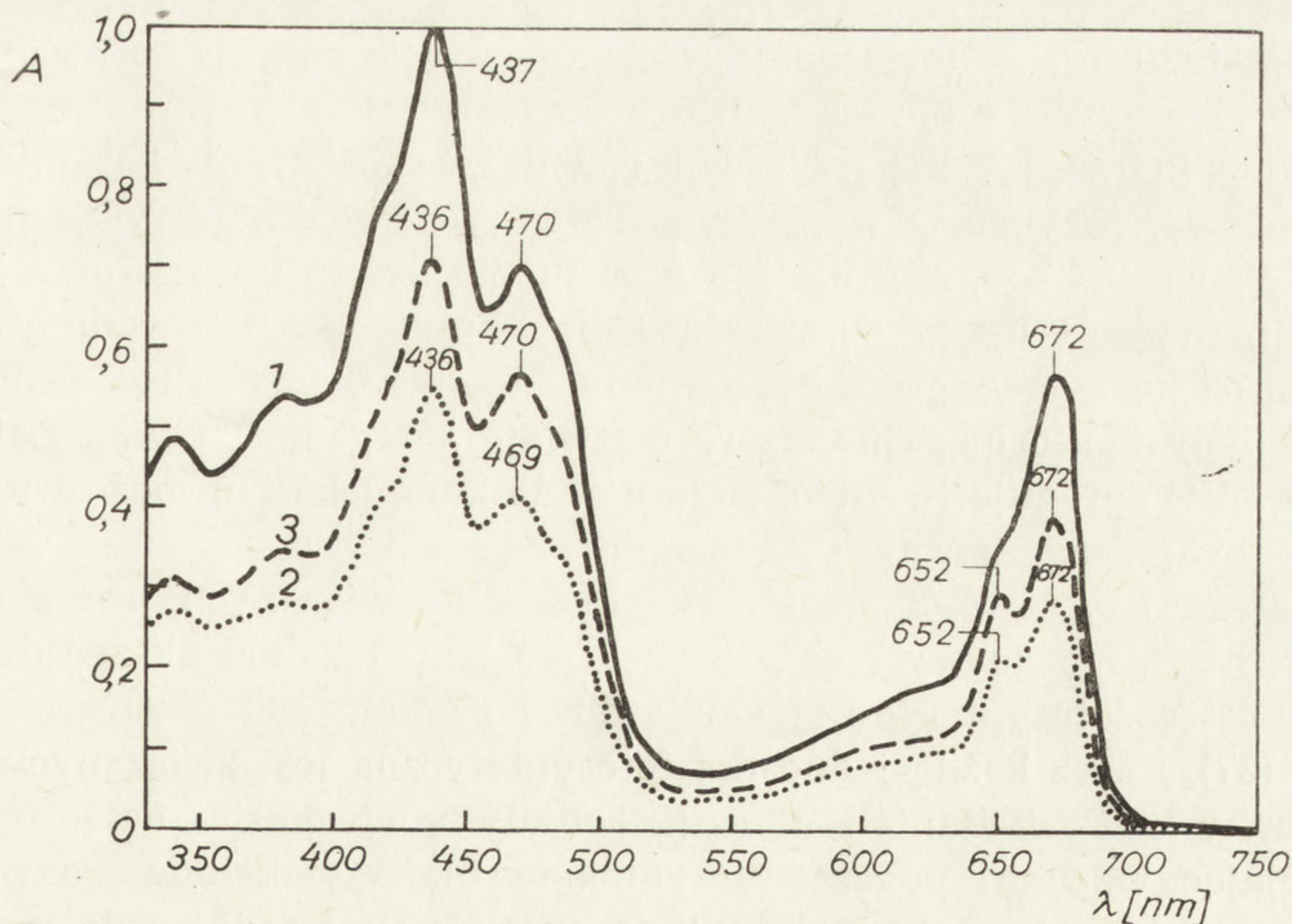
Materiał	Modyfikacje metody	LHC monomer				LHC dimer		LHC oligomer		Literatura
		nazwa	masa cząsteczkowa	chl a/b	polipeptydy	nazwa	masa cząsteczkowa	nazwa	masa cząsteczkowa	
tytoń	elektroforeza natychmiast po dodaniu SDS	I Ic	30 000	1,25	24 000	II b		II a	70 000	[51]
	obniżenie temperatury rozdźwięku	LHC			24 000 27 000		47 000			[63]
fasola szpinak	rozdzielanie na kolumnie hydroksypatytu	C II	35 000	1,0						[14]
	obniżenie stężenia SDS/chl	chl a/b P2	29 000		24 000 25 000	chl a/b P2*	50 000	chl a/b P2** chl a/b P2***	71 000 (trimer?) 107 000 (tetramer?)	[40]
bób	rozdzielanie w gradientie stężenia sacharozy	C III C II	30 000 26 000	2,1 0,9	24 000 23 000					[36]
	obniżenie stężenia SDBS/chl	C II	34 000					C II d	69 000	[28]
fasola szpinak jęczmień	dodanie Tritonu X-100 do zawiesiny po wcześniejszej inkubacji z SDS	LHCP <sup>3</sup>		1,28	26 000	LHCP <sup>2</sup>		LHCP <sup>1</sup>	68 000	[2, 24]



usunięty z kolumny podczas przemywania 0,4 M buforem fosforanowym z dodatkiem 1 mM  $MgCl_2$ .

Wielu badaczy podjęło systematyczne badania nad składem polipeptydowym i podjednostkowym LHC, zakładając, że poznanie struktury wyizolowanego kompleksu umożliwi zrozumienie jego roli w układzie *in vivo*. Zmieniając skład buforu, stężenie detergentu i akrylamidu oraz warunki elektroforezy otrzymano dane, z których wynika, że w skład LHC wchodzi polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 25 000 daltónów (tab. 2) [26]. Wiele danych wskazuje na to, że może to być mieszanina dwóch polipeptydów o podobnych ciężarach cząsteczkowych, przy czym tylko polipeptyd występujący w większych ilościach tworzyłby kompleksy z chlorofilem. Z każdym monomerem LHC ma być związanych 6 - 12 cząsteczek chlorofilu [61], a stosunek chlorofilu *a* do *b* jest różny w kompleksie chl. *a/b*-białko zbierającym energie u różnych gatunków roślin [56]. Stabilność LHC *in vitro* zależy m.in. od pH buforu inkubacyjnego oraz zawartości mocznika przy rozdziale elektroforetycznym [38].

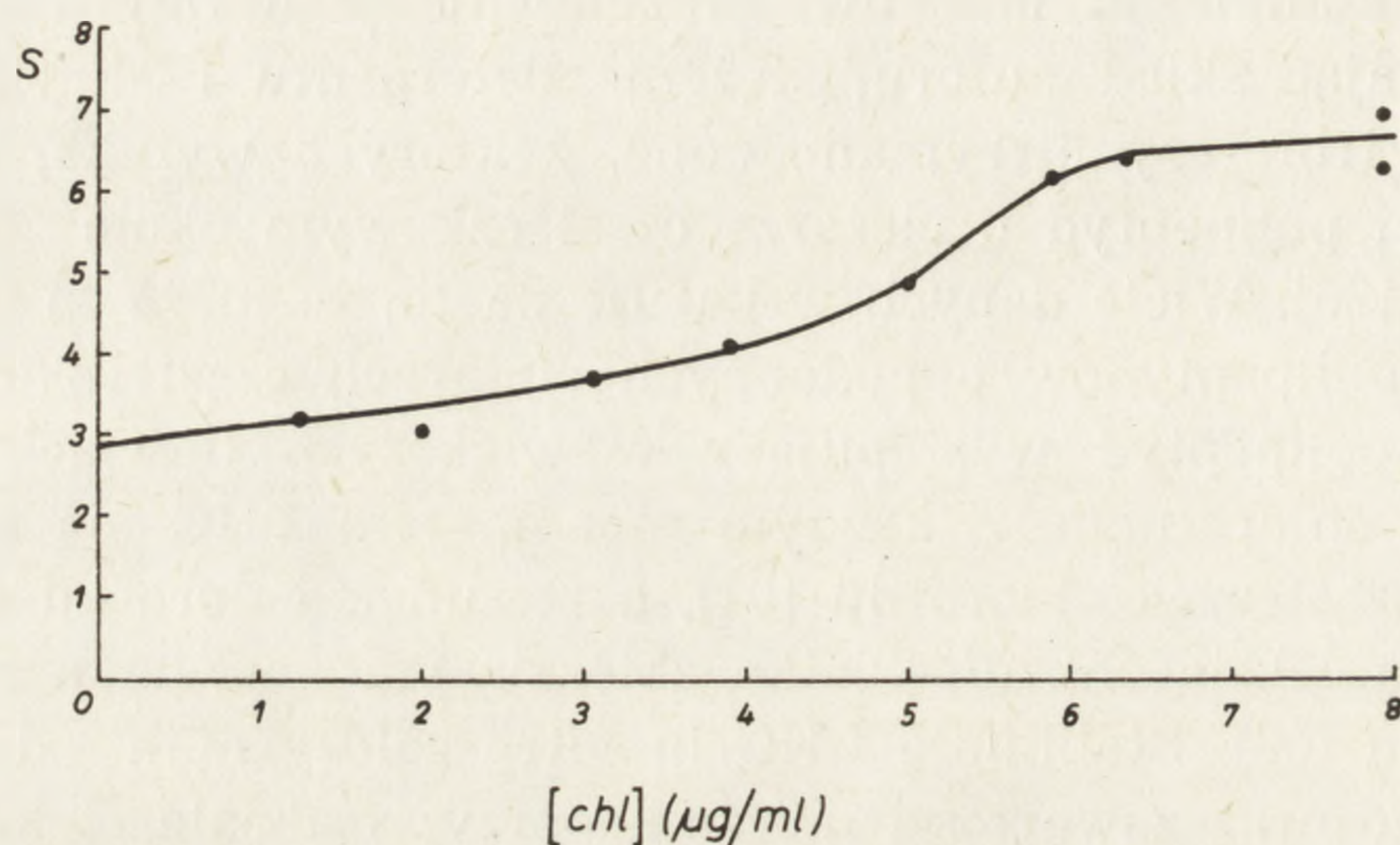
Stwierdzono, że obniżenie stosunku SDS/chlorofil podczas upłyniania błon umożliwia wydzielenie metodą elektroforezy nie tylko formy monomerycznej LHC, ale także dimerów i oligomerów [2, 24, 27, 28], które różnią się m.in. widmami absorpcyjnymi (ryc. 1). Również obniżenie temperatury prowadzi do wydzielenia kompleksów zagregowa-



Ryc. 1. Widma absorpcyjne monomeru (1), dimeru (2), oligomeru (3) LHC (wg [2])



nych [65]. In vitro dwa czynniki sprzyjają agregacji: duże stężenie białka LHC oraz duże stężenie kationów. Davis i Gross [23] stwierdzili, że wraz ze wzrostem stężenia białka LHC rośnie stała sedymentacji ( $S$ ) otrzymanych kompleksów. Krzywa zależności  $S$  od stężenia chlorofilu



Ryc. 2. Zależność stałej sedymentacji ( $S$ ) powstających kompleksów LHC od stężenia chlorofilu (wg [22])

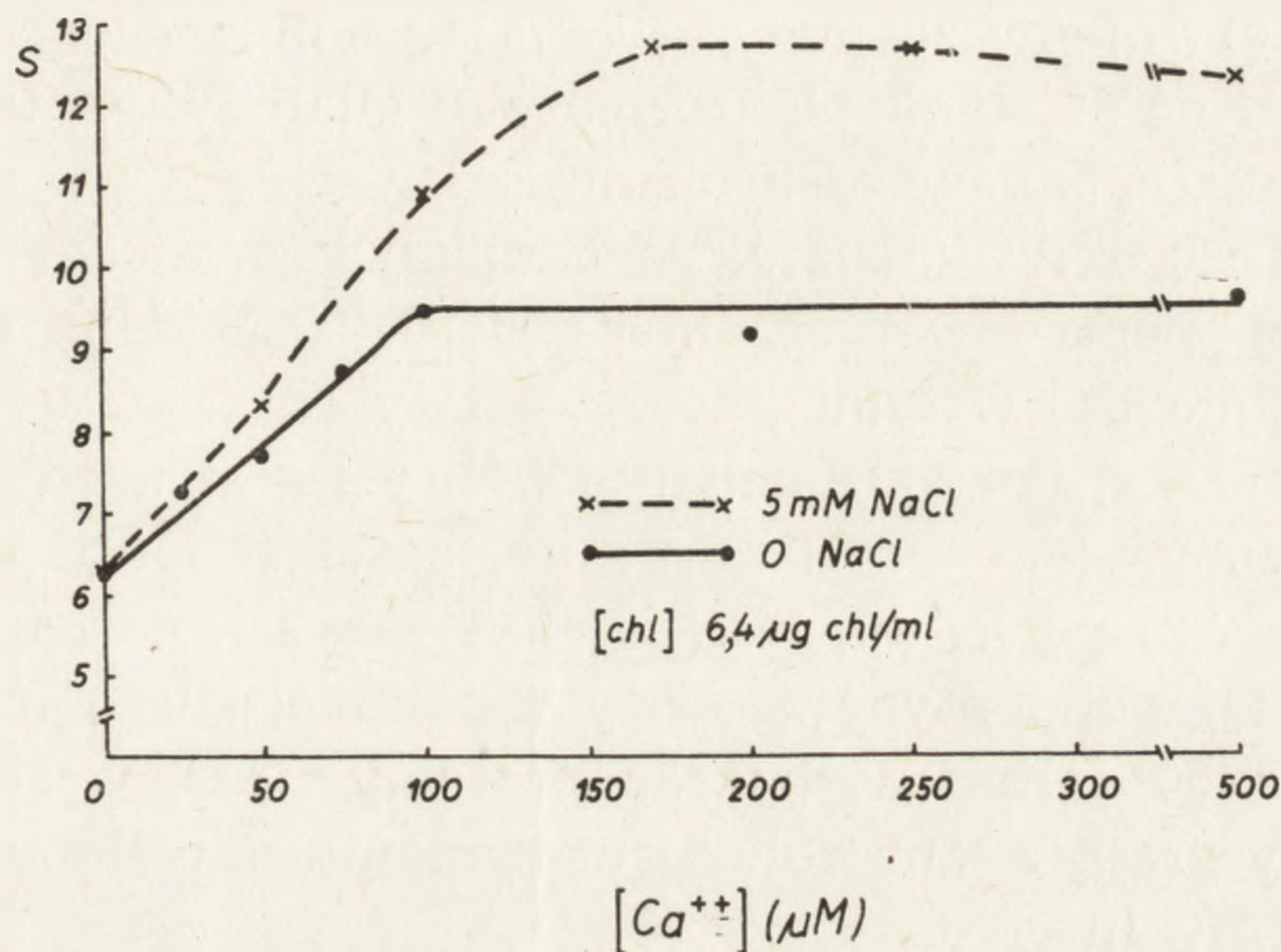
używanego jako wskaźnik stężenia białka ma charakter dwufazowy (ryc. 2): w zakresie 0 - 5 mg ml<sup>-1</sup> następuje powolny wzrost, w zakresie 5 - 6 mg ml<sup>-1</sup> wzrost wartości  $S$  jest o wiele szybszy. Dane te sugerują, że istnieją oddziaływania białko-białko w agregatach LHC. Zmiany zachodzące w widmach absorpcyjnych i fluorescencyjnych oraz efektywności wzbudzenia fluorescencji wskazują, że agregacja prowadzi do zmiany otoczenia cząstek chlorofilu  $a$  i  $b$  [22].

Davis i Gross [22, 23] stwierdzili również, że LHC wiąże kationy dwuwartościowe, przy czym mają istnieć dwa rodzaje miejsc wiązania (SI i SII). W warunkach, gdy nie zachodzi już agregacja zależna od stężenia białka (powyżej 6 mg ml<sup>-1</sup>), przyłączenie wapnia do SII powoduje dalszą zależną od kationów agregację. Kationy jednowartościowe mają modulować zmiany konformacyjne, które ułatwiają agregację (ryc. 3). Łatwość, z jaką LHC agreguje in vitro, sugeruje, że kompleks ten może występować w formie zagregowanej również in vivo.

Zakładając, że 7 - 8 cząsteczek chlorofilu związanych jest z monomerem LHC, można wyliczyć, że około 40 takich jednostek znajduje się w jednostce fotosyntetycznej zbudowanej z około 600 cząsteczek chlorofilu [27]. Czy z każdą jednostką fotosyntetyczną jest związanych kilka agregatów LHC? Badania Hillera [29] miały odpowiedzieć na to pytanie. Zmieniając warunki podczas upłynniania błon tylakoidów za pomocą SDS przez dodanie małych ilości Tritonu X-100, doszedł on do wniosku, że detergenty niejonowe stabilizują istniejące dimery LHC w błonach



tylakoidów, a nie sprzyjają ich tworzeniu. Podobne wyniki uzyskali Anderson [2] i Dunkley [24]. Istnieją także inne dane świadczące o tym, że LHC *in vivo* może występować w formie zagregowanej [27].



Ryc. 3. Wpływ jonów  $Ca^{2+}$  i  $Na^+$  na wartość stałej sedymentacji ( $S$ ) kompleksów LHC (wg [22])

Przeprowadzone przez Bennetta [15, 16] badania wykazały, że podczas inkubacji izolowanych chloroplastów lub całych liści grochu z  $^{32}P$  ortofosforanem (w świetle) zachodzi wbudowywanie izotopu (w sposób odwracalny) do kilku polipeptydów błon tylakoidów, wśród których znajdują się oba polipeptydy LHC (o ciężarze cząsteczkowym około 26 000 daltonów). Mechanizm tej reakcji polega na tym, że fosforan nieorganiczny w reakcji fosforylacji fotosyntetycznej tworzy początkowo  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP, który jest następnie substratem dla związanej z błonami tylakoidów kinazy białkowej aktywowanej przez  $Mg^{2+}$ . Połowiczny czas fosforylacji wynosi około 1 - 3 minut [17]. Enzymem defosforylującym jest prawdopodobnie związana z błonami tylakoidów fosfataza, której aktywność nie jest regulowana oświetleniem. Połowiczny czas defosforylacji wynosi 5 - 10 minut. Nie poznano dotychczas znaczenia tego cyklu fosforylacji i defosforylacji białek LHC. Należy jeszcze dodać, że ortofosforan jest przyłączony do reszty treonylowej znajdującej się w łańcuchu peptydowym wystającym ponad powierzchnię błony tylakoidu.

#### LOKALIZACJA LHC W OBREBIE BŁON TYLAKOIDÓW

Ponieważ LHC stanowi około 40% białek błony [57] i zawiera 32 - 50% chlorofilu [39, 60], powinien być ważnym elementem strukturalnym błon tylakoidów. Otrzymane dane wskazuje, że LHC jest częścią tzw. zrębu białkowego, którego obecność warunkuje zachowanie natyw-



nej struktury błony. Na przykład traktowanie trypsyną nie powoduje całkowitego rozpadu LHC i dezintegracji błon, natomiast w obecności pronazy następuje zanik LHC i rozpad błon [55]. Frakcja lipidowa odgrywa ważną rolę w utrzymaniu stabilności LHC w błonie. Po usunięciu lipidów i barwników za pomocą 80% acetonu, zwiększa się bowiem wrażliwość LHC na działanie chlorowodoru guanidyny i trawienie trypsyną [39]. Stosując pomiary dichroizmu kołowego (DC) w dalekim ultrafiolecie starano się określić charakter oddziaływań między wyizolowanymi frakcjami polipeptydów błon chloroplastów i lipidami [45]. Wiadomo bowiem, że widmo DC w tym zakresie zależy od struktury drugorzędowej badanego białka, tzn. od udziału  $\alpha$  helisy i  $\beta$  struktury oraz zawartości statystycznego kłębka. Stwierdzono, że sulfolipidy w wąskim zakresie pH (6,8 - 7,2) powodują wzrost eliptyczności, co odpowiada zmianom konformacji polipeptydów (w tym polipeptydu o masie cząsteczkowej około 24 000 daltonów, tzn. apoproteiny LHC) w stronę  $\alpha$  helisy. Tak więc lipidy grają ważną rolę w utrzymaniu określonego stanu konformacyjnego LHC *in vivo*.

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech LHC jest to, że zawiera chlorofil *b* i jest wzbogacony w ksantofile, dlatego przez pewien czas wiązano go z drugim układem fotosyntetycznym. Przynależność tę potwierdziły rozdziały elektroforetyczne frakcji błon tylakoidów wzbogaconych w PSII [4, 7, 33, 52, 58]. Badania Arntzena i wsp. [12] sugerują, że LHC łączy się z PSII przy udziale kationów. Ukazały się jednak prace, z których wynika, że niewielkie ilości LHC znajdują się zawsze we frakcjach wzbogaconych w PSI [33]. Ponieważ PSII zlokalizowany jest głównie w błonach tylakoidów granowych, należy spodziewać się, że frakcja wzbogacona w grana powinna być także wzbogacona w LHC [1]. Rzeczywiście stwierdzono [8], że stosunek białek LHC do białek CI w lamelach stromy jest równy 0,6 - 0,7 (podobnie jak w pierwotnych tylakoidach); w całym systemie lamelarnym wynosi przeciętnie około 2,5, a w tylakoidach gran (obliczono w sposób pośredni) osiąga wartość 4.

Badania Prochaski [50] wykazały, że LHC jest również wykrywalny na powierzchni błon tylakoidów. Badacz ten stwierdził, że w chloroplastach pozbawionych otoczki w obecności EDC (1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu) znakowany GEE (eter etylowy glicyny) łączy się w sposób trwały z miejscami wiązania kationów. Przeprowadzając następnie dezintegracje błon tylakoidów za pomocą SDS i rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym wykazał, że największa radioaktywność jest związana z apoproteina LHC o masie cząsteczkowej 24 000 daltonów. Metodą immunologiczną wykazano również, że przeciwciała przeciw polipeptydowi o masie cząsteczkowej 24 000 dalto-



nów powodują aglutynację wolnych od stromy lamel [44]. Wyniki te sugerują, że część cząsteczki tego białka jest obecna na zewnętrznej powierzchni błony. Uogólnienie to jest zgodne z wynikami badań, w których stwierdzono, że inkubacja błon tylakoidów w roztworze trypsyny powoduje zwiększenie ruchliwości elektroforetycznej apoproteiny LHC w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, co jest związane ze zmniejszeniem się masy cząsteczkowej o 2 000 daltonów, tzn. o przypuszczalnie o ten fragment, który wystając ponad powierzchnię warstwy lipidowej jest dostępny dla trypsyny [54, 55]. Ostatnio Steinback i wsp. [54] wykazali, że po usunięciu powierzchniowego fragmentu LHC nie dochodzi do zależnego od kationów tworzenia gran. Obserwacje te sugerują, że własności fizykochemiczne (np. ładunek elektryczny [13]) tego fragmentu odgrywają rolę w tworzeniu się podwójnych lamel w systemie chloroplastów granowych. Miller [46] sugeruje, że powstałe na terenie lamel stromy zawierające LHC duże cząstki (o średnicy 16,4 nm) posiadają tendencję do migracji w obszar gran i istnieje jakiś specyficzny czynnik (np. lokalna różnica w stężeniu kationów), który determinuje intensywność tej migracji. Obecność zwiększonej liczby cząstek o średnicy 16,4 nm powoduje zmiany własności błony, w wyniku czego zachodzi tworzenie się gran. O udziale LHC w tworzeniu gran mogą również świadczyć następujące fakty:

1. agregacja wyizolowanych monomerów LHC przebiega w takim samym stężeniu kationu, jakie jest wymagane do utworzenia gran w pozbawionej stromy zawieszynie lamel [20];

2. pojawienie się LHC w czasie rozwoju roślin jest skorelowane z powstaniem gran [7, 8].

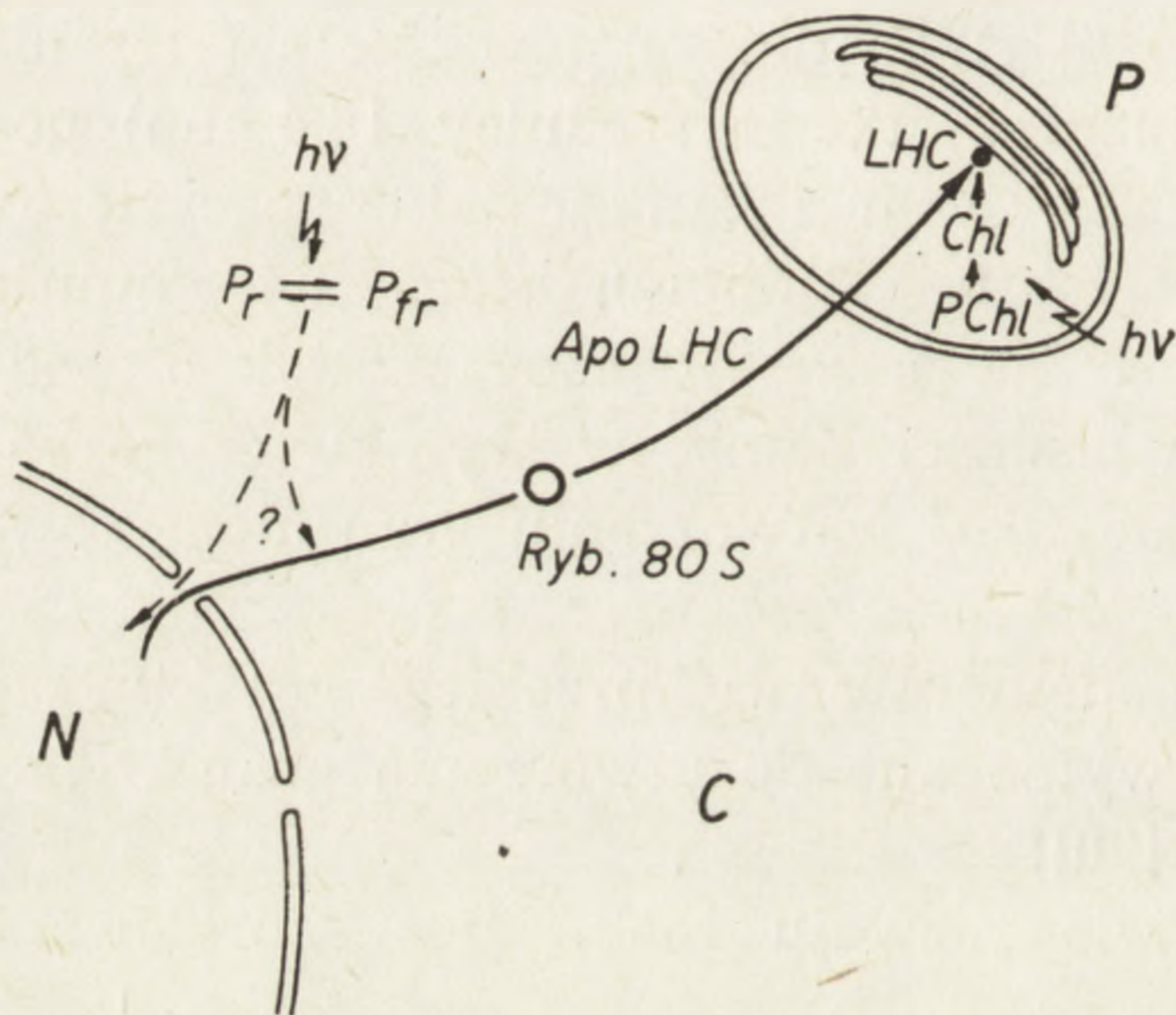
Należy jednak dodać, że mutanty pozbawione chlorofilu *b* i LHC mają zdolność tworzenia mniejszej ilości gran [46], co wskazuje, że w procesie tym LHC może być zastąpiony przez inne białka. Nie tylko kationy wpływają na stan konformacyjny LHC *in vivo*. Oświetlenie chloroplastów doprowadza do zmian w budowie LHC, gdyż po oświetleniu zmniejsza się liczba miejsc wiązania kationów dwuwartościowych [50]. Jest więc prawdopodobne, że błona tylakoidu, jak i inne błony cytoplazmatyczne, jest strukturą dynamiczną, w obrębie której zachodzą przemieszczenia kompleksów białkowych zależnie od stanu funkcjonalnego, a kationy regulują te procesy.

#### POWSTANIE LHC

Badania przeprowadzone przez Apela [5, 6] wykazały, że światło absorbowane przez oba układy barwników indukuje powstanie LHC. Synteza składników tego kompleksu jest również pod kontrolą układu



fitochromowego [6]. Ponadto badacz ten wykazał, że trwające 15 s oświetlenie roślin etiolowanych światłem czerwonym powoduje powstanie poli-A mRNA, którego translacja prowadzi do utworzenia prekursora apoproteiny LHC o masie cząsteczkowej 29 500 daltonów. Według Macholda i wsp. [37] geny kodujące to białko znajdują się w jądrze komórkowym, a proces jego translacji zachodzi na rybosomach typu 80 S. Krótkotrwałe oświetlenie roślin etiolowanych światłem czerwonym nie wystarcza jednak do powstania kompletnego LHC. Drugim niezbędnym elementem do jego utworzenia jest fototransformacja protochlorofilid w chlorofilid *a* i synteza chlorofilu *b* (ryc. 4). Dane te potwierdzają hipotezę Thornbera [60], według której akumulacja chlorofilu *b* jest niezbędna do wytworzenia trwałego kompleksu LHC.



Ryc. 4. Wpływ światła na proces tworzenia LHC (wg [6])

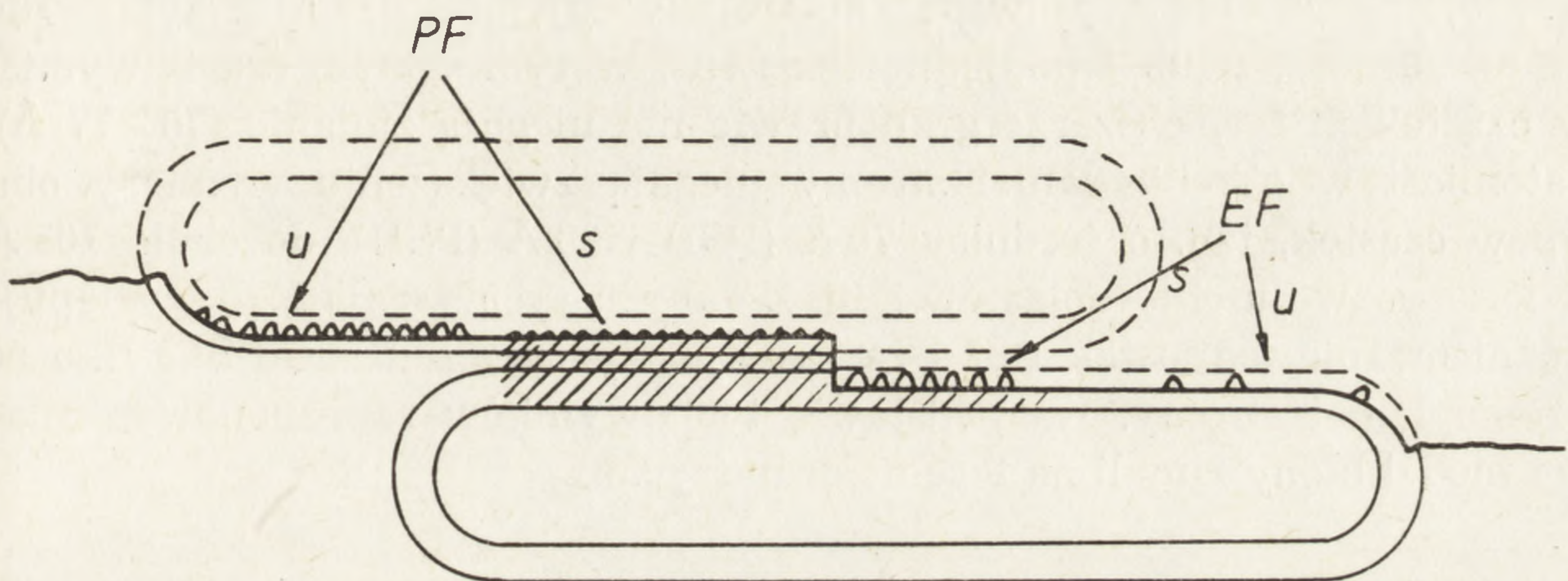
N — jądro, C — cytoplazma, P — chloroplast,  $P_r$  — fitochrom forma krótkofalowa,  $P_{fr}$  — fitochrom forma długofalowa, Ryb. 80S — rybosomy 80 S, Apo LHC — apoproteina LHC, PChl — protochlorofil, Chl — chlorofil,  $h\nu$  — miejsce absorpcji światła

W badaniach fotochemicznych udowodniono również, że wielkości jednostek PSI i PSII zależą od stopnia rozwoju chloroplastów. Jak wynika z pomiarów aktywności fotochemicznej oraz kinetyki narastania fluorescencji w protochloroplastach pozbawionych LHC, jednostki PSI i PSII są bardziej aktywne fotochemicznie oraz posiadają mniejsze wymiary niż w dojrzałych chloroplastach [9, 11]. Wyniki obserwacji prowadzonych za pomocą mikroskopu elektronowego również wskazują na to, że wraz z powstaniem LHC następują zmiany w budowie układów fotosyntezy.

Badania Armonda i wsp. [10] dotyczyły zmian w liczebności i wielkości cząstek na powierzchni błon tylakoidów w czasie rozwoju chloroplastów. Rośliny etiolowane zawierające etioplasty z ciałem protolamelarnym Armond oświetlał światłem błyskowym w celu otrzymania protochloroplastów, tzn. plastydów pozbawionych chlorofilu *b* i LHC, a następnie przenosił rośliny do oświetlenia ciągłego, gdzie chloroplasty osiągały



pełny rozwój. Dzięki zastosowaniu techniki kriorytownictwa\* mógł on stwierdzić, że liczba cząstek przypadająca na jednostkę powierzchni lamel gran i stromy nie ulega zmianie podczas rozwoju chloroplastów, wzrastają natomiast ich wymiary (tab. 3); największe różnice zaobser-



Ryc. 5. Schemat ilustrujący sposób powstawania 4 typów powierzchni błon tylakoidów przy zastosowaniu techniki kriorytownictwa (wg [46])

PF — powierzchnie zewnętrzne błon tylakoidów, EF — powierzchnie wewnętrzne błon tylakoidów, u i s — oznaczają odpowiednio regiony stromy i gran

TABELA 3

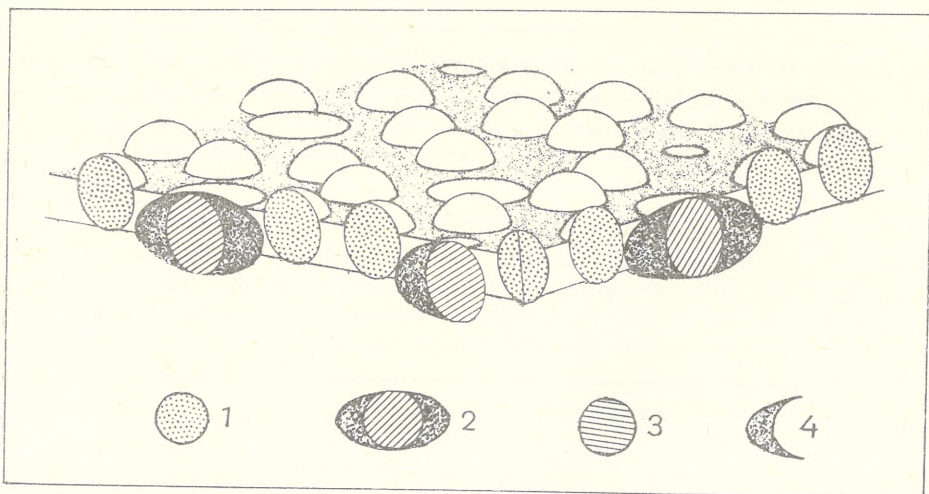
Zmiany względnych objętości cząstek występujących na powierzchni EF i PF (patrz ryc. 5) w czasie transformacji protochloroplastów w chloroplasty w ciągłym oświetleniu (założono, że 2/3 błon tylakoidów znajduje się w obszarze gran, a 1/3 — w obszarze stromy) (wg [10])

Ilość godz. oświetlenia	Nazwa powierzchni	Średnica cząstek (Å)	Ilość cząstek na $\mu\text{m}^2$	Objętość cząstek przypadająca na jednostkę powierzchni ( $\text{Å}^3/\mu\text{m}^2$ )	Suma objętości cząstek przypadająca na $\mu\text{m}^2$ błony	Procent sumarycznej objętości
0	PF	70	5412	$9,72 \times 10^8$	$9,72 \times 10^8$	75
	EF	80	1213	$3,27 \times 10^8$	$3,27 \times 10^8$	25
48	PF u	70	2930	$5,26 \times 10^8$	$3,79 \times 10^8$	19
		105	1510	$6,10 \times 10^8$		
	PF s	77	4520	$10,80 \times 10^8$	$7,20 \times 10^8$	38
		80	241	$0,65 \times 10^8$		
	EF u	105	175	$0,81 \times 10^8$	$0,49 \times 10^8$	3
		105	762	$3,52 \times 10^8$		
EF s	164	704	$7,74 \times 10^8$	$7,51 \times 10^8$	40	

\* Technika kriorytownictwa pozwala na otrzymanie czterech rodzajów powierzchni powstałych w wyniku rozłupania błon tylakoidów w obszarze gran i stromy (ryc. 5).



wowano na powierzchniach EF. Założono, że kuliste cząstki o średnicy 80 Å stanowią rdzeń PSII z centrami reakcji, a elipsoidalne cząstki o średnicach 105, 132, 164 Å powstają w wyniku przyłączenia LHC do rdzenia PSII. Wyliczono również, że zmiany wielkości średnicy z 80 Å na 105, 132 lub 164 Å prowadzą do zmiany objętości dzięki przyłączeniu odpowiednio 1, 2 lub 4 podjednostek LHC. W tym samym czasie wymiary cząstek PSI w obszarze gran prawie nie ulegają zmianie (70 - 77 Å). Natomiast w obrębie lamel stromy ulegają zwiększeniu wymiary obu typów cząstek, tzn. o średnicy 70 Å (PSI) i 80 Å (PSII), do około 105 Å podczas rozwoju chloroplastów [10]. Z danych tych wynika, że występuje zróżnicowanie jednostek PSI i że LHC jest przyłączone do PSI tylko na terenie lamel stromy. Na podstawie tych wyników zaproponowano nawet model błony lameli na terenie gran (ryc. 6).



Ryc. 6. Schemat błon tylakoidów z regionu gran według Armonda i wsp. [10]

#### ROLA LHC W PROCESIE FOTOSYNTEZY

Według teorii Butlera i wsp. [21, 32] LHC przyczynia się do znacznego wzrostu absorpcji energii świetlnej, która jest następnie przekazywana do centrów reakcji PSII i PSI oraz bierze udział w regulacji przepływu energii wzbudzenia między PSII i PSI. Wielkość przepływu energii wzbudzenia z PSII do PSI może być wyznaczona z krzywej indukcji fluorescencji mierzonej przy 695 lub 730 nm w temperaturze ciekłego azotu [31]\*. Liczbowo jest on równy stosunkowi  $F_o/F_v$  mierzo-

\* W temperaturze 77 K chlorofil anteny PSI ( $chl_{aI}$ ), PSII ( $chl_{aII}$ ) oraz chlorofil *a* LHC wykazują główne maksima fluorescencji odpowiednio przy 730, 695 i 685 nm [32].



nemu w pasmie 695 nm lub wielkości  $F_v$  przy 730 nm, gdzie  $F_o$  reprezentuje wartości fluorescencji stałej, a  $F_v$  — wartość fluorescencji zmiennej. Wydajność przenoszenia energii z centrum reakcji PSII na PSI  $\varphi_{T(II-I)}$  może być wyrażona jako funkcja ilości pierwotnego akceptora elektronów PSII będącego w stanie utlenionym (A):

$$\varphi_{T(II-I)} = \frac{k_{T(II-I)}}{k_{F690} + k_{DII} + k_{T(II-I)} + k_{TII}} \left( A_{II} + \frac{1 - A_{II}}{1 - \varphi_{TII} \varphi_{III}} \right)$$

gdzie  $k$  — stałe szybkości zaniku wzbudzenia chl $a_{II}$  na drodze:  $k_{F690}$  — fluorescencji,  $k_{DII}$  — procesów bezpromienistych,  $k_{TII}$  — przeniesienia na centra reakcji,  $k_{T(II-I)}$  — przepływu energii z PSII na PSI;  $\varphi$  — wydajność przenoszenia energii wzbudzenia z:  $\varphi_{TII}$  — chl $a_{II}$  na centra reakcji PSII,  $\varphi_{III}$  — centrów reakcji PSII na chl $a_{II}$ .

Otrzymano wiele dowodów na to, że LHC uczestniczy w rozdziale energii wzbudzenia zależnym od stężenia kationów [18, 19, 42, 49]. Między innymi wykazano [20], że dodanie przeciwciał przeciw LHC ( $\alpha$ LHC) do zawiesiny bezgranowych chloroplastów w obecności  $Mg^{2+}$  powoduje (w odniesieniu do kontroli nie zawierającej  $\alpha$ LHC):

- a) redukcje wzrostu wydajności kwantowej PSII o 35%,
- b) redukcje wzrostu zmiennej fluorescencji  $F_v$  w temperaturze pokojowej o 60%,
- c) redukcje wzrostu stosunku natężenia fluorescencji  $F_{685}$  do  $F_{730}$  w temperaturze 77 K.

Wszystkie te dane wskazują na to, że aktywny LHC jest konieczny do zależnej od kationów regulacji rozdziału energii wzbudzenia. Drugą grupę dowodów uzyskano w badaniach wykonanych na mutancie Su/Su tytoniu, który posiadał zmniejszoną ilość LHC [64]. Stwierdzono, że:

- a) dodanie  $Mg^{2+}$  do zawiesiny chloroplastów mutantu wywiera mniejszy wpływ na poziom maksymalnej fluorescencji w temperaturze pokojowej niż u formy niezmutowanej,
- b) wprowadzenie  $Mg^{2+}$  nie zmienia stosunku  $F_{730}$  do  $F_{690}$  mierzonego w temperaturze 77 K.

Wyniki te sugerują, że u tego mutantu brak jest zależnego od kationów przepływu energii z PSII na PSI.

Pewnego rodzaju dowodem może być również wykrycie korelacji między pojawieniem się LHC podczas zielenienia chloroplastów a powstaniem zależnej od kationów regulacji rozdziału energii wzbudzenia [30, 35]. Ponadto wykazano, że  $Mg^{2+}$  przyczynia się do wzrostu depolaryzacji fluorescencji ze szczytami przy 650, 675, 685 nm [66]. W tych warunkach zaobserwowano także wzrost względnej wydajności fluorescencji przy 650 i 675 nm. Dane te przemawiały za tym, że po dodaniu  $Mg^{2+}$  następuje wzrost efektywności przekazywania energii z LHC na chloro-



fil anteny PSII i równocześnie zachodzi spadek efektywności przepływu energii z PSII na PSI. Natomiast kationy jednowartościowe stymulują przekazywanie energii wzbudzenia z PSII na PSI [18, 62, 65].

Według modelu Seely (za [23, 62]) orientacja momentów przejścia niewielu, bo tylko 6 cząsteczek chlorofilu (z 344 znajdujących się w jednostce fotosyntetycznej) zlokalizowanych w strategicznym punkcie między PSII i PSI może decydować o wydajności przepływu energii między dwoma układami fotosyntezy. Ten „kanał” ma różnić się od innych kompleksów chlorofilowo-białkowych składem i sposobem ułożenia cząsteczek chlorofilu. Kationy wiążąc się z nim powodują zmiany konformacyjne cząsteczek, przy czym kationy jednowartościowe są odpowiedzialne za powstanie stanu sprzyjającego przepływowi energii wzbudzenia PSII na PSI, a kationy dwuwartościowe hamują ten przepływ.

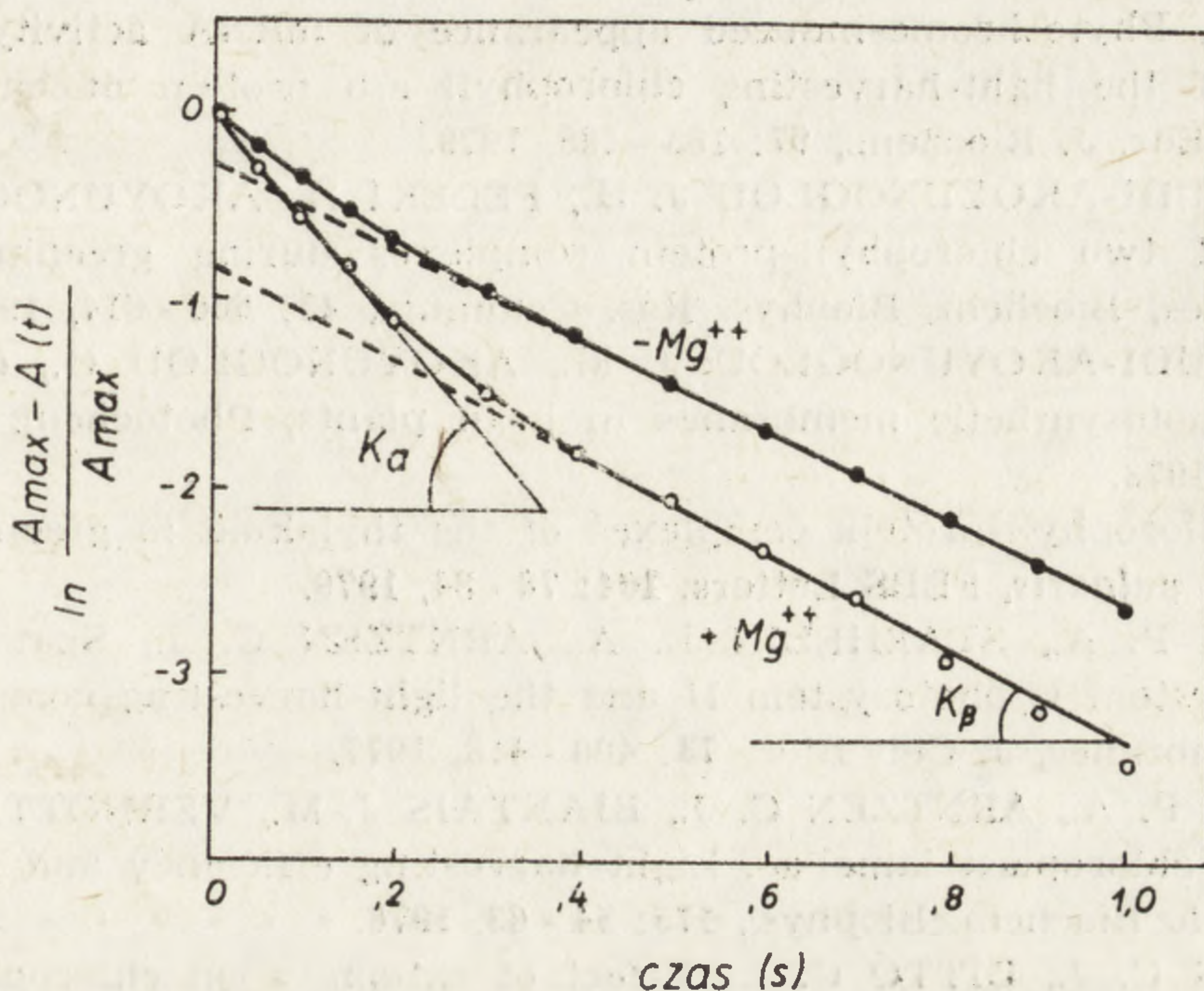
Ponieważ chloroplasty w środowisku zawierającym lub nie zawierającym kationy dwuwartościowe odpowiadają *in vivo* odpowiednim stanom SI i SII [42] \*, podjęto badania tych stanów u mutanta *soi* z obniżoną ilością LHC i mutanta jęczmienia, którego pozbawiono LHC [35]. Z widm fluorescencji wykonanych w temperaturze 77 K chloroplastów utrwalonych w aldehydzie glutarowym obliczono zmiany w stosunku do wielkości pasm emisyjnych przy 685 i 730 nm po oświetleniu światłem 710 nm i światłem 650 nm. Stwierdzono redukcję przejścia SI-SI u mutanta *soi* i całkowite zahamowanie u mutanta jęczmienia, z czego można wysnuć wniosek, że LHC bierze udział w rozdziale energii wzbudzenia *in vivo*.

Analiza wzrostu pola nad krzywą indukcji fluorescencji w zawiesinie chloroplastów z dodatkiem DCMU daje informację o kinetyce reakcji fotochemicznej PSII [43]. Wykreślając krzywą zależności logarytmu względnego pola od czasu, wykryto dwufazowy przebieg reakcji fotochemicznych w centrach reakcji PSII (ryc. 7). Prawdopodobnie jest to związane z istnieniem dwóch typów centrów reakcji ( $\alpha$  i  $\beta$ ), które posiadają różne stałe szybkości. Kationy dwuwartościowe zwiększają aktywność tylko centrów  $\alpha$ , co może wskazywać, że tylko ten typ centrów reakcji jest związany z kompleksem LHC.

Z przedstawionych faktów wynika, że LHC tworzy odrębną jednostkę strukturalną w obrębie błony tylakoidów. Jednostka ta połączona głównie z PSII w obszarze gran i w mniejszej ilości z PSI tego regionu

\* W stanie SI chloroplasty są zaadaptowane do światła absorbowanego przez barwniki PSI lub do ciemności. Występuje intensywna fluorescencja, gdyż energia absorbowana przez PSII nie jest przekazywana na PSI. W stanie SII energia jest absorbowana przez barwnik PSII i z dużą wydajnością jest przekazywana na PSI; obserwuje się w tym przypadku słabą fluorescencję.





Ryc. 7. Wpływ  $Mg^{2+}$  na zmiany względnego pola nad krzywą indukcji fluorescencji (wg [43])

1 — cząsteczki występujące na powierzchni PF, 2 — cząsteczki występujące na powierzchni EF, 3 — część korowa cząstek EF, 4 — kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię

odgrywa istotną rolę w absorpcji energii świetlnej i w rozdziale energii wzbudzenia między układy fotosyntezy.

Składam serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. St. Więckowskiemu za zainteresowanie, pomocną dyskusję oraz uwagi i wskazówki przy opracowaniu niniejszej pracy.

#### LITERATURA

- [1] ANDERSON J. M., LEVINE R. P., The relationship between chlorophyllprotein complexes and chloroplast membrane polypeptides, *Biochem. Biophys. Acta*, **357**: 118 - 126, 1974.
- [2] ANDERSON J. M., WALDRON J. C., THORNE S. W., Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characterization of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure, *FEBS Letters*, **92**: 227 - 235, 1978.
- [3] ANDERSON J. M., LEVINE R. P., Membrane polypeptides of some higher plant chloroplast, *Biochem. Biophys. Acta*, **333**: 378 - 387, 1974.
- [4] APEL K., BOGORAD L., WOOKCOCK C. L. F., Chloroplast membranes of the green alga *Acetabularia mediterranea*. Isolation of the photosystem II, *Biochem. Biophys. Acta*, **387**: 568 - 579, 1975.
- [5] APEL K., KLOPPSTECH K., The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein, *Eur. J. Biochem.*, **85**: 581 - 588, 1978.



- [6] APEL K., Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apo-protein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*), *Eur. J. Biochem.*, **97**: 183 - 188, 1979.
- [7] ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J. H., FELEKI Z., AKOYUNOGLU G., Formation of two chlorophyll-protein complexes during greening of etiolated bean leaves, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 606 - 614, 1971.
- [8] ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J. M., AKOYUNOGLU G., On the formation of photosynthetic membranes in bean plants, *Photochem. Photobiol.*, **18**: 219 - 228, 1973.
- [9] — The chlorophyll-protein complexes of the thylakoid in greening plastids of *Phaseolus vulgaris*, *FEBS Letters*, **104**: 78 - 84, 1979.
- [10] ARMOND P. A., STAEHELIN L. A., ARNTZEN C. J., Spatial relationship of photosystem I, photosystem II and the light-harvesting complex in chloroplast membranes, *J. Cell Biol.*, **73**: 400 - 418, 1977.
- [11] ARMOND P. A., ARNTZEN C. J., BIANTAIS J.-M., VERNOTTE C., Differentiation of chloroplast lamellae. Light harvesting efficiency and grana development, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**: 54 - 63, 1976.
- [12] ARNTZEN C. J., DITTO C. L., Effect of cations upon chloroplast membrane subunit interactions and excitation energy distribution, *Biochem. Biophys. Acta*, **449**: 259 - 274, 1976.
- [13] BARBER J., CHOW W. S., A mechanism for controlling the stacking and unstacking of chloroplast thylakoid membranes, *FEBS Letters*, **103**: 342 - 344, 1979.
- [14] BAILEY L. V., KRENTZ W., Characterization of pigment-protein complexes related to photosystem I and photosystem II, *Progress in Photosynthesis Research*, **1**: 149 - 158, 1969.
- [15] BENNETT J., Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependence, *FEBS Letters*, **103**: 342 - 344, 1979.
- [16] — Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of light-harvesting chlorophyll protein complex, *Eur. J. Biochem.*, **99**: 133 - 137, 1979.
- [17] — The protein that harvests sunlight, *Trends in Biochemical Sciences*, **4**, **12**: 268 - 272, 1979.
- [18] BOARDMAN N. K., THORNE S. W., Cation effects on light-induced chlorophyll a fluorescence in chloroplasts lacking both chlorophyll b and chlorophyll-protein complex II, *Plant Sci. Lett.*, **7**: 219 - 224, 1976.
- [19] BRIANTAIS J.-M., VERNOTTE C., HOYA I., Intersystem exciton transfer in isolated chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **325**: 530 - 538, 1973.
- [20] BURKE J. J., DITTO C. L., ARNTZEN C. J., Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**: 252 - 263, 1978.
- [21] BUTLER W. L., KITAJIMA M., Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **396**: 72 - 85, 1975.
- [22] DAVIS D. J., GROSS E. L., Protein-protein interactions of light-harvesting pigment protein from spinach chloroplasts. Ca<sup>2+</sup> binding and its relation to protein association, *Biochem. Biophys. Acta*, **387**: 557 - 567, 1975.
- [23] — Protein-protein interactions of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Evidence for two stages of cation independent association, *Biochem. Biophys. Acta*, **449**: 554 - 564, 1976.
- [24] DUNKLEY P. R., ANDERSON J. M., The light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from barley thylakoid membranes. Polypeptide composition



- and characterization of an oligomer, *Biochem. Biophys. Acta*, **545**: 175 - 187, 1979.
- [25] FRĄCKOWIAK D., FIKSINSKI K., *Biofizyczne podstawy procesu fotosyntezy, Wykłady z biofizyki pod redakcją W. Leyko, Łódź 1975, str. 47 - 69.*
- [26] HENRIQUES F., PARK R. B., Further chemical and morphological characterization of chloroplast membranes from a chlorophyll b-less mutant of *Hordeum vulgare*, *Plant Physiol.*, **55**: 763 - 767, 1975.
- [27] — Spectral characterization of five chlorophyll-protein complexes, *Plant Physiol.*, **62**: 856 - 860, 1978.
- [28] HILLER R. G., GENGE S., PILGER D., Evidence for a dimer of the light-harvesting chlorophyll-protein complex II, *Plant Sci. Lett.*, **2**: 239 - 242, 1974.
- [29] HILLER R. G., PILGER T. B. G., CAMPBELL D., Extraction and stabilization of the dimer of chlorophyll-protein complex II, *Plant Sci. Lett.*, **14**: 7 - 11, 1979.
- [30] JENNINGS R., GARLASELLI F. M., FORLI G., GEROLA P. D., Evidence for a structural role for chlorophyll in chlorophyll-protein complexes, *Biochem. Biophys. Acta*, **581**: 87 - 95, 1979.
- [31] KITAJIMA M., BUTLER W. L., Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone, *Biochem. Biophys. Acta*, **376**: 105 - 115, 1975.
- [32] — Excitation spectra for photosystem I and photosystem II in chloroplasts and the spectral characteristics of the distribution quanta between the two photosystems, *Biochem. Biophys. Acta*, **408**: 297 - 305, 1975.
- [33] KLEIN S. M., VERNON L. P., Protein composition of spinach chloroplasts and their photosystem I and photosystem II subfragments, *Photochem. Photobiol.*, **19**: 43 - 53, 1974.
- [34] KUNG S. D., THORNER M. P., Photosystem I and II chlorophyll-protein complex of higher plant chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **253**: 285 - 289, 1971.
- [35] LIEBERMAN J. R., BOSE S., ARNTZEN H. J., Requirement of the light-harvesting pigment protein complex for magnesium ion regulation of excitation energy distribution in chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **502**: 417 - 429, 1978.
- [36] MACHOLD O., MEISTER A., Resolution of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of *Vicia faba* chloroplasts into two different chlorophyll-protein complexes, *Biochem. Biophys. Acta*, **546**: 472 - 480, 1979.
- [37] MACHOLD O., AURICH O., Site of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia faba*, *Biochem. Biophys. Acta*, **281**: 103 - 112, 1972.
- [38] MACHOLD O., MEISTER A., Stability of chlorophyll-protein complexes in vitro, *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **174**: 92 - 98, 1979.
- [39] MACHOLD O., SIMPSON D. J., MOLIER B. L., Chlorophyll-proteins of thylakoids from wild-type and mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Carlsberg Res. Commun.*, **44**: 235 - 254, 1979.
- [40] MACHOLD O., On the molecular nature of chloroplast thylakoid membranes, *Biochem. Biophys. Acta*, **382**: 494 - 505, 1975.
- [41] MARKWELL J. P., THORNER J. P., BOGGS R. T., Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1233 - 1235, 1979.
- [42] MARSHO T. V., KOK B., Photosynthetic regulation by cations in spinach chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **333**: 353 - 365, 1974.



- [43] MELIS A., HOMANN P. H., A selective effect of  $Mg^{2+}$  on the photochemistry at one type of reaction center in photosystem II of chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**: 523 - 530, 1978.
- [44] MENKE W., KOENIG F., RADUNZ A., SCHMID G. H., The isolation of some polypeptides from thylakoid membrane, their localization and function, *FEBS Letters*, **49**: 372 - 375, 1975.
- [45] MENKE W., RADUNZ A., SCHMID G. H., KOENIG F., HIRTZ R-D., Inter-molecular interactions of polypeptides and lipids in the thylakoid membrane, *Z. Naturforsch.*, **31C**: 436 - 444, 1976.
- [46] MILLER K. R., MILLER G. J., MC INTYRE K. R., The light-harvesting chlorophyll protein complex of photosystem II, *J. Cell Biol.*, **71**: 624 - 638, 1976.
- [47] OGAWA T., OBATA F., SHIBATA K., Two pigment proteins in spinach chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **112**: 223 - 234, 1966.
- [48] PARK R. B., NOLAN W. G., The chemical composition and fotochemical activity of chloroplast grana and stroma lamellae, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **227**: 579 - 586, 1974.
- [49] PROCHASKA L. J., GROSS E. L., Cation induced quenching of chlorophyll a fluorescence in Triton X-100 subchloroplast particles, *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**: 147 - 154, 1977.
- [50] — Evidence for the location of divalent cation binding sites on the chloroplast membrane, *J. Membrane Biol.*, **36**: 13 - 32, 1977.
- [51] REMY R., HOARAN J., LECLERC J. C., Electrophoretic and spectrophotometric studies of chlorophyll-protein complexes from tobacco chloroplasts. Isolation of a light-harvesting pigment protein complex with a molecular weight of 70 000, *Photochem. Photobiol.*, **26**: 151 - 158, 1977.
- [52] SATOH K., Polypeptide composition of the purified photosystem II pigment-protein complex from spinach, *Biochem. Biophys. Acta*, **546**: 84 - 92, 1979.
- [53] TROSPER T., FREEMAN C., Carotenoid composition of spinach chloroplast. Grana and stroma lamellae, *Plant Physiol.*, **51**: 584 - 585, 1973.
- [54] STEINBACK K. E., BURKE J. J., ARNTZEN C. J., Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation mediated control of chloroplast structure and function, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**: 546 - 557, 1979.
- [55] SUSS H-K., SCHMIDT O., MACHOLD O., The action of proteolytic enzymes on chloroplast thylakoid membranes, *Biochem. Biophys. Acta*, **448**: 103 - 113, 1976.
- [56] THOMAS J. B., KLEINEN J. W., VERWER W., On the quantitative relationship between chlorophyll b and chlorophyll a from Ca 685 in the light-harvesting pigment-protein complex of chloroplasts, *Acta Bot. Neerl.*, **26**: 377 - 383, 1977.
- [57] THORNER J. P., GREGORY P. F., SMITH C. A., BAILEY J. L., Studies on the nature of chloroplast lamellae. I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes, *Biochemistry*, **6**: 391 - 396, 1967.
- [58] THORNER J. P., STEWART J. C., HATTON M. W. C., BAILEY J. L., Studies on the nature of chloroplast lamellae. II. Chemical composition and further physical properties of two chlorophyll-protein complexes, *Biochemistry*, **6**: 2006 - 2014, 1967.
- [59] THORNER J. P., Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**: 127 - 158, 1975.
- [60] THORNER J. P., HIGHKIN H. R., Composition of the photosynthetic



- apparatus of normal barley leaves and mutant lacking chlorophyll b, *Eur. J. Biochem.*, **41**: 109 - 116, 1974.
- [61] THORNER J. P., MARKWELL J. P., REINMAN S., Plant chlorophyll-protein complexes, recent advances, *Photochem. Photobiol.*, **29**: 1205 - 1216, 1979.
- [62] VANDERMENLEN D. L., GOVINDJEE, Relation of membrane structural changes to energy spillover in oat and spinach chloroplasts: use of fluorescence probes and light scattering, *Biochem. Biophys. Acta*, **368**: 61 - 70, 1974.
- [63] VERNON L. P., KE B., MOLLENHAUER H. H., SHAW E. R., Composition and structure of spinach subchloroplast fragments obtained by action of the Triton X-100, *Progress in Photosyn. Res.*, **I**: 137 - 148, 1969.
- [64] VERNOTTE C., BRIANTAIS J.-M., REMY R., Light-harvesting pigment protein complex requirement for spill-over changes induced by cations, *Plant Sci. Lett.*, **6**: 135 - 141, 1976.
- [65] WESSELS J. S. C., BORCHERT M. T., Polypeptide profiles of chlorophyll-protein complexes and thylakoid membranes of spinach chloroplasts, *Biochem. Biophys. Acta*, **503**: 78 - 93, 1978.
- [66] WONG D., GOVINDJEE, Antagonistic effects of mono and divalent cations polarization of chlorophyll fluorescence in thylakoids and changes in excitation energy transfer, *FEBS Letters*, **97**: 373 - 377, 1979.

*Otrzymano: 14 lipca 1980.*

*Przyjęto: 13 listopada 1980.*

*Adres autorki: ul. Grodzka 53, 31 - 001 Kraków.*







APARAT KURCZLIWY I SZKIELETOWY KOMÓRKI  
(Pokłosie II Międzynarodowego Kongresu Biologii Komórki)

Jacek KUŹNICKI

Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02 - 093 Warszawa

W dniach 31 września do 5 października 1980 r. odbył się w Berlinie Zachodnim II Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki zorganizowany przez European Cell Biology Organization (Federation of European Cell Biology Societies). W obradach wzięło udział ponad 3000 uczestników reprezentujących 51 krajów, w tym 12 uczestników z Polski. Na program Kongresu składały się wykłady plenarne, sympozja, spotkania robocze oraz sesje plakatowe\*.

Wygłoszono następujące wykłady plenarne: Nowe aspekty onkologii (H. Harris); Organizacja i reorganizacja genów immunoglobulin (P. Leder); Zabiegi genetyczne na zarodkach (K. Illmensee); Mapowanie genów a transfer genów w komórkach ssaków (F. Ruddle); Geny eukariotyczne w komórkach prokariotycznych (W. Gilbert); Chloroplast i jądro — współdziałanie genomów różnych organelli komórkowych (D. von Wettstein).

Sympozja, spotkania robocze oraz sesje plakatowe odbywały się w sześciu grupach tematycznych:

I. Genomy, transkrypcja, powstawanie RNA i struktury z nim związane.

II. Błony, synteza białka, wydzielanie i interakcja komórek.

III. Składniki aparatu kurczliwego i szkieletu komórki, ruchy wewnątrzkomórkowe i poruszanie się komórek.

IV. Komórki różnicujące się i ich różnicowanie.

---

\* Materiały z Kongresu ukazały się w Eur. J. Cell Biol., 22 (1), 1980, w postaci zbioru komunikatów. Ponadto, w połowie 1981 r. ukaze się książka pt. "International Cell Biology 1980/1981" zawierająca teksty wykładów plenarnych, sympozjalnych i innych.



V. Wyspecjalizowane układy komórek i ogólne problemy metabolizmu komórkowego.

VI. Patologia komórek i komórkowe aspekty chorób.

Ponadto wyodrębniono sesję plakatową numer VII, pt. „Nowe metody stosowane w biologii komórki”.

Przedstawione sprawozdanie dotyczy tylko sympozjum III, pt. „Contractile and Cytoskeleton Elements, Intracellular Movements, and Cellular Locomotion”, i omawia te zagadnienia, które wzbudziły najwięcej uwagi i dyskusji, a które mogą wytyczać interesujące kierunki dalszych badań.

W komórkach niemięśniowych wyróżnia się trzy rodzaje ultrastruktur pełniących funkcje motoryczne i szkieletowe, tzw. cytoskielet. Są to mikrotubule, filamenty aktynowe, zwane mikrofilamentami, i filamenty pośrednie. Sympozjum podzielono na trzy części odpowiadające takiemu rozróżnieniu struktur motoryczno-szkieletowych w komórce. Podział ten, dokonany ze względów organizacyjnych, okazał się czysto formalny, gdyż przedstawione w czasie sympozjum fakty wskazują na współdziałanie mikrotubul z aktyną lub filamentami pośrednimi oraz na interakcję aktyny z filamentami pośrednimi.

W pierwszej części sympozjum dotyczącej mikrotubul i mitozy na szczególną uwagę zasługują trzy zagadnienia:

(a) Właściwości białek związanych z mikrotubulami

Od kilku lat prowadzone są prace nad charakterystyką białek związanych z mikrotubulami, tzw. microtubule associated proteins (MAPs), obecnych w oczyszczonych przez polimeryzację i depolimeryzację preparatach tubuliny. W czasie sympozjum przedstawiono nowe dane na ten temat. Między innymi za pomocą przeciwciał wykazano, iż MAPs występują w wielu różnych komórkach i niezależnie od rodzaju komórki mają jednakowe właściwości immunologiczne. Stwierdzono, że MAPs wiążą się do kompleksu tubulina-liposomy. Wśród MAPs, oprócz białek o nieznannej funkcji enzymatycznej, wyróżniono fosfatazę, ATPazę oraz dwie kinazy. Jedna z nich o ciężarze cząsteczkowym około 100 000 daltonów katalizuje fosforylację związanego z tubuliną GDP do GTP. Aktywność tej kinazy nie zależy od stężenia jonów wapnia i cAMP, ale wzrasta pod wpływem jonów magnezu. Druga kinaza, obecna w preparatach tubuliny, katalizuje fosforylację białek związanych z mikrotubulami, a jej aktywność zależy od stężenia cAMP.

(b) Inhibitory polimeryzacji tubuliny

W ciągu ostatnich dwóch lat pojawiły się prace dotyczące hamującego, w obecności jonów wapnia, wpływu kalmoduliny na polimery-



zacje tubuliny. Wyniki przedstawione w czasie sympozjum wskazują, że kalmodulina nie wiąże się, jak sugerowano wcześniej, bezpośrednio z tubuliną, ale pośrednio — poprzez białka związane z mikrotubulami (MAPs). Ponadto, za pomocą metod immunologicznych wykazano, że w czasie mitozy kalmodulina pojawia się w dużym stężeniu w miejscu tworzenia nowych mikrotubul. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze sugestie o udziale kalmoduliny w zależnym od mikrotubul ruchu chromosomów. Przedstawiono też nowe dane na temat obecności i właściwości kalmoduliny w rzęskach komórek nabłonka skrzelii mięczaków i pierwotniaków. Kalmodulina z tych komórek jest bardzo podobna do kalmoduliny z komórek ssaków, chociaż słabiej aktywuje fosfodwuesterazę cyklicznych nukleotydów.

Z ameby *Dictyostelium discoideum* wyizolowano białko o ciężarze cząsteczkowym około 15 000 daltonów, będące inhibitorem polimeryzacji tubuliny. Prawdopodobnie łączy się ono bezpośrednio z tubuliną, a nie jak kalmodulina za pośrednictwem MAPs.

Kolchicina jest znanym i stosowanym od lat inhibitorem polimeryzacji tubuliny. W doniesieniach zaprezentowanych w czasie sympozjum wykorzystano kolchicynę sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny do zbadania lokalizacji tubuliny. Zaobserwowano inny obraz fluorescencji niż przy użyciu przeciwciał na tubulinę wskazujący, że tak zmodyfikowana kolchicina wiąże się nie tylko do rozpuszczalnej tubuliny, lecz również do składników błon oraz do końca mikrotubul. W innych badaniach wykazano, że kolchicina słabiej hamuje polimeryzację tubuliny z drożdży niż tubuliny z mózgu ssaków, co prawdopodobnie odzwierciedla różnice w sekwencji aminokwasowej obu białek.

### (c) Współdziałanie mikrotubul z aktyną

Aktyna i miozyna zostały zidentyfikowane jako składniki wrzeciona mitotycznego. Stwierdzono, że *in vivo* część aktyny jest związana z mikrotubulami, a oczyszczona aktyna reaguje *in vitro* z tubuliną, tworząc struktury o właściwościach żelu. Połączenia między aktyną a tubuliną są utworzone przez białka związane z mikrotubulami (MAPs), które dodatkowo wykazują zdolność do rozgałęziania mikrofilamentów aktynowych. Współdziałanie mikrotubul z aktyną wykryto nie tylko w komórkach nerwowych ssaków, lecz również w płytkach krwi, w nabłonku tarczycy, w ciałkach bazalnych komórek rzęskowych nabłonka tchawicy i nibynózek otwornic. Ponadto, za pomocą metod immunologicznych wykazano, że rzęski nabłonka jajowodów zawierają aktynę i miozynę, co razem z wcześniejszymi doniesieniami o obecności aktyny w wiciach pozwala sugerować o występowaniu w wiciach i rzęskach dwóch układów: tubulino-dyneinowego i aktomiozynowego. Sugerowano,



że współdziałanie mikrotubul i mikrofilamentów aktyny podlegać może podobnym zasadom, co współdziałanie mięśni i kości na poziomie makroskopowym.

W drugiej części sympozjum dotyczącej mikrofilamentów aktynowych dwa zagadnienia zasługują na szczególną uwagę:

(a) Rodzaje i właściwości białek regulujących polimeryzację aktyny i rozgałęzianie jej mikrofilamentów

Na polimeryzację i żelifikację endogennej aktyny wpływają w różnych komórkach różne białka: np. w *Dictyostelium discoideum* — białko o ciężarze cząsteczkowym 39 000 daltonów, w *Physarum polycephalum* — fragmina — 43 000, w makrofagach — żelsolina — 91 000 i białko wiążące aktynę, w płytkach krwi — białko o ciężarze cząsteczkowym 95 000, w *Acanthamoeba castellani* — plastycina — białko składające się z dwóch łańcuchów polipeptydowych o ciężarze 31 000 i 28 000, w komórkach Ehrlicha — aktynożelina o ciężarze cząsteczkowym 115 000, w kosmkach śluzówki jelita — wilina — 95 000, a w osoczu krwi — białko o ciężarze 92 000. Większość tych białek działa tylko w obecności mikromolowych stężeń jonów wapnia, ale nie wymaga obecności kalmoduliny. Białko z *Dictyostelium discoideum* hamuje depolimeryzację aktyny, natomiast żelsolina z makrofagów, plastycina z *Acanthamoeba* oraz fragmina z *Physarum* powodują depolimeryzację F-aktyny do krótkich mikrofilamentów. Z kolei aktynożelina z komórek Ehrlicha i białko wiążące aktynę z makrofagów biorą udział w rozgałęzianiu mikrofilamentów aktynowych i tworzeniu struktur sieciowatych. Jeszcze inaczej działa wilina, która tworzy połączenia między poszczególnymi mikrofilamentami w pęczkach aktynowych kosmków jelita.

(b) Zastosowanie cytochalazyny do badania polimeryzacji aktyny i jej interakcji z różnymi białkami

Cytochalazyna wpływa destrukcyjnie na końce polimeryzujących mikrofilamentów aktyny oraz na tworzenie połączeń między nimi. Hamujące działanie cytochalazyny na cytokinezę polega na dezintegracji mikrofilamentów aktyny. Podobnie tłumaczy się stymulujący wpływ tego związku na sekrecję mukopolisacharydów i enzymów lizosomalnych przez fibroblasty. Cytochalazyna powoduje gwałtowne cofanie się krawędzi hodowanych fibroblastów i odwracalne zmiany strukturalne w układzie mikrofilamentów.

Tematem trzeciej części sympozjum były pośrednie filamenty: ich skład białkowy, występowanie i funkcja. Są to podłużne struktury o średnicy około 100 Å występujące w większości komórek. Na podstawie właściwości biochemicznych i immunologicznych wyróżnia się pięć



rodzajów pośrednich filamentów: keratynowe, desminowe, wimentinowe oraz neurofilamenty i filamenty komórek glejowych. Filamenty keratynowe występują w komórkach nabłonkowych i są zbudowane z białek o ciężarze cząsteczkowym od 40 000 do 70 000 daltonów. Neurofilamenty składają się z dwóch, a częściej z trzech białek o różnych ciężarach cząsteczkowych. W mózgu ssaków dwa z tych białek mają wysoki ciężar cząsteczkowy, rzędu 200 000, a trzecie białko — około 70 000 daltonów. Filamenty desminowe, zbudowane z jednego białka zwanego desminą (50 000), znajdują się w mięśniach, natomiast filamenty wimentinowe zbudowane są z białka wimentyny (52 000) i występują zarówno w mięśniach, jak i w komórkach niemięśniowych. W większości komórek znajdują się dwa rodzaje filamentów pośrednich: filamenty specyficzne dla danego rodzaju tkanki oraz filamenty wimentinowe, np. w mięśniach szkieletowych i sercowych składnikami linii Z oprócz innych białek są desmina i wimentina, a w komórkach nabłonkowych oprócz filamentów keratynowych są obecne filamenty wimentinowe. Wszystkie białka wchodzące w skład filamentów pośrednich są ufosforylowane i ulegają fosforylacji *in vitro*. Przypuszcza się, że proces fosforylacji wpływa na stopień polimeryzacji i agregacji pośrednich filamentów, chociaż nie zostało to dowiedzione.

Oczyszczone filamenty pośrednie, podobnie jak mikrotubule, zawierają związane białka, które pod wieloma względami (ciężar cząsteczkowy, mapy peptydowe, zdolność do fosforylacji i zdolność do indukowania agregacji mikrotubul) przypominają MAPs. Oprócz tych białek w preparatach pośrednich filamentów znaleziono również zależną od stężenia jonów wapnia proteazę, specyficzną wobec tych filamentów. W komórkach nerwowych oraz w fibroblastach wykazano, że między pośrednimi filamentami a mikrotubulami istnieją funkcjonalne połączenia. Uważa się, że pośrednie filamenty tworzą mechaniczne połączenia między poszczególnymi składnikami komórki i razem z mikrotubulami stanowią szkielet komórkowy.

Omówione zagadnienia nie wyczerpują tematów omawianych w czasie III sympozjum II Międzynarodowego Kongresu Biologii Komórki. Odzwierciedlają one jedynie te kierunki badań, wokół których skoncentrowana była uwaga dużej grupy uczestników. Największy postęp zaznaczył się w dwóch dziedzinach: w badaniach nad budową i funkcją pośrednich filamentów oraz w badaniach nad białkami wiążącymi aktyne, które regulują stopień jej polimeryzacji i rozgałęzienia. Dominował pogląd, że właśnie wyniki tych badań przybliżą nas w znacznym stopniu do zrozumienia molekularnych zasad funkcjonowania aparatu ruchowego komórek mięśniowych i niemięśniowych.







## RECENZJE

Histochemistry. Theoretical and Applied. Volume one: Preparative and Optical Technology, by A. G. E. Pearse.

Wyd. czwarte, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York 1980.

Prawie 27 lat upłynęło od ukazania się pierwszego wydania „Histochemii Pearse'a”, która stała się swojego rodzaju „vademecum” nie tylko początkujących histochemików. Pierwsze wydanie tej książki (1953 r.) doczekało się tłumaczenia na język polski, następnie hiszpański, a wydanie następne (1960 r.) — na język rosyjski. Trzecie wydanie (1979 r.) przełożono na język włoski. Obecne czwarte wydanie, znacznie poszerzone, składać się będzie z trzech tomów, obecnego i dwóch następnych będących w przygotowaniu: „Analytical Technology” i „Enzyme Technology”.

Od narodzenia się pierwszej myśli napisania tej książki upłynęło bez mała 30 lat. W tym okresie byliśmy świadkami narodzenia się wielu technik badawczych, a przede wszystkim mikroskopii elektronowej; najpierw transmisyjnej, następnie skaningowej i wysokonapięciowej. Wypracowano zatem i zaadoptowano wiele metod badawczych, które pozwalają spojrzeć na ultrastrukturalną organizację cytoplazmy komórki oczyma chemika i biochemika. Rozwój technik badawczych, synteza nowych związków chemicznych, wprężenie w służbę histologii pierwiastków promieniotwórczych i metod immunologicznych zmusiły autora książki do gruntownej rewizji poprzednich wydań i poszerzenia wydania obecnego do objętości trzech tomów.

Pierwszy tom, który ukazał się na początku bieżącego roku, obejmuje głównie zagadnienia techniki przygotowawczej materiału oraz mikroskopii świetlnej. Książka składa się z 11 rozdziałów oraz krótkiego dodatku, w którym czytelnik może znaleźć m. in. bardzo pożytecznie zestawione wartości i symbole różnych jednostek tak fizycznych, jak i chemicznych. Oprócz krótkiego rysu historycznego, który wprowadza młodego adepta histochemii w dzieje tej metody badawczej (rozd. 1), na-



stępne cztery rozdziały zawierają opisy metod przygotowania tkanek do dalszych procesów histochemicznych oraz rozważania teoretyczne, w których autor uzasadnia zastosowanie poszczególnych metod przygotowania tkanek do odpowiednich analiz chemicznych. Rozdział drugi został poświęcony metodom skrawania tkanek w niskich temperaturach z zastosowaniem kriomikrotomów i ultrakriomikrotomów, z przeznaczeniem do obserwacji w mikroskopie elektronowym. Każdy rozdział niniejszej książki, a zatem i ten, składa się z dwóch części: rozważań historycznych nad powstaniem danej metody oraz dyskusji teoretycznej zawartych w rozdziale metod. Na końcu rozdziału czytelnik znajdzie dodatek, w którym autor zebrał szczegółowe recepty, według których czytelnik może prowadzić swoje badania histochemiczne. Rozdział drugi jest bogato ilustrowany fotografiami różnych typów krioultramikrotomów oraz ich schematami. W rozdziale trzecim autor omawia różne metody liofilizacji tkanek, ilustrując te metody wykresami obrazującymi przebieg fizycznego procesu, jakim jest zamrażanie tkanek. Znajdują się tam również bardzo instruktywne schematy liofilizatorów, dzięki czemu niejeden pomysłowy badacz może skonstruować własny aparat do suszenia tkanek. W rozdziale tym autor opisuje również metody przygotowania tkanek do obserwacji w mikroskopie skaningowym. W stosunkowo krótkim rozdziale czwartym czytelnik może zaznajomić się z metodami utrwalania tkanek na drodze wymiany, podstawienia wody w tkankach odpowiednim rozpuszczalnikiem, jak alkohol lub aceton z dodatkiem soli lub tlenków niektórych metali ciężkich, takich jak osm, rtęć lub chrom. Metoda ta — „Freeze-substitution” — ma bardzo szerokie zastosowanie w histochemii, a zwłaszcza w immunohistochemii. W rozdziale piątym autor rozważa procesy chemiczne, jakie mają lub mogą mieć miejsce w czasie działania związków utrwalających, takich jak aldehydy, sole metali ciężkich itp., na różne związki organiczne i polimery budujące składniki komórki. W dodatku czytelnik znajdzie kilka przepisów rutynowo używanych utrwalaczy do różnych typów tkanek. Największym rozdziałem recenzowanej książki jest rozdział poświęcony immunohistochemii. Autor rozwinął w obecnym wydaniu książki mały fragment z podobnego rozdziału wydania pierwszego do pełnego rozdziału liczącego 95 stron. Opisuje w nim wiele metod znakowania przeciwciał oraz sposoby ich wykrywania tak w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym. Rozdział dotyczący metod immunohistochemicznych jest bogato ilustrowany kolorowymi schematami, które bardzo instruktywnie obrazują mechanizmy interakcji różnie znakowanych przeciwciał z antygenami. Obszerny dodatek do tego rozdziału obejmuje przepisy na sprawdzanie specyfiki przeciwciał, przygotowywanie i oczyszczanie immunoglobulin i cały szereg recept niezbędnych do pracy metodami immuno-



cytochemicznymi tak na poziomie mikroskopii świetlnej, jak i elektro-nowej. Bardzo pożytecznym dodatkiem do tego rozdziału jest załączony spis adresów firm, które rozprawdzają potrzebne do immunohistochemii odczynniki.

Rozdziały 7 i 8 dotyczą odpowiednio wykrywania pewnej grupy enzymów za pomocą techniki sporządzania błon żelatynowych nasyconych odpowiednim substratem, np. DNA dla wykrywania DN-azy, zastosowania enzymów jako odczynników na specyficzne składniki komórkowe, np. nukleazy, hyaluronidazy i neuraminidazy. Oprócz tej pierwszej grupy enzymów o pierwszorzędym znaczeniu, autor z całą ostrożnością omawia jeszcze dwie inne grupy enzymów o drugorzędym znaczeniu w technice histochemicznej, są to: amylazy, trypsyna i pepsyna oraz różne elastazy, kolagenazy, pektynazy, lipazy i fosfolipazy. Drugim co do wielkości rozdziałem jest rozdział 9 (43 str.), poświęcony autoradiografii oraz jej zastosowaniu. Z przyjemnością znajdujemy w tym rozdziale nazwiska polskich uczonych (K. Ostrowski, W. Sawicki, E. Platkowska i in.), którzy opracowali specjalną metodę scyntylicyjną, opisaną i zalecaną przez autora książki. Ostatnie dwa rozdziały (10 i 11) poświęcone mikroskopii fluorescencyjnej i histochemii ilościowej zostały napisane przez F. D. W. Rosta. Autor tych rozdziałów omawia na wstępie podstawy zjawiska fluorescencji oraz jej źródła i zastosowanie. W krótkim dodatku znajdujemy zestaw barwników fluorescencyjnych oraz ich fizykochemiczne właściwości. Omawia również rodzaje materiału fotograficznego, jaki powinien być stosowany równoległe z tą techniką badawczą. W rozdziale ostatnim (11) znajdzie czytelnik opisy, niestety bardzo kosztownych, instrumentów, które muszą być stosowane, jeżeli badacz postawi sobie ambitne zadanie ilościowego określenia różnych wyników przeprowadzonych reakcji histochemicznych. Książka zawiera bardzo czytelnie zestawiony indeks.

Recenzowana książka została napisana przez wybitnego specjalistę histochemika, którego autorytetu nie trzeba rekomendować wśród cytologów i histologów polskich. Zebrany w niej kapitał informacji znajdzie bez wątpienia inwestorów w naszym kraju i pomimo zapewne wysokiej ceny (recenzent dysponował egzemplarzem okazowym) znajdzie chętnych nabywców. Można również zainteresować wydawców polskich do wszczęcia kroków z autorem, w celu przetłumaczenia tego dzieła na język polski.

W. Kilarski



Primordial Germ Cells in Chordates. Embriogenesis and development, by Peter D. Nieuwkoop and Lien A. Sutasurya.

Wydana przez Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, Melbourne.

Recenzowana książka jest następną (7) edycją w znanej serii „Developmental and Cell Biology”. Opracowania problemu pochodzenia i losów komórek prapłciowych w ontogenezie strunowców podjęli się P. D. Nieuwkoop, dyrektor Laboratorium Hubrechta w Utrechcie i profesor uniwersytetu w Utrechcie (Holandia), oraz jego współpracownik L. A. Sutasurya, obecnie wykładowca biologii w Bandungu (Indonezja).

Książka liczy 148 stron tekstu, jest zaopatrzona w spis literatury o pełnej bibliografii. Zawiera ona około 520 pozycji datowanych od drugiej połowy XIX w. do lat ostatnich naszego dziesięciolecia. Trzy indeksy: autorski, nazw zwierząt i rzeczowy podnoszą dodatkowo wartość użytkową tego cennego dzieła.

Komórki prapłciowe są szczególnie wyróżniającymi się wśród innych komórek budujących ciało zarodka. Ich szczególne cechy morfologiczne pozwalają wyróżnić je wśród innych komórek już we wczesnych stadiach rozwojowych strunowców i następnie prześledzić szlaki ich wędrówek od miejsca powstania do zawiązków gonad, gdzie osiedlają się i różnicują w przyszłe definitywne komórki płciowe.

Autorzy dyskutują na podstawie zarówno danych opisowych, jak i badań eksperymentalnych prowadzonych na przedstawicielach prawie wszystkich grup strunowców. Przeprowadzają oni porównawcze analizy nad charakterystycznymi cechami morfologicznymi, które jak się okazało są wspólne dla wielu grup strunowców. Autorzy postawili sobie zadanie ustalenia strukturalnego czynnika determinującego przeznaczenie komórek prapłciowych. W efekcie tych rozważań czytelnik dowiaduje się, że czynnik determinujący, zdaniem autorów, nie ma charakteru strukturalnego, a obserwowane charakterystyczne dla tych komórek elementy cytoplazmatyczne (plazma zarodkowa) są jedynie efektem towarzyszącym i nie są równoważnościowe pod względem funkcjonalnym w komórkach prapłciowych różnych grup kręgowców. Zdaniem recenzenta autorzy zbyt pobieżnie przedstawili zagadnienie czynnika lub czynników determinujących, które bezsprzecznie mają swoje strukturalne wykładniki pod postacią układów cząsteczkowych, które umykają obserwatorowi wyposażonemu nawet w najdoskonalsze mikroskopy elektronowe czy też inne instrumenty analityczne.

Strunowce stanowią stosunkowo zwartą grupę z filogenetycznego punktu widzenia. Dzięki współcześnie żyjącym bardzo prymitywnym formom, oprócz tych, które stoją na szczycie filogenetycznego rozwoju, moż-



na prześledzić i wskazać stosunkowo wspólną linię ogólnego rozwoju komórek prapłciowych z równoczesnym podkreśleniem różnic tak w pochodzeniu tych komórek, jak również w sposobie ich wędrówek do miejsca przeznaczenia (zawiązki gonad) w różnych grupach kręgowców. Autorzy bardzo sugestywnie przedstawiają filogenetyczne zależności, jakie istnieją między różnymi sposobami powstawania komórek prapłciowych różnych grup strunowców a historią ich rozwoju. Dzięki temu historia rozwoju komórek prapłciowych dostarcza nowych dowodów embriologicznych, które w pewnym stopniu wyjaśniają stosunki pokrewieństw, jakie istnieją między współcześnie istniejącymi strunowcami.

Treść książki zawarta jest w 9 rozdziałach obejmujących dane dotyczące: wczesnych stadiów rozwojowych kręgowców ze specjalnym uwzględnieniem powstawania mezodermy, charakterystyki komórek prapłciowych, ich powstawania, tworzenia zawiązków gonad, sposobu migracji komórek prapłciowych oraz filogenetycznego znaczenia omawianych danych embriologicznych. Wiadomości ujęte w rozdziałach omawiane są według jednego schematu. Autorzy omawiają najpierw dane pozyskane z obserwacji opisowych, a następnie eksperymentalnych. W konkluzji można stwierdzić, zgodnie z intencją autorów, że wiadomości nasze dotyczące powstawania komórek prapłciowych są bardzo ograniczone, a w niektórych grupach wprost fragmentaryczne. Po przeczytaniu tej książki, ilustrowanej bardzo przejrzystymi oraz instruktywnymi schematami, czytelnik natychmiast zrozumie, że problem powstawania komórek prapłciowych pozostaje nadal otwarty, a wiele grup kręgowców oczekuje nadal na podstawowe badania embriologiczne, tak opisowe, jak i eksperymentalne, które dostarczą nowych, a w wielu przypadkach całkiem podstawowych informacji o komórkach prapłciowych.

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, przed tekstem, należy podać 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] 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.
- [2] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, 73: 41 - 48, 1972.

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 zrobić korektę autorską, 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 I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland are available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.



### SPIS TREŚCI

J. POLKOWSKA, Immunocytochemiczna lokalizacja gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórzu . . . . .	87
E. WŁOCH, Kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię świetlną . . . . .	107
J. KUŹNICKI, Aparat kurczliwy i szkieletowy komórki (Pokłosie II Międzynarodowego Kongresu Biologii Komórki) . . . . .	127
Recenzje . . . . .	133