

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 20 1993

Suplement nr 2

suplement

Postępy Biologii Komórki

redaktor
HALINA GABRYŚ

**POSTĘP
W BADANIACH
RUCHÓW
KOMÓRKOWYCH**

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Polskiej Sieci UNSCO wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa*

WSTĘP

Materiały zebrane w obecnym Zeszycie były przedstawione w postaci referatów na XXII Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego, które odbyło się w Rabce w dniach 6–13 marca 1993.

Tematem Seminarium był **Postęp w badaniach systemów ruchowych komórek**. Wzięło w nim udział 48 osób. Wygłoszono 21 referatów, których tematyka obejmowała zagadnienia metodyczne, modelowanie matematyczne ruchów, mechanizmy molekularne ruchów wewnątrzkomórkowych i migracji całych komórek oraz reakcje ruchowe na bodźce zewnętrzne. W obecnym Zeszycie trafia do rąk Czytelnika większość prezentowanych doniesień.

Seminaria rabczańskie zostały zaplanowane przez pierwszych organizatorów jako spotkania pracowników Instytutu umożliwiające wymianę doświadczeń i prezentację badań prowadzonych w różnych pracowniach oraz przegląd prac decydujących o postępie dokonującym się w różnych dziedzinach biologii molekularnej. Ten ich charakter utrzymał się na przestrzeni dwudziestu trzech lat i tylko dwukrotnie, zamiast tradycyjnego spotkania pracowników, odbyły się konferencje o charakterze międzynarodowym.

Stałym zwyczajem stało się zapraszanie specjalistów z innych polskich ośrodków badawczych co nadało seminariom rabczańskim charakter szkoły. Od czterech lat w seminariach biorą także udział grupy studentów UJ, głównie ze specjalności biologia molekularna, wykazujących zainteresowania pracą badawczą.

W opinii uczestników spotkania były zawsze udane. Chwalono przede wszystkim stworzenie możliwości prowadzenia nieograniczonej czasowo dyskusji naukowej w nieformalnej atmosferze i okazji do prezentacji własnych wyników i przemyśleń dla młodych naukowców czy studentów, dla których wystąpienie na forum publicznym jest zazwyczaj bardzo stresujące. Podkreślano również, że jest to okazja do bliższego poznania się ludzi pracujących w różnych ośrodkach a nawet pod jednym dachem i często nie zdających sobie sprawy ze zbieżności swoich zainteresowań naukowych i kierunku prowadzo-

nych badań. Istotna jest także wyjątkowa uroda okolicy i możliwość spędzenia czasu poza zajęciami na pieszych wędrówkach i na nartach.

Dlatego seminaria odbywały się regularnie od 1970 roku z przerwami jedynie w okresie stanu wojennego oraz w 1991 roku z powodu zasadniczych trudności finansowych.

W 1993 roku w sukurs Instytutowi przyszła Polska Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN, która dofinansowała XXII Seminarium w wysokości 30 mln zł. Za tę pomoc finansową, która praktycznie umożliwiła odbycie się spotkania w jego zaplanowanej formie, organizatorzy składają serdeczne podziękowania na ręce Dyrektora Sieci – docenta Macieja Nałęcza. Nie mniej gorące podziękowania pragniemy wyrazić Profesorowi Włodzimierzowi Korohodzie za faktyczną współorganizację Seminarium oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu materiałów do druku.

Dziękujemy również recenzentom artykułów tego suplementu Profesorom: Andrzejowi Grębeckiemu i Włodzimierzowi Korohodzie.

Organizatorzy XXII Seminarium IBM:
doc. dr hab. Halina Gabryś
mgr Przemysław Malec
mgr Andrzej Waloszek

BADANIA MIGRACJI KOMÓREK – WĄTPLIWOŚCI I TRUDNOŚCI INTERPRETACJI

MEASUREMENT OF CELL MIGRATION – UNCERTAINTIES AND DIFFICULTIES OF INTERPRETATION

Włodzimierz KOROHODA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Aktywność ruchowa komórek w organizmach zwierzęcych odgrywa rolę w procesach morfogenezy, regeneracji, gojenia się ran, kancerogenezy oraz w reakcjach obronnych komórek układu immunologicznego. Coraz więcej pracowni naukowych koncentruje swoje badania na analizie ruchów komórek. W pracowniach tych badane są rozmaite komórki i stosowane są różnorodne metody określania prędkości i orientacji migracji oraz zmian kształtu komórek. W artykule przedyskutowano możliwości i ograniczenia najczęściej stosowanych metod. Szczególną uwagę zwrócono na potrzebę rozwijania bezpośrednich metod komputerowego ciągłego zapisywania i analizowania obrazu populacji pojedynczych komórek.

Summary. Cell motile activity plays a significant role in processes of morphogenesis, regeneration, wound healing, cancerogenesis, and in immune responses in animal organisms. Numerous laboratories concentrate research on analysis of cell motile activity. There are used, however, various methods to determinate and describe the speed and orientation of cell locomotion and changes in cell polarization and shape. In this review the main limitations and advantages of the most often applied methods are discussed. The special attention is paid to the need of development of direct, computer asissted methods which permit continuous recording and analysing pictures of a great number of individual cell motile behaviour under well defined experimental conditions.

Aktywność ruchowa komórek w żywych organizmach zwierzęcych występuje podczas procesów morfogenezy, regeneracji i gojenia się ran, reakcji obronnych układu immunologicznego oraz w procesach kancerogenezy [6, 7, 8, 29, 30, 35, 36, 38, 41, 45, 49, 53, 54, 57, 61]. Równocześnie aktywność ta związana jest z polaryzacją struktury i funkcji komórek, organizacją ich cytoplazmy, regulacją metabolizmu włącznie z syntezą DNA i ekspresją genów. Coraz więcej pracowni naukowych koncentruje swe badania na analizie ruchów komórek. Świadczy o tym narastająca liczba publikacji poświęconych tym zagadnieniom, kilku tysięcy rocznie. Badania prowadzone są na rozmaitych komórkach i stosowane są bardzo rozmaite metody określania prędkości lokomocji, polaryzacji kształtu i orientacji migracji komórek. Wiele z tych metod podlega ograniczeniom, które powodują, iż uzyskanych wyników nie można jednoznacznie interpretować. Nie zawsze autorzy prac zdają sobie sprawę z ograniczeń stosowanych metod i wynikających z nich błędów interpretacji. Ten referat

poświęcony jest omówieniu trudności interpretacji wyników badań i pomiarów aktywności ruchowej komórek zwierzęcych.

RÓŻNORODNOŚĆ METOD BADANIA MIGRACJI KOMÓREK

Różne komórki migrują z bardzo różną prędkością. Dla przykładu:

orzęski i wiciowce pływają z prędkością	ponad 100	$\mu\text{m/s}$
ameby migrują z prędkością	2–5	$\mu\text{m/s}$
keratynocyty	15–30	$\mu\text{m/min}$
granulocyty wielojądrzaste	5–10	$\mu\text{m/min}$
fibroblasty	20–40	$\mu\text{m/h}$
melanoma B16	10–20	$\mu\text{m/dobę}$

Bezpośrednio można mierzyć szybkość migracji komórek określając czas potrzebny do przebycia danego odcinka, np. 100 μm , lub określając długość odcinka drogi przebytej w danym czasie. Takie pomiary można wykonać stosunkowo łatwo na komórkach względnie szybko migrujących, takich jak wiciowce, orzęski lub ameby. Jednak liczba takich pomiarów zwykle jest ograniczona, gdyż wykonywane są na pojedynczych komórkach. W wypadku keratynocytów i granulocytów pomiary takie są trudniejsze, gdyż trudno jest bezpośrednio obserwować wolno migrujące komórki, a dla fibroblastów lub komórek melanoma wykonanie takich bezpośrednich pomiarów pod mikroskopem przez obserwatora jest niemożliwe. Dlatego starano się opracować pośrednie metody pomiaru prędkości ruchów komórek.

I. POŚREDNIE METODY BADANIA AKTYWNOŚCI RUCHOWEJ KOMÓREK

W literaturze można spotkać najczęściej trzy grupy metod pośrednich. Pierwsza z nich opiera się na pomiarze drogi przebytej przez najszybciej migrujące komórki odrywające się z brzegu pojedynczej, zwartej warstwy komórek (tzw. *monolayer*) do wolnej "rany" albo z brzegu eksplantatu tkanki, agregatu komórek lub sferoidu. Położenie komórek określa się zwykle po jednym lub dwu dniach (24 lub 48 h). W metodzie tej bada się wielkość przemieszczenia się (translokacji) komórek najszybciej migrujących (rys. 1), czyli tworzących tzw. front prowadzący (ang. *leading front*). Komórki podczas doświadczenia zazwyczaj migrują od kilkudziesięciu do kilku tysięcy μm (do 2 mm) [37,38,42,55,56].

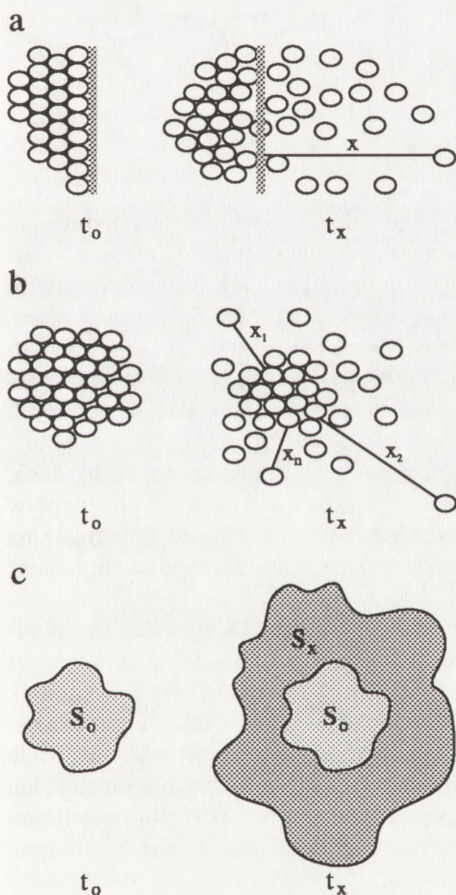
Jedną z modyfikacji tej metody polega na tym, że zamiast migracji komórek do "rany" obserwuje się wymigrowywanie komórek z agregatu lub sferoidu na wolną powierzchnię szkła lub plastiku.

W metodzie tej określa się maksymalny odcinek migracji z brzegu sferoidu – D1, minimalny odcinek migracji – D2 i inne przypadkowo wybrane cztery odcinki – D3–6. Po 48 godzinach fotografuje się preparat i oblicza średnią wartość migracji w danych warunkach, w μm na 2 dni. W innej modyfikacji, po utrwaleniu, wybarwieniu i sfotografowaniu preparatu, planimetruje się preparat i oblicza się stosunek powierzchni zajętej przez komórki po doświadczeniu do ich powierzchni przed doświadczeniem [35, 41]. Metodę taką wykorzystali Mandell i Afnan [41] do określenia współczynnika chemotaksji wielojądrzastych granulocytów (PMNL). Badali oni wymigrowywanie pod agarozą granulocytów ze studzienki w kierunku sąsiednich studzienek, zawierającej chemoatraktant i kontrolnej. Obserwowali oni

kształt pola zajętego przez komórki, przypominający "rakię" tenisową. Po 18 godzinach inkubacji określano stosunek drogi przebytej przez komórki stanowiące front skierowany do badanej studzienki do drogi frontu komórek przypadkowo migrujących w innym kierunku niż badana studzienka. Wyniki tej pracy przedstawiane są w liczbach względnych i przez to praktycznie nieporównywalne z danymi z innych pracowni.

Najczęściej stosowanymi metodami pomiaru aktywności ruchowej, przede wszystkim komórek układu immunologicznego, ale także fibroblastów i innych komórek, są rozmaite modyfikacje zastosowań komór Boydena [2, 11, 12, 44, 58].

W metodzie tej liczy się komórki, które przedostały się przez pory filtru mającego zazwyczaj grubość od kilku do kilkuset μm i średnicę porów 2, 4, 6 lub 8 μm , na jego drugą stronę w obecności i przy braku badanych chemoatraktantów w dolnej komorze. W najnowszych wersjach tej metody bada się migrację wewnątrz filtru pojedynczych, znakowanych fluorescencyjnie komórek.



Rys. 1. Zasada metod badania przemieszczeń komórek wymigrowujących z pojedynczej warstwy lub agregatów, bliższe objaśnienia w tekście

Do obliczeń wykorzystuje się najszybciej migrujące komórki z frontu prowadzącego [12, 58]. Stosując filtry o grubości 100–200 μm można określić w nich położenia najszybciej migrujących komórek i z pewnym przybliżeniem modelować (ale nie mierzyć) stromość gradientu stężeń chemoatraktantów [62]. Uzyskane w takich warunkach prędkości migracji komórek, włącznie z wielojądrzastymi granulocytami, są dziesięciokrotnie do stukrotnie mniejsze niż w innych testach, np. pod agarozą [12].

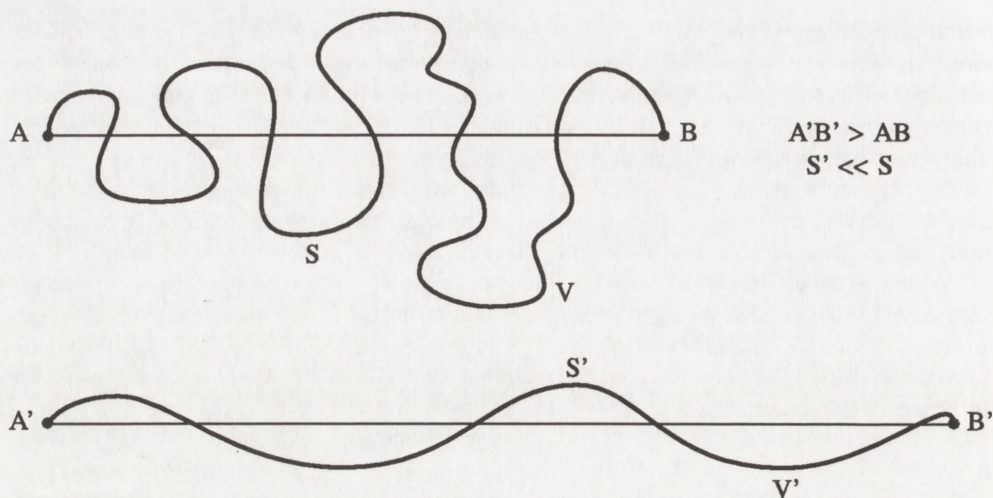
Wszystkie powyżej opisane metody w rzeczywistości określają przemieszczenie (translokację) komórek po stosunkowo długim czasie trwania doświadczenia, od kilkudziesięciu minut do kilku dni.

Nie biorą one pod uwagę, że końcowa translokacja komórek, określana po długim czasie, zależy nie tylko od szybkości migracji komórek i ich aktywności lokomocyjnej, ale i od:

a) polaryzacji komórek i kształtu drogi przebytej przez komórki; komórki ulegające polaryzacji mogą wędrować wolniej, ale poruszając się po drogach prostych mogą dalej zejść [17], ilustruje to rysunek 2;

b) wzajemnych oddziaływań między powierzchniami migrujących komórek.

Komórki spotykając się ze sobą mogą się przejściowo "zlepić", a kolizje między nimi nie mają charakteru zderzeń sprężystych. Każde takie zderzenie zwalnia migrację komórki. Szczególnie komórki wymigrowujące z poje-



Rys. 2. Ilustracja jak czynniki zwalniające szybkość migracji komórek wpływając na polaryzację ich ruchu mogą powodować wzrost przemieszczenia komórek

dynczej warstwy (tzw. *monolayer*), agregatu lub sferoidu są hamowane przez oddziaływania między ich powierzchniami i kontakty międzykomórkowe. Lokalna gęstość komórek i częstość kolizji między nimi ma znaczny wpływ na przesunięcie komórek badane po długim czasie. Na skuteczność wymigrowania komórek mają duży wpływ czynniki rozpraszające, takie jak *scatter factor* wytwarzany przez fibroblasty identyczny z HGF – czynnikiem wzrostowym hepatocytów. Czynniki takie osłabiają kontakty międzykomórkowe i zapobiegają "zlepianiu się" komórek, a przez to ułatwiają migrację w gęstych populacjach komórek [5].

c) W wypadku badania migracji wewnątrz lub w poprzek filtrów w komorze Boydena, dodatkowo obok dwu pierwszych czynników, na przemieszczenie komórek ma duży wpływ zdolność ich do zmiany kształtu i przeciskania się przez pory filtru. Komórki podatne na deformację łatwiej będą przechodzić przez filtr nawet wówczas, gdy ich rzeczywista aktywność lokomocyjna będzie zmniejszona.

Wyniki dotyczące pomiaru końcowego przemieszczenia komórek mogą zatem być obarczone błędami. Zwiększone przemieszczenie może zachodzić przy zmniejszonej prędkości migracji, jeśli działają czynniki wpływające na kontakty międzykomórkowe lub czynnik badany wpływa na polaryzację kształtu komórek i "permanencję" ruchu lokomotorycznego [4], a w wypadku badań migracji wewnątrz filtrów na przemieszczenie wpływa tak wiele innych czynników poza rzeczywistą aktywnością lokomocyjną komórek, że interpretacja ich jest prawie niemożliwa. Wyniki badań prowadzonych wymienionymi powyżej pośrednimi metodami coraz częściej okazują się sprzeczne z bezpośrednimi pomiarami aktywności ruchowej komórek.

Trzecia grupa, ostatnio ponownie stosowanych po kilkuletniej przerwie, pośrednich metod pomiaru szybkości ruchów komórek, związana jest z porównaniem migracji komórek do przypadkowego błędzenia (ang. *random walk*), takiego jakie występuje w ruchach Browna.

Ilościowy opis ruchów Browna i określenie tzw. "średniego przesunięcia kwadratowego" (ang. *mean square displacement*) podali na początku tego wieku Einstein i Smoluchowski. Analizę ruchów komórek przy wykorzystaniu takiego modelu zaproponowali m.in. Sayers i wsp. [50] dla opisu ruchów *Amoeba proteus* oraz Gail i Boone [21, 22, 23] – dla opisu ruchów fibroblastów, na początku lat siedemdziesiątych. Gail i Boone zauważyli jednak, że tak uzyskane wartości liczbowe są dla większości typów komórek niepowtarzalne. Formalny opis przypadkowego błędzenia zakłada, że :

komórki mogą wytwarzać pseudopodia przypadkowo, w dowolnym kierunku z takim samym prawdopodobieństwem;

zderzenia (kolizje) między komórkami są sprężyste, a nie plastyczne, tzn. komórki nie przyczepiają się do siebie, zderzenie ma wpływ na kierunek ruchu, ale nie na jego prędkość.

Gail i Boone [21, 23] pokazali ilościowo, jak lokalna gęstość komórek wpływa na wartości średniego przesunięcia kwadratowego. Okazało się, że bardzo silnie zależy ona od lokalnej gęstości komórek w wypadku komórek prawidłowych wykazujących kontaktowe hamowanie migracji, natomiast słabiej zależy od gęstości w wypadku nowotworowo transformowanych komórek [31, 32, 33].

Jako dane podawane są tutaj zazwyczaj wyniki bezpośrednich obserwacji migrujących komórek z filmów wykonanych metodą zdjęć poklatkowych (ang. *time lapse cinematography*) lub z pomiarów przemieszczeń komórek prowadzącego frontu.

Doświadczenia wykazują, że taki opis daje się zastosować niemal wyłącznie do komórek, które wzajemnie ze sobą słabo oddziałują, takie jak ameby, monocyty i wielojądrzaste granulocyty, i powinny być zdolne do wytwarzania pseudopodiów z jednakowym prawdopodobieństwem we wszystkich kierunkach (por. [4]). W wypadku innych komórek wykazujących stałą polaryzację kształtu i migrujących bez zmian kierunku lokomocji, jak np. keratynocyty [9, 10] lub limfocyty, brak jest zgodności z krzywą przewidywaną przez równania Smoluchowskiego-Einsteina [4]. Stosowanie tej metody opisu do fibroblastów, keratynocytów i innych komórek tkankowych prowadzi do otrzymania danych liczbowych, jednak niepowtarzalnych, szczególnie w wypadku prawidłowych komórek, wykazujących kontaktowe hamowanie migracji.

II. METODY ANALIZY AKTYWNOŚCI RUCHOWEJ KOMÓREK OPARTE NA OBSERWACJI I ZAPISIE KSZTAŁTU I RUCHÓW POJEDYNCZYCH KOMÓREK

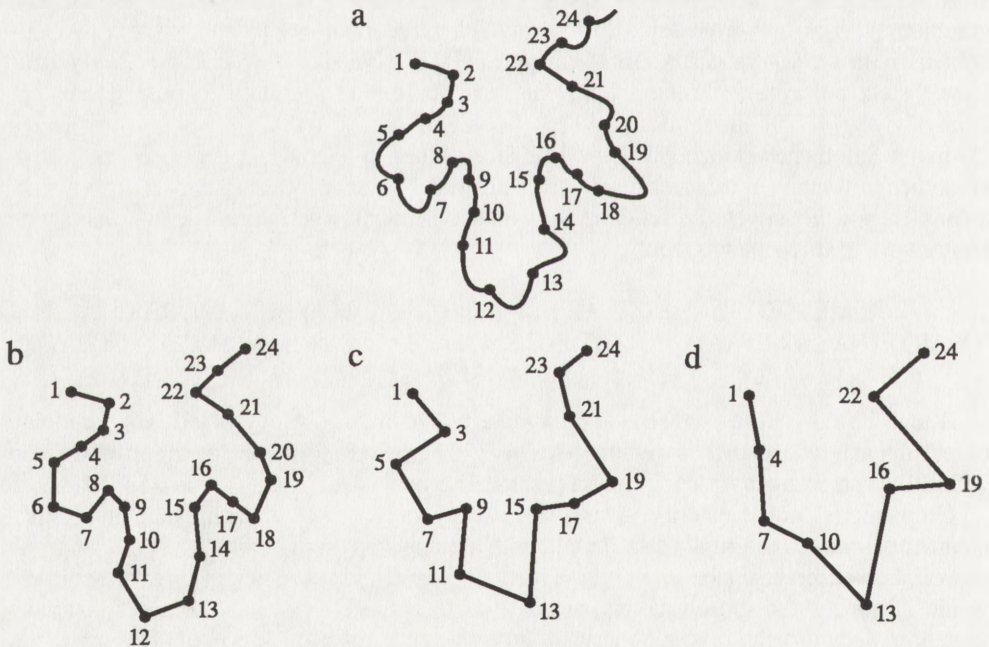
Z tego co dotychczas powiedziano, wynika potrzeba stosowania metod bezpośrednich określania aktywności ruchowej komórek. Wszystkie metody pośrednie mogą prowadzić do wniosków sprzecznych z rzeczywistym przebiegiem zjawiska.

Grupa metod, obecnie coraz częściej wykorzystywanych w badaniach, polega na bezpośredniej obserwacji migrujących komórek. Gdy komórki wędrują bardzo szybko lub bardzo powoli, konieczne staje się rejestrowanie ruchów komórek w sposób ciągły, tzw. "monitorowanie". Tylko w ten sposób można wyznaczyć rzeczywiste tory ruchu komórek i zmiany kształtu pojedynczych komórek. Pierwsze próby wyznaczenia trajektorii, czyli torów ruchu migrujących komórek, pochodzą z lat pięćdziesiątych. Wówczas to Dryl zastosował metodę ciemnego pola i długotrwałego naświetlania obrazu do badania ruchów orzęsków [15]. Stosowanie tej metody można spotkać jeszcze obecnie dla szybko migrujących lub płynących

komórek [28, 40]. Także w latach pięćdziesiątych Rose, Abercrombie i Ambrose zastosowali metody filmowe, zdjęć poklatkowych i analizy klatka po klatce (ang. *frame by frame analysis*). Metody te, chociaż żmudne, wniosły wiele do opisu ruchów komórek, ale ze względu na pracochłonność były stosowane do opisu ruchu pojedynczych, nielicznych komórek, a nie populacji pojedynczych komórek [1, 7, 10, 11, 21, 24, 25, 26, 27]. Dopiero po połączeniu rejestracji poklatkowej obrazu z jego analizą komputerową, metody te w ostatnich pięciu latach znajdują coraz szersze zastosowanie do ilościowego opisu aktywności wielu komórek w badanej populacji.

W 1977 r. Albrecht-Buehler [3] wprowadził metodę wyznaczania torów ruchu wolno migrujących komórek przez rejestrowanie tzw. fagokinetycznych śladów ruchu komórek. W metodzie tej powierzchnię pokrywa się złotem koloidalnym. Migrujące komórki fagocytykując pozostawiają ślady czystej powierzchni. Metoda ta stosowana była bardzo często aż do połowy lat osiemdziesiątych, ale i dzisiaj publikowane są prace wykonane tą metodą [63, 65].

Druga połowa lat osiemdziesiątych przyniosła bardzo szybki rozwój metod komputerowych. Metody filmowania poklatkowego zastąpiono zapisem obrazu na taśmach magnetowidowych i firma Panasonic jako pierwsza wyprodukowała analogowy magnetowid poklatkowy. Zaletą tego systemu jest możliwość zapisu obrazu przy bardzo słabym oświetleniu, możliwość zapisu 25 obrazów na sekundę oraz rejestracji zwolnionej do kilkuset razy, a przy zastosowaniu zewnętrznego generatora impulsów można zapisywać obraz z dowolną



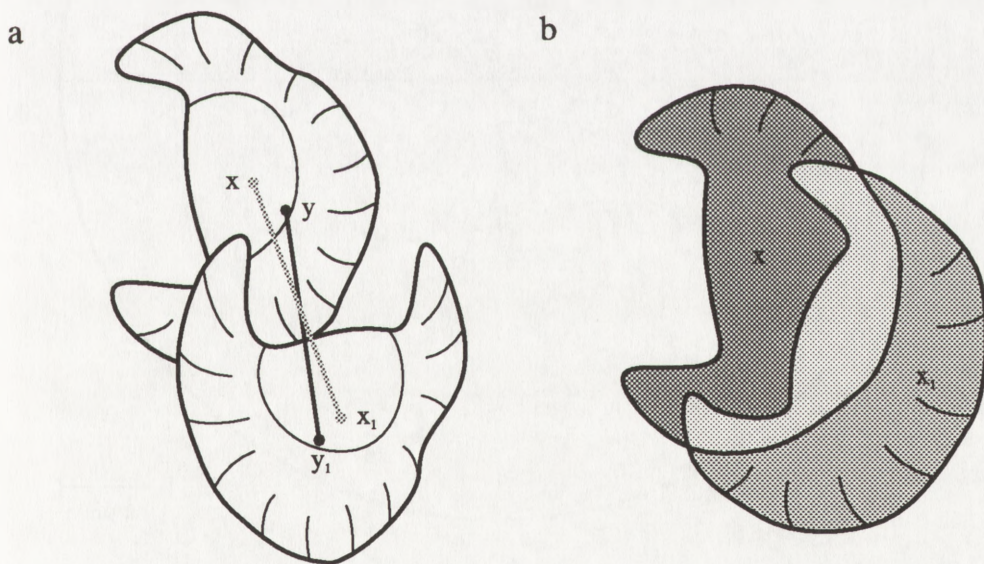
Rys. 3. Zależność długości mierzonej drogi przebytej w danym czasie przez komórkę od odstępu czasu pomiędzy kolejnymi zapisami obrazu – im większy odstęp czasu ("krok czasowy"), tym większy błąd pomiaru

częstotliwością nawet przez wiele dni. Lepsze okazują się jednak wprowadzane w latach dziewięćdziesiątych magnetowidy z cyfrowym zapisem obrazu (digitalne) lub ostatnio, bezpośrednio zapisy poklatkowe obrazu w pamięci komputera. Pozwala to zapisywać obrazy od 50 obrazów na sekundę do jednego obrazu na kilka godzin, w zależności od życzenia badacza. Wielu badaczy do dzisiaj jeszcze stosuje metody łączone – zapis obrazu z użyciem magnetowidu analogowego, a potem jego digitalizacja przy użyciu tzw. *frame grabber* i wprowadzanie cyfrowego zapisu obrazu do komputera lub przerysowywanie śladów komórek na foliach [52].

Wyznaczanie trajektorii, torów wędrówki pojedynczych komórek i zmian kształtu komórek, nawet przy zastosowaniu najnowocześniejszych, dostępnych technik napotyka na trudności wynikające z natury obserwowanych zjawisk. Trudności te ilustrują podane poniżej przykłady.

Jeśli odstępy czasowe (kroki czasowe) dla migrującej komórki są zbyt duże, to następuje wyraźne skrócenie obrazu rzeczywistej drogi komórki. Jest to błąd mniej istotny, gdy badamy komórki migrujące po drogach prostych, z tzw. dużą permanencją ruchu, rzadko skręcających, takich jak np. keratynocyty lub fibroblasty [9]. W wypadku jednak, gdy obserwujemy ruchy np. PMNL lub ameb *Dictyostelium*, drogi migracji tych komórek mogą być bardzo kręte i błędy mogą mieć dużą wartość [4, 32, 39] (rys. 3). Stąd korzystne byłyby możliwie częste pomiary położenia komórek [39].

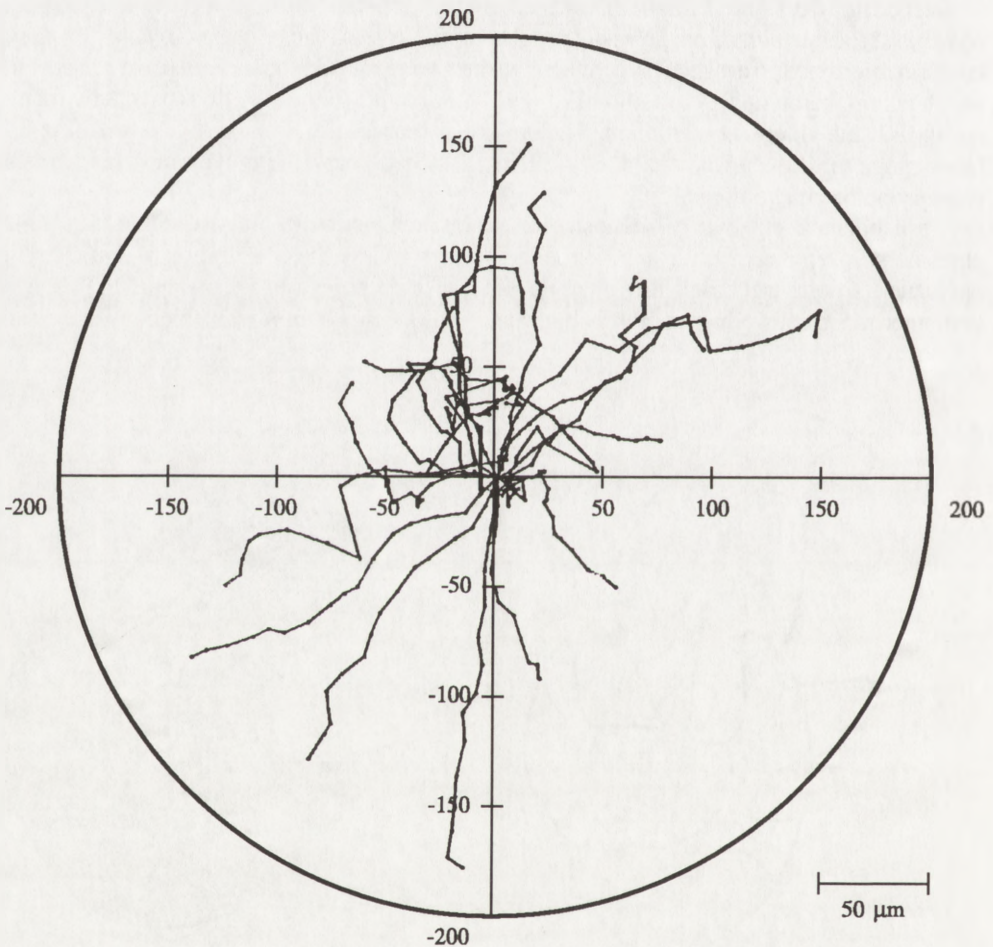
Jeśli odcinek przebyty w jednostce czasu jest mniejszy niż długość komórki, trzeba określać położenie tzw. centroidu – środka geometrycznego komórki albo środka gęstości optycznej (środku ciężkości) [16] (rys. 4). Inna metoda polega na rysowaniu (lub zapisie komputerowym) obwodu komórek i obliczaniu – nakładając obrazy na siebie i wyznaczając



Rys. 4. Określanie położenia komórek przez wyznaczenie: A – środka gęstości optycznej komórki lub środka geometrycznego komórki lub B – analizę powierzchni rzutu komórek na płaszczyznę (bliższe objaśnienia w tekście)

powierzchnię zajęta przez komórkę w czasie $t+1$ nie zajmowaną w czasie t , a następnie dzieląc tę powierzchnię przez powierzchnię wspólną – procentowej zmiany nowej powierzchni zajętej przez migrującą komórkę (rys. 5).

Metodę tę z dużym nakładem pracy, stosowano analizując klatka po klatce obrazy zapisane na filmach poklatkowych, zanim powszechnie wprowadzono do pracowni komputerowe metody analizy obrazu [7, 9, 10, 24, 25, 26, 27]. Można tak było analizować ruchy i zmiany kształtu podczas lokomocji pojedynczych komórek i uzyskać wiele bardzo cennych informacji. Ta metoda po wprowadzeniu komputerowych metod zapisu i analizy obwodu i kształtu komórek pozostaje niezastąpiona, gdy chcemy zbadać aktywność motoryczną np. w komór-

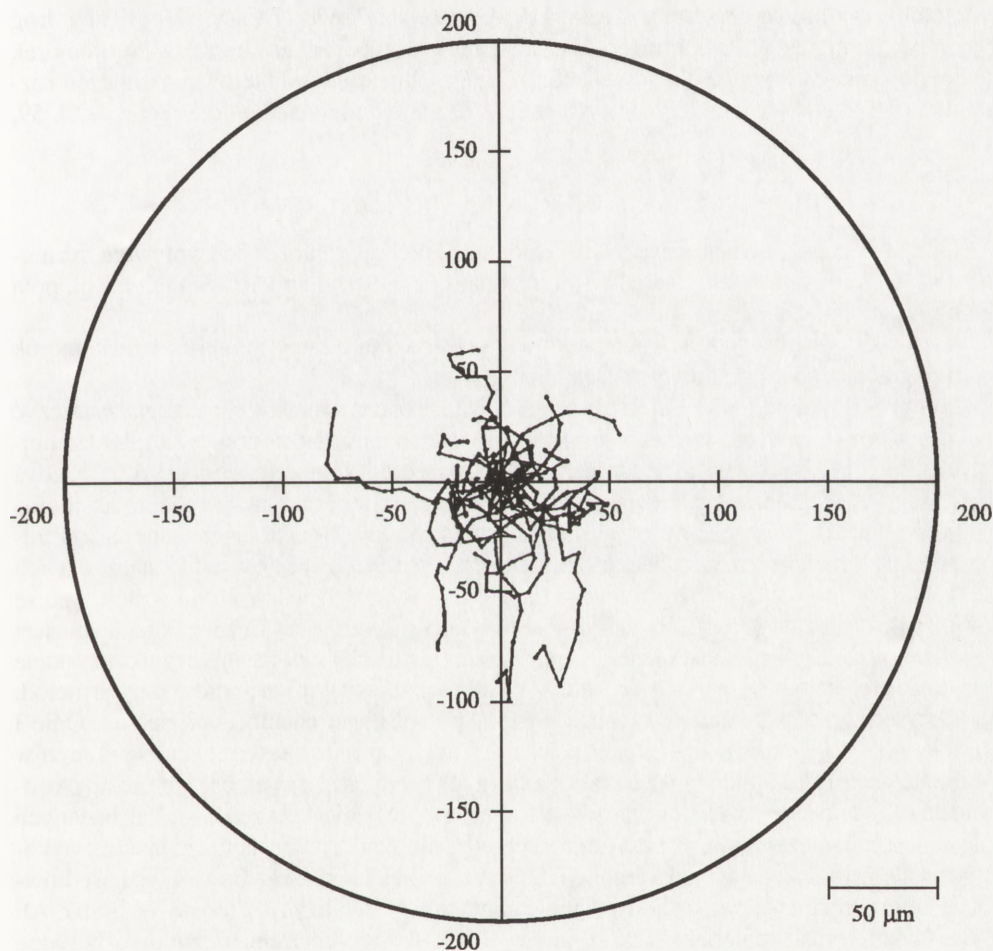


Rys. 5a. Wykresy kołowe zapisu migracji keratynocytów rybich (*Lebistes punctatus*) po powierzchni szkła

kach, które nie migrują, a tylko zmieniają kształty. Stosowana bywa jednak także do określania migracji komórek zmieniających kształt i rozplaszczanie [16, 19, 34, 57, 64].

Gdy badamy drogi migracji, błędy wszystkich opisanych powyżej metod mogą wynikać z faktu obserwacji rzutów komórek na płaszczyznę zamiast obserwacji zmian trójwymiarowego, rzeczywistego kształtu komórek [46, 51]. Ostatnio ukazały się prace dotyczące wielojądrowych granulocytów, w których próbuje się metodą komputerowego składania obrazu przedstawiać rzeczywiste kształty migrujących komórek [46].

Pomocne mogą okazać się także zastosowane np. w naszej pracowni mikroskopu do badania trójwymiarowej rzeźby powierzchni metali, dające obrazy trójwymiarowe w świetle widzialnym także żywych komórek, o ile ich grubość nie przekracza 8–10 μm . Jeśli komórki



Rys. 5b. Wykresy kołowe zapisu migracji keratynocytów rybich (*Lebistes punctatus*) po powierzchni szkła pokrytej kolagenem IV

są grubsze, wymagane jest składanie obrazów z rozmaitych płaszczyzn ostrości. Według najnowszych prac, zapis takiego "składanego" obrazu ze zwykłego mikroskopu świetlnego wyposażonego w optykę do różnicowego kontrastu interferencyjnego typu Nomarskiego trwa kilka sekund i może być wykorzystany do badania ruchów wolno migrujących komórek.

Z naszego doświadczenia wynika, że najwygodniej jest do badania torów komórek dobieierać takie odstępy czasu między kolejnymi zapisywanymi lub analizowanymi obrazami (kroki czasowe), aby komórka mogła przewędrować połowę swej długości. Stosując stosunkowo małe powiększenia i kontrast fazowy można z małym błędem wyznaczać środki geometryczne komórek. Umożliwia to śledzenie kilkunastu do kilkudziesięciu komórek w jednym doświadczeniu i brak dokładności w wyznaczeniu położenia środka geometrycznego jest kompensowany dużą liczbą pomiarów, kilku tysięcy odcinków drogi przebytych przez kilkadziesiąt komórek w jednostce czasu odpowiadającej jednemu "krokowi". Zapisy takiej liczby dróg wędrówki komórek stanowią materiał do ilościowych badań zachowań się wielu komórek danej populacji w wybranych warunkach doświadczalnych i komputerowych obliczeń rozmaitych parametrów charakteryzujących zmiany kształtu i migrację komórek [por. 4, 14, 59, 60].

III. OKREŚLANIE KIERUNKU MIGRACJI KOMÓREK

Odrębnym zagadnieniem jest określanie orientacji ruchów komórek pod wpływem rozmaitych czynników, takich jak gradienty stężeń badanych substancji podczas chemotaksji, pola elektryczne, gradienty adhezji itd.

Wszystkie uwagi dotyczące badania aktywności ruchowej, a zatem zmian kształtu komórek i ich migracji odnoszą się do tych zagadnień.

Komory Boydena, najczęściej stosowane do takich badań w przeszłości, mogą dostarczyć tylko danych wstępnych, wymagających potwierdzenia za pomocą nowszych, dokładniejszych metod. W komorach Boydena nieznane pozostają drogi komórek wewnątrz filtrów, gdyż bada się tylko ich końcowe przemieszczenie, nie rozróżnia się haptotaksji i chemotaksji oraz pułapkowania (wybiórczego zatrzymywania – ang. *trapping*). Ponadto wymagane są kontrolne pomiary kinetyki przechodzenia komórek przez filtry (co nie jest jednoznaczne z ich zdolnością do migracji), nieokreślone pozostają gradienty stężeń badanych substancji, a także zdolność komórek do deformacji podczas przeciskania się przez pory filtrów. Ponadto nie jest możliwe badanie chemotaksji ujemnej. Stąd, jak coraz częściej się okazuje, wyniki uzyskane za pomocą tej metody są nieporównywalne z wynikami uzyskanymi za pomocą innych metod.

Aby otrzymać bardziej wiarygodne wyniki, w badaniach chemotaksji Nelson, Quie i Simons w 1975 r. wprowadzili metodę znaną dziś powszechnie jako **test migracji leukocytów pod agarozą** [47]. Metoda ta doczekała się licznych modyfikacji i jest bardzo często stosowana [13, 41, 59, 60, 64]. Jej wadą jest trudność określenia lokalnych stężeń badanych substancji oraz niezbyt dobry obraz mikroskopowy. Metoda ta pozwala już jednak na wykorzystanie nowoczesnych metod rejestracji ruchów komórek i wyznaczania torów ich wędrówki, a dzięki temu umożliwia wykorzystanie komputerów do analizy tych torów. W 1990 r. Alt i Hoffmann wydali materiały symposium w Bonn, w których zamieszczono różnorodne propozycje analizy ruchów komórek i orientacji ich migracji na podstawie rozmaitych metod matematycznych.

Jak wynika z aktualnie prowadzonych prac i teoretycznych rozważań dotyczących aktywności ruchowej komórek, dla zastosowania **ściślejszych metod matematycznych** do ilościowego badania aktywności ruchowej komórek niezbędne jest:

- 1) obserwowanie pojedynczych komórek;
- 2) wyznaczanie torów dróg migracji tych komórek lub zmian kształtu nie migrujących komórek;
- 3) wszędzie, gdzie to tylko możliwe, dokładne określenie czynników zewnętrznych, gradientów stężeń, natężeń pól, rzeźby podłoża, adhezyności podłoża etc.

Dopiero dysponując takimi danymi można obliczać:

- a) prędkość chwilową ruchu wielu pojedynczych komórek;
- b) prędkość średnią migracji komórek;
- c) zmiany kształtu podczas migracji wielu pojedynczych komórek;
- d) stosunek wartości przemieszczenia do drogi rzeczywistej, a przez to określać tzw. permanencję ruchu, zależną od trwałości polaryzacji kształtu komórek;
- e) współczynniki McCutcheona określające kierunkowość migracji [20, 43];
- f) wartość kosinusa kąta pomiędzy odcinkiem translokacji w danym czasie (po 1, 2, ... n krokach czasowych), a wybraną osią (zależną od badanego gradientu lub pola) oraz sumy takich wartości kątów dla całych populacji migrujących komórek [4, 33, 59, 60];
- g) możliwe staje się także wówczas obrazowanie wyników pomiarów na zaproponowanych przez Ericksona i Nuccitelliego w 1984 r. wykresach kołowych, gdy początki torów migracji wszystkich komórek danej populacji sprowadza się do jednego punktu zerowego układu współrzędnych [14, 18, 48].

W naszej pracowni opracowaliśmy komory na zasadzie niemieszanych warstw cieczy (ang. *unstirred layers*), w kształcie kieszeni, w których można równocześnie mierzyć chwilowy rozkład stężeń badanych substancji i śledzić zachowanie się komórek. Odpowiednie programy komputerowe specjalnie przygotowane do analizy aktywności ruchowej komórek pozwalają na zapis torów migracji komórek i zmian ich kształtu, a w następstwie automatyczne przedstawianie danych w rozmaitej formie, m.in. na wykresach kołowych (rys. 5), oraz obliczania rozmaitych parametrów charakteryzujących ruchy komórek.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABERCROMBIE M, HEAYSMAN JM, PEGRUM SM. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* 1970; **59**: 393–398.
- [2] ADELMANN-GRILL BC, CULLY Z. Signal perception of fibroblasts for directional migration to platelet-derived growth factor in Boyden type chambers. *J Cell Physiol* 1990; **143**: 172–177.
- [3] ALBRECHT-BUEHLER G. The phagokinetic track of 3T3 cells. *Cell* 1977; **11**: 395–404.
- [4] ALT W. Correlation analysis of two-dimensional locomotion paths. (w) Lecture Notes in Biomathematics, W. Alt, G. Hoffmann (red.) Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990: 254–268.
- [5] BHARGAVA MM, LI Y, JOSEPH A, JIN L, ROSEN EM, GOLDBERG ID. HGF-SF: Effects on motility and morphology of normal and tumour cells. (w) Hepatocyte Growth Factor - Scatter Factor (HGF-SF) and the C-Met Receptor. I.D. Goldberg, E.M. Rosen (red.) Birkhauser Verlag Basel, 1993: 341–349.
- [6] BAYERS HR, ETOH T, DOHERTY JR, SOBER AJ, MIHM jr. MC. Cell migration and actin organization in cultured human primary, recurrent cutaneous and metastatic melanoma. Time-lapse and image analysis. *Amer J Pathol* 1991; **139**: 423–435.

- [7] BEREITER-HAHN J. Epidermal cell migration and wound repair. (w) *Biology of the Integument*. Vol.2 Vertebrates, J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy, K.S. Richards (red.) Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, 1986: 443-472.
- [8] BEREITER-HAHN J. Cytomechanics and biochemistry. (w) *Constructional Morphology and Evolution*. N. Schmidt-Kittler, K. Vogel (red.) Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991: 81-90.
- [9] BEREITER-HAHN J, BRAUN N, VÖTH M. Continuity of movement and preservation of architecture during cell locomotion. (w) *Lecture Notes in Biomathematics*, W. Alt i G. Hoffmann (red.) Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990: 68-84.
- [10] BEREITER-HAHN J, STROHMEIER R, BUNZENBACHER I, BECK K, VÖTH M. Locomotion of *Xenopus* epidermis cells in primary culture. *J Cell Sci* 1981; **52**: 289-311.
- [11] BOYDEN S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; **115**: 453-466.
- [12] BUETTNER HM, LAUFFENBURGER DA, ZIGMOND SH. Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with the milipore filter assay. *J Immunol Methods* 1989; **123**: 25-37.
- [13] BURTON JL, LAW H, BANK HL. Video analysis of chemotactic locomotion of stored human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Motility and Cytoskeleton* 1986; **6**: 485-491.
- [14] DEHOST EJ, REHFUESS C, BRADTKE B, WADDELL DR, ALBRECHT R, MURPHY J, GERISCH G. *Dictyostelium* mutants lacking the the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol* 1993; **120**: 163-173.
- [15] DRYL S. Photographic registration of movement of *Protozoa*. *Bull Acad Pol Sci Cl II Ser Sci Biol* 1958; **6**: 429-430.
- [16] DUNN GA, BROWN AF. A unified approach to analysing cell motility. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 81-102.
- [17] EMGELMANN U, KRASSINGG F, SCHILL WB. Sperm motility under conditions of weightlessness. *J Andrology* 1992; **13**: 433-436.
- [18] ERICSON CA, NUCITELLI R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields. *J Cell Biol* 1984; **98**: 296-307.
- [19] FUKUI Y, MURRAY J, RIDDELLE KS, SOLL DR. Cell behavior and actomiosin organisation in *Dictyostelium* during substrate exploration. *Cell Structure and Function* 1991; **16**: 289-301.
- [20] FUKUSHIMA K, SENDA N, INUI H, MIURA H, TAMAI H, MURAKAMI Y. Studies on galvanotaxis of leukocytes. I. Galvanotaxis of human neutrophilic leukocytes and methods of its measurement. *Medical J Osaka Univ* 1953; **4**: 195-208.
- [21] GAIL M. Time lapse studies on the motility of fibroblasts in tissue culture. (w) *Locomotion of Tissue Cells*, Ciba Found. Symposium 14, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, London, New York, 1973: 297-310.
- [22] GAIL MH, BOONE CW. The locomotion of mouse fibroblasts in tissue culture. *Biophys J* 1970; **10**: 980-993.
- [23] GAIL MH, BOONE CW. Density inhibition of motility in 3T3 fibroblasts and their SV40 transformants. *Exp Cell Res* 1971; **64**: 156-162.
- [24] GRĘBECKI A. Co-axial motion of the semirigid cell frame in *Amoeba proteus*. *Acta Protozool* 1976; **15**: 221-248.
- [25] GRĘBECKI A. Nonaxial frame movements and the locomotion of *Amoeba proteus*. *Acta Protozool* 1977; **16**: 53-85.
- [26] GRĘBECKI A. Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. I. Behavior of Monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon. *Protoplasma* 1984; **123**: 116-134.
- [27] GRĘBECKI L, GRĘBECKI A. Morphometric study of moving *Amoeba proteus*. *Acta Protozool* 1975; **14**: 337-361.
- [28] GRĘBECKI A, NOWAKOWSKA G. On the mechanism of orientation of *Paramecium caudatum* in the gravity field. I. Influence of ciliary reversal and of external Ca deficiency on the geotactic behaviour. *Acta Protozool* 1977; **16**: 351-358.
- [29] GRIMSTAD IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp Cell Res* 1987; **173**: 515-523.
- [30] GROTENDORST GR. Alteration of the chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation, and tumour promoters. *Cell* 1984; **36**: 279-285.
- [31] GRULER H. Cell movement analysis in a necrotactic assay. *Blood Cells* 1984; **10**: 107-121.
- [32] GRULER H. Chemokinesis and necrotaxis of human granulocytes: the important cellular organelles. *Z Naturforsch* 1987; **42c**, 1126-1134.
- [33] GRULER H. Biophysics of leukocytes: neutrophil chemotaxis, characteristics, and mechanisms. (w) *The Neutrophil: Cellular Biochemistry and Physiology*, M.B. Hallett (red.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1989: 63-95.

- [34] HALL AL, SCHLEIN A, CONDEELIS J. Relationship of pseudopod extension to chemotactic hormone induced actin polymerization in amoeboid cell. *J Cell Biochem* 1988; **37**: 285–299.
- [35] JANIK P, SZANIAWSKA B, MIŁOSZEWSKA J, PIETRUSZEWSKA E, KOWALCZYK D. The role of protein kinase C in migration of rat glioma cells from spheroid cultures. *Cancer Lett* 1992; **63**: 167–170.
- [36] JUTILA MA. Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 1992; **100**: 191–201.
- [37] KAJSTURA J, KOROHODA W. 1983. Significance of energy metabolism pathways for stimulation of DNA synthesis by cell migration and serum. *Europ J Cell Biol* 1983; **31**: 9–14.
- [38] KONDO H, YONEZAWA Y. Changes in the migratory ability of human lung and skin fibroblasts during in vitro aging and in vitro cellular senescence. *Mechanism of Ageing and Development* 1992; **63**: 223–233.
- [39] LACKIE JM, WILKINSON PC. 1984. Adhesion and locomotion of neutrophil leukocytes on 2-D substrata and in 3-D matrices. (w) *White Cell Mechanics: Basic Science and Clinical Aspects*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984: 37–254.
- [40] ŁAZOWSKI K, KUŹNICKI L. Photophobic and phototactic responses of *Amoeba proteus* in KCN and sham solutions. *Cell Biol Intern Rep* 1985; **9**: 373–378.
- [41] MANDELL LA, AFNAN M. Chemotactic inhibitors in sera of patients with neoplastic disease. *Clin Invest Med* 1991; **14**: 131–141.
- [42] MC CORMACK SA, VIAR MJ, JOHNSON LR. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. *Amer J Physiol* 1992; **263**: G426–G435.
- [43] MC CUTCHEON M. Chemotaxis in leukocytes. *Physiol Rev* 1946; **26**: 319–336.
- [44] MICHNA H. Induced locomotion of human and murine macrophages: A comparative analysis by means of the modified Boyden-chamber system and the agarose migration assay. *Cell and Tissue Res* 1989; **255**: 423–429.
- [45] MOHLER JL. Cellular motility and prostatic carcinoma metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; **12**: 53–67.
- [46] MURRAY J, VAWTER-HUGARTH, VOSS E, SOLL DR. Three-dimensional motility cycle in leukocytes. *Cell Motility and Cytoskeleton* 1992; **22**: 211–223.
- [47] NELSON DR, QUIE PG, SIMONS RI. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 1975; **115**: 1651–1656.
- [48] NOCCITELLI R, SMART T, FERGUSON J. Protein kinases are required for embryonic neural crest cell galvanotaxis. *Cell Motility and Cytoskeleton* 1993; **24**: 54–66.
- [49] RAZ A. Actin organization, cell motility, and metastasis. *Adv Exp Med Biol* 1988; **233**: 227–233.
- [50] SAYERS Z, ROBERTS AM, BANNISTER LH. Random walk analysis of movement and galvanotaxis of *Amoeba proteus*. *Acta Protozool* 1979; **18**: 313–325.
- [51] SENDA N, TAMURA H, SHIBATA N, YOSHITAKE J, KONDO K, TANAKA K. The mechanism of the movement of leukocytes. *Exp Cell Res* 1975; **91**: 393–407.
- [52] SEGALL JE. Behavioral responses of streamer F mutants of *Dictyostelium discoideum*: effects of cyclic GMP on cell motility. *J Cell Sci* 1992; **101**: 589–597.
- [53] SINGER SJ, KUPFER A. The directed migration of eucaryotic cells. *Ann Rev Cell Biol* 1986; **2**: 337–365.
- [54] SMOLLE J, HOFFMANN-WELLENHOF R, KOFLER R, SOYER HP, KERL H. Tumor cell proliferation and motility estimates are prognostic factors in malignant melanoma. *Analyt Cell Pathol* 1993; **5**: 113–124.
- [55] STENN KS. Quantitative assay of dissociated tissue cell motility in vitro. *In Vitro* 1980; **16**: 357–360.
- [56] SUMIDA H, NAKAMURAA H, YASUDA M. Role of vitronectin in embryonic rat endocardial cell migration in vitro. *Cell Tissue Res* 1992; **268**: 41–49.
- [57] TATSUKA M, JINNO S, KAKUNAGA T. Quantitative measurement of cell motility associated with transformed phenotype. *Jpn J Cancer Res* 1989; **80**: 408–412.
- [58] THOMSEN MK, JENSEN AL. Reassessment of two Boyden chamber methods for measuring canine neutrophil migration: the leading front and the lower surface count assays. *Veterin Immunol Immunopathol* 1991; **29**: 197–211.
- [59] TRANQUILLO RT, LAUFFENBURGER DA. Definition and measurement of cell migration coefficient. (w) *Lecture Notes in Biomathematics*, W. Alt, G. Hoffmann (red.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990: 475–496.
- [60] TRANQUILLO RT, ZIGMOND SH, LAUFFENBURGER DA. Measurement of the chemotaxis coefficient for human neutrophils in the underagarose migration assay. *Cell Motility and Cytoskeleton* 1988; **11**: 1–15.
- [61] TRINKAUS JP. Protrusive activity of the cell surface and the initiation of cell movement during morphogenesis. *Exp Biol Med* 1985; **10**: 130–173.
- [62] VICKER MG. Gradient and temporal signal perception in chemotaxis. *J Cell Sci* 1989; **92**: 1–4.

- [63] WATANABE H, SHINOZAKI T, RAZ A, CHIGARA M. Expression of autocrine motility factor receptor in serum- and protein-independent fibrosarcoma cells: implications for autonomy in tumor-cell motility and metastasis. *Int J Cancer* 1993; **53**: 689–695.
- [64] WESSELS D, MURRAY J, SOLL DR. Behavior of *Dictyostelium amoebae* is regulated primarily by the temporal dynamic of the natural cAMP wave. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1992; **23**: 145–156.
- [65] WESTERMARK B, BLOMQUISTE E. Stimulation of fibroblast migration by epidermal growth factor. *Cell Biol Intern Rep* 1980; **4**: 649–654.

PESETA OPTYCZNA – NOWE NARZĘDZIE DO BADANIA SYSTEMÓW RUCHOWYCH KOMÓREK

OPTICAL TWEEZERS – NEW TOOL TO STUDY THE INTERNAL CELL MOVEMENT

Małgorzata PIERZCHALSKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego Uniwersytetu
Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Przedstawiono prace dotyczące pęsety optycznej – obiecującej metody badawczej wprowadzanej ostatnio w biologii komórki. Wytwarzana przez światło laserowe pułapka optyczna została wbudowana do mikroskopu świetlnego o dużej rozdzielczości. Nowa metoda umożliwiła zdalne przemieszczanie obiektów w przestrzeni, również we wnętrzu żywych komórek. Pęseta optyczna jest wykorzystywana zarówno jako mikromanipulator, jak i jako przyrząd do pomiaru sił działających na poziomie ultrastruktur komórkowych. Przykładem jest, opisana w artykule, próba pomiaru sił wytwarzanych przez jedną cząsteczkę cytotdyneiny.

Słowa kluczowe: pęseta optyczna, pułapka laserowa, mikrotubule, cytotdyneina

Summary: The papers concerning optical tweezers, a promising tool recently introduced in cell biology are presented. Laser induced, single beam optical gradient trap has been attached to a high resolution light microscope. Microscopic objects can be remotely manipulated with optical tweezers, also within a living cell. Laser traps are used both as micromanipulators and tensiometers. The forces generated by single cytotdynein molecule were also measured with optical tweezers.

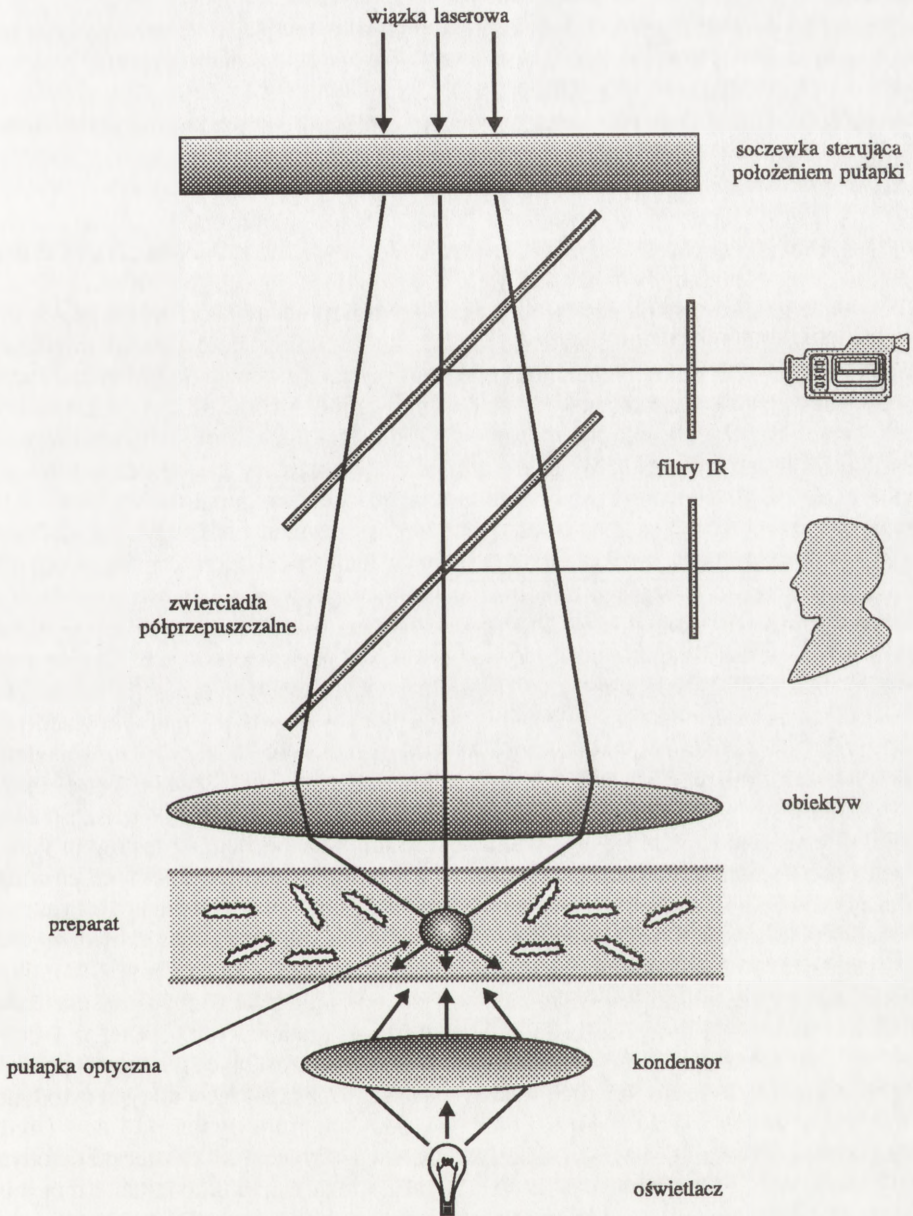
Key words: optical tweezers, laser trap, microtubule, cytotdynein

Kierowanie obojętnymi elektrycznie obiektami o niezwykle małych rozmiarach w celu zmiany ich położenia lub prędkości jest trudnym zadaniem. Obiekty naładowane elektrycznie, takie jak jony i elektrony, łatwiej poddają się sterowaniu, gdyż pola elektryczne i magnetyczne oddziałują z naładowanymi cząstkami. Wpływanie na położenie cząstek elektrycznie obojętnych jest teoretycznie możliwe i zostało, w ostatnim dziesięcioleciu, przeprowadzone praktycznie dzięki wykorzystaniu odpowiednio zbudowanych pułapek [9]. Zastosowanie światła laserowego i pola magnetycznego umożliwiło stworzenie tzw. pułapek optycznych, magnetycznych lub najczęściej stosowanych pułapek magneto-optycznych. Światło laserowe polaryzuje obojętne atomy. Stają się one dipolami elektrycznymi. Działa na nie siła o kierunku zgodnym z gradientem pola elektrycznego. Zmienne pole elektryczne o lokalnym maksimum w przestrzeni wytwarza zogniskowana wiązka laserowa. W tym wypadku siła dipolowa działająca na atomy jest jednak zbyt mała, aby przeciwstawić się ruchom cieplnym atomów w temperaturze pokojowej. Aby tak zaprojektowana pułapka mogła działać, atomy muszą być

oziębione do bardzo niskich temperatur. Wykorzystując również wiązki światła laserowego o odpowiedniej długości fali i rozmieszczeniu, wytwarzające tak zwaną "melasę optyczną" udało się oziębic atomy w stanie gazu do temperatur bliskich zeru bezwzględnemu [9]. Oprócz pułapek mogących uwięzić atomy w określonym punkcie przestrzeni skonstruowano następnie soczewki i zwierciadła atomowe, atomowe lejki i atomowe fontanny zdolne wytwarzać strumień zimnych atomów o określonej prędkości. Odkrycia te znalazły szerokie zastosowania w różnych dziedzinach fizyki doświadczalnej i jednocześnie przyczyniły się do wynalezienia nowej metody badawczej w biologii komórki. W pierwszej połowie lat osiemdziesiątych jednym z wiodących ośrodków pracujących nad pułapkami laserowymi był Laser Science Research Department w Laboratoriach AT&T Bell w Holmdel w Stanach Zjednoczonych. Pracujący tam Arthur Ashkin był pierwszym, który wykorzystał promienie laserowe do poruszania małych, widocznych w mikroskopie świetlnym, obiektów biologicznych: wirusów, bakterii, komórek eukariotycznych i organelli komórkowych. W pracach opublikowanych w roku 1987 w *Science* i *Nature* użył dla określenia swojego wynalazku sugestywnej nazwy pęseta optyczna (ang. *optical tweezers*) [1,2].

W roku 1986 Ashkin wykazał, że obojętne cząstki o rozmiarach od 200 nm do 10 μm (np. kulki polistyrenowe lub lateksowe) można złapać w pułpkę optyczną, którą jest jedna silnie zogniskowana wiązka laserowa [1]. Procesom absorpcji, odbicia i załamania światła towarzyszy powstanie niewielkich sił proporcjonalnych do mocy promieniowania. Światło padając na powierzchnię danego ciała wywiera na tę powierzchnię pewne ciśnienie. Kiedy oświetlanym obiektem jest kulka z dielektryka, działa na nią siła o kierunku zgodnym z kierunkiem rozchodzenia się światła. Jest to tak zwana siła rozproszenia. Jeśli taką kulkę z materiału o współczynniku załamania większym od otaczającego ośrodka umieścimy w pobliżu punktu, w którym zogniskowana jest wiązka laserowa, to oddziaływanie między indukowanymi przez światło dipolami a gradientem pola elektrycznego doprowadzi do powstania siły popychającej kulkę w kierunku punktu o maksymalnej jasności światła. Jeśli siła skierowana w stronę punktu o największej gęstości promieniowania jest większa od siły rozproszenia, obiekt nie może wydostać się z obszaru, w którym jest zogniskowana wiązka laserowa i "wpada do pułapki" [5].

Aby wykorzystać tę zasadę do poruszania cząstek pochodzenia biologicznego o rozmiarach kilku mikrometrów, pułpkę laserową wbudowano do mikroskopu świetlnego o dużej rozdzielczości (rys. 1). Wiązka promieniowania laserowego ogniskowana jest przez ten sam obiektyw, który służy do obserwacji preparatu w elemencie objętości o rozmiarach w przybliżeniu równych długości fali emitowanej przez laser. Siła działająca na wpadający do pułapki obiekt jest proporcjonalna do mocy lasera. Kilku miliwatowa moc wiązki laserowej odpowiada sile rzędu pikoniutonów (0,1 mikrodyny). Żywa komórka oświetlana przez laser może ulec fotouszkodzeniu i ogrzaniu. Aby zminimalizować te efekty, używa się lasera o linii w zakresie podczerwieni (np. 1064 nm). Światło o takiej długości fali jest stosunkowo słabo absorbowane przez komórki. Dzięki możliwości ciągłej zmiany mocy lasera siła, z którą światło działa na obiekt, może być również zmieniana w sposób ciągły. Przy użyciu pęsety optycznej można badany obiekt przesuwając w obrębie pola widzenia mikroskopu używając do tego celu zewnętrznej soczewki. Steruje ona miejscem, w którym ogniskowana jest wiązka laserowa. Komórki *E. coli* lub komórki drożdży mogą przebywać w obrębie pułapki przez kilka godzin i dzielić się nie wykazując żadnych objawów uszkodzenia [2]. Za pomocą lasera o mocy 80 mW raz złapana bakteria może być przesuwana z prędkością 500 $\mu\text{m/s}$ [2].



Rys. 1. Mikroskop optyczny z pęsetą optyczną (wg [2] zmodyfikowany)

Pęseta optyczna jest wyjątkowo precyzyjnym mikromanipulatorem mającym wiele zalet odróżniających ją od innych przyrządów tego samego przeznaczenia [8].

1. Współdziała niemal z każdą techniką mikroskopową (ciemne pole, kontrast faz, różnicowy kontrast interferencyjny (DIC), epifluorescencja, system wzmocnienia obrazu Allena (AVEC).
2. Siła, z jaką działa na obiekt, ma znaną wartość proporcjonalną do mocy lasera i jest powtarzalna.
3. Obiektem można precyzyjnie manipulować w przestrzeni.
4. Uchwyt jej może być zwalniany natychmiast lub stopniowo.
5. Umożliwia poruszanie obiektami wewnątrz żywych komórek bez przerywania ciągłości błony komórkowej.

Przykładem zastosowania pęsety optycznej jako mikromanipulatora jest dowolne przemieszczanie lub unieruchamianie przez eksperymentatora chromosomów lub ich fragmentów w czasie mitozy [12,13]. Metoda ta może być wykorzystana zarówno do badań nad ruchem chromosomów, jak i do badań genetycznych, na przykład do tworzenia komórek o monosomicznej lub trisomicznej liczbie chromosomów lub komórek pozbawionych pewnej wybranej części materiału genetycznego. W tego typu doświadczeniach pęsetę optyczną stosuje się równocześnie z skalpelem optycznym, czyli laserem działającym impulsowo w zakresie UV, który może przeciąć chromosom w wybranym przez eksperymentatora miejscu [14]. Pęsetę i skalpel optyczny próbowano wykorzystać do wywołania fuzji błon komórkowych [3] i komórek oraz procesu sztucznego zapłodnienia [8].

Siły o wartościach pikoniutonowych wywierane przez światło laserowe są dobrze dopasowane do zakresu sił działających na poziomie ultrastuktur komórkowych. Użycie pęsety optycznej stwarza możliwość pomiaru tych sił (np. sił wytwarzanych przez mechanoenzymy zwane silnikami molekularnymi). Wyniki takich pomiarów zostały opublikowane przez współpracujący z twórcą pęsety optycznej A. Ashkinem zespół badaczy z Uniwersytetu w Berkeley w Kalifornii pracujący pod kierunkiem Manfreda Schliwy. Użyli oni pęsety optycznej do pomiaru siły wytwarzanej przez jedną cząsteczkę cytotodyneiny [4]. Większość wiadomości na temat działania kinezyiny, cytotodyneiny i miozyny pochodzi z testów *in vitro*, w których obserwuje się ruch kulek polistyrenowych lub lateksowych pokrytych enzymami wzdłuż mikrotubul lub ruch mikrotubul po pokrytej enzymami powierzchni [14]. Tym razem użyto jednak ekstraktów cytoplazmatycznych – pozbawionych błony komórkowej, cienkich pasm cytoplazmy z retikulopodiów wielkiej, słodkowodnej ameby *Reticulomyxa*. W retikulopodiach o średnicy 0,3 mikrometra zawierających od 1 do 4 mikrotubul odbywa się intensywny ruch mitochondriów. Mitochondria kuliste, o zbliżonej średnicy (ok. 300 nm) i dużym współczynniku załamania światła (wyraźnie widoczne w mikroskopie świetlnym) poruszają się z prędkością ok. 10 $\mu\text{m/s}$. Ich ruch zależy od ATPazy należącej do typu cytotodynein. Liczba cząsteczek tego białka związana z jednym mitochondrium wynosi od 1 do 4 (średnia obliczona na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego wynosi 2,4 cząsteczki cytotodyneiny/mitochondrium). Pułapka optyczna została zogniskowana na retikulopodium, a moc jej tak dobrano, aby mitochondrium wędrujące po mikrotubuli wchodząc w obszar pułapki zatrzymało się. Następnie zmniejszono moc lasera. W momencie, w którym siła działania pułapki była mniejsza od siły wytwarzanej przez silnik molekularny, mitochondrium uciekało z obszaru pułapki i ruszało dalej wzdłuż mikrotubul. Średnia moc lasera, przy której następowała ucieczka mitochondrium, wynosiła 160 mW. Siła jednej cząsteczki cytotodyneiny była równoważona średnio przy mocy lasera równej 63 mW. Po odpowiedniej kalibracji obliczono,

że odpowiada to sile $2,6 \cdot 10^{-7}$ dyny. W tej samej serii doświadczeń udowodniono również, że mitochondrium może być transportowane przez tę samą cząsteczkę enzymu w obu kierunkach wzdłuż polarnej wiązki mikrotubul, gdyż uwolnione z pułapki mitochondria poruszały się niekoniecznie w tę samą stronę co poprzednio. Opisane powyżej doświadczenia stanowią szczególnie interesujący przykład zastosowania omawianej techniki. Wyniki ich wskazują, że przynosi ona nowe możliwości zarówno w zakresie pomiaru sił działających na poziomie komórki, jak i badania mechanizmów ruchów wewnątrzkomórkowych.

Oprócz pomiaru siły potrzebnej do transportu organelli wzdłuż mikrotubul pęseta optyczna została wykorzystana do pomiaru właściwości mechanicznych witki bakteryjnej [6]. Umożliwiła również bardziej precyzyjne badanie mechanizmu działania silników molekularnych w układzie pozakomórkowym, w tzw. teście opłaszczonych ziaren (ang. *bead assay*) [7, 11, 16]. W testach tych obserwuje się ruch pokrytych odpowiednim białkiem ziaren polistyrenowych o znanych wymiarach wzdłuż mikrotubul lub wiązek filamentów aktynowych. Pęsetę optyczną wykorzystano do naprowadzania poszczególnych ziaren przed rozpoczęciem obserwacji. Podobne podejście zastosowano w badaniach nad ruchem cząsteczek glikoprotein w błonie komórkowej poruszających się keratynocytów. Kulki lateksowe pokryte konkanawaliną A umieszczano w wybranych obszarach błony komórkowej poruszającej się komórki. Następnie, zmniejszając moc lasera, analizowano siłę, z jaką kulki wiążą się z błoną [10]. Ciekawe wyniki uzyskano również badając z użyciem pęsety laserowej własności mechaniczne cytoszkieletu erytrocytów [15]. Pojedynczy erytrocyt umieszczany był w pułapce laserowej wytworzonej wewnątrz komory przepływowej w taki sposób, że nie dotykał żadnej z jej ścian. Tak uwięziona komórka poddawana była następnie ekstrakcji detergentem i działaniu roztworów o różnej sile jonowej.

Metodę pułapkowania laserowego w biologii komórki stosuje się dopiero od 5 lat, a jej wykorzystanie ograniczone było do tej pory do kilku laboratoriów amerykańskich dysponujących odpowiednią aparaturą. W nadchodzących latach zapowiadane udoskonalenia techniczne oraz dostępność handlowa urządzenia zapewne znacznie poszerzą zakres jego zastosowań. Położeniem pułapki można sterować komputerowo, tak jak kieruje się promieniem lasera w laserowym skaningowym mikroskopie konfokalnym. W ten sposób próbuje się wytworzyć w jednym preparacie kilka miejsc pułapkowania jednocześnie, szybko włączając i wyłączając wiązkę światła laserowego i jednocześnie zmieniając miejsce jej ogniskowania [8]. Wykorzystanie tańszych laserów diodowych wytwarzających wiązkę światła o długości fali 780–950 nm w dostępnym handlowo urządzeniu ma obniżyć jego koszt, a także stworzy możliwość operowania większymi siłami przez zmniejszenie efektu fotouszkodzania żywych komórek [8].

LITERATURA

- [1] ASHKIN A, DZIEDZIC JM. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 1987; **235**: 1517–1520.
- [2] ASHKIN A, DZIEDZIC JM, YAMANE T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 1987; **330**: 769–771.
- [3] ASHKIN A, DZIEDZIC JM. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7914–7918.

- [4] ASHKIN A, SCHATZ K, DZIEDZIC JM, EUTENEUER U, SCHLIWA M. Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature* 1990; **348**: 346–348.
- [5] ASHKIN A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys J* 1992; **61**: 569–578.
- [6] BLOCK SM, BLAIR DF, BERG HC. Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature* 1989; **338**: 514–517.
- [7] BLOCK SM, GOLDSTEIN LSB, SCHNAPP BJ. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 1990; **348**: 348–352.
- [8] BLOCK SM. Making light work with optical tweezers. *Nature* 1992; **360**: 493–495.
- [9] CHU S. Laser Manipulation of atoms and particles. *Science* 1991; **253**: 861–865.
- [10] KUCIK DF, KUO SC, ELSON EL, SHEETZ MP. Preferential attachment of membrane glycoproteins to the cytoskeleton at the leading edge of lamella. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1029–1036.
- [11] KUO SC, SHEETZ MP. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science* 1993; **260**: 232–234.
- [12] LIANG H, WRIGHT WH, CHENG S, HE W, BERNS MW. Micromanipulation of mitotic chromosomes in PKT2 cells using laser-induced optical forces ("optical tweezers"). *Exp Cell Res* 1991; **198**: 375–378.
- [13] LIANG H, WRIGHT WH, CHENG S, HE W, BERNS MW. Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical forces (optical tweezers). *Exp Cell Res* 1993; **204**: 110–120.
- [14] MCINTOSH JR, PORTER ME. Enzymes for microtubule-dependent motility. *J Biol Chem* 1989; **264**: 6001–6004.
- [15] SVOBODA K, SCHMIDT CF, BRANTON D, BLOCK SM. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys J* 1992; **63**: 784–793.
- [16] SHEPHARD GMG, COREY DP, BLOCK SM. Actin cores of hair-cell stereocilia support myosin motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8627–8631.

LOGICZNO-SEMIOTYCZNE ASPEKTY BIOLOGII KOMÓRKI

LOGICAL AND SEMIOTIC PROBLEMS OF CELL BIOLOGY

Jan DOROSZEWSKI

Zakład Biofizyki i Biomatematyki Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Streszczenie. W pierwszej części niniejszej pracy przedstawione są wybrane, szczególnie ważne, ogólnometodologiczne cechy wiedzy biologicznej, a mianowicie: systemowy charakter, znaczenie czynnika czasu, różne stopnie ogólności, szczegółowości, ścisłości oraz pewności twierdzeń i fragmentów wiedzy. Druga część pracy poświęcona jest semiotycznej analizie wiedzy cytobiologicznej; wprowadzone jest pojęcie znaków instrumentalnych, które odpowiadają zinterpretowanym obrazom i wartościom liczbowym stanowiącym wyniki działania przyrządów. W części trzeciej autor zwraca uwagę na charakter obiektów będących przedmiotem badań cytobiologicznych oraz na związek między lingwistycznym (jakościowym) a ilościowym sposobem opisu zjawisk w tej dziedzinie.

Summary. In the first part of the present paper some chosen, especially important features of the biological knowledge are described, namely: its systemic character, importance of the time factor, various degrees of generality, of richness of detail, of precision and degree of certainty of the statements and fragments of knowledge. The second part contains semiotic analysis of cytobiological knowledge. The notion of instrumental signs is introduced; the signs of this kind embrace interpreted images and numerical values which are the results of functioning of the scientific instruments. The third part concentrates on the character of the objects studied in cytobiology and the connection between linguistic (qualitative) and quantitative description of phenomena in this field.

Logiczna struktura i ogólna metodologia biologii komórki i większości innych dziedzin biologii są w ogólnych zarysach podobne; nauka o komórce jednak wykazuje także pewne swoiste dla niej cechy logiczno-metodologiczne.

I. OGÓLNY SCHEMAT STRUKTURY WIEDZY BIOLOGICZNEJ

Organizm żywy – niezależnie od poziomu gatunkowego, tj. zarówno pojedyncza komórka jak i ustrój wielokomórkowy – jest ogromnie złożonym systemem, czyli zespołem bardzo licznych i różnorodnych elementów powiązanych ogromną liczbą nie mniej różnorodnych zależności. Elementami systemu żywego są – zgodnie z powszechnym ujęciem – obiekty (twory morfologiczne) odznaczające się właściwymi dla nich cechami (własnościami), związki zaś, które – według naszego poglądu – łączą te twory i ich cechy stanowią charakterystyczne dla tego systemu relacje. System żywy znajduje w naszym umyśle odzwierciedlenie w postaci sądów wyrażonych w zdaniach o charakterze ogólnym stanowiących twierdzenia i prawa

biologii, których wzajemnie powiązane zespoły tworzą większe i mniejsze fragmenty wiedzy i teorie. Innymi słowy, obiekty wchodzące w skład systemu żywego, ich cechy i łączące je relacje stanowią treść (znaczenie) sądów i wypowiedzi tworzących naukę biologiczną.

Szczególnie charakterystyczne dla biologii jest to, że twierdzenia (prawa) tej nauki tworzą zespoły (fragmenty wiedzy), w których obrębie są one wzajemnie ściśle i wielostronnie powiązane w postaci niezmiernie rozbudowanej struktury typu sieci lub grafu, którego węzły odpowiadają zjawiskom, gałęzie zaś – łączącym je zależnościom. Termin "zjawisko" użyty jest tu w najbardziej ogólny sposób dla oznaczenia zarówno występowania określonych obiektów, przysługiwania obiektom określonych właściwości oraz zachodzenia takich a takich relacji między obiektami i ich właściwościami. Zjawiska opisywane przez elementy wiedzy biologicznej są przeważnie związane z określonym czasem, pojęcie to obejmuje więc także stany obiektów oraz zmiany stanów i ciągi lub zespoły zmian stanów czyli procesy (taki sposób rozumienia tego terminu jest szczególnie typowy dla nauk fizjologicznych).

Obok zarysowanego wyżej systemowego charakteru wiedzy biologicznej, bardzo charakterystyczną jej cechą jest fakt, że jej fragmenty są wyrażane w różny sposób z punktu widzenia opisu obiektów oraz ich właściwości i relacji. Innymi słowy, prawa i fragmenty wiedzy biologicznej bywają wyrażane z różnym stopniem ogólności, szczegółowości, ścisłości i pewności.

Stopień ogólności elementów wiedzy, tj. przede wszystkim praw (twierdzeń), a także ich zespołów (fragmentów), zależy od treści (denotacji) występujących w nich pojęć: im szerszy jest zakres odpowiadających tym pojęciom terminów, tym bardziej ogólne jest dane prawo lub tym większy jest poziom ogólności danego fragmentu wiedzy. Z praw o wyższym stopniu ogólności mogą być wyprowadzane prawa mniej ogólne; pierwsze można też określić mianem praw bardziej abstrakcyjnych, drugie – bardziej konkretnych.

Większa lub mniejsza szczegółowość praw i fragmentów wiedzy wiąże się z faktem, że wiedza biologiczna opisuje złożone systemy, których części składowe mogą być wyróżniane w rozmaity sposób, tj. poprzez pojęcia oznaczające większe lub mniejsze podsystemy, czyli zespoły zjawisk, które są bardziej lub mniej zagregowane z systemowego punktu widzenia.

Prawa wiedzy biologicznej odznaczają się różnym stopniem pewności: jedne mają charakter bezwyjątkowy, inne przyjmowane są ze świadomością, że nie zawsze sprawdzają się, jeszcze inne przyjmowane są jako niepewne hipotezy. Sposób wyrażenia czynnika niepewności w prawach biologicznych bywa bardzo rozmaity: stosowane są bądź różnorodne oceny słowne, bądź oszacowania ilościowe.

Różne stopnie i rodzaje ścisłości praw biologicznych odzwierciedlają rozmaite sposoby wyrażania zależności między obiektami i wartościami cech; mogą być one oparte na zastosowaniu skal typu jakościowego, tj. nominalnej, porządkującej lub przedziałowej albo skali ilościowej. Związki między wartościami cech wyrażonymi w sposób jakościowy są podstawą praw wiążących pojedyncze wartości, prawa typu ilościowego łączą wiele wartości cech. Przy jakościowym sposobie wyrażania cech wykorzystanie wiedzy, tj. rozumowanie, opiera się na operacjach typu logicznego, ujęcie ilościowe umożliwia stosowanie metod matematycznych.

Sposób ujęcia wiedzy biologicznej z punktu widzenia jej ogólności, szczegółowości i ścisłości zależy z jednej strony od stopnia zaawansowania i sposobu poznania danego systemu żywego i jego podsystemów, z drugiej zaś strony od tego, do czego dany fragment wiedzy jest wykorzystywany. Na przykład charakter wiedzy biologicznej – z powyższego punktu widzenia – służący praktyce lekarskiej jest inny w porównaniu z wiedzą niezbędną dla badania naukowego.

II. SEMIOTYCZNE PROBLEMY BIOLOGII KOMÓRKI

Podobnie jak każda nauka empiryczna, wiedza biologiczna oparta jest na obserwacji obiektów stanowiących przedmiot jej zainteresowania, tj. organizmów żywych. Obserwacja jest podstawą stwierdzenia – myślowego i słownego – faktu, że taki a taki obiekt wykazuje taką a taką cechę. Stwierdzony fakt ma często sam przez się istotne znaczenie dla obserwatora, najczęściej jednak jest również interpretowany z punktu widzenia związków z innymi, bezpośrednio nie spostrzeganymi zjawiskami; innymi słowy, obserwowane zjawiska są wykorzystywane jako znaki (oznaki) innych zjawisk; sądy o zjawiskach będących korelatami znaków powstają w wyniku wnioskowania semiotycznego. W celu porozumienia z innymi ludźmi, np. z innymi badaczami, obserwator posługuje się znakami językowymi wyrażając słowami swoje sądy. W ten sposób nowe fakty są przez obserwatora (eksperymentatora) stwierdzane bezpośrednio oraz postulowane drogą rozumowania, sądy zaś o tych faktach komunikowane są za pomocą środków językowych.

Jeśli chodzi o biologię komórki – obserwacje wykonywane są w ramach eksperymentów, w których prawie zawsze stosowane są różnorodne badawcze narzędzia techniczne. Do najczęściej używanych w badaniach cytologicznych przyrządów należą na przykład mikroskopy (optyczne i elektronowe), wagi, detektory i rejestratory zjawisk elektrycznych, analizatory biochemiczne, liczniki cząstek. Umożliwiają one w sposób pośredni obserwację i pomiar cech obiektów pojedynczych, tj. komórek i ich części oraz obiektów zbiorowych, którymi są kolekcje i zespoły tych tworów; w tym ostatnim wypadku przedmiotem obserwacji są wypadkowe wartości cech obiektów pojedynczych oraz liczebności zbiorów.

Przyrządy badawcze przetwarzają sygnały, których źródłem są badane zjawiska oraz wykonują pomiary i procedury obliczeniowe. Wynikiem działania przyrządów są w większości wypadków bądź obrazy, jak przy użyciu mikroskopu, bądź wielkości liczbowe przedstawione w postaci cyfr, krzywych, wykresów itp. Pomijając proste badanie za pomocą mikroskopu optycznego, przy każdym zastosowaniu instrumentu w eksperymencie cytologicznym obiektem bezpośrednio obserwowanym jest bądź część przyrządu (np. tarcza z podziałką), bądź – co jest szczególnie częste – taki czy inny dokument: zdjęcie mikroskopowe, papier z narysowanym wykresem (krzywa obrazująca zależność nasilenia procesu od czasu, histogram itp.) lub z wydrukowanymi cyframi (np. w postaci tabeli) albo z wypisanymi słowami. Różne rodzaje wyżej wymienionych wyników badań dokonywanych za pomocą przyrządów można ująć w dwie grupy, którymi są obrazy i napisy; te ostatnie można podzielić na wyrażenia cyfrowe i słowne.

Przyrząd lub produkt działania przyrządu, który eksperymentator obserwuje, jest obiektem znajdującym się w określonym stanie, czyli wykazującym takie czy inne cechy; bezpośrednim przeto rezultatem jego spostrzeżenia jest stwierdzenie tych właśnie cech (położenia wskazówki, określonego kształtu itp.) tego obiektu (tarczy ze skalą, ekranu, wydruku itp.). Stan, czyli tzw. wskazanie przyrządu lub jego wytworu, jest jednak dla obserwatora istotne wyłącznie ze względu na to, że na tej podstawie wnioskuje on o stanie obiektu, który jest przedmiotem jego badania, tj. w wypadku cytologa – komórki lub zbioru komórek albo ich części czy produktów. Zjawisko, które człowiek spostrzega i które wykorzystuje, aby poznać inne zjawisko, jest dla niego znakiem (naturalnym) czyli oznaką nieobserwowanego zjawiska, będącego korelatem tego znaku, rozumowanie zaś, które prowadzi od sądu orzekającego o stwierdzeniu znaku do sądu dotyczącego korelatu, jest wnioskowaniem semiotycznym.

Stany przyrządów badawczych, jako że służą do wnioskowania o stanach innych obiektów, można określić mianem znaków instrumentalnych, przy czym należy wyróżnić dwa rodzaje takich znaków; stosując przyjętą terminologię, jeden z tych rodzajów odpowiada znakom naturalnym, drugi – znakom typu konwencjonalnego. Jako przykład znaku instrumentalnego typu naturalnego można podać obraz na zdjęciu mikroskopowym będący znakiem cech badanej komórki. Wnioskowanie związane z interpretacją obrazu przebiega mniej więcej następująco. Badacz wie lub przypuszcza, iż jeśli obiekt jego zainteresowania, tj. komórka, wykazuje taki a taki zespół cech i jeśli znajduje się w takich a takich warunkach i w określonym stosunku względem przyrządu (mikroskopu), to produkt działania tego przyrządu, czyli mikrografia, odznacza się takimi a takimi cechami: widoczne są określone kształty i barwy. Podstawę wnioskowania stanowi znana badaczowi zależność łącząca cechy przedmiotu badania (korelatu znaku) z cechami obiektu obserwowanego (znaku); w tym wypadku jest to stosunek podobieństwa zachodzący między cechami komórki a cechami widocznymi na zdjęciu mikroskopowym, który zależy od budowy i sposobu funkcjonowania przyrządu. Trzeba więc przyjąć, że obraz na zdjęciu mikroskopowym jest znakiem (typu naturalnego) pewnych cech komórki lub jej części składowych. Warto tu zwrócić uwagę, że mniej oczywisty jest stosunek, jaki łączy obraz optyczny obserwowany bezpośrednio w mikroskopie z cechami obiektu obserwacji; można zapewne przyjąć, że przy takim zastosowaniu mikroskop jest narzędziem raczej wspomagającym obserwację niż tworzącym znak obiektu.

Bardziej złożony charakter mają z semiotycznego punktu widzenia stany i wytwory takich przyrządów badawczych, jak np. waga, miernik potencjału elektrycznego czy spektrofotometr. Instrumenty te wytwarzają nie obrazy (w wyżej używanym znaczeniu), lecz różnego rodzaju napisy, tj. reprezentacje – graficzne i cyfrowe – wielkości liczbowych, czasem też wyrażenia słowne. Stosunek łączący krzywą, wykres, zespół cyfr lub słowa wytworzone przez przyrząd z cechami obiektów, które są przedmiotem badania za pomocą tego przyrządu, nie jest stosunkiem podobieństwa, jak w wypadku obrazu na zdjęciu mikroskopowym i cech komórki. Jest to zależność związana z procedurą pomiaru wartości cech obiektów (np. organelli komórkowych) lub zliczania elementów składających się na obiekty zbiorowe (np. liczby komórek w jakimś środowisku). Nie wnikając w bardzo złożoną problematykę pomiaru, można stwierdzić, że napisy produkowane przez przyrządy pomiarowe i liczniki interpretowane są przez obserwatora jako znaki typu konwencjonalnego lub symbolicznego, których korelatami są określone wartości cech lub liczebności obiektów badanych. Podstawy rozumowań semiotycznych, których przesłankami są symbole liczbowe stanowiące wyniki działania przyrządów, wnioskami zaś ilościowe oszacowania wartości cech, są bardzo złożone. Podobnie jak w wypadku interpretacji instrumentalnych znaków typu naturalnego (np. obrazów) wnioskowania te przebiegają prawie zawsze w sposób nieuświadomiony, choć bywają sytuacje (np. podejrzenie niesprawności przyrządu), w których przynajmniej częściowo muszą być ujawnione.

III. TEORETYCZNO-KONKRETNY CHARAKTER WIEDZY CYTOLOGICZNEJ

Obiekty, które są przedmiotem badania biologii komórki i których cechy stanowią korelaty znaków instrumentalnych, należą w znacznej części do klasy obiektów zwanych teoretyczny-

mi, częściowo zaś mają status niejako pośredni między obiektami obserwowalnymi bezpośrednio a takimi, które można poznać jedynie jako myślowo konstruowane korelaty znaków. Ta druga grupa obejmuje struktury i cechy morfologiczne, które można "uwidocznic" za pomocą mikroskopu świetlnego lub elektronowego; obiekty możliwe do zaobserwowania bez zastosowania przyrządów są w cytobiologii nieliczne lub odgrywają rolę niejako pomocniczą. Znaczna większość badań w dziedzinie biologii komórki dotyczy "poziomu molekularnego", tj. przedmiotem tych badań są cząsteczki i atomy, właściwości tych obiektów, związane z nimi procesy i łączące je relacje. Ścisłe biorąc, charakter taki ma większość szczegółowych badań prowadzonych niejako na codzień w laboratoriach cytobiologicznych; ostatecznym jednak ich celem i ukoronowaniem jest poznanie komórek jako całości, których częściami są cząsteczki i atomy. Poznanie obiektów teoretycznych, które w takich naukach jak fizyka i chemia stanowi główne dążenie badawcze, jest więc w biologii komórki celem pośrednim a nie ostatecznym. Fakt jednak, że obiekty te są bezpośrednim przedmiotem większości eksperymentów w tej dziedzinie, ma istotne znaczenie z punktu widzenia semiotycznej analizy tego rodzaju poznania naukowego. Podobnie jak w fizyce czy chemii, korelatami znaków instrumentalnych w cytobiologii są cechy obiektów, które (zarówno obiekty jak i większość cech) są teoretycznymi "konstruktami", tj. zjawiskami postulowanymi na podstawie niezmiernie złożonych rozumowań, w których sądy bezpośrednio oparte na obserwacji są bardzo odległymi od wniosków przesłankami. Jest to sytuacja podobna jak w naukach fizykalnych, wnioskowanie jednak semiotyczne w biologii komórki jest jeszcze bardziej złożone i wieloogniowe, teoretyczne bowiem korelaty znaków instrumentalnych stanowią punkt wyjścia do wniosków dotyczących obiektów niejako półteoretycznych, jakimi są podstawowe obiekty badania cytologicznego, tj. komórki jako całości.

Dla biologii komórki bardzo ważne znaczenie ma również ścisły związek między jakościowym, tj. lingwistycznym, a ilościowym, matematycznym opisem obiektów, ich własności i relacji. W stosunkowo dawnych już czasach, gdy w cytologii dominowała problematyka morfologiczna, niemal wyłącznym sposobem wyrażania wiedzy była fachowa odmiana języka naturalnego. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat główny nurt badań w biologii komórki wiąże się w coraz większym stopniu z zagadnieniami biochemicznymi i biofizycznymi; w związku z tym obok metod badania morfologicznego coraz większego znaczenia nabierają metody doświadczalne i teoretyczne typowe dla chemii i fizyki, m.in. matematyczne opracowanie wyników. Obecnie jednak metody matematyczne służą w biologii komórki w większym stopniu jako środek precyzyjnego wyrażania wyników pomiarów – przede wszystkim dla celów porównawczych – niż jako podstawowe narzędzie opisu badanych zjawisk. Dlatego też szczególnie często stosowane są metody statystyczne, dzięki którym możliwy jest szczegółowy i wielostronny opis wyników oraz obiektywne wnioskowanie w procesie sprawdzania hipotez. Zarówno jednak przesłanki badawcze, jak i wnioski mają w większości charakter sądów typu jakościowego. W ciągu ostatnich lat żywo także rozwijają się badania, w których metody matematyczne stanowią podstawowy sposób formułowania hipotez badawczych, rozumowania (w postaci operacji formalnych i obliczeniowych) i opisu wniosków badawczych; do takich dziedzin należy na przykład biofizyka komórki. We wszystkich jednak działach cytologii, podobnie jak w innych dziedzinach biologii, udział języka typu naturalnego jako nośnika wiedzy i narzędzia rozumowania jest znacznie większy w porównaniu z naukami typu fizycznego. Nie jest to zapewne sprawa związana jedynie z obecnym charakterem i stopniem rozwoju biologii, prawdopodobnie nie wynika to również tylko z ogromnej złożoności i różnorodności obiektów biologicznych. Poznanie systemów żywych – w związku z

samą ich istotą – ma bardziej konkretny, mniej abstrakcyjny charakter w porównaniu z poznaniem zjawisk będących przedmiotem nauk fizycznych, konkretne zaś poznanie znajduje lepszy wyraz w znakach językowych (i innych, np. obrazowych) zbliżonych do tych, jakimi posługujemy się w życiu codziennym, niż w symbolice liczbowej i formalnej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AJDUKIEWICZ K. Logika pragmatyczna. PWN, Warszawa, 1965.
- [2] DOROSZEWSKI J. Logiczna struktura wiedzy medycznej. (w) Postępy biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, (red.) M. Nałęcz, Wyd. Komunikacji i Łączności, Warszawa, 1990: 94–110.
- [3] KOTARBIŃSKA J. Pojęcie znaku. (w) Z zagadnień teorii nauki i teorii języka, PWN, Warszawa 1990: 152–244.
- [4] PELC J. Wstęp do semiotyki. Wiedza Powszechna, Warszawa, 1984.

MODELE RUCHU LEUKOCYTÓW W JEDNORODNYM POLU BODŹCOWYM

MODELS OF LEUKOCYTE MOVEMENT IN THE STIMULATING FIELD

Anna KORZYŃSKA*, Maciej GÓRKIEWICZ **

*Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN, **Zakład Biocybernetyki
Collegium Medicum UJ w Krakowie

Streszczenie. Wstępna część pracy zawiera krótkie omówienie trzech poziomów abstrakcji opisu ruchu komórki. Zasadnicza część pracy poświęcona jest modelom procesów stochastycznych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na modele zakładające występowanie zmian mechanizmu losowego generującego bazowy proces stacjonarny: proces przedziałami Markowa, proces odcinkami ARMA, proces AR z progiem, proces AR wykładniczy, proces AR biliniowy. Dyskutuje się przydatność przedstawionych modeli do opisu wpływu zmian w otoczeniu komórki na jej aktywność ruchową.

Summary. In the introductory part three levels of abstraction used to description of the leukocyte movement are briefly discussed. The basic part of the paper provides a review of probabilistic models that have been proposed to description of the directional movement: the piece-wise Markov chains, the piece-wise ARMA models, the threshold AR models, the exponential AR models, the bilinear AR model. These all share a common premise, that the mechanisms, forming a stochastic process, fluctuate in time. The application is discussed to describe the relationships between the cell behavioural expression and changes in its neighbourhood.

WPROWADZENIE

Stosowane w praktyce modele ruchu komórek można podzielić na trzy klasy modeli, leżące na różnych poziomach abstrakcji:

- 1) modele faz aktywności;
- 2) modele trajektorii przemieszczeń;
- 3) modele regulacyjne.

W modelach pierwszego typu wszystkie możliwe formy ruchowej aktywności komórki dzieli się na kilka stanów, zachowanie się komórki opisywane jest jako ciąg następujących po sobie faz ruchu. W modelach regulacyjnych komórka traktowana jest jako układ kilku powiązanych receptorów. Pod działaniem pola bodźcowego, interakcja kilku receptorów wywołuje określone zmiany kształtu i przemieszczanie się całego układu. W modelach trajektorii przemieszczeń aktywność ruchowa komórki analizowana jest jako realizacja kilku-

wymiarowego, dyskretnego procesu stochastycznego, której poszczególne składowe odpowiadają, na przykład, odległościom między położeniami środka ciężkości komórki i kierunkom przemieszczeń w kolejnych chwilach. Modele trajektorii przemieszczeń spełniają szczególną rolę służąc obiektywizacji, potwierdzaniu zasadności pozostałych typów modeli. Stąd główna część pracy poświęcona jest różnym postaciom modeli trajektorii przemieszczeń, opartych na modelu stochastycznego procesu autoregresji z pełzającą średnią (ARMA), takich jak: proces odcinkami ARMA, proces AR z progiem, proces AR wykładniczy, proces AR biliniowy. Przytacza się przykłady poświadczające przydatność przedstawionych modeli do opisu swobodnego ruchu komórki, dyskutuje się zasadność stosowania ich do opisu ruchu w polu bodźcowym.

TYPY MODELI

Model matematyczny porządkuje wiedzę o obiekcie badań w tym sensie, że wyróżnia wielkości, które w wybranym aspekcie charakteryzują obiekt, oraz wielkości, od których one zależą. W kategoriach cybernetycznych pierwsze nazywane są wielkościami wyjściowymi a drugie wielkościami wejściowymi i parametrami badanego systemu. Wielkości wyjściowe definiowane są *explicite*, z mniej lub bardziej jednoznaczными sugestiami co do sposobu ich pomiaru w warunkach rzeczywistych. Natomiast wielkości wejściowe i parametry badanego systemu są często określane za pomocą werbalnego opisu lub tak zwanych milczących założeń co do podlegających modelowaniu rzeczywistych obiektów i warunków. Pożądane jest, aby opis wielkości wejściowych i parametrów był sformułowany dostatecznie jasno dla użytkownika modelu tak, aby ten potrafił określić, w jakich warunkach może i w jakich nie powinien oczekiwać zgodności między wielkościami wyjściowymi obliczonymi na podstawie modelu a obserwowanymi w praktyce. Poza tym jest pożądane, aby modele o różnych poziomach abstrakcji i dotyczące różnych aspektów badanych zjawisk korespondowały między sobą – przynajmniej żeby parametry i wielkości jednego modelu mogły być interpretowane w kategoriach drugiego modelu. W odniesieniu do fizykalnych modeli przemieszczania się komórek oznaczać to może żądanie powiązań nie tylko między modelami fizykalnymi, ale także z modelami struktury komórek, modelami funkcjonalnymi i modelami biochemicznymi. Szukanie takich powiązań wykracza poza zakres niniejszej pracy. Jak już zaznaczono, fizykalne modele ruchu komórek można podzielić na trzy klasy modeli, leżące na różnych poziomach abstrakcji:

- modele faz aktywności;
- modele trajektorii przemieszczeń;
- modele regulacyjne.

W modelach pierwszego typu wszystkie możliwe formy ruchowej aktywności komórki dzieli się na kilka stanów, na przykład [22, 23]: wyrzut, szukanie, zaokrąglenie. Jeśli z założenia w każdej chwili komórka może przejawiać jedną i tylko jedną z wyróżnionych faz aktywności, to matematycznie model może być wyrażony w kategoriach dyskretnego łańcucha Markowa. Jak wiadomo, przy tym sposobie opisu zachowanie się komórki charakteryzują prawdopodobieństwa następstw faz ruchu. W cytowanym przykładzie [22, 23] występuje sześć możliwych następstw faz ruchu:

wyrzut → szukanie, wyrzut → zaokrąglenie, szukanie → wyrzut, szukanie → zaokrąglenie

zaokrąglanie \rightarrow wyrzut, zaokrąglanie \rightarrow szukanie
i odpowiednio sześć prawdopodobieństw warunkowych:
 $p(\text{szukanie}|\text{wyrzut}), \dots, p(\text{szukanie}|\text{zaokrąglanie})$.

Uwzględnienie zależności czasowych wymaga wprowadzenia następstw polegających na trwaniu w początkowej fazie, na przykład:

wyrzut \rightarrow wyrzut, szukanie \rightarrow szukanie, zaokrąglanie \rightarrow zaokrąglanie
oraz uzależnienia od czasu albo wszystkich prawdopodobieństw następstw, albo tylko prawdopodobieństw trwania w początkowej fazie ruchu [17, 18].

Szczególnie chętnie stosowany jest tu rozkład wykładniczy, dla którego prawdopodobieństwo nastąpienia zdarzenia w odcinku czasu o zadanej stałej długości nie zależy od tego, jak długo już trwa oczekiwanie na wystąpienie tego zdarzenia. Oczywiście, style zachowania się komórki mogą być analizowane na podstawie dłuższych sekwencji kolejnych faz ruchu niż tylko faza poprzednia – faza następna. Pozostanie przy tym na gruncie modeli Markowskich umożliwia typ modelu "łańcuchy przedziałami Markowa" [28, 29, 30]. W tym modelu zakłada się, że w historii zachowania się komórki można wyróżnić kilka stadiów aktywności, a w każdym stadium obowiązuje inny model Markowa. Przy tym ujęciu, jeśli wystąpienie zmiany stadium aktywności powiązać ze zmianą zewnętrznych warunków ruchu, staje się możliwe badanie wpływu zmian pola bodźcowego na zachowanie się komórki. Należy zauważyć, że oszacowanie prawdopodobieństw wymaga dostatecznie dużej liczby zaobserwowanych przejść z każdej fazy ruchu w inne. Stąd w każdym stadium pole bodźcowe powinno być dostatecznie rozległe i dostatecznie długotrwałe. Poza tym założenie stałości poszczególnych prawdopodobieństw przejść w każdym z wyróżnionych stadiów ruchu sugeruje stosowanie pól bodźcowych o takiej samej wartości w każdym położeniu komórki.

U podstaw wszystkich modeli faz aktywności leży milczące założenie, że istnieje kryterium wykrywania wystąpienia zmiany jednej fazy ruchu w drugą, jednego stadium aktywności w drugie. Obiektywne kryterium może bazować na analizie trajektorii ruchu komórki. W modelach trajektorii przemieszczeń obserwowana aktywność ruchowa komórki analizowana jest jako realizacja kilkuwymiarowego dyskretnego procesu stochastycznego, której poszczególne składowe odpowiadają, na przykład, odległościom między położeniami środka ciężkości komórki w kolejnych chwilach, kierunkom przemieszczeń między kolejnymi chwilami, określonym parametrom kształtu komórki w kolejnych chwilach. Metody identyfikacji kilku postaci modeli związanych z tym podejściem omawiane są niżej. Gromadzenie danych potrzebnych do oszacowania parametrów modelu wymaga podjęcia decyzji co do odstępu czasu między kolejnymi obserwacjami, a także napotyka na pewne trudności interpretacyjne, na przykład, co uznać za centrum komórki (w grę wchodzi środek geometryczny rzutu komórki, środek ciężkości rzutu komórki, środek ciężkości komórki), jak wyrazić zmiany kształtu komórki. W przypadku pola bodźcowego o różnych wartościach w różnych miejscach do wymienionych trudności interpretacyjnych dołączają się trudności związane z określeniem, co właściwie oddziałuje na badaną komórkę i jak to mierzyć: pod uwagę mogą tu być brane różne sposoby określania umownej wartości bodźca (albo różnic wartości bodźca) w miejscu, gdzie znajduje się komórka.

Z analogicznymi trudnościami związane jest gromadzenie danych do oceny modeli regulacyjnych ruchu komórki. W modelach tych komórka traktowana jest jako układ kilku powiązanych receptorów. Pod wpływem chwilowych i lokalnych oddziaływań pola bodźcowego, w każdym receptorze powstaje lokalna tendencja do zmiany lub utrzymania miejsca pobytu. Interakcja kilku receptorów wywołuje określone zmiany kształtu i przemie-

szczenie się całego układu. W najprostszym przypadku cała komórka traktowana jest jako jeden punktowy receptor, a w opisie reakcji na bodziec pomijane są losowe odchyłki reakcji od jej wartości oczekiwanej [12, 13]. W przypadku skokowych zmian wartości pola bodźcowego obiektem zainteresowania modeli regulacyjnych, w odróżnieniu na przykład od modeli "przedziałami Markowa" jest faza przejściowa od jednego stanu ustalonego do drugiego, a nie same stany ustalone. W cytowanych pracach [7, 13] przytaczane są przykłady faz przejściowych o czasie trwania rzędu minuty.

Ścisłe deterministyczny opis zachowania się komórki kłóci się z zachowaniem obserwowanym w praktyce. Stąd w modelach regulacyjnych mających opisywać reakcje komórki na wymuszenia bardziej subtelne od znacznej skokowej zmiany otoczenia, do deterministycznej składowej odpowiedzi odpowiednio dodawana jest składowa losowa tak, aby uzyskać zadowalającą zgodność z obserwacją [32, 33, 34]. Możliwość wyboru modeli z większą liczbą receptorów (bez względu na to, czy są to receptory umownie rozmieszczone na powłoce komórki, czy odpowiedniki receptorów zaobserwowanych w badanej komórce) wynika z fizycznej możliwości rejestrowania różnic wartości pola bodźcowego w najbliższym otoczeniu komórki [19]. To, czy właściwie dobrano charakter zależności bodziec \rightarrow reakcja, sprawdzić można tylko analizując zgodność reakcji (trajektorii ruchu) na różne zmiany bodźca obliczonej na podstawie modelu z reakcją obserwowaną, to znaczy, innymi słowami, badając wiele modeli trajektorii przemieszczeń. Jak widać, modele trajektorii przemieszczeń spełniają szczególną rolę wśród pozostałych typów modeli: same, być może, niewiele wnosząc do zrozumienia zjawisk ruchu komórek służą obiektywizacji, potwierdzaniu zasadności tak modeli faz aktywności, jak i modeli regulacyjnych.

Dalsza część pracy w całości poświęcona jest różnym postaciom modeli trajektorii przemieszczeń, opartych na modelu stochastycznego procesu autoregresji z pelżającą średnią.

MODELE LINIOWE TRAJEKTORII: AR, MA i ARMA

Przez znalezienie modelu danego szeregu czasowego

$$\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots\}$$

zazwyczaj rozumie się znalezienie funkcji przekształcającej ten szereg w tak zwany biały szum $\{\varepsilon(t)\}$, definiowany jako sekwencja nieskorelowanych zmiennych losowych o zerowej wartości oczekiwanej i stałej wariancji:

$$E\{\varepsilon(t)\} = 0; E\{\varepsilon(t)^2\} = \sigma^2; E\{\varepsilon(s) * \varepsilon(t)\} = 0 \text{ dla } s \neq t \quad (1)$$

$$h(\dots, x(t-2), x(t-1), x(t)) = \varepsilon(t) \quad (2)$$

Określenie "realizowalny model" oznacza, że aktualna wartość procesu nie jest uzależniana od przyszłych wartości procesu. Liniowość modelu (2) polega na tym, że funkcję przekształcającą można przedstawić w postaci sumy:

$$\sum h(s)x(t-s) = \varepsilon(t); s = (0, \infty) \quad (3)$$

lub, równoważnie, za pomocą operatora zespolonego:

$$H(z) = \sum h(s) z^s; s = (0, \infty) \quad (4)$$

Jeśli wszystkie zera $H(z)$ leżą na zewnątrz koła jednostkowego, to $H^{-1}(z)$ może być rozwinięte dla $|z| < 1$:

$$H^{-1}(z) = \sum_{s=0}^{\infty} g(s) z^s = \Gamma(z) \quad (5)$$

gdzie: $H^{-1}(z)\Gamma(z) = 1$

W takim przypadku $x(t)$ może być jawnie wyrażone jako:

$$x(t) = \sum g(s) \varepsilon(t-s); \quad s = (0, \infty) \quad (6)$$

Modele (3) lub (6) bez dodatkowych założeń nie mogą mieć praktycznego zastosowania ze względu na nieskończoną liczbę składników. Model AR (akronim od angielskiego określenia: *autoregressive*) powstaje przy założeniu, że $H(z)$ może być aproksymowane jako wielomian:

$$H(z) = 1 + a(1)z + \dots + a(k)z^k \quad (7)$$

co w dziedzinie czasu oznacza, że:

$$x(t) + a(1)x(t-1) + \dots + a(k)x(t-k) = \varepsilon(t) \quad (8)$$

gdzie: $k < \infty$ – rząd modelu AR.

Model MA (akronim od angielskiego określenia: *moving average* – pełzająca średnia) powstaje przy założeniu, że $\Gamma(z)$ może być aproksymowane jako wielomian:

$$\Gamma(z) = 1 + b(1)z^1 + \dots + b(m)z^m \quad (9)$$

co w dziedzinie czasu oznacza, że:

$$x(t) = \varepsilon(t) + b(1)\varepsilon(t-1) + \dots + \varepsilon(t-m) \quad (10)$$

gdzie: $m < \infty$ – rząd modelu MA.

Model ARMA jest modelem mieszanym:

$$\Gamma(z) = \frac{1 + b(1)z^1 + \dots + b(m)z^m}{1 + a(1)z^1 + \dots + a(k)z^k} \quad (11)$$

co w dziedzinie czasu oznacza, że:

$$x(t) + a(1)x(t-1) + \dots + a(k)x(t-k) = \varepsilon(t) + b(1)\varepsilon(t-1) + \dots + \varepsilon(t-m) \quad (12)$$

gdzie: $k, m < \infty$ – rząd modelu ARMA.

Jak widać, modele (8) i (10) stanowią szczególne przypadki (12). Ogólnie rzecz biorąc, każda dostatecznie długa realizacja $\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots\}$ może być równie dobrze (na przykład w sensie minimum sumy kwadratów odchyłeń) estymowana tak za pomocą modelu AR odpowiednio dużego rzędu, jak za pomocą modelu MA. Rząd modelu ARMA może być dowolnie zwiększany poprzez mnożenie licznika i mianownika ułamka (11) przez ten sam wielomian, którego wszystkie pierwiastki leżą poza kołem jednostkowym. Stąd przy wyborze modelu spośród obserwacyjnie równoważnych przyjmuje się postulat oszczędności (*principle of parsimony*) nakazujący dobrać możliwie niskie rzędy wielomianów ułamka (11). W fundamentalnej pracy [4], proponuje się, aby wyniki raczej skomplikowanej procedury

identyfikacji modelu poddawać sprawdzeniu, czy postulat oszczędności jest zachowany, to znaczy obliczać zera wyestymowanych wielomianów i , jeśli występują prawie znoszące się czynniki, odpowiednio zmniejszać rząd modelu i powtarzać procedurę identyfikacji. Inne podejście, polegające na stopniowym zwiększaniu rzędu modelu, opiera się na kryterium informacyjnym Akaike'a [1, 35]. Kryterium Akaike (oznaczane AIC od angielskiego skrótu nazwy), obliczane jest według zależności:

$$\text{AIC}(p) = N \log E(p) + 2p \quad (13)$$

gdzie:

p – rząd modelu;

N – liczba pomiarów;

$E(p)$ – błąd, występujący przy danym rzędzie modelu.

W konkretnych zastosowaniach posługiwanie się modelem AR wymaga następujących rozstrzygnięć [10]:

dobór długości odcinków, dla których estymuje się model AR;

dobór algorytmu estymacji modelu AR;

dobór rzędu modelu AR;

dobór wskaźników podobieństwa (lub przeciwnie, odległości) modeli AR;

dobór sposobów klasyfikowania modeli AR.

Jako rozsądne minimum długości badanego odcinka przyjmuje się ok. 75 punktów pomiarowych, co daje zadowalające wyniki przy zastosowaniu metody najmniejszych kwadratów [9], jako bardziej odpowiedniej przy małej liczbie pomiarów. Wyniki obliczeń silnie zależą od przyjętego rzędu modelu. Przedstawione procedury identyfikacji modeli ARMA nie przewidują weryfikacji, czy szereg różnic:

$$\delta(i) = x(i)^{\wedge} - x(i), \quad i = 1, 2, \dots \quad (14)$$

gdzie:

$x(i)^{\wedge}$ – wartość $x(i)$ przewidywana w chwili $t = i-1$ według (12);

$x(i)$ – wartość $x(i)$ faktycznie zrealizowana w chwili $t=i$;

może być uważany za biały szum (1). Nie jest to dopuszczalne, jeśli na podstawie modelu (2) mają być wyciągane wnioski co do fizykalnych mechanizmów badanego procesu. Jak wskazują przykłady weryfikacji przytoczone w [3] postulat zgodności (14) z (1) może prowadzić albo do mniej "oszczędnych" modeli, albo w ogóle do odrzucenia postaci ARMA modelu.

APROKSYMACJA ODCINKAMI ARMA

Przy braku powodzenia w liniowej estymacji funkcji często uciekamy się do estymacji odcinkowo-liniowej. Analogiczny chwyt można zastosować w przypadku estymacji modeli ARMA. Zakłada się przy tym, że obserwowany proces $\{X(t)\}$ faktycznie składa się z odcinków różnych, co najmniej dwóch procesów tak, że przez pewien czas obserwujemy jeden proces, a od pewnej chwili, w ogólnym przypadku nieznaney, obserwujemy drugi proces. Poza tym przyjmuje się pragmatyczne założenie, że przynajmniej jeden z tych procesów obserwujemy dostatecznie długo, aby z wymaganą dokładnością określić jego parametry, a także – co

niekiedy niemniej ważne – wyznaczyć początkową i końcową chwilę obserwacji. Proponuje się następujące sformułowanie zadania wykrywania zmian właściwości sygnałów [2]: Dany jest zapis badanego odcinka sygnału: $\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, n\}$. Dana jest rodzina modeli $M(Q)$ z parametrami Q . Wyznaczyć, która z dwóch hipotez jest prawdziwa:

$$H(0): \{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, n\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(0)); \quad (15)$$

$H(1)$: jest taki moment czasu $t = v$, $1 < v < n$, że:

$$\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, v-1\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(0)); \quad (16)$$

$$\{X(t); t = v, v+1, \dots, v-1\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(1)) \quad (17)$$

Jeżeli za prawdziwą uznaje się hipotezę $H(1)$, dodatkowe zadanie polega na ocenie chwili v , w której nastąpiła zmiana. W przypadku wykrywania zmian na bieżąco (*on-line*), powyższe sformułowanie zadania wystarcza. Czas $t = 0$ odpowiada chwili poprzedniej zmiany lub pierwszej pamiętanej wartości sygnału; czas $t = n$ odpowiada chwili bieżącej, a $t = v$ chwili ostatniej zmiany właściwości sygnału. W przypadku wykrywania zmian a posteriori (*off-line*) sprawa się komplikuje, gdyż odcinek $\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, n\}$ może zawierać więcej niż dwa segmenty. Sprowadzenie do zadania z dwoma segmentami wymaga wprowadzenia tak zwanego ruchomego końca kolejno tworzonych segmentów $\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, m\}$, $m < n$:

$$H(0): \{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, m\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(0)); \quad (18)$$

$H(1)$: jest taki moment czasu v , $1 < v < m$, że:

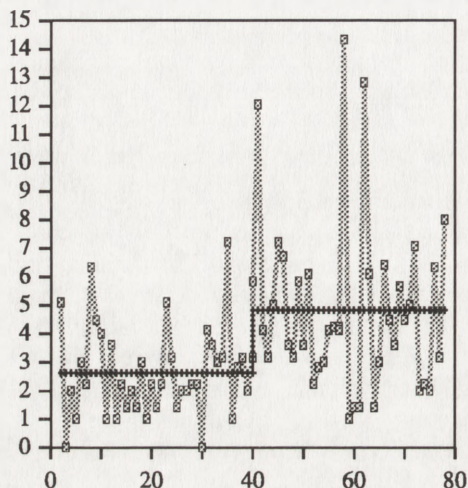
$$\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, v-1\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(0)); \quad (19)$$

$$\{X(t); t = v, v+1, \dots, v-1\} \text{ odpowiada modelowi } M(Q(1)) \quad (20)$$

W powyższym sformułowaniu zadania v jest chwilą zmiany właściwości sygnału z $M(0)$ na $M(1)$, natomiast m może, lecz nie musi być chwilą zmiany właściwości sygnału z $M(1)$ na inny. Przedstawiony schemat obliczeniowy bezpośrednio rzadko jest stosowany w praktyce, częściej pośrednio, jako uzasadnienie różnych testów i kryteriów wykrywania zmian [3, 24]. Jeżeli chodzi o badania ruchu organizmów, wyodrębnione segmenty badanego szeregu $\{X(t); t = 0, 1, 2, \dots, n\}$ mogą być klasyfikowane jako różne stany aktywności ruchowej spontanicznej, a także stanowiącej określone formy reakcji na nagle pojawiający się lub/i znikający bodziec. Przy tym reakcja na bodziec może wyrażać się nie tylko wystąpieniem lub zaniechaniem określonych form aktywności, lecz także zmianą proporcji trwania różnych form ruchu lub zmianami kolejności ich występowania. Obecnie dostępny materiał doświadczalny nie pozwala na wyciąganie daleko idących wniosków, głównie ze względu na zbyt krótkie serie obserwacji pojedynczych osobników. Niemniej, w niektórych zarejestrowanych szeregach czasowych można stwierdzać występowanie zmian form aktywności. Na przykład, na wykresie (rys. 1) amplitudy przemieszczeń leukocytu oznaczonego numerem 115 [20] wyraźnie wydzielają się dwa odcinki – jeden o średniej amplitudzie ok. 2,6, obejmujący kroki 2–40 i drugi, o średniej amplitudzie ok. 4,8 obejmujący dwa fragmenty: kroki 40–57 i kroki

57–78 (na wykresie w miejscu krok=40 i krok=57 usunięto fragmenty wykresu i wprowadzono jednolitą numerację kroków).

MODELE NIELINIOWE



Rys. 1. Amplitudy przemieszczeń leukocytu, oznaczonego numerem 115 w badaniach [20]: widoczne odcinki o wyraźnie różnych wartościach średnich

Podstawowy model ARMA (8, 10, 12) powinien być odrzucony a priori, jeśli są podstawy do odrzucenia założenia o stałości mechanizmu losowego, generującego badany proces. Istnieją modele nieliniowe nawiązujące do modeli ARMA w tym sensie, że modele ARMA stanowią ich przypadki szczególne: model AR z progami [31], wykładniczy model AR (15), model biliniowy ARMA (11). Model AR z progami zakłada, że początkowy model AR (8), określony parametrami $A(0)$ realizowany jest tak długo, aż kilka ostatnich obserwacji $x(t)$ nie przekroczy założonej wartości progowej. Wtedy następuje przełączenie się na nową postać modelu AR, określoną innymi wartościami parametrów $A(1)$. W wykładniczym modelu AR w odróżnieniu od liniowego modelu AR (8) współczynniki modelu nie są stałymi, a są wykładniczymi funkcjami ostatniej poprzedniej realizacji procesu:

$$a_{\sim}(i) = a(i) \exp(-\mu(i)x(t-1)); \quad i=(0,k) \quad (21)$$

$$x(t) + a_{\sim}(1)x(t-1) + \dots + a_{\sim}(k)x(t-k) = \varepsilon(t) \quad (22)$$

W odniesieniu do badań ruchu, oba przedstawione modele umożliwiają uwzględnienie silniejszego tłumienia dużych amplitud przemieszczeń. Ze względów energetycznych małe amplitudy przemieszczeń mają większą tendencję trwania w kolejnych realizacjach obserwowanego procesu, natomiast duże amplitudy są słabiej przenoszone na przyszłe zachowania. Na przykład, na wykresach amplitud przemieszczeń leukocytów [22] oznaczonego numerem 621 wyraźnie występują duże amplitudy bez następstw (rys. 2).

Model biliniowy ARMA zakłada, że oddziaływanie zakłóceń $\varepsilon(t-i)$, $i = 1,0$ jest tym silniejsze, im większe były poprzednie realizacje procesu $x(t-j)$, $j = 1,p$. W porównaniu z liniowym modelem (12) pojawiają się tu składniki zależne od iloczynu:

$$x(t) + \sum_{j=1}^k a(j)x(t-j) = \varepsilon(t) + \sum_{i=1}^m b(i)\varepsilon(t-i) + \sum_{i=1}^o \sum_{j=1}^p c(i,j) x(t-j) \varepsilon(t-i) \quad (23)$$

Ogólny schemat estymacji modeli nieliniowych przedstawiono w pracy [16].

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA OMÓWIONYCH MODELI DO BADAŃ RUCHU W POLU BODŹCOWYM

Pole bodźcowe, działające w obserwowanym obszarze, opisuje funkcja $\Phi = f(u, v)$, gdzie: Φ – wybrana miara oddziaływania bodźca (na przykład stężenie roztworu, natężenie światła) w punkcie o współrzędnych u, v . Badanie ruchu w polu bodźcowym napotyka dwie poważne bariery. Pierwsza związana jest z techniczną realizowalnością pola bodźcowego o żądanym rozkładzie wartości w przestrzeni i czasie, a następnie z techniczną realizowalnością pomiaru faktycznych wartości pola. Druga bariera wynika z trudności interpretacji oddziaływania pola, określenia, jakie parametry pola w otoczeniu badanej komórki wywierają wpływ na jej aktywność ruchową. Względem na techniczną realizowalność pola o znanych parametrach w obrębie obszaru obserwacji mikroskopowej nakazuje preferować pola skrajnie proste takie, których gradient w obszarze obserwacji:

- może być uznany za równy zeru:

$$\Phi(u, v) - \Phi(0) = \text{const.} \quad (24)$$

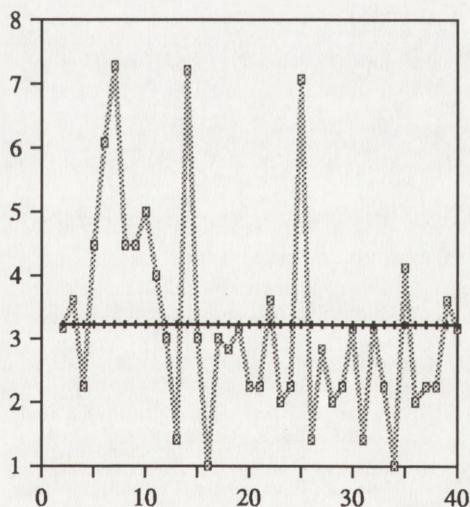
- jest równoległy do jednej z osi współrzędnych:

$$\Phi(u, v) = \Phi(u) \quad (25)$$

- jest skierowany do lub od bieguna ($u=0, v=0$):

$$\Phi(u, v) = \Phi(r); \quad r^2 = u^2 + v^2 \quad (26)$$

Trudności interpretacyjne wywołuje nawet pole (24). W grę wchodzi tu szereg supozycji co do sposobu oddziaływania pola: począwszy od najprostszej, zakładającej zależność aktywności ruchowej tylko od chwilowej wartości pola $\Phi(t)$, lub tylko od wielkości ostatniej zmiany $\Phi(t) - \Phi(t-1)$, poprzez szukanie zależności ruchu od obu tych wielkości, to jest i od $\Phi(t)$ i od $\Phi(t) - \Phi(t-1)$, aż po skomplikowane modele oddziaływania pola, uzależniające aktualny charakter ruchu od jego historii, to jest od czasów przebywania pod działaniem poprzedniej i aktualnej wartości pola, od stanu badanej komórki w chwili zaistnienia zmiany wartości pola. W przypadku pól (25) i (26) ruch komórki powoduje zmiany wartości pola w jej otoczeniu co, oczywiście, potęguje trudności interpretacyjne, zwłaszcza w przypadku modeli traktujących komórkę jako poruszający się punkt. W przypadku modeli regulacyjnych, traktujących komórkę jako przestrzenny układ receptorów, trudności interpretacyjne mogą być mniejsze,



Rys.2. Amplitudy przemieszczeń leukocytu, oznaczonego numerem 621 w badaniach [22]; widoczne pojedyncze duże amplitudy

za to zwiększają się wymagania co do precyzji i szybkości pomiarów wartości pola w najbliższym otoczeniu komórki. Do niedawna problemy pomiarowe uniemożliwiały wszechstronną weryfikację modeli regulacyjnych na podstawie zarejestrowanych trajektorii ruchu w różnych polach bodźcowych. Nowe perspektywy w tym zakresie przedstawia praca Korohody [19] – dzięki połączeniu technik dozowania i chemicznego znakowania roztworów uzyskuje się możliwość wizualnej kontroli zgodności faktycznego przebiegu zmian wartości pola z zamierzonym, z kolei dzięki zastosowaniu technik cyfrowej rejestracji obrazów i, następnie, chromatycznej analizy obrazów staje się możliwe precyzyjne określanie i odtwarzanie wartości pola w zarejestrowanym obszarze obserwacji [93]. Pełne wykorzystanie rysujących się możliwości pomiarowych nie jest możliwe na gruncie stacjonarnych modeli, w zasadzie dopuszczających co najwyżej skokowe zmiany pola o zerowym gradiencie. Przedstawione wyżej modele trajektorii ruchu w pełni zasadnie mogą być stosowane do estymowania tak zwanych stanów ustalonych reakcji komórki na zewnętrzne bodźce [13] i, konsekwentnie, powinny być tak rozwijane, aby mogły opisywać niestacjonarne przebiegi przejściowe, pomijane w przedstawionych modelach stacjonarnych [4].

LITERATURA

- [1] AKAIKE H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans Autom Control* 1974; **AC-10**: 667–674.
- [2] APPEL U, BRANDT AV. Adaptive Sequential Segmentation of Piecewise Stationary *Time Series Inf Sci* 29 (April 1983).
- [3] BASSEVILLE M, BENVENISTE A. (red.) Detection of Abrupt Changes in Signals and Dynamical Systems, Springer V., 1986.
- [4] BOX GEP, JENKINS GM. Time Series Analysis. San Francisco, Holden-Day 1976, (polski przekład: Analiza szeregów czasowych. Warszawa, PWN, 1983).
- [5] BROCKWELL P, DAVIS RA. Time Series: Theory and Methods. Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- [6] BRUZZONE SP, KAVEN M. Tradeoffs in Using the Sample Autoregressive Function in ARMA Parameter Estimation. *IEEE Transon A S S P* (August) ASSP-32, 1984; **4**: 701–715.
- [7] FRANKE K, GRULER H. Galvanotaxis of Human Granulocytes: Electric Field Jump Studies. *Eur Biophys J* 1990; **18**: 335–346.
- [8] GABR MM, SUBBA RAO T. The Estimation and Prediction of Subset Bilinear Time Series Model with Application. *J Time Ser Anal* 1981; **2**: 3.
- [9] GÓRAL A, LUDWICZAK B. O estymacji funkcji spektralnej na podstawie krótkich szeregów czasowych. *Przegląd Statystyczny* 1985; **32**, **2**: 110–119.
- [10] GÓRAL A. Analiza porównawcza wybranych metod doboru rzędu w modelach autoregresyjnych, *Przegląd Statystyczny* 1988; **35**, **3**: 255–266.
- [11] GRANGER CW, ANDERSEN AP. An Introduction to Bilinear Time Series Models. Gottingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 1978.
- [12] GRULER H, NUCCITELLI R. New Insights into Galvanotaxis and Other Directed Cell Movements: an Analysis of the Translocation Distribution Function. (w) Ionic Currents in Development. R. Nuccitelli (red.) AR Liss, New York, 1986: 337–347.
- [13] GRULER H. Biophysics of Leukocytes: Neutrophil Chemotaxis, Characteristics and Mechanisms. (w) The Cellular Biochemistry and Physiology of Neutrophil. MB Hallett (red.) CRS-Press Uniscience, 1989: 63–95.
- [14] GRULER H. Chemokinesis, Chemotaxis and Galvanotaxis Dose-Response Curves and Signal Chains. (w) Biological Motion, W. Alt, G. Hoffmann (red.) Springer Verlag, 1990: 396–414.
- [15] HAGGAN V, OZAKI T. Modelling Non-Linear Random Vibrations Using an Amplitude-Dependent Autoregressive Time Series Model. *Biometrika* 1981; **68**: 189–196.
- [16] HAGGAN V, HERAVI SM, PRIESTLEY MB. A Study of the Application of State-Dependent Models in Non-Linear Time Series Analysis. *J Time Ser Anal* 1984; **5**, **2**: 69–102.

- [17] JAIN RK. Semi-Markov Model and its Application. *Biom J* 1987; **29**, 4: 439–443.
- [18] JAIN RK. The Effect of Parameters Change of a Semi-Markov Model on Interval Transition Probabilities. *Biom J* 1989; **31**, 6: 721–725.
- [19] KOROHODA W. Metody określenia kierunkowych ruchów komórek. XXII Sem. Postęp w badaniach systemów ruchowych komórek, IBM UJ, Rabka 1993.
- [20] KORZYŃSKA A. Stochastyczne modele ruchu leukocytów. IX KK Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, Gdańsk 1992; t.1: 77–80.
- [21] KORZYŃSKA A., GÓRKIEWICZ M. Modelowanie błędzenia przypadkowego. III KK Uniwersalność Cybernetyki, Janowice 1992; 9.
- [22] KORZYŃSKA A. Propozycja modelu ruchu granulocytów oparta na procesach Markowa. XXII Sem. Postęp w badaniach systemów ruchowych komórek, IBM UJ, Rabka 1993.
- [23] KORZYŃSKA A. Modelowanie faz aktywności ruchu leukocytów. IV KK Uniwersalność Cybernetyki, Kraków 1993; 7.
- [24] NIKIFOROV IW. Posledovatelnoe obnaruzhenie izmeneniya svoystv stohasticheskikh signalov i sistem na osnove modifizirovannogo algoritma kumulativnyh summ. (w) Obnaruzhenie izmeneniya svoystv signalov i dinamiceskikh sistem. M.Basseville, A.Benveniste (red.), Mir, Moskwa 1989 (rozszerzone tłumaczenie z języka angielskiego)
- [25] PANDIT SM, WU SM. Time Series and Systems Analysis with Applications. John Wiley, New York 1983.
- [26] PRIESTLEY MB. New Developments in Time-Series Analysis. (w) New Perspectives in Theoretical and Applied Statistics. Madan LP et al. (red.), John Wiley & Sons, New York 1987: 119–131.
- [27] RUTMAN MA. Integral Representation of Functions Forming a Markov Series. (Russian). *Dokl. Akad. SSSR* 1965; **164**: 989–992.
- [28] TABEAU A. Łańcuchy przedziałami Markowa. Część I – Podstawowe własności. *Przegląd Statystyczny* 1987; **34**, 4: 355–368.
- [29] TABEAU A. Łańcuchy przedziałami Markowa. Część II – Rozkłady graniczne. *Przegląd Statystyczny* 1988; **35**, 1: 99–107.
- [30] TABEAU A. Łańcuchy przedziałami Markowa. Część III – Klasyfikacja stanów, ergodyczność. *Przegląd Statystyczny* 1988; **35**, 2: 175–185.
- [31] TONG H, LIM KS. Threshold Autoregression, Limit Cycles and Cyclical data. *J R Statist Soc* 1980; **B42**: 245–292.
- [32] TRANQUILLO RT, LAUFFENBURGER DA. Stochastic Model of Leukocyte Chemosensory Movement. *J Math Biol* 1987; **25**: 229–262.
- [33] TRANQUILLO RT. Theory and Models of Gradient Perception. (w) Motility & Taxis. JM Lackie, J Armitage (red.) Cambridge Univ. Press, Cambridge 1990.
- [34] TRANQUILLO RT. Models of Chemical Gradient Sensing by Cells. (w) Biological Motion, W Alt, G Hoffmann (red.) Springer Verlag, 1990: 415–441.
- [35] ZIELIŃSKI R. Optimal Choice of a Statistical Model: a Discussion of the Akaike and Classical Approaches. *Zastosowania Matematyki (Applicationes Mathematicae)* 1990; **20**, 4: 543–549.

ROLA SIATECZKI SARKOPLAZMATYCZNEJ W SPRZĘŻENIU ELEKTRO-MECHANICZNYM I KOMÓRKOWYM TRANSPORCIE WAPNIA W MIOCYTACH SERCA

ROLE OF SARCOPLASMIC RETICULUM IN EXCITATION-CONTRACTION COUPLING AND CELLULAR CALCIUM TRANSPORT IN CARDIAC MYOCYTES

Bohdan LEWARTOWSKI

Zakład Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
w Warszawie

Streszczenie. Według powszechnie przyjętej hipotezy siateczka sarkoplazmatyczna (SS) miocytów serca pełni funkcję zbiornika wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} aktywującego skurcz. Ponieważ ilość Ca^{2+} napływającego do sarkoplazmy przez pobudzoną błonę komórkową ma być zbyt mała dla aktywacji skurczu, SS miałaby być niezbędnym ogniwem w sprzężeniu elektro-mechanicznym w miocytach serca. Wapń uwolniony z SS miałby być niemal w całości wylapywany z powrotem przez jej Ca^{2+} -ATPazę, co byłoby głównym mechanizmem rozkurczu. Tak więc SS pracowałaby w obiegu prawie całkowicie zamkniętym. W obecnym opracowaniu przedstawiono wyniki nowych prac przemawiające za tym, że SS jest czynnym, ważnym ogniwem w odkomórkowym transporcie Ca^{2+} . W sprzężeniu elektro-mechanicznym odgrywa głównie rolę wewnątrzkomórkowego dystrybutora Ca^{2+} , którego przezbłonowy napływ może być wystarczający dla aktywacji skurczu. W ten sposób SS może kontrolować siłę skurczu i jego przebieg w czasie.

Summary. According to widely accepted hypothesis sarcoplasmic reticulum (SR) is a main source of Ca^{2+} activating contraction in cardiac myocytes. As the amount of Ca^{2+} diffusing into sarcoplasm through the stimulated sarcolemma is believed to be too small to activate contraction, SR would be the indispensable link of excitation-contraction coupling. Calcium released from the SR upon excitation, would be almost completely recaptured by its Ca^{2+} -ATPase, which would provide the main mechanism of relaxation. Thus SR would work in the almost closed calcium circuit. In this paper we present results of the recent papers suggesting that the SR is an important, active link in the outward Ca^{2+} transport. Its major function in excitation-contraction coupling would be an even distribution of sarcolemmal-derived Ca^{2+} , the amount of which may be sufficient for activation of relatively strong contraction. This way SR could control the force and time course of contraction.

WSTĘP

Zrozumienie procesów molekularnych i komórkowych składających się na skurcz mięśnia sercowego i regulujących jego siłę i przebieg w czasie ma ogromne znaczenie nie tylko

poznawcze, ale i praktyczne. Ponad 50% zgonów w Polsce jest spowodowane chorobami układu krążenia. Ostateczną przyczyną zgonu jest niewydolność serca spowodowana zaburzeniami rytmu i/lub spadkiem kurczliwości serca. Niewydolność serca rozwija się najczęściej w toku procesu noszącego nazwę "przemodelowania" (ang. *remodeling*) będącego jego odczynem na przeciążenie lub różne czynniki chorobowe, np. zawał [1, 2]. Jednym z elementów procesu przemodelowania są bardzo wczesnie rozwijające się zaburzenia ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę białek kurczliwych oraz białek składających się na ogniwa sprzężenia elektro-mechanicznego w miocytach serca. Prowadzi to do niekorzystnych zmian przebiegu procesu zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego, mających swe odbicie w zaburzeniach hemodynamiki. Przedmiotem tego opracowania jest proces sprzężenia elektro-mechanicznego w miocytach serca ze szczególnym uwzględnieniem roli siateczki sarkoplazmatycznej.

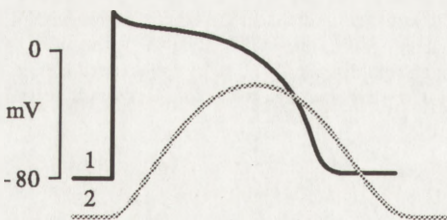
Rysunek 1 pokazuje czynnościowy potencjał błonowy (górną krzywą) jednej z komórek izolowanego mięśnia brodawkowatego serca kota. Pobudzenie błony komórkowej, którego objawem jest potencjał czynnościowy, inicjuje aktywację układów kurczliwych. Przebieg skurczu w czasie ilustruje dolna krzywa na rysunku 1. Zespół zjawisk prowadzących od pobudzenia błony komórkowej do aktywacji układów kurczliwych nazywamy sprzężeniem elektro-mechanicznym. Źródłowe informacje dotyczące współczesnej wiedzy i ogólnie przyjętych poglądów na mechanizm sprzężenia elektro-mechanicznego w miocytach serca znajdzie Czytelnik w znakomitej monografii D.M. Bersa [3]. W znacznym skrócie mechanizm ten wygląda następująco.

Jednym z prądów jonowych odpowiedzialnych za czynnościowy potencjał błonowy komórek mięśnia sercowego jest dokomórkowy prąd wapniowy (I_{Ca}), płynący przez aktywowane kanały wapniowe typu L. Przebieg tego prądu zarejestrowany w pojedynczej komórce mięśnia komory serca świnki morskiej za pomocą metody *voltage clamping* w układzie całokomórkowym przedstawia górną krzywą na rysunku 2. I_{Ca} inicjuje wzrost stężenia wolnego Ca^{2+} w sarkoplazmie [Ca^{2+}]_i, którego przebieg ilustruje środkowa krzywa na rysunku 2. Pomiar polega tu na graficznym zapisie stosunku natężenia wzbudzonej fluorescencji Indo-1 o długości fali 405 nm do natężenia fluorescencji o długości fali 495 nm. Stosunek ten zmienia się proporcjonalnie do [Ca^{2+}]_i. Indo-1 został wprowadzony do komórki przed doświadczeniem. Wzrost [Ca^{2+}]_i powoduje wiązanie się go z podjednostką C troponiny, co inicjuje skurcz. Wolny Ca^{2+} pojawiający się w sarkoplazmie pochodzi z dwóch źródeł:

1) napływa z zewnątrz przez aktywowane kanały wapniowe i w bardzo małej ilości drogą chwilowo odwróconej wymiany Na/Ca,

2) zostaje uwolniony z pęcherzyków końcowych siateczki sarkoplazmatycznej (SS) (rys. 3).

SS jest błoniastym tworem, w którym można wyróżnić 2 zasadnicze części odmienne morfologicznie i czynnościowo (rys. 3). Część kanalikowa składa się z sieci kanalików oplatających sarkomery. W ścianie kanalików występuje Ca^{2+} -ATPaza transportująca Ca^{2+} do ich wnętrza. Aktywność tej ATPazy jest regulowana przez sprzężony z nią fosfoproteid, fosfolamban.

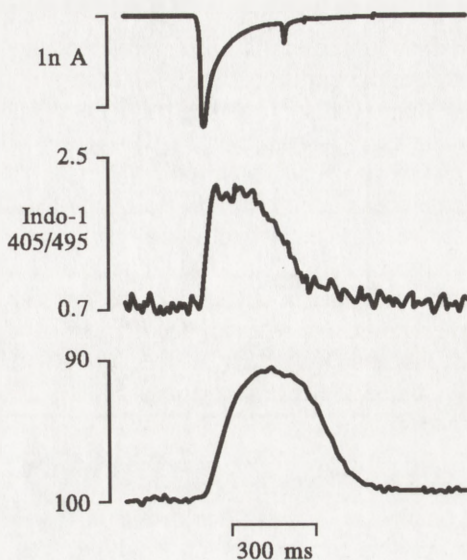


Rys. 1. Komórkowy potencjał czynnościowy (górną krzywą) i skurcz izolowanego mięśnia brodawkowatego prawej komory serca kota (krzywe schematyzowane na podstawie oryginalnego zapisu)

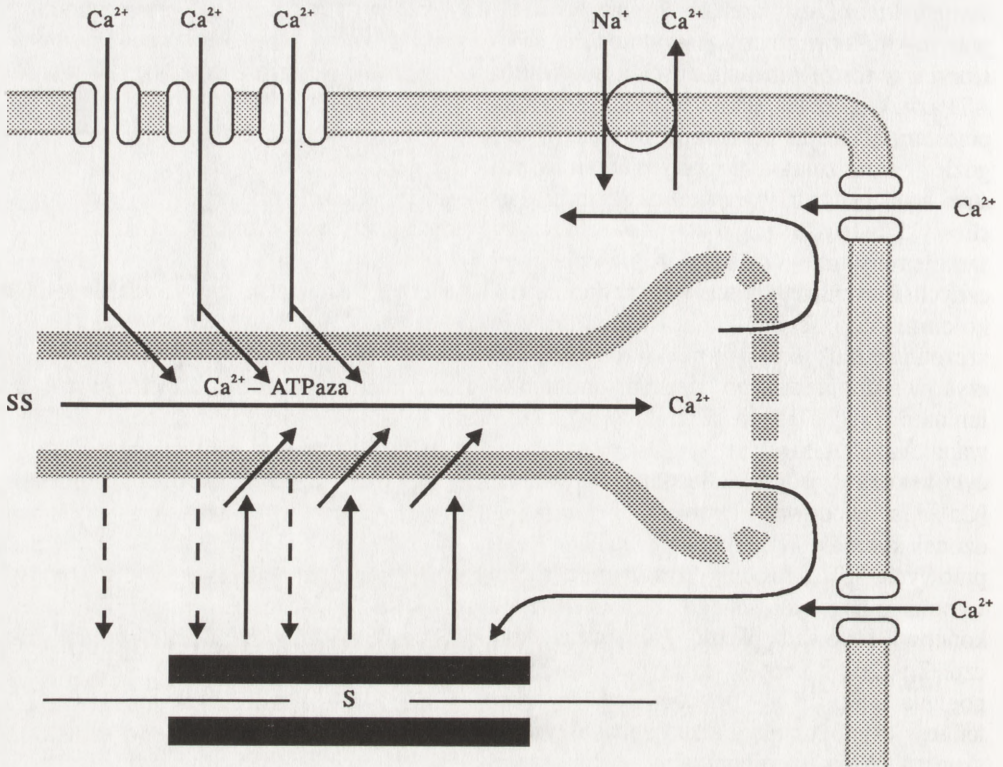
Swoista kinaza fosfolambanu jest aktywowana przez cAMP oraz przez Ca^{2+} -kaldmodulinę. Fosforylacja fosfolambanu zwiększa aktywność ATPazy. Wapń z kanalikowej części SS zostaje przesunięty do jej pęcherzyków końcowych, gdzie zostaje zmagazynowany głównie w postaci związanej z białkiem kalsekwestryną. Pęcherzyki końcowe są zwrócone do zewnętrznej sarkolemmy lub do ściany kanalików poprzecznych T. Pomiędzy błoną pęcherzyków a sarkolemmą lub ścianą kanalika znajduje się szczelina szerokości ~ 10 nm, do której z pęcherzyków wystają twory zwane stopkami lub kolumnami (ang. *feet* lub *pillars*). Są to kanały wapniowe SS. Głównym czynnikiem aktywującym te kanały jest niewielki, ale szybki wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spowodowany aktywacją I_{Ca} w pobudzonej komórce [7]. Aktywacja kanałów wapniowych SS powoduje uwolnienie części wapnia zmagazynowanego w pęcherzykach końcowych do sarkoplazmy i aktywację skurczu. Zgodnie z szeroko rozpowszechnionymi poglądami ilość Ca^{2+} pochodzącego z sarkolemmy jest zbyt mała dla znaczącej aktywacji skurczu. Wapń sarkolemmalny spełnia raczej rolę mechanizmu spustowego dla SS [3,7]. Z badań Fabiato [8] prowadzonych na "odskórowanych", tj. pozbawionych sarkolemmy miocytach zdaje się wynikać, że napływający spoza komórki Ca^{2+} jest tak aktywnie wylapywany przez Ca^{2+} -ATPazę SS, że w ogóle nie może on dotrzeć do sarkomerów bez jej pośrednictwa. Tak więc siateczka byłaby głównym i nieodzownym źródłem Ca^{2+} aktywującego skurcz.

Wapń uwolniony do sarkolemmy jest z powrotem wylapywany przez SS, co jest zasadniczym mechanizmem rozkurczu. Drobną część tego Ca^{2+} ilościowo odpowiadająca napływowi przez sarkolemmę jest transportowana na zewnątrz, głównie w drodze wymiany Na/Ca. W znacznie mniejszym stopniu transport ten jest dokonywany przez Ca^{2+} -ATPazę sarkolemmy.

Rekapitulując, siateczka sarkoplazmatyczna miocytów serca miałaby być głównym, nieodzownym zbiornikiem Ca^{2+} aktywującego skurcz komórki, pracującym w układzie prawie całkowicie zamkniętym między białkami kurczliwymi, sarkoplazmą, kanalikami podłużnymi (wychwyty) i pęcherzykami końcowymi (uwalnianie), jak to przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 2. Od góry ku dołowi: wykres przebiegu przez-błonowego prądu wapniowego, stężenia wolnego Ca^{2+} oraz skurczu izolowanego miocytu komory serca świnki morskiej; prąd wapniowy rejestrowano metodą *voltage clamping* w układzie całokomórkowym, stężenie Ca^{2+} przez pomiar fluorescencji wprowadzonego do komórki Indo-1, a skurcz za pomocą telewizyjnego układu pomiaru przesunięcia cienia (komórki) (z archiwum Zakładu Fizjologii Klinicznej CMKP)



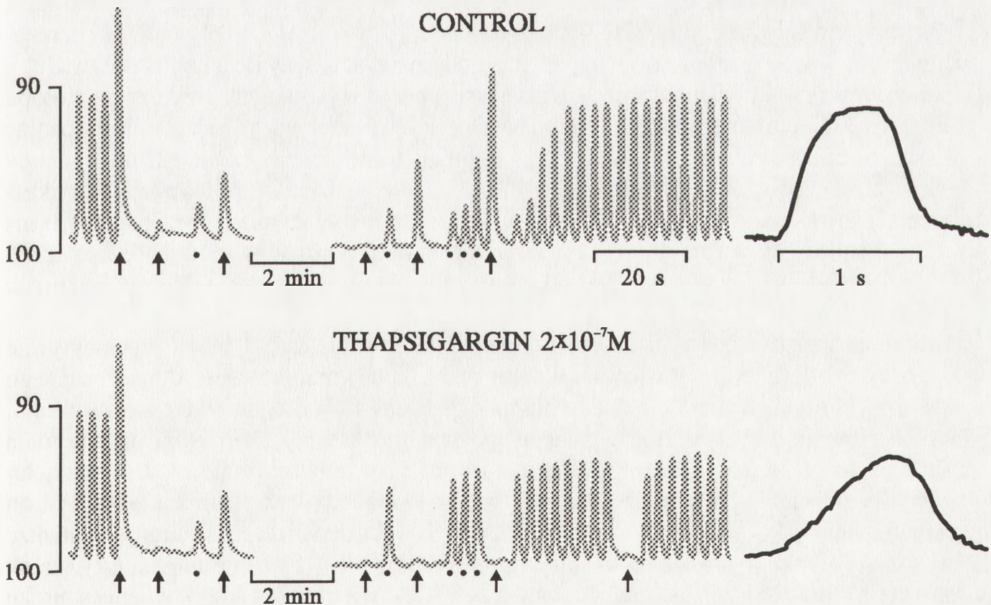
Rys. 3. "Klasyczny" schemat sprzężenia elektro-mechanicznego w miocytach serca: SS – siateczka sarkoplazmatyczna, pozostałe objaśnienia w tekście

NOWE WYNIKI DOTYCZĄCE FUNKCJI SS W SPRZĘŻENIU ELEKTRO-MECHANICZNYM I TRANSPORCIE Ca^{2+} W MIOCYTACH SERCA

Badania prowadzone w ciągu kilku ostatnich lat równolegle przez naszą grupę i grupę Langer'a z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles skłaniają do rewizji wyżej przedstawionych "klasycznych" poglądów na rolę SS w sprzężeniu elektro-mechanicznym i obiegu Ca^{2+} w miocytach serca. Badania te były po większej części prowadzone na izolowanych, pojedynczych komórkach mięśnia sercowego przy użyciu szeregu metod, takich jak: rejestracja skurczów komórek, *voltage clamping*, rejestracja stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia z użyciem Indo-1 oraz wymiany Ca^{2+} za pomocą izotopu $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

W ostatnich latach pojawiło się znakomite narzędzie badania funkcji SS. Jest nim tapsigargina (TG) [28], która wybiórczo blokuje Ca^{2+} -ATPazę SS nie blokując ATPazę sarkolemy ani aktomiozyny. TG nie ma również wpływu na aktywność kanałów Ca^{2+} SS ani na wrażliwość na Ca^{2+} białkowych układów kurczliwych [11, 31]. Rysunek 4 ilustruje doś-

wiadczenie, w którym badaliśmy wpływ TG na wychwyt Ca^{2+} przez SS i na czynność skurczową izolowanego miocytu komory serca świnki morskiej [16]. Górna część rysunku ilustruje kontrolną część doświadczenia. Miocyt znajdował się w przezroczystej komerce przepływowej umieszczonej na stoliku odwróconego mikroskopu (Nikon Diaphot) z kamerą telewizyjną zamontowaną w jego bocznym wyjściu. Specjalny układ sprzężony z kamerą TV i monitorem pozwalał na graficzny zapis zmian długości komórki w czasie jej skurczu. Połączone ze stymulatorem elektrody umieszczone na dnie kamery przepływowej pozwalały na elektryczne drażnienie komórki celem wywołania jej skurczu. Bardzo szybki przepływ płynu wokół miocytu pozwalał na wymianę jego środowiska w czasie ~ 300 ms. Wykorzystywano to m.in. dla krótkiej (1,0 s) perfuzji komórki płynem zawierającym 15 mM kofeiny. Kofeina bardzo szybko dyfunduje do komórki i aktywuje kanały wapniowe SS [14]. Uwolniony z niej Ca^{2+} aktywuje układy kurczliwe, co przejawia się fazowym przykurczem (rys. 4, strzałki). Amplituda tego przykurczu może być użyta jako względny wskaźnik zawartości Ca^{2+} w SS. Komórka nie reaguje skurczem na następne podanie kofeiny (następna strzałka), co wskazuje, że pierwsze podanie całkowicie pozbawiło SS wapnia. Następne pobudzenie elektryczne (kropki) inicjuje skurcz o bardzo małej amplitudzie, gdyż siateczka jest pozbawiona Ca^{2+} , ale jedno czy więcej pobudzeń elektrycznych przywraca reakcję komórki na kofeinę. Jest to skutek wyłapywania przez SS wapnia dyfundującego przez pobudzoną sarkolemmę. Tak więc komórki, których SS została wybiórczo pozbawiona Ca^{2+} przez kofeinę, są znakomitymi modelami dla badania wychwyty Ca^{2+} przez SS i jego modyfikacji przez interwencje doświadczalne. Dolna część rysunku 4 pokazuje, że TG całkowicie ten



Rys. 4. Wywołane drażnieniem elektrycznym (kropki) lub podaniem kofeiny (strzałki) skurcze izolowanego, pojedynczego miocytu serca świnki morskiej, szczegółowe objaśnienia w tekście (reproduковано za pozwoleniem wydawcy wg [16])

wychwył blokuje. Mimo wielokrotnych pobudzeń elektrycznych reakcja skurczowa na kofeinę nie powraca. Mimo że siateczka jest całkowicie pozbawiona Ca^{2+} , amplituda skurczów wywołanych elektrycznie zmniejsza się średnio tylko o 30%. Z innych naszych doświadczeń wynika, że TG nie zmienia maksymalnego natężenia I_{Ca} ani jego przebiegu w czasie [15]. Tak więc Ca^{2+} napływający w normalnej ilości przez aktywowane kanały wapniowe sarkolemy może ominąć zablokowaną przez TG siateczkę i aktywować całkiem silny skurcz (wbrew cytowanej we wstępie obiegowej hipotezie).

Jaka jest więc rola SS w sprzężeniu elektro-mechanicznym? Prawe zapisy obu części rysunku 4 ilustrują przebieg w czasie skurczu miocytu przed i po podaniu TG. Skurcz wywołany przy pełnej zawartości Ca^{2+} w SS narasta znacznie szybciej aniżeli skurcz aktywowany bezpośrednio przez Ca^{2+} napływający przez kanały wapniowe sarkolemy (dolny zapis). To porównanie nasuwa przypuszczenie, że główną funkcją SS w sprzężeniu elektro-mechanicznym miocytów serca jest kontrola ich przebiegu w czasie [14, 16]. Odbywa się to zapewne w ten sposób, że nienaruszona SS wychwytuje większość Ca^{2+} napływającego w czasie pobudzenia do sarkoplazmy i zatrzymuje go w swoich pęcherzykach końcowych do następnego pobudzenia. Jest on wtedy uwalniany w bezpośrednim sąsiedztwie sarkomerów, co zapewnia ich synchroniczną, szybką aktywację. Jeżeli wychwył Ca^{2+} przez SS jest zablokowany, Ca^{2+} dyfunduje z sarkolemy bezpośrednio do układów kurczliwych. Ze względu na znaczny dystans tej dyfuzji i obecność wielu czynników buforujących po drodze, jest to proces znacznie wolniejszy, a sarkomery podbłonowe są aktywowane wcześniej niż leżące w głębi komórki. Zapewne taki jest mechanizm powolnego narastania skurczu aktywowanego bezpośrednio przez wapń sarkolemalny.

Tego rodzaju interpretacja zakłada bardzo dużą wymianę Ca^{2+} pomiędzy komórką a przestrzenią zewnątrzkomórkową ze skurczu na skurcz, gdyż dużemu napływowi wystarczającemu do aktywacji układów kurczliwych musi odpowiadać równy ilościowo odpływ Ca^{2+} . Taki duży obrót Ca^{2+} stwierdzaliśmy już dawno w pracach wykonanych przy użyciu izotopu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [26]. Potwierdzony on został w niedawno opublikowanej pracy [17], w której stosując ultraszybką perfuzję pojedynczych komórek (wymiana środowiska w czasie ~ 25 ms) byliśmy w stanie blokować wymianę Na/Ca w wybranych przedziałach cyklu skurczowo-rozkurczowego. Zablokowanie wymiany ok. 50 ms po początku pobudzenia na przeciąg 1000 ms powoduje znaczny wzrost amplitudy skurczu i opóźnienie rozkurczu. Wynika stąd, że znaczna ilość Ca^{2+} jest usuwana z komórki w drodze wymiany Na/Ca już w czasie aktywacji skurczu i w czasie rozkurczu.

Istnieje szereg dowodów na to, że normalnie funkcjonująca SS może wychwytywać większość Ca^{2+} dyfundującego do sarkoplazmy przez błonę komórkową nie dopuszczając go w danym cyklu pobudzenia do układów kurczliwych. Jak to wyraźnie widać na rysunku 4, pierwszy normalny, elektrycznie wywołany po podaniu kofeiny skurcz ma bardzo małą amplitudę. Zjawisko to było na ogół interpretowane jako potwierdzenie ogólnie przyjętej hipotezy: pozbawienie SS wapnia powoduje bardzo słabą aktywację skurczu, gdyż jest on teraz inicjowany tylko przez bardzo małą ilość Ca napływającego przez sarkolemmę. Jednakże dolna część rysunku 4 pokazuje, że skurcz po-kofeinowy jest znacznie mocniejszy, jeżeli wychwył Ca^{2+} przez SS zostaje zablokowany przez TG. A więc tak wielkie osłabienie skurczu po kofeinie nie jest wynikiem bardzo małego napływu Ca^{2+} przez sarkolemmę, a wynikiem wychwytu tego Ca^{2+} przez opróżnioną SS.

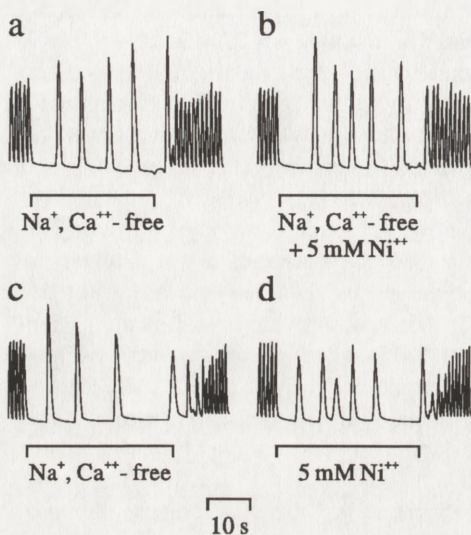
Alkaloid pochodzenia roślinnego ryanodyna wiąże się z receptorami kanałów wapniowych SS i utrzuła je w stanie pół-otwartym [19]. Dzięki temu wapń wychwytyany przez SS ucieka

z niej bardzo szybko [4]. Ucieczka może być tak szybka, że Ca^{2+} wychwytywany w czasie danego pobudzenia ucieka z SS przed zakończeniem rozkurczu [14]. Tak więc w momencie następnego pobudzenia siateczka jest już pusta. Temu opróżnieniu SS z wapnia towarzyszy zwykle mniej lub bardziej zaznaczone zmniejszenie siły skurczu (zależnie od gatunku zwierzęcia i warunków doświadczenia). To ujemne, inotropowe działanie ryanodyny jest na ogół interpretowane jako następny dowód na to, że SS jest głównym źródłem Ca^{2+} aktywującego skurcz. Jednakże w ostatnio przekazanej do druku pracy [15] stwierdziliśmy, że ujemny efekt inotropowy ryanodyny jest odwracany przez TG, mimo że do reszty pozbawia ona SS wapnia. Nie stwierdziliśmy przy tym zwiększenia natężenia I_{Ca} również i w komórkach zatrutych ryanodyną. Tak więc zmniejszenie siły skurczu przez ryanodynę nie jest wynikiem prostego opróżnienia SS z wapnia. Raczej jest ono skutkiem wychwyty przez SS większej części wapnia napływającego przez sarkolemmę z natychmiastowym wydzieleniem go w takim miejscu i w taki sposób, że nie może on aktywować układów kurczliwych. Następne doświadczenia przyniosły wskazówkę, na czym to może polegać. Otóż podobne odwrócenie efektów inotropowych ryanodyny jak TG daje perfuzja komórki płynem o obniżonym stężeniu Na^+ , co powoduje przyhamowanie wymiany Na/Ca . Wynik ten wskazuje, że Ca^{2+} uwalniany podobno z kanałów SS otwartych przez ryanodynę jest natychmiast usuwany z komórki w drodze wymiany Na/Ca . Rekapitulując, to co się dzieje w komórce potraktowanej ryanodyną, wygląda następująco. SS nadal, tak jak w normalnej komórce, wyłapuje większość Ca^{2+} napływającego przez kanały sarkolemmy (ryanodyna nie ma wpływu na Ca^{2+} -ATPazę SS [27]). Normalnie kanały wapniowe siateczki są na tyle mało aktywne pomiędzy pobudzeniami, że wychwytywany Ca^{2+} może być zatrzymany do następnego pobudzenia i aktywować skurcz. W komórce zatrutej ryanodyną ten Ca^{2+} jest natychmiast uwalniany z SS podobno i usuwany z komórki przez wymianę Na/Ca . Występuje tu jakby krótkie spięcie pomiędzy kanałami wapniowymi sarkolemmy, SS, wymianą Na/Ca i przestrzenią zewnątrzkomórkową. TG to krótkie spięcie przerywa kierując Ca^{2+} napływający przez sarkolemmę bezpośrednio do układów kurczliwych.

To, co dzieje się w komórce zatrutej ryanodyną, jest tylko skrajnym stanem zjawiska, jakim jest stałe wydzielenie Ca^{2+} z pęcherzyków końcowych SS również pomiędzy pobudzeniami i w stanie spoczynku. W czasie długiej przerwy pomiędzy pobudzeniami mięsień traci kurczliwość, co przejawia się bardzo małą amplitudą skurczów po-sporocynkowych. Zanikowi kurczliwości towarzyszy spadek zawartości Ca^{2+} w SS. Kofeina podana po długiej przerwie w drażnieniu nie wywołuje prawie żadnej odpowiedzi skurczowej [14]. Zablockowanie wymiany Na/Ca na samym początku spoczynku komórki powoduje wystąpienie serii fazowych przykurczów (rys. 5). Przykurcze nie występują, jeżeli Ca^{2+} zostaje usunięty z SS przed zablockowaniem wymiany Na/Ca za pomocą kofeiny lub jeżeli przepływ Ca^{2+} przez SS zostaje zablockowany przez TG [30]. Doświadczenia te dowodzą, że źródłem wapnia aktywującego fazowe przykurcze jest SS. Wapń jest więc stale w stanie spoczynku komórki lub pomiędzy pobudzeniami uwalniany z SS do przestrzeni podbłonowej, a stamtąd usuwany z komórki w drodze wymiany Na/Ca . Jeżeli zostaje ona zablockowana, stężenie Ca^{2+} w otoczeniu kanałów wapniowych pęcherzyków końcowych SS osiąga wartość progową dla ich pełnej aktywacji. Uwolniony Ca^{2+} aktywuje układy kurczliwe, a następnie jest z powrotem wyłapywany przez kanalikową część siateczki, co powoduje rozkurcz. Wielokrotny obieg Ca^{2+} na tej kołowej drodze powoduje występowanie wielokrotnych przykurczów. Ich amplituda i częstotliwość nie zależą od bezwzględnej zawartości Ca^{2+} w SS, a od czasu, jaki upływa od ostatniego skurczu wywołanego rytmicznym drażnieniem elektrycznym do zablockowania wymiany

Na/Ca. Wynik ten sugeruje istnienie stałego przepływu Ca^{2+} na drodze: sarkoplazma – SS – przestrzeń podbłonowa – wymiana Na/Ca. Istotnie, można udowodnić, że SS wychwytuje wapń uwalniany do sarkoplazmy z mitochondriów [2, 29]. To samo ma zapewne miejsce w stosunku do innych miejsc wiązania Ca^{2+} w komórce. W miarę jak zapasy Ca^{2+} w sarkoplazmie ulegają zmniejszeniu na skutek transportu na wymienionej drodze, przepływ Ca^{2+} przez SS ustaje, wobec czego zablokowanie wymiany Na/Ca nie powoduje wystąpienia spontanicznych przykurczów. Wobec tego SS wydaje się być nie tylko ważnym ogniwem w procesie sprzężenia elektro-mechanicznego, ale również jednym z głównych, czynnych ogniw odkomórkowego transportu Ca^{2+} . Jej rola w tym procesie mogłaby polegać na generowaniu (kosztem energii rozpadu ATP rozkładanego przez Ca^{2+} -ATPazę SS) gradientu stężeń wapnia pomiędzy przestrzenią podbłonową a resztą sarkoplazmy. Ta czynność SS jest prawdopodobnie ściśle związana z czynnością sarkolemy (zewnątrznej lub ściany kanalików T), do której zwrócone są pęcherzyki końcowe.

Jak wynika z badań grupy Langer, wewnętrzna warstwa błony komórkowej może wiązać ~550 $\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{kg}$ mokrej wagi komórek, tj. ~25% komórkowego wapnia. Ogromna większość tego wapnia jest związana z miejscami o $K_D = 1,1 \text{ mM}$ i pojemności 84 nmol/mg sarkolemy. Sarkolemma ma również miejsca wiązania Ca^{2+} o $K_D = 13 \mu\text{M}$, ale pojemności tylko 7 nmol/mg sarkolemy [23]. Chemicznym substratem miejsc wiązania o niskim powinowactwie są fosfolipidy błony komórkowej, przede wszystkim fosfatydylseryna i fosfatydyloinyzyl, które obficie występują w warstwie wewnętrznej, w przeciwieństwie do zewnętrznej warstwy sarkolemy [25]. Wobec stężenia Ca^{2+} wynoszącego w ogólnej masie sarkoplazmy 0,06–0,1



Rys. 5. Wywołane drażnieniem elektrycznym skurcze izolowanego, pojedynczego miocytu serca świnki morskiej; na początku 30 s przerwy w drażnieniu komórkę perfundowano płynem nie zawierającym Na ani Ca lub zawierającym Ni w celu zablokowania wymiany Na/Ca; manewr ten powodował wystąpienie wielokrotnych, spontanicznych przykurczów, które nigdy nie występują w stanie spoczynku komórki, jeżeli wymiana Na/Ca jest czynna (reproduковано za pozwoleniem wydawcy wg [30])

μM w spoczynku i ok. 5 μM w czasie pobudzenia, ilość Ca^{2+} związaną z sarkolemmą musiałaby być bardzo mała. Jednakże kanały wapniowe pęcherzyków końcowych SS uwalniają wapń do wąskiej szczeliny, z której dyfuzja jest utrudniona. Przy założeniu, że błony ograniczające szczelinę podbłonową nie mają żadnych właściwości buforowych, stężenie Ca^{2+} w czasie pełnej aktywacji kanałów wapniowych SS w czasie pobudzenia powinno osiągnąć w szczelinie podbłonowej wartość do 1,0 mM [20] i spaść do 10^{-4} M w ciągu ok. 100 ms. Jednakże wewnętrzna powierzchnia błony wiąże wapń, a stężenie 1,0 mM jest bliskie K_D miejsc wiązania o niskim powinowactwie. Wobec tego błona komórkowa może silnie buforować Ca^{2+} uwolniony do przestrzeni podbłonowej. Jego maksymalne stężenie powinno wg obliczeń Peskoffa i wsp. [20] oscylować koło 10^{-1} mM , a spadki pomiędzy pobudzeniami

komórki być płytsze i osiągać $\sim 10^{-3}$ mM w czasie ok. 500 ms. Jak wynika z przedstawionych powyżej naszych badań [30], SS wydziela Ca^{2+} do przestrzeni podbłonowej również pomiędzy pobudzeniami i w czasie spoczynku komórki. Podtrzymuje to zapewne stężenie wapnia w przestrzeni podbłonowej na jeszcze wyższym poziomie. Tak więc interakcja SS i sarkolemmy może powodować utrzymywanie w szczelinach podbłonowych i w ich bezpośrednim otoczeniu stężenia Ca^{2+} znacznie wyższego niż w ogólnej masie sarkoplazmy. Podwyższone stężenie podsarkolemmalnego wapnia może mieć znaczenie dla jego odkomórkowego transportu w drodze wymiany Na/Ca.

Powinowactwo wymiennika Na/Ca do Ca^{2+} jest niskie ($K_D \sim 3 \mu\text{M}$) [21]. Jeżeli byłby on eksponowany na stężenia wapnia występujące w ogólnej masie sarkoplazmy, aktywność wymiany byłaby niska. Tymczasem aktywność ta jest bardzo wysoka i wymiana Na/Ca jest w stanie w ciągu kilkuset ms usunąć z komórki Ca^{2+} uwolniony z SS przez kofeinę [6, 17] lub Ca^{2+} , który napłynął przez maksymalnie aktywowane kanały wapniowe sarkolemmy [5]. Wysoka aktywność jest najprawdopodobniej wynikiem tworzenia, dzięki interakcji SS i sarkolemmy podbłonowej, frakcji Ca^{2+} o wysokim stężeniu. Jak wynika z ostatnich badań Frank i wsp. [9], nośniki wymiany Na/Ca są prawdopodobnie zlokalizowane w sarkolemnie naprzeciw pęcherzyków końcowych SS, co by je eksponowało na najwyższe stężenie wapnia, jakie istnieje w pobliżu błony komórkowej. Istnienie podbłonowej frakcji Ca^{2+} zostało bezpośrednio potwierdzone w bardzo subtelnych badaniach wymiany tego jonu w izolowanych miocytach przy użyciu izotopu $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Frakcja ta zawiera $\sim 350 \mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{kg}$ suchej masy komórek i jest wymieniana z $t_{1/2} = 650$ ms. Szybka wymiana lokalizuje tę frakcję w bezpośrednim kontakcie z sarkolemmą, a oporność na La^{2+} po jej wewnętrznej stronie. Wymiana tej frakcji ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym zależy wyłącznie od wymiany Na/Ca [23]. Jej zawartość Ca^{2+} rośnie po zablokowaniu wymiany Na/Ca, a spada po zablokowaniu przepływu Ca^{2+} przez SS przy pomocy TG [24].

Rekapitulując, SS jest zaangażowana w tworzenie podbłonowej frakcji wapnia, pozostającej w równowadze z Ca^{2+} związanym przez fosfolipidy wewnętrznej powierzchni sarkolemmy i wymienianej ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym w drodze wymiany Na/Ca. Tworzenie tej frakcji jest ważnym elementem odkomórkowego transportu Ca^{2+} , a więc homeostazy wapniowej komórki.

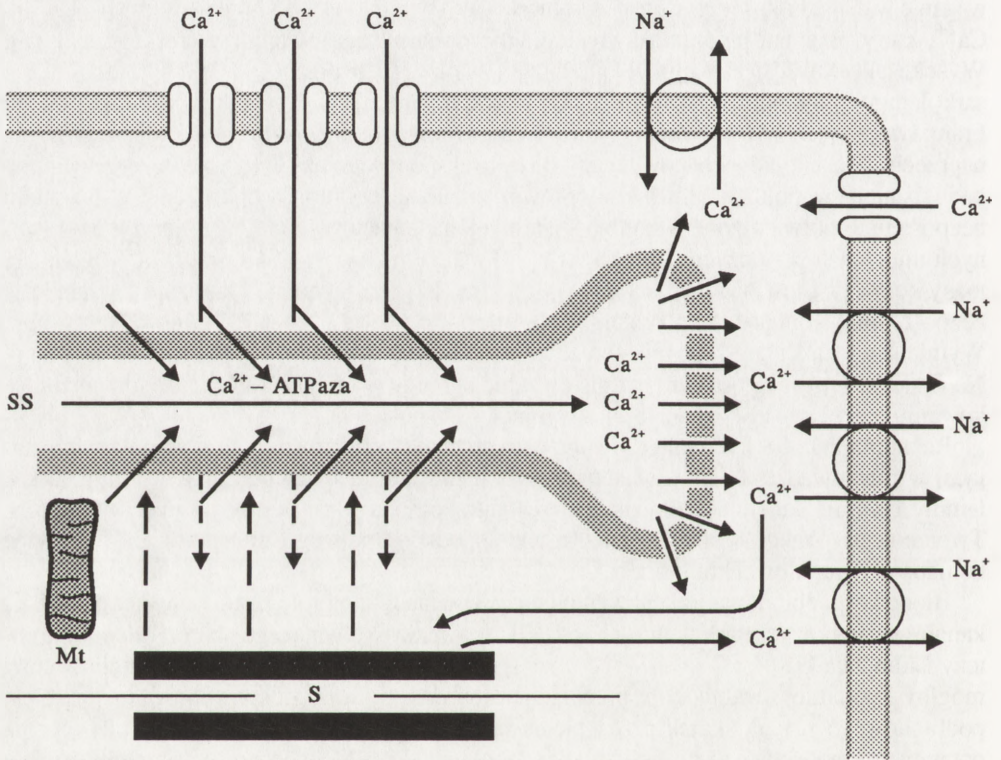
Błonowo-podbłonowa frakcja wapnia może spełniać i inną rolę, a mianowicie, obok SS i kanałów wapniowych sarkolemmy być źródłem wapnia aktywującego skurcz. Według hipotezy Lulmanna [18] Ca^{2+} związany z fosfatydylseryną na wewnętrznej powierzchni błony mógłby być z niej uwalniany w pobudzonej komórce. Byłoby to spowodowane spadkiem podbłonowego pH na skutek przesunięcia protonów ku zewnątrz w wyniku odwrócenia potencjału komórkowego na dodatni. Po repolaryzacji pH podbłonowe ulegałyby znowu podwyższeniu, co powodowałoby ponowne wiązanie wapnia.

PODSUMOWANIE

Funkcja SS miocytów serca z pewnością nie sprowadza się do roli zbiornika wapnia aktywującego skurcz i pracującego w obiegu prawie zamkniętym, jak to przedstawiono na "klasycznym" schemacie na rysunku 3. Z badań ostatnich 5 lat wynika, że siateczka jest ważnym, czynnym ogniwem w odkomórkowym transporcie wapnia na drodze: sarkoplazma

– kanałki podłużne siateczki – pęcherzyki końcowe siateczki – szczelina (przestrzeń) podbłonowa – wymiana Na/Ca, co ilustruje rysunek 6.

SS ma na tej drodze 2 czynniki i podlegające regulacji miejsca. Pierwszym z nich jest Ca^{2+} -ATPaza kanałków podłużnych. Jej aktywność jest tak duża, że może ona wylapywać większość Ca^{2+} napływającego przez kanały wapniowe sarkolemy i ew. uwalnianego z wewnętrznej jej powierzchni. Może ona też skutecznie konkurować o wapń z innymi organelami, takimi jak mitochondria lub białkowymi miejscami wiązania. Energia uwalniana przez tę ATPazę jest wykorzystywana do tworzenia gradientu stężeń Ca^{2+} pomiędzy wnętrzem



Rys. 6. Schemat ilustrujący proponowaną modyfikację modelu mechanizmu sprzężenia elektro-mechanicznego i rolę siateczki sarkoplazmatycznej w obrocie Ca^{2+} w miocytach serca, dokładne objaśnienia w tekście

pęcherzyków końcowych SS a sarkoplazmą. Dzięki temu gradientowi może funkcjonować drugie czynne miejsce, jakim są kanały wapniowe SS. Stopień ich aktywacji pomiędzy pobudzeniami z jednej strony reguluje ilość Ca^{2+} wydzielanego do przestrzeni podbłonowej, a więc tworzenie podbłonowej frakcji Ca^{2+} , a z drugiej decyduje o tym, ile Ca^{2+} wychwyta-

nego z sarkoplazmy może być zatrzymane (spiętrzone) w pęcherzykach końcowych przed następnym pobudzeniem komórki.

Wapń uwalniany z pęcherzyków końcowych pomiędzy pobudzeniami jest w całości usuwany z komórki w drodze wymiany Na/Ca. A więc stopień aktywacji kanałów wapniowych SS w tym okresie wpływa na wielkość odkomórkowego transportu Ca^{2+} . Uwolnienie do szczeliny podbłonowej naraz dużej ilości Ca^{2+} na początku pobudzenia komórki znacznie przekracza możliwość usunięcia go na zewnątrz przez wymianę Na/Ca. Większość tego Ca^{2+} dyfunduje do sarkoplazmy i aktywuje skurcz. Jednakże i w tej sytuacji wymiana Na/Ca konkuruje o wapń z układami kurczliwymi. Dowodzi tego znaczne wzmocnienie skurczu, jakie obserwuje się po zablokowaniu wymiany Na/Ca ok. 50 ms po początku pobudzenia [17]. Od ilości i rozmieszczenia Ca^{2+} uwolnionego z SS w czasie pobudzenia zależy siła skurczu i jego przebieg w czasie. Jednakże ponieważ ilość Ca^{2+} dyfundującego z sarkolemy jest wystarczająca dla aktywacji silnego skurczu, SS odgrywa tu rolę raczej dystrybutora niż nieodzownego źródła.

Na zakończenie należy podkreślić, że powyższa hipoteza dotyczy przede wszystkim miocytów serc świnek morskich i tych gatunków, w których procesy sprzężenia elektro-mechanicznego przebiegają podobnie. Należą do nich królik, kot, a prawdopodobnie i człowiek. Wymaga ona znacznej modyfikacji w stosunku do serc szczurów, a prawdopodobnie chomików i myszy, u których procesy sprzężenia elektro-mechanicznego przebiegają odmiennie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALPERT NR, HASENFUSS G, MULIERT LA, BLANCHARD EM, LEAVOT BJ, ITTLEMANN F. The reorganization of the human and rabbit heart in response to hemodynamic overload. *Europ Heart J* 1992; **13** (suppl D): 9–16.
- [2] BASSANI JWM, BASSANI RA, BERS DM. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)*, 1993; **460**: 603–621.
- [3] BERS DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. *Developments in Cardiovascular Medicine*. 1991, vol 122, Dordrecht, Cluver Academic Publishers.
- [4] BERS DM, BRIDGE JHB, MACLEOD KT. The mechanism of ryanodine action in rabbit ventricular muscle evaluated with Ca-sensitive microelectrodes and rapid cooling contractures. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; **65**: 610–616.
- [5] BRIDGE JHB, SMOLLEY JR, SPITZER KW. Relationship between charge movements associated with I_{Ca} and $I_{\text{Na,Ca}}$ in cardiac myocytes. *Science* 1990; 376–378.
- [6] CALLEVAERT G, CLEEMAN L, MORADM. Caffeine induced Ca^{2+} release activates Ca^{2+} extrusion via Na/Ca exchange in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1989; **257**: C147–C152.
- [7] FABIATO A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; **85**: 247–289.
- [8] FABIATO A. Effects of ryanodine in skinned cardiac cells. *Federation Proc* 1985; **44**: 2970–2976.
- [9] FRANK JS, MALTANO G, REID D, MOLDAY RS, PHILIPSON KD. Distribution of the Na/Ca exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* 1992; **117**: 337–345.
- [10] HOLUBARSCH C, HASENFUSS L, THIERFELDER B, PIESKE B, JUST H. The heart in heart failure. Ventricular and myocardial alterations. *Europ Heart J* 1991; **12** (suppl C): 8–13.
- [11] KIRBY MS, SAGARA Y, GOW S, INUI G, LEDERER WJ, ROGERS TB. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 1992; **267**: 12545–12551.
- [12] LANGER GA, RICH TL. A discrete Na/Ca exchange-dependent Ca compartment in rat ventricular cells: exchange and localisation. *Am J Physiol* 1992; **262**: C1149–C1153.

- [13] LEWARTOWSKI B. Quantitative aspects of cellular calcium regulation during prestimulation in cardiac muscle: implications for steady-state conditions. (w) *The Interval-Force Relationship of the Heart*. Wyd. M.I.M. Noble i W.A. Seed. Cambridge University Press, 1992: 173–191.
- [14] LEWARTOWSKI B, HANSFORD RG, LANGER GA, LAKATTA EG. Contraction and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in single myocytes of guinea-pig heart: effect of ryanodine. *Am J Physiol* 1990; H1222–H1229.
- [15] LEWARTOWSKI B, RÓŻYCKA M, JANIĄK R. Thapsigargin reverses inotropic effect of ryanodine in ventricular myocytes of guinea-pig heart. *Am J Physiol* (oddane do druku).
- [16] LEWARTOWSKI B, WOLSKA BM. The effect of thapsigargin on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and contractions in single myocytes of guinea-pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 1993; **125**: 23–29.
- [17] LEWARTOWSKI B, WOLSKA BM, ZDANOWSKI K. The effect of blocking the Na-Ca exchange at intervals throughout the physiological contraction-relaxation cycle of single cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 1992; **24**: 967–976.
- [18] LULLMAN H, PETERS J. Role of plasmalemma for calcium homeostasis and for excitation-contraction coupling in cardiac muscle. (w) *Cardiac Metabolism*, wyd. A.J. Drake-Holland i M.I.M. Noble, John Wiley and Sons, Chichester, 1983: 1–18.
- [19] MEISSNER G. Ryanodine activation and inactivation of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1986; **261**: 6300–6306.
- [20] PESKOFF A, POST JA, LANGER GA. Sarcolemmal calcium binding sites in heart: II. Mathematical model for diffusion of calcium released from the sarcoplasmic reticulum into the diadic region. *J Membrane Biol* 1992; **129**: 59–69.
- [21] PHILIPSON KD. The cardiac Na-Ca exchange. (w) *Calcium and the Heart*. wyd. G.A. Langer, Raven Press, New York, 1990: 85–108.
- [22] POST JA, KUWATA JH, LANGER GA. A discrete Na-Ca exchange dependent Ca^{2+} compartment in the cultured neonatal rat heart cells. Characterisation, localisation, and possible physiological function. *Cell Calcium* 1993; **14**: 61–71.
- [23] POST JA, LANGER GA. Sarcolemmal calcium binding in heart: I. Molecular origin in "gas-dissected" sarcolemma. *J Membrane Biol* 1992; **129**: 49–57.
- [24] POST JA, LANGER GA. Cellular origin of the rapidly exchangeable calcium pool in the cultured neonatal rat heart cells. *Cell Calcium* 1992; **13**: 627–634.
- [25] POST JA, LANGER GA, OPDEN KAMP JAF, VERKLEIJ AJ. Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and "gas-dissected" membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **943**: 256–266.
- [26] PYTKOWSKI B, LEWARTOWSKI B, PROKOPCZUK A, ZDANOWSKI K, LEWANDOWSKA K. Excitation- and rest-dependent shifts of Ca in the guinea-pig ventricular myocardium. *Pflugers Arch* 1983; **398**: 103–113.
- [27] SUTKO JL, WILLERSON JT, TEMPLETON GH, JONES LR, BESH HR. Ryanodine: its alteration of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and suggested mechanism of action. *J Pharmacol Exp Therap* 1979; **209**: 37–47.
- [28] THASTRUP J, CULLEN PJ, DROBAK B, HANLEY MR, DAWSON AP. Thapsigargin, a tumor promoting factor, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA (biochemistry)* 1990; **87**: 2466–2470.
- [29] WOLSKA BM, LEWARTOWSKI B. Calcium in the in situ mitochondria of rested and stimulated myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1991; **23**: 217–226.
- [30] WOLSKA BM, LEWARTOWSKI B. The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the Ca^{2+} extrusion from the resting myocytes of guinea-pig heart: comparison with rat. *J Mol Cell Cardiol* 1993; **25**: 75–91.
- [31] WRZOSEK A, SCHNEIDER N, GRUENINGER S, CHIESI M. Effect of thapsigargin on cardiac muscle cells. *Cell Calcium* 1992; **13**: 281–292.

SUBSTANCJE ZMIENIAJĄCE AKTYWNOŚĆ KANALÓW POTASOWYCH ZALEŻNYCH OD ATP

MODULATORS OF ATP SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS

Adam SZEWCZYK, Beata MIKOŁAJEK, Maciej J. NAŁĘCZ

Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Warszawa

Streszczenie. Artykuł omawia podstawowe właściwości kanałów potasowych zależnych od ATP (K_{ATP}). Potencjał błonowy wielu komórek jest kontrolowany przez kanały K_{ATP} , których aktywność z kolei zależy od poziomu metabolizmu komórkowego. Kanały K_{ATP} zaangażowane są m.in. w procesie wydzielania insuliny z komórek β wysepek Langerhansa oraz wydzielania kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w centralnym układzie nerwowym. Szczegółowo omówiono związki chemiczne, które oddziałują z kanałami K_{ATP} , ze szczególnym uwzględnieniem sulfonoczników i aktywatorów kanałów potasowych. Substancje te stanowią nie tylko ważne narzędzie badawcze kanałów potasowych, ale znalazły również zastosowanie w terapii m.in. cukrzycy typu II, nadciśnienia i astmy.

Słowa kluczowe: kanały potasowe, sulfonoczniki, ATP, aktywatory kanałów

Summary. The article describes basic properties of ATP sensitive potassium channels (K_{ATP}). These channels control membrane potential in different cell types and couple it to the level of cellular metabolism. They are involved in secretion of insulin from β cells of Langerhans islets and gamma-aminobutyric acid (GABA) release in central nervous system. Interactions of sulfonylureas and activators of potassium channels with K_{ATP} channels are discussed. These substances are important not only as probes to characterize K_{ATP} channel but they are also currently used as drugs in therapy of type II diabetes mellitus, hypertension, asthma etc.

Key words: potassium channels, sulfonylureas, ATP, openers

WSTĘP

Od czasu odkrycia 10 lat temu pierwszego kanału potasowego zależnego od ATP (K_{ATP}) w błonie plazmatycznej mięśnia sercowego kanały te stały się obiektem badań wielu pracowni na całym świecie [66]. Kanały K_{ATP} zidentyfikowano w błonie plazmatycznej mięśni szkieletowych i gładkich, w komórkach β trzustki, w komórkach nerki oraz w centralnym układzie nerwowym [4, 7, 11, 59, 75, 94]. Opisano oraz wstępnie scharakteryzowano także kanały K_{ATP} w wewnętrznej błonie mitochondriów wątrobowych [42, 70, 99]. Niedawno dokonano klonowania kanału K_{ATP} z nerki szczura [40].

Dwa czynniki zadecydowały o tym, że badania kanałów K_{ATP} są niezwykle intensywnie prowadzone:

- Kanały K_{ATP} są, obok kanałów potasowych regulowanych jonami wapnia, elementem łączącym metabolizm komórki ze stanem elektrycznym błony plazmatycznej i wieloma zjawiskami przebiegającymi przy udziale błony plazmatycznej; aktywność tych kanałów ma wpływ np. na aktywność kanałów wapniowych zależnych od potencjału błonowego, i na procesy egzocytozy.
- Substancje chemiczne, które hamują lub aktywują kanały K_{ATP} , znalazły zastosowanie w terapii różnych schorzeń, np. cukrzycy typu II, nadciśnienia lub astmy.

Kanały K_{ATP} uznaje się za białka kontrolujące potencjał błonowy błony plazmatycznej komórek, w których ten kanał występuje. Najlepiej poznano kanał K_{ATP} w błonie plazmatycznej komórek β wysepek Langerhansa trzustki [71]. Kanał K_{ATP} jest zaangażowany w proces regulacji wydzielania insuliny. Wzrost poziomu glukozy we krwi prowadzi do wzrostu stężenia glukozy w cytoplazmie komórek β i dalej, w wyniku glikolizy i oksydacyjnej fosforylacji, do znacznego podniesienia poziomu ATP wewnątrz komórki. Zahamowanie kanału K_{ATP} przez ATP powoduje depolaryzację potencjału błonowego (z ok. -70 mV do ok. -30 mV), co aktywuje z kolei kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego. Napływający do komórki wapń uruchamia całą sekwencję zdarzeń prowadzących do wydzielania, w procesie egzocytozy, insuliny z komórek β trzustki. Co ciekawe, podobną rolę kanału K_{ATP} w procesie inicjowania egzocytozy GABA zaproponowano dla *substantia nigra* mózgu [3]. Jednakże należy w tym miejscu przypomnieć, że kanały K_{ATP} nie są jedynymi kanałami regulowanymi przez metabolizm komórek β trzustki [39] oraz że glukoza może regulować wypływ insuliny z komórek β niezależnie od aktywności kanałów K_{ATP} [36].

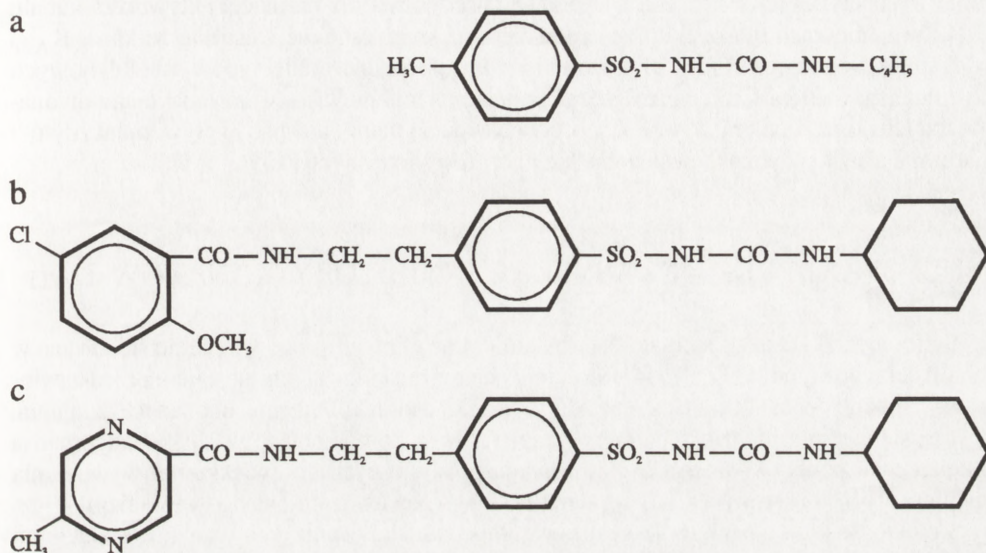
Patologia mięśnia sercowego charakteryzuje się zaburzeniami w aktywności kanałów potasowych. W wyniku niedokrwienia i niedotlenienia mięśnia sercowego następuje obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP i następnie aktywacja kanałów K_{ATP} [16, 17, 21, 101]. Prowadzi to z kolei do skrócenia czasu trwania potencjału czynnościowego i wzrostu zewnątrzkomórkowego potasu [51]. Stąd próby zastosowania glibenklamidu, związku hamującego kanały K_{ATP} , jako leku znoszącego arytmie serca.

W niniejszej pracy przedstawimy podstawowe wiadomości o substancjach regulujących aktywność kanałów K_{ATP} . Więcej informacji dotyczących regulacji i innych właściwości kanałów K_{ATP} znajdzie czytelnik w artykułach przeglądowych [18, 23, 24].

WPŁYW NUKLEOTYDÓW NA AKTYWNOŚĆ KANAŁÓW K_{ATP}

Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowego ATP hamuje aktywność kanałów K_{ATP} . Wartość K_i mierzona *in vitro* dla oddziaływań ATP z kanałem K_{ATP} waha się od 10 do 70 μ M. Nukleotydy, takie jak ADP, GDP i GTP, znoszą hamowanie przez ATP [13, 44]. Wydaje się, że zjawisko hamowania kanału nie obejmuje procesu fosforylacji białka kanałowego, ponieważ aktywność kanału może zostać zahamowana także analogami ATP, które nie ulegają hydrolizie (np. ATP γ S). Co więcej, ATP hamuje kanał pod nieobecność jonów magnezowych, niezbędnych dla aktywności fosforylacyjnej kinaz białkowych. W obecności ATP obserwujemy jednak przeciwny efekt, usunięcie magnezu zwiększa zdolność ATP do zaha-

mowania kanału. To wszystko sugeruje, że wolny (niezwiązany z magnezem) ATP, prawdopodobnie jon ATP^{4-} , jest odpowiedzialny za hamowanie kanału K_{ATP} . Wykazano również, że kanał K_{ATP} w mysich komórkach β jest hamowany przez analogi ATP ulegające fotoaktywacji [2].



Rys. 1. Struktura chemiczna sulfomoczników: A – tolbutamid, B – glibenklamid, C – glipizyd

Jednym z podstawowych problemów w trakcie pomiarów aktywności kanałów K_{ATP} w technice *patch-clamp* jest inaktywacja (ang. *run-down*) kanału. Objawia się ona zanikaniem aktywności kanału w czasie od kilku sekund do kilkunastu minut od momentu rozpoczęcia pomiarów. Inaktywacja kanału wynika z zależnych od wapnia reakcji defosforylacji białka kanałowego. Kilkuminutowa inkubacja fragmentu badanej błony z roztworem zawierającym jony magnezowe i ATP oraz następnie odpłukanie tego roztworu przywraca aktywność kanału (ang. *refreshment*).

Efekty ADP na aktywność kanału są jeszcze bardziej skomplikowane. ADP w niskich stężeniach aktywuje kanał, natomiast w stężeniach powyżej 0,5 mM kanał jest hamowany. Interesujące jest, że niehydrolizowalne analogi ADP mają zdolności wyłącznie hamujące. W czasie, gdy ATP jest obecne, dodatek ADP powoduje aktywację kanału.

Opisane powyżej oddziaływania ATP i ADP z kanałem potasowym mogą zostać wytlumaczone zarówno obecnością jednego miejsca wiążącego nukleotydy adeninowe (konkurencja między ATP i ADP), jak i dwoma miejscami wiążącymi (jedno dla ATP i jedno dla ADP). Dodatkowo, ostatnio przeprowadzone badania wskazują, że miejsce wiążące nukleotydy adeninowe znajduje się w tym samym białku, co miejsce wiążące sulfomoczniki [10, 87].

Zredukowane i niezredukowane formy nukleotydów pirymidynowych wpływają także na aktywność kanału K_{ATP} . Wysokie stężenia, wyższe od 500 μM , hamują aktywność kanałów

K_{ATP} , natomiast niskie stężenia działają aktywnie. W roztworach pozbawionych magnezu obserwuje się tylko hamowanie kanału przez nukleotydy pirymidynowe.

Nukleotydy guanidynowe (GTP, GDP oraz ich analogi, które nie ulegają hydrolizie) aktywują kanał w zakresie stężeń od 10 μM do 2 mM. Zaproponowano, że GDP jest fizjologicznym aktywatorem kanału K_{ATP} w mięśniach gładkich [45]. Efekty te zachodzą tylko w obecności jonów magnezowych. Te obserwacje oraz regulacja aktywności kanału K_{ATP} w komórkach β trzustki przez galaninę oraz somatostatynę sugerują, że kanał K_{ATP} oddziałuje z białkami G [26, 27]. Stosując różne pochodne nukleotydów guanidynowych postuluje się występowanie heterogennej populacji kanałów K_{ATP} w kardiocytach nowonarodzonych szczurów [9]. Podobne obserwacje poczyniono badając wpływ pinacydylu i siarczanu minoksydylu na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [104].

SULFOMOCZNIKI – KLASYCZNE INHIBITORY KANAŁÓW K_{ATP}

Sulfomoczniki (np. glibenklamid, tolbutamid oraz glipizyd) są powszechnie stosowane w terapii cukrzycy typu II [33, 37, 54]. Strukturę chemiczną kilku z tych substancji przedstawiono na rysunku 1. W ciągu kilku ostatnich lat wyjaśniono molekularny mechanizm ich działania. Uważa się, że sulfomoczniki blokując kanał K_{ATP} w komórkach β wysepek Langerhansa uruchamiają, podobnie jak ATP, ciąg zdarzeń prowadzących do zwiększenia wydzielania insuliny z tych komórek [6, 29]. Niezależnie od tego mechanizmu opisano wiele fizjologicznych efektów sulfomoczników, które nie wynikają z oddziaływania tych związków z kanałami K_{ATP} . I tak np. zaobserwowano, że sulfomoczniki hamują syntezę glukozy w wątrobie oraz stymulują aktywność glukokinazy w izolowanych hepatocytach [52].

Nie wszystkie sulfomoczniki jednakowo skutecznie blokują kanały K_{ATP} komórek β trzustki. I tak wartość K_i dla tolbutamidu wynosi 10–17 μM , natomiast dla najbardziej efektywnego inhibitora, glibenklamidu, wynosi ona od 4 do 20 nM. Warto jest podkreślić, że zdolność sulfomoczników do hamowania aktywności kanału w komórkach β trzustki, ich powinowactwo do receptora w tych komórkach (przypuszczalnie samego kanału K_{ATP}) oraz wielkość stosowanych dawek terapeutycznych w przypadku cukrzycy typu II są podobnie skorelowane dla różnych sulfomoczników [85]. Sulfomoczniki skutecznie hamują aktywność kanału, niezależnie od której strony błony plazmatycznej zostaną podane. Zdolność sulfomoczników do hamowania kanału nie jest uwarunkowana obecnością jonów magnezu. Wysokie powinowactwo glibenklamidu do kanału umożliwiło oczyszczenie peptydu wiążącego glibenklamid [11]. Zwiększenie kwasowości środowiska, zmieniającej stopień zjonizowania glibenklamidu, zwiększa zdolność tego związku do hamowania aktywności kanałów K_{ATP} [20, 34, 95, 106].

Niezależnie od bogatej obserwacji wpływu sulfomoczników na wydzielanie insuliny z trzustki obserwowano również wiele fizjologicznych efektów sulfomoczników w centralnym układzie nerwowym. Glibenklamid stymuluje wydzielanie prolaktyny z komórek przysadki mózgowej [55]. Oddziałuje on również z kanałami K_{ATP} w *substantia nigra* mózgu, stymulując sekrecję GABA [3, 50, 62].

Sulfomoczniki hamują również kanały K_{ATP} w komórkach mięśnia sercowego [35].

Sulfomoczniki, w zakresie mikromolowych stężeń, mogą również wpływać na aktywność innych kanałów, np. kanału chlorkowego, którego zaburzenie aktywności prowadzi do muko-

wiscydozy (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [90]. W komórkach ludzkiej neuroblastomy glibenklamid hamuje aktywność kanałów potasowych zależnych od potencjału i kanałów potasowych zależnych od wapnia [80].

INNE SUBSTANCJE BLOKUJĄCE KANAŁY K_{ATP}

Kanały K_{ATP} są również blokowane przez kilka klasycznych inhibitorów kanałów potasowych, takich jak: aminoakrydyna czy 4-aminopirydyna. Zidentyfikowano także kilkanaście innych substancji, które nie będąc sulfomocznikami, efektywnie hamują aktywność kanałów K_{ATP} . I tak opisano substancje będące antagonistami alfa-adrenoreceptorów, które jednocześnie blokują kanały K_{ATP} w komórkach β trzustki i stymulują wydzielanie insuliny z tych komórek [15, 28, 43].

Podobnie 8-metoksypsoralen, stosowany w terapii łuszczycy, hamuje aktywność kanału K_{ATP} w komórkach insulinomy oraz stymuluje wydzielanie insuliny z tych komórek [97]. Analogicznie działa amantadyna i sparteina [5]. Antagonista wapniowy TMB-8 również hamuje aktywność kanałów K_{ATP} w komórkach insulinomy [98]. Klonidyna blokuje kanały K_{ATP} w mysich komórkach β trzustki [73]. Chlorpromazyna, stosowana w leczeniu niektórych typów zaburzeń psychicznych, blokuje kanał K_{ATP} w komórkach insulinomy [60]. Prawdopodobnie takryna, związek łagodzący symptomy choroby Alzheimera, blokuje kanał K_{ATP} w komórkach β wysepek Langerhansa [46]. Podobnie działa substancja hypoglicemiczna AZ-DF-265 [81]. Związek przeciwdziałający arytmii serca, kwas 5-hydroksydekanowy, hamuje kanał K_{ATP} miocytów komorowych serca [67, 68]. Bipirydyna o właściwościach kardiotonicznych, AWD 122-60, hamuje kanał K_{ATP} w mięśniach szkieletowych [12]. Barbiturany hamują kanały K_{ATP} w komórkach β wydzielających insulinę [49]. Podobnie tłumaczy się działanie linoglyrydu [82].

AKTYWATORY KANAŁÓW K_{ATP}

Aktywatory kanałów K_{ATP} (ang. *potassium channel openers*) stanowią bardzo heterogenną klasę substancji, z punktu widzenia ich budowy chemicznej [30, 31]. Prekursorem tych substancji była kromakalima, substancja obniżająca ciśnienie obwodowe krwi i rozluźniająca mięśnie gładkie. Obserwowane zjawiska były wynikiem aktywacji kanałów potasowych przez kromakalimę w błonie plazmatycznej tych komórek. Podobnie tłumaczy się mechanizm działania diazoksydu, siarczanu minoksydylu, pinacydylu oraz wielu innych substancji obniżających ciśnienie krwi. Strukturę chemiczną kilku wybranych aktywatorów kanałów K_{ATP} przedstawiono na rysunku 2.

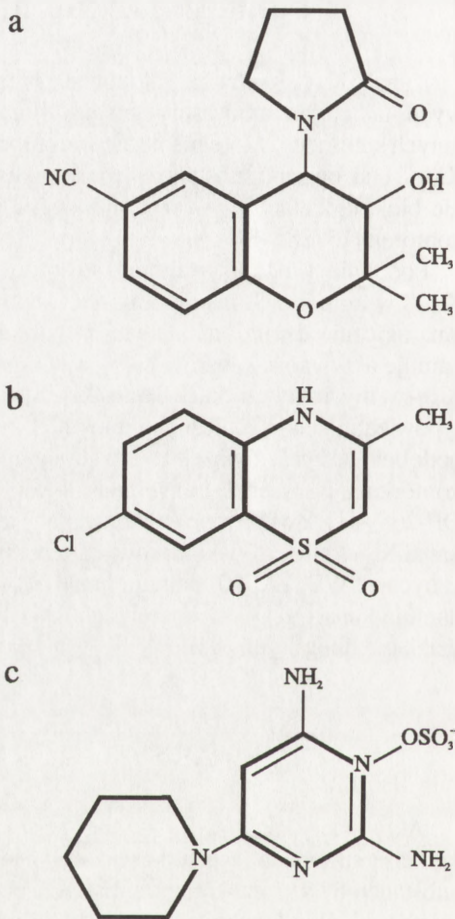
Kolejne lata przyniosły prawdziwą eksplozję syntez różnych związków chemicznych aktywujących kanały potasowe w różnych tkankach. Prawdopodobnie substancje te znajdą wielorakie zastosowania terapeutyczne [14]. Mechanizm oddziaływania aktywatorów z kanałami K_{ATP} jest nieznan, obecnie podejmuje się pierwsze próby charakterystyki miejsca wiążącego aktywatory [77]. Uważa się, że dla aktywacji kanału K_{ATP} w komórkach mięśnia

sercowego przez nikorandil wymagana jest obecność ADP, natomiast dla lemakalimy i pinacydylu taka obecność nie jest konieczna [89].

Opisano wiele różnych efektów aktywatorów kanałów potasowych na funkcje komórek, w których występują kanały K_{ATP} . Szczegółowo opisano oddziaływania aktywatorów kanałów potasowych z kanałami K_{ATP} mięśni gładkich [45]. I tak m.in. w mięśniach gładkich żyły wrotnej kanały K_{ATP} są aktywowane przez BRL 38227 [65]. NIP-121 i kromakalima oraz SDZ PCO 400 i RP 49356 indukują rozluźnienie tchawicy [79, 91, 93]. Podobnie działa aktywator LP-805 [48]. KRN 2391 oraz nikorandil powodują wzrost przepływu krwi w naczyniach wieńcowych oraz zmniejszają ciśnienie krwi [69]. Efekty te były antagonizowane glibenklamidem, co wskazuje na zaangażowanie kanału K_{ATP} mięśni gładkich w wyżej wymienione procesy. ER-001533 aktywuje kanały K_{ATP} w mięśniu sercowym [88]. Związek SR 44866 aktywuje kanały K_{ATP} w mięśniu szkieletowym [84]. Stwierdzono, że aktywator EMD 56431 może skutecznie przeciwdziałać niedokrwieniu serca [83]. Podobną rolę postuluje się dla kromakalimy [102]. Aktywatory kanałów, np. BRL 38227, mogą również rozszerzać płucne naczynia krwionośne [19, 72]. Aktywatory kanałów K_{ATP} działające na mięśnie gładkie dróg oddechowych mogą być stosowane w terapii astmy [92]. Diazoksyd aktywuje kanał K_{ATP} w komórkach β trzustki [86]. Hormonalna aktywacja wydzielania hormonu wzrostu z komórek części gruczołowej przysadki mózgowej jest hamowana przez aktywatory kanałów K_{ATP} , podczas gdy hormonalne hamowanie wydzielania hormonu wzrostu podlega supresji związkami hamującymi kanały K_{ATP} [22]. Nikorandil, pinacydyl oraz lemakalima rozszerzają naczynia krwionośne w mózgu [105]. Kromakalima aktywuje kanały K_{ATP} w neuronach hipokampa [74] oraz w *substantia nigra* mózgu [38].

Postulowana obecność kanału K_{ATP} w centralnym układzie nerwowym znalazła swoje potwierdzenie w badaniach behawioralnych. Stwierdzono, że podawanie kromakalimy bezpośrednio na *globus pallidus* stymuluje aktywność lokomotoryczną szczura [1].

Uważa się, że oddziaływanie aktywatorów kanałów potasowych z białkiem kanału potasowego nie powoduje chemicznej transformacji cząsteczki aktywatora. Wyjątkiem są aktywatory, które mogą być donorem azotu dla syntezy tlenku azotu, np. nikorandil. W tym



Rys. 2. Struktura chemiczna niektórych aktywatorów kanałów K_{ATP} : A – kromakalima, B – diazoksyd, C – siarczan minoksydylu

przypadku postuluje się dwa mechanizmy prowadzące do rozszerzania naczyń krwionośnych: bezpośrednie oddziaływanie tej substancji z białkiem kanałowym oraz stymulacja cyklicznej guanylowej, prowadząca do podniesienia poziomu cGMP [41]. W przypadku siarczanu minoksydylu zaobserwowano przeniesienie radioaktywnej siarki z grupy sulfonowej aktywatora na kilka białek. Pozostaje do określenia, czy ta reakcja jest odpowiedzialna za efekty fizjologiczne siarczanu minoksydylu [53]. Zaproponowano dwa mechanizmy działania diazoksydu: pierwszy, polegający na fosforylacji białka kanałowego w obecności aktywatora oraz drugi, postulujący oddziaływanie diazoksydu oraz nukleotydu purynowego związanego z magnezem, z białkiem kanałowym [49, 64].

Wykazano, że aromatyczne aldehydy i ketony mają właściwości aktywujące kanały miocytów komorowych serca [32]. Pochodne fluoresceiny mogą aktywować i hamować kanały K_{ATP} komórek β trzustki [25]. Milimolowe stężenia mleczanu aktywują kanały K_{ATP} mięśnia sercowego [47]. Wanadian aktywuje kanał K_{ATP} w mięśniu szkieletowym [63]. Kwasy tłuszczowe aktywują kanały K_{ATP} w komórkach insulinomy [61].

Kromakalima oraz pinacydyl mogą aktywować również kanały potasowe zależne od wapnia w mięśniach gładkich [96].

Szczegółowe informacje na temat farmakologii i zastosowań aktywatorów kanałów potasowych znajdzie czytelnik w artykułach przeglądowych [8, 76, 78, 103].

UWAGI KOŃCOWE

Nie omówiono tutaj regulacji kanałów K_{ATP} przez peptydy: somatostatynę, galaninę oraz endotelinę [22, 26, 57, 58] i angiotensynę blokującą kanały K_{ATP} w mięśniach gładkich [56]. Nie jest jasna rola jonów zewnątrzkomórkowych w modulowaniu oddziaływań ATP z kanałami K_{ATP} [100]. Opisane powyżej interakcje różnych substancji z kanałami K_{ATP} powinny przekonać czytelnika, jak ważna jest szczegółowa charakterystyka kanałów K_{ATP} . Umożliwi ona dogłębne zrozumienie mechanizmów funkcjonowania tego białka i jego roli w procesach przekazywania sygnałów w komórce. Istotne jest także zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływania substancji modulujących aktywność kanałów K_{ATP} w różnych tkankach. To z kolei powinno umożliwić bardziej racjonalne projektowanie związków chemicznych, zwiększenie ich specyficzności i skuteczności działania terapeutycznego.

PODZIĘKOWANIE

Praca ta była finansowana z projektu badawczego nr 6 PZ03 003 04 Komitetu Badań Naukowych.

LITERATURA

- [1] AMALRIC M, HEURTEAUX C, NIEOULLON A, LAZDUNSKI M. Behavioral effects of modulators of ATP-sensitive K^+ channels in the rat dorsal pallidum. *Eur J Pharmacol* 1992; **217**: 71–77.
- [2] AMMALA C, BOKVIST K, GALT S, RORSMAN P. Inhibition of ATP-regulated K^+ -channels by a photoactivatable ATP-analogue in mouse pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1092**: 347–349.

- [3] AMOROSO S, SCHMID-ANTOMARCHI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K^+ channels. *Science* 1990; **247**: 852–.
- [4] ASHCROFT FM, HARRISON DE, ASHCROFT SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 1984; **312**: 446–447.
- [5] ASHCROFT FM, KERR AJ, GIBSON JS, WILLIAMS BA. Amantadine and sparteine inhibit ATP-regulated K-currents in the insulin-secreting beta-cell line, HIT-T15. *Br J Pharmacol* 1991; **104**: 579–584.
- [6] ASHCROFT SJH, ASHCROFT FM. The sulfonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1175**: 45–59.
- [7] ASHFORD MLJ, STURGESS NL, TROUT NJ, GARDNER NJ, HALES CN. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Arch* 1988; **412**: 297–304.
- [8] ATWAL KS. Modulation of potassium channels by organic molecules. *Med Res Rev* 1992; **12**: 6: 569–591.
- [9] BENZ I, KOHLHARDT M. Differential sensitivity of cardiac K^+ (ATP) channels to guanine nucleotides – evidence for a heterogeneous channel population. *Eur Biophys J* 1992; **21**: 299–302.
- [10] BERNARDI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M. ATP/ADP binding sites are present in the sulfonylurea binding protein associated with brain ATP-sensitive K^+ channels. *Biochemistry* 1992; **31**: 6328–6332.
- [11] BERNARDI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M. Characterization, purification and affinity labelling of the brain [3 H]glibenclamide binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9816–9820.
- [12] BODEWEI R, HEHL S, NEUMCKE B. The cardiotoxic bipirydine AWD 122-60 inhibits adenosine triphosphate-sensitive potassium channels of mouse skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; **345**: 570–577.
- [13] BOKVIST K, AMMALA C, ASHCROFT FM, BERGGREN PO, LARSSON O, RORSMAN P. Separate processes mediate nucleotide-induced inhibition and stimulation of the ATP-regulated K^+ -channels in mouse pancreatic beta-cells. *Proc R Soc Lond Biol* 1991; **243**: 139–144.
- [14] CARMELIET E. Ion channel agonists: expectations for therapy. *Eur Heart J* 1991; **12** Suppl F: 30–37.
- [15] CHAN SL, DUNNE MJ, STILLINGS MR, MORGAN NG. The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K^+ ATP channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 1991; **204**: 41–48.
- [16] COETZEE WA. ATP-sensitive potassium channels and myocardial ischemia: why do they open? *Cardiovasc Drugs Ther* 1992; **6**: 201–208.
- [17] COLE WC, MCPHERSON CD, SONTAG D. ATP-regulated K^+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 1991; **69**: 571–581.
- [18] COOK NS, QUAST U. Potassium channel pharmacology. [w] Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential: Cook NS [red] Ellis Horwood 1990: 275–312.
- [19] CORNFIELD DN, McQUESTON JA, McMURTRY IF, RODMAN DM, ABMAN SH. Role of ATP-sensitive potassium channels in ovine fetal pulmonary vascular tone. *Am J Physiol* 1992; **263**: H1363–H1368.
- [20] CUEVAS J, BASSETT AL, CAMERON JS, FURUKAWA T, MYERBURG RJ, KIMURA S. Effect of H^+ on ATP-regulated K^+ channels in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1991; **261**: H755–H761.
- [21] DEUTSCH N, KLITZNER TS, LAMP ST, WEISS JN. Activation of cardiac ATP-sensitive K^+ current during hypoxia: correlation with tissue ATP levels. *Am J Physiol* 1991; **261**: H671–H676.
- [22] DE WEILLE JR, FOSSET M, EPELBAUM J, LAZDUNSKI M. Effectors of ATP-sensitive K^+ channels inhibit the regulatory effects of somatostatin and GH-releasing factor on growth hormone secretion. *Biochim Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1007–1014.
- [23] De WEILLE JR, FOSSET M, MOURRE C, SCHMID-ANTOMARCHI H, BERNARDI H, LAZDUNSKI M. Pharmacology and regulation of ATP sensitive K^+ channels. *Pflügers Arch* 1989; **414** Suppl 1: S80–S87.
- [24] De WEILLE JR, LAZDUNSKI M. Regulation of the ATP-sensitive potassium channel. *Ion Channels* 1990; **2**: 205–222.
- [25] De WEILLE JR, MÜLLER M, LAZDUNSKI M. Activation and inhibition of ATP-sensitive K^+ channels by fluorescein derivatives. *J Biol Chem* 1992; **267**: 4557–4563.
- [26] De WEILLE JR, SCHMID-ANTOMARCHI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M. ATP-sensitive K^+ channels that are blocked by hypoglycemic sulfonylureas in insulin secreting cells are activated by galanin, an hyperglycemic hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1312–1316.
- [27] De WEILLE JR, SCHMID-ANTOMARCHI H, FOSSET M, LAZDUNSKI M. Regulation of ATP-sensitive K^+ channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and kinase C and the role of cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2971–2975.
- [28] DUNNE MJ. Block of ATP-regulated potassium channels by phentolamine and other alpha-adrenoceptor antagonists. *Br J Pharmacol* 1991; **103**: 1847–1850.
- [29] DUNNE MJ, PETERSEN OH. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1071**: 67–82.

- [30] DUTY S, WESTON AH. Potassium channel openers. *Drugs* 1990; **40**: 785–788.
- [31] EDWARDS G, WESTON AH. Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 417–422.
- [32] FAN Z, NAKAYAMA K, SAWANOBORI T, HIRAOKA M. Aromatic aldehydes and aromatic ketones open ATP-sensitive K⁺ channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1992; **421**: 409–415.
- [33] FERNER RE. Oral hypoglycemic agents. *Med Clin North Am* 1988; **72**: 1323–1335.
- [34] FINDLAY I. Effects of pH upon the inhibition by sulphonylurea drugs of ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **262**: 71–79.
- [35] FINDLAY I. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac muscle by sulphonylurea drug glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **261**: 540–545.
- [36] GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse β cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1288–1295.
- [37] GOLDMANN JM. Oral hypoglycemic agents: an update of sulfonylureas. *Drugs of Today* 1989; **25**: 689–695.
- [38] HAUSSER MA, De WELLE JR, LAZDUNSKI M. Activation by cromakalim of pre- and post-synaptic ATP-sensitive K⁺ channels in substantia nigra. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 909–914.
- [39] HENQUIN JC. Adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels may not be the sole regulators of glucose induced electrical activity in pancreatic β -cells. *Endocrinology* 1992; **131**: 127–131.
- [40] HO K, NICHOLS CG, LEDERER WJ, LYTTON J, VASSILEV PM, KANAZIRSKA MV, HEBERT SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; **362**: 31–38.
- [41] HOLZMANN S, KUKOVETZ WR, BRAIDA C, POCH G. Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive K⁺ channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil. *Eur J Pharmacol* 1992; **215**: 1–7.
- [42] INOUE I, NAGASE H, KISHI K, HIGUTI T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991; **352**: 244–247.
- [43] JONAS JC, PLANT TD, HENQUIN JC. Imidazoline antagonists of alpha 2-adrenoceptors increase insulin release in vitro by inhibiting ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 8–14.
- [44] KAJIOKA S, KITAMURA K, KURIYAMA H. Guanosine diphosphate activates an adenosine 5'-triphosphate-sensitive K⁺ channel in the rabbit portal vein. *J Physiol Lond* 1991; **444**: 397–418.
- [45] KAJIOKA S, KITAMURA K, KURIYAMA H. Properties of ATP-sensitive K⁺ channel in the smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *Jpn J Pharmacol* 1992; **58** Suppl 2: 343P.
- [46] KARLSSON S, AHREN B. Effects of tacrine on insulin secretion and ⁸⁶Rb⁺ and ⁴⁵Ca²⁺ efflux from rat pancreatic islets. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **263**: 494–498.
- [47] KEUNG EC, LI Q. Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1772–1777.
- [48] KISHII K, MORIMOTO T, NAKAJIMA N, YANAZAKI K, TSUJITANI M, TAKAYANAGI I. Effects of LP-805, a novel vasorelaxant agent, a potassium channel opener, on rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol* 1992; **23**: 347–353.
- [49] KOZLOWSKI RZ, ASHFORD ML. Nucleotide-dependent activation of K_{ATP} channels by diazoxide in CRI-G1 insulin-secreting cells. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 34–43.
- [50] LEVESQUE D, GREENFIELD SA. Psychopharmacological evidence for a role of the ATP-sensitive potassium channel in the substantia nigra of the rat. *Neuropharmacology* 1991; **30**: 359–365.
- [51] LYNCH JJ, SANGUINETTI MC, KIMURA S, BASSETT AL. Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. *FASEB J* 1992; **6**: 2952–2960.
- [52] MARSHALL A, GINGERICH RL, WRIGHT PH. Hepatic effect of sulfonylureas. *Metabolism* 1970; **19**: 1046–1052.
- [53] MEISHERI KD, JOHNSON GA, PUDDINGTON L. Enzymatic and non-enzymatic sulfation mechanism in the biological actions of minoxidil. *Biochem Pharm* 1993; **45**: 271–279.
- [54] MELANDER A, BITZEN P-O, FABER O, GROOP L. Sulphonylurea antidiabetic drugs. *Drugs* 1989; **37**: 58–72.
- [55] MEUCCI O, LANDOLFI E, SCORZIELLO A, GRIMALDI M, VENTRA C, FLORIO T, AVALLONE A, SCHETTINI G. Dopamine and somatostatin inhibition of prolactin secretion from MMQ pituitary cells: role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrinology* 1992; **131**: 1942–1947.
- [56] MIYOSHI Y, NAKAYA Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 700–706.
- [57] MIYOSHI Y, NAKAYA Y, WAKATSUKI T, NAKAYA S, FUJINO K, SAITO K, INOUE I. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ Res* 1992; **70**: 612–616.

- [58] MIYOSHI Y, WAKATSUKI T, NOMURA M, SAITO K, NAKAYA Y, INOUE I. Endotheline blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Jpn J Pharmacol* 1992; **58** Suppl 2: 338P.
- [59] MOURRE C, WIDMANN C, LAZDUNSKI M. Sulfonylurea binding sites associated with ATP-regulated K⁺ channels in the central nervous system: autoradiographic analysis of their distribution and ontogenesis, and of their localization in mutant mice cerebellum. *Brain Res* 1990; **519**: 29–43.
- [60] MÜLLER M, De WELLE JR, LAZDUNSKI M. Chlorpromazine and related phenothiazines inhibit the ATP-sensitive K⁺ channel. *Eur J Pharmacol* 1991; **198**: 101–104.
- [61] MÜLLER M, SZEWCZYK A, De WELLE J, LAZDUNSKI M. ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells are activated by nonesterified fatty acids. *Biochemistry* 1992; **31**: 4656–4661.
- [62] MURPHY KP, GREENFIELD SA. ATP-sensitive potassium channels counteract anoxia in neurones of the substantia nigra. *Exp Brain Res* 1991; **84**: 355–358.
- [63] NEUMCKE B, WEIK R. Vanadate as an activator of ATP-sensitive potassium channels in mouse skeletal muscle. *Eur Biophys J* 1991; **19**: 119–123.
- [64] NIKI I, ASHCROFT SJ. Possible involvement of protein phosphorylation in the regulation of the sulphonylurea receptor of a pancreatic beta-cell line, HIT T15. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1133**: 95–101.
- [65] NOACK T, EDWARDS G, DEITMER P, WESTON AH. Potassium channel modulation in rat portal vein by ATP depletion: a comparison with the effects of levromakalim (BRL 38227). *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 945–955.
- [66] NOMA A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; **305**: 147–148.
- [67] NOTSU T, OHASHI K, TANAKA I, ISHIKAWA H, NIHO T, FUKUTAKE K, MIZOTA M. 5-Hydroxydecanoate inhibits ATP-sensitive K⁺ channel currents in guinea-pig single ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1992; **220**: 35–41.
- [68] NOTSU T, TANAKA I, TAKANO M, NOMA A. Blockade of the ATP-sensitive K⁺ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **260**: 702–708.
- [69] OGAWA N, FUKATA Y, KANETA S, JINNO Y, FUKUSHIMA H, NISHIKORI K. Comparison of KRN 2391 with nicorandil and nifedipine on canine coronary blood flow: antagonism by glibenclamide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; **20**: 11–17.
- [70] PAUCEK P, MIRONOVA G, MAHDI F, BEAVIS AD, WOLDEGIORGIS G, GARLID KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992; **267**: 26062–26069.
- [71] PETERSEN OH, DUNNE MJ. Regulation of K⁺ channels plays a crucial role in the control of insulin secretion. *Pflügers Arch* 1989; **414**: S115–S121.
- [72] PINHEIRO JM, MALIK AB. K⁺ ATP-channel activation causes marked vasodilation in the hypertensive neonatal pig lung. *Am J Physiol* 1992; **263**: H1532–H1536.
- [73] PLANT TD, JONAS JC, HENQUIN JC. Clonidine inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* 1991; **104**: 385–390.
- [74] POLITIDM, ROGAWSKI MA. Glyburide-sensitive K⁺ channels in cultured rat hippocampal neurons: activation by cromakalim and energy-depleting conditions. *Mol Pharmacol* 1991; **40**: 308–315.
- [75] QUAU U. Inhibition of the effects of the K⁺ channel stimulator cromakalim (BRL 34915) in vascular smooth muscle by glibenclamide and forskolin. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol* 1988; **337**: suppl RF2.
- [76] QUAU U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol* 1992; **6**: 279–293.
- [77] QUAU U, BRAY KM, BAUMLIN Y, ANDRES H, MANLEY PW. Identification of specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *Jpn J Pharmacol* 1992; **58** Suppl 2: 226P–231P.
- [78] QUAU U, COOK NS. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 1989; **10**: 431–435.
- [79] RAEBURN D, BROWN TJ. RP49356 and cromakalim relax airway smooth muscle in vitro by opening a sulphonylurea-sensitive K⁺ channel: a comparison with nifedipine. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **256**: 480–485.
- [80] REEVE HL, VAUGHAN PF, PEERS C. Glibenclamide inhibits a voltage-gated K⁺ current in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Neurosci Lett* 1992; **135**: 37–40.
- [81] RONNER P, HANG TL, KRAEBBER MJ, HIGGINS TJ. Effect of the hypoglycaemic drug (-)-AZ-DF-265 on ATP-sensitive potassium channels in pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol* 1992; **106**: 250–255.
- [82] RONNER P, HIGGINS TJ, KIMMICH GA. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells by nonsulfonylurea drug linogrilide. *Diabetes* 1991; **40**: 885–892.
- [83] SARGENT CA, DZWONCZYK S, GROVER GJ. Effect of the potassium channel opener EMD 56431 on globally ischemic rat heart. *Pharmacology* 1992; **45**: 260–268.

- [84] SAUVIAT MP, ECAULT E, FAIVRE JF, FINDLAY I. Activation of ATP-sensitive K^+ channel opener (SR 44866) and the effect upon electrical and mechanical activity of frog skeletal muscle. *Pflügers Arch* 1991; **418**: 261–265.
- [85] SCHMID-ANTOMARCHI H, De WEILLE J, FOSSET M, LAZDUNSKI M. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K^+ channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15840–15844.
- [86] SCHWANSTECHE C, DICKEL C, EBERS I, LINS S, ZUNKLER BJ, PANTEN U. Diazoxide-sensitivity of the adenosine 5'-triphosphate-dependent K^+ channel in mouse pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 87–94.
- [87] SCHWANSTECHE M, LOSER S, BRANDT C, SCHEFFER K, ROSENBERGER F, PANTEN U. Adenine nucleotide-induced inhibition of binding of sulfonylureas to their receptor in pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 1992; **105**: 531–534.
- [88] SHEN WK, TUNG RT, KURACHI Y. Activation of cardiac ATP-sensitive K^+ channel by ER-001533, a newly synthesized vasorelaxant. *Circ Res* 1992; **70**: 1054–1061.
- [89] SHEN WK, TUNG RT, MACHULDA MM, KURACHI Y. Essential role of nucleotide diphosphates in nicorandil-mediated activation of cardiac ATP-sensitive K^+ channel. A comparison with pinacidil and lemakalim. *Circ Res* 1991; **69**: 1152–1158.
- [90] SHEPPARD DN, WELSH MJ. Effect of ATP-sensitive K^+ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J Gen Physiol* 1992; **100**: 573–579.
- [91] SHIKADA K, TANAKA S. Potassium channel openers, NIP-121 and cromakalim, enhance the relaxation induced by sodium nitroprusside in the guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 1116–1120.
- [92] SMALL RC, BERRY JL, BURKA JF, COOK SJ, FOSTER RW, GREEN KA, MURRAY MA. Potassium channel activators and bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1992; **22**: 11–18.
- [93] SMALL RC, BERRY JL, FOSTER RW, BLARER S, QUAST U. Analysis of the relaxant action of SDZ PCO 400 in airway smooth muscle from the ox and guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 1992; **219**: 81–88.
- [94] SPRUCE AE, STANDEN NB, STANFIELD PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985; **316**: 736–738.
- [95] STANDEN NB, PETTIT AI, DAVIES NW, STANFIELD PR. Activation of ATP dependent K^+ currents in intact skeletal muscle fibers by reduced intracellular pH. *Proc R Soc Lond Biol* 1992; **247**: 195–198.
- [96] STOCKBRIDGE N, ZHANG H, WEIR B. Effects of K^+ channel agonists cromakalim and pinacidil on rat basilar artery smooth muscle cells are mediated by Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 172–178.
- [97] SZEWCZYK A, De WEILLE JR, LAZDUNSKI M. 8-Methoxypsoralen blocks ATP-sensitive potassium channels and stimulates insulin release. *Eur J Pharmacol* 1992; **216**: 323–326
- [98] SZEWCZYK A, De WEILLE JR, LAZDUNSKI M. TMB-8 (8-(N,N-dimethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate) inhibits the ATP-sensitive K^+ channel. *Eur J Pharmacol* 1992; **226**: 175–177.
- [99] SZEWCZYK A, PIKUŁA S, WOJTCZAK L, NAŁĘCZ MJ. ATP-sensitive K^+ channel in rat liver mitochondria: functional characteristics. [w] *Molecular Biology of Mitochondrial Transport Systems*. Colombini M, Forte M (red.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1993; w druku.
- [100] TREHERNE JM, ASHFORD ML. Extracellular cations modulate the ATP-sensitivity of ATP K^+ channels in rat ventromedial hypothalamic neurons. *Proc R Soc Lond Biol* 1992; **247**: 121–124.
- [101] VENKATESH N, LAMP ST, WEISS JN. Sulfonylureas ATP-sensitive K^+ channels, and cellular K^+ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res* 1991; **69**: 623–637.
- [102] VENKATESH N, STUART JS, LAMP ST, ALEXANDER LD, WEISS JN. Activation of ATP-sensitive K^+ channels by cromakalim. Effects of cellular K^+ loss and cardiac function in ischemic and reperfused mammalian ventricle. *Circ Res* 1992; **71**: 1324–1333.
- [103] WESTON AH, EDWARDS G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochem Pharmacol* 1992; **43**: 47–54.
- [104] WICKENDEN AD, GRIMWOOD S, GRANT TL, TODD MH. Comparison of the effects of the K^+ -channel openers cromakalim and minoxidil sulphate on vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1991; **103**: 1148–1152.
- [105] ZHANG H, STOCKBRIDGE N, WEIR B, VOLLRATH B, COOK D. Vasodilatation of canine cerebral arteries by nicorandil, pinacidil and lemakalim. *Gen Pharmacol* 1992; **23**: 197–201.
- [106] ZUNKLER BJ, TRUBE G, PANTEN U. How do sulfonylureas approach their receptor in the β -cell plasma membrane? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; **340**: 328–331.

ROLA KANAŁÓW JONOWYCH W PRZEMIESZCZANIU CHLOROPLASTÓW W GLONIE *MOUGEOTIA*

THE ROLE OF ION CHANNELS IN THE MOVEMENT OF CHLOROPLASTS IN *MOUGEOTIA*

Anna TROJAN

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin Instytutu Biologii Molekularnej UJ w Krakowie

Streszczenie. Zostały opisane cztery główne typy kanałów jonowych zbudowanych z białek zapewniających szybki przepływ jonów przez błony lipidowo-białkowe w roślinach. Na podstawie zdolności do selektywnego przewodzenia jonów wyróżniono kanały: wapniowe, chlorkowe, potasowe, protonowe (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , H^+). Występuje wiele podtypów, różniących się: kontrolą otwarcia, przewodnością, wrażliwością na inhibitory. Świadczy to o zróżnicowaniu strukturalnym białek budujących kanały. Ich funkcja w komórkach roślinnych jest jednak słabo poznana. Wiadomo, że biorą one udział w regulacji turgoru, spełniają jakąś rolę w przewodzeniu sygnału w komórce i tworzeniu potencjału czynnościowego. W plazmolemie komórek glonu *Mougeotia* stwierdzono obecność kanałów potasowych regulowanych Ca^{2+} i aktywowanych przez fitochrom. Próbowano znaleźć związek pomiędzy aktywnością tych kanałów i ruchem chloroplastów.

Słowa kluczowe: kanał jonowy, błona plazmatyczna, tonoplast, *Mougeotia*, ruchy chloroplastów

Summary. Four main types of channels have recently been described in plants according to ion selectivity: Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , H^+ channels. Many subtypes have been described differing in gating control, unitary conductance and pharmacology. They are involved in the regulation of turgor and membrane potential. They are also supposed to play a role in signal transduction in plant cells. The functions of ion channels are largely speculative. Ca^{2+} -regulated K^+ channels have been described in *Mougeotia*. These channels are activated by phytochrome. Attempts were made to determine if they play a role in the classic phytochrome response, chloroplast rotation in this alga.

Key words: ion channel, plasma membrane, tonoplast, *Mougeotia*, chloroplast movement

Wykaz skrótów: A23187 – jonofor wapniowy, ABA – kwas abscysynowy, A-9-C – kwas antraceno-9-karboxylowy, DCCD – 1,3-dicykloheksylokarbodiimid, DIDS – disulfonian 4,4-diiizotiocyjano-2,2-stilbenu, TEA^+ – jon tetraetyloamony, TMB-8 – chlorowodorek [8-(dietyloamino)-oktyl-3,4,5-trimetoksybenzoian].

I. WSTĘP

Żywa komórka ograniczona jest białkowo-lipidową błoną komórkową. Jej zrąb budowany jest przez dwuwarstwę lipidową, w której rozmieszczone są białka integralne. Na powierzchni

błony występują białka powierzchniowe, rozpuszczalne w wodzie i stosunkowo łatwo ekstrahowalne bez niszczenia struktury błony. Białka integralne zanurzone są w błonie, a ich łańcuchy polipeptydowe przebijają warstwę lipidową jedno- lub wielokrotnie. Łańcuchy te zawierają domeny hydrofobowe o konformacji α -helisy. Proces izolacji tych białek z błony wymaga stosowania detergentów i związany jest ze zniszczeniem struktury błony [43]. Błona komórkowa stanowi strukturalną barierę, oddzielającą wewnątrz komórki od bezpośredniego wpływu otoczenia, zapobiega swobodnemu przepływowi jonów, substratów i metabolitów. Białka, występujące w błonach, zapewniają wymianę substancji pomiędzy komórką i jej otoczeniem w sposób kontrolowany. W procesach tych zaangażowane są układy białek integralnych budujące w błonach pompy i kanały jonowe. Wiele z tych białek jest enzymami (szczególnie w pompach jonowych) pozwalającymi na utrzymanie gradientów stężeń jonów w poprzek błony.

Białka receptorowe, białka przenoszące i przetwarzające sygnały oraz białka budujące pompy i kanały jonowe tworzą złożone układy, umożliwiające komunikowanie się komórki z otoczeniem oraz wzajemne oddziaływanie komórek pomiędzy sobą, kontrolując liczne procesy przebiegające we wnętrzu komórki [43]. Badania prowadzone głównie na komórkach zwierzęcych doprowadziły do poznania białek wielu typów kanałów. Przyczyniło się do tego wprowadzenie nowych metod elektrofizjologicznych, m.in. metody stabilizacji potencjału skrawka błony komórkowej (*patch-clamp*) [53]. Możliwość określenia struktury pierwszorzędowej białek oraz sekwencji nukleotydowej genów odpowiedzialnych za syntezę białek kanałowych pozwoliło na bliższe określenie budowy niektórych kanałów jonowych oraz ich funkcji. W przypadku komórek roślinnych informacje na temat kanałów jonowych są ograniczone, chociaż w ostatnich latach pojawiły się doniesienia o obecności białek kanałowych, także w błonach komórek roślinnych. Jak do tej pory, nie została jednak określona molekularna budowa któregośkolwiek z kanałów, a ich funkcje nie są wyraźnie sprecyzowane. Przyczyną tego jest m.in. obecność ściany komórkowej na powierzchni komórki roślinnej, utrudniająca badania nad błoną. W celu rozpoczęcia doświadczeń nad kanałami jonowymi konieczne jest usunięcie ściany za pomocą enzymów. Proces trawienia wymaga dobrania odpowiednich enzymów trawiących. Dodatkowo może on powodować zmiany funkcji biologicznych komórki. Przed rozpoczęciem badań niezbędne jest sprawdzenie, jakie właściwości nietkniętej komórki roślinnej zostały zachowane w protoplastach. Przy badaniach elektrofizjologicznych mogą także wystąpić trudności z przyssaniem pipety do błony protoplastu. Jest to czynność dużo trudniejsza niż w wypadku pozbawionej ściany komórkowej komórki zwierzęcej [35]. Niniejsza praca omawia dostępne informacje dotyczące opisanych dotychczas kanałów jonowych u roślin i badania nad możliwością udziału kanałów w ruchu chloroplastów w glonie *Mougeotia*.

II. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROŚLINNYCH KANAŁÓW JONOWYCH

Białka kanałów jonowych zapewniają szybki, pasywny, elektrogeniczny przepływ jonów przez błonę. Tworzą one białkową porę przebijającą warstwę lipidowo-białkową. Zmniejszają energię wymaganą do transportu jonów przez błonę z 250 do 20 kJ/mol. Pomiędzy poszcze-

gólnymi białkami kanałowymi występują znaczne różnice. Klasyfikuje się je na podstawie następujących cech:

- 1) selektywności względem jonów (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , H^+),
- 2) czynników kontrolujących zamykanie i otwieranie kanałów (ang. *gating*),
- 3) przewodności jednostkowej (ang. *unitary conductance*),
- 4) blokowania funkcji kanałów przez określone inhibitory i blokery (ang. *pharmacology*).

Otwarty kanał katalizuje przepływ 10^6 – 10^8 jonów na sekundę [69]. Poziom przepływu jonów przy określonym napięciu elektrycznym i składzie jonowym środowiska zewnętrznego komórki jest istotnym parametrem opisującym kanały w stanie otwarcia. Pomiar prądu jonowego umożliwia identyfikację poszczególnych typów kanałów. Występują często tzw. podstany, charakteryzujące się mniejszym przepływem jonów w stosunku do stanu pełnego otwarcia. Przewodzenie jonów przez kanały w najprostszym układzie może być opisane jako prosta dyfuzja przez pory wypełnione wodą [69], ale w niektórych wypadkach muszą być zastosowane bardziej złożone modele. W przypadku kanałów potasowych u *Nitella* przyjmuje się, że jony wiążą się z białkiem kanałowym. Ten model wyjaśnia wysycenie przepływu jonów przy pewnej wartości różnicy potencjałów (PD); dalszy jej wzrost nie wpływa na zwiększenie ilości przepuszczanych jonów [29]. Tłumaczy się to interakcją jonów z białkami kanałowymi, co obrazowo bardziej przypomina model pytona polykającego posiłek niż model piłki toczącej się w rurze [69]. Selektyność kanałów jonowych przejawia się tym, że przepuszczają pewne jony łatwiej i szybciej niż inne. Niektóre kanały wykazują bardzo słabą selektywność. Są to te, które dokonują selekcji przepuszczanych cząstek na podstawie jednej tylko cechy: ładunku lub masy cząsteczkowej [29]. Inne białka kanałowe selekcionują cząsteczki na podstawie zarówno ładunku, jak i ich wielkości oraz energii wymaganej do hydratacji [67]. To powoduje, że tylko niewiele rodzajów jonów może zostać przepuszczonych przez określone białko. Przewodzenie, selektywność oraz kontrola otwierania i zamykania określają kinetyczne właściwości danego kanału jonowego. Próbuje dokonywać się także opisu struktury i konformacji tych białek w błonie. W przeciwieństwie do kanałów w komórkach zwierzęcych, u roślin niewiele jeszcze wiadomo na ten temat. Kanały roślinne próbuje się identyfikować metodami immunologicznymi oraz genetyki molekularnej [69]. Stwierdzono podobieństwo pomiędzy kanałem potasowym, występującym u *Drosophila* i białkowym składnikiem błony drożdży o masie cz. 87 kDa [4]. Również dane farmakologiczne, określające wpływ związków chemicznych na aktywność kanałów, umożliwiają porównywanie kanałów roślinnych i zwierzęcych oraz struktury [30,69]. Charakterystykę opisanych dotychczas kanałów jonowych oraz ich postulowane funkcje w komórkach roślinnych przedstawia tabela 1. Kanały jonowe biorą udział w dużej liczbie procesów zachodzących w roślinach, ale próby określenia bliższego związku pomiędzy kanałem i jego funkcją są zwykle spekulatywne [35,69]. Dotychczas ustalono jedynie, że w organizmach roślinnych uczestniczą w regulacji turgoru oraz spełniają bliżej jeszcze nie określoną rolę w przewodzeniu sygnałów. Odpowiedzialne są prawdopodobnie za utrzymanie potencjału błony komórkowej i tonoplastu oraz wyrównywanie ładunków po oświetleniu w błonach tylakoidów. Są aktywne także w procesach komórkowych wymagających dużych zmian potencjału osmotycznego. Kanałom jonowym przypisuje się także znaczenie w reakcjach ruchowych różnych części roślin, wymagających prawdopodobnie znacznego przepływu jonów [55]. Przyjmując udział kanałów jonowych w tworzeniu potencjałów membranowych komórki można wskazać na te procesy, w których zmiany potencjału odgrywają istotną rolę. Jest to m.in. sygnalizacja międzykomórkowa stymulująca np. ruchy roślin. Potencjały elektryczne wpływają na ruch również poprzez redukcję turgoru

TABELA 1. Charakterystyka kanałów jonowych w komórkach roślinnych [69]

Typ kanału	Lokalizacja	Kontrola otwarcia	Przewodność	Selektywność	Inhibitory	Występowanie	Funkcja	Literatura
Ca ²⁺	błona komórkowa	otwieranie przy depolaryzacji; zamykanie przez defosforylację	200 pS w 100 mM KCl	Rb ⁺ > K ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺ ; Ba ²⁺ > Sr ²⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺	Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , La ³⁺ ; nifedypina	<i>Charophyta</i>	wieloraka słabo poznana	8,49,62,78
jw.	?	?	?	?	verapamil	<i>Daucus carota</i> ¹⁾	?	26
tonoplast		stymulowane przez IP ₃	30 pS w 1,5 mM Ca ²⁺	?	heparyna ²⁾ , TMB-8	<i>Neurospora</i> , <i>Acer</i> , <i>Avena</i>		1,16,54
Cl ⁻	błona komórkowa	otwarcie – wzrost stężenia Ca ²⁺ w cytoplazmie	?	Cl ⁻ /K ⁺ = 5–7	A-9-C, kwas etakrynowy	<i>Charophyta</i> komórki szparkowe	redukcja turgoru w komórce, wypływ Cl ⁻	38,49,59,61
jw.		otwarcie – hyperpolaryzacja oraz niskie pH środowiska	7–44 pS w 4 mM Cl ⁻ ; wiele podstanów	Cl ⁻ /K ⁺ = 20:1	A-9-C, kwas etakrynowy Zn ²⁺ , La ³⁺ , ABA (100 μM/l)	<i>Chara</i> , <i>Asclepias</i>	regulacja siły protonowej	17,56,71
jw.		długi czas otwierania i zamykania	20 pS w 750 mM KCl	?	?	<i>Beta vulgaris</i>	?	67
jw.		aktywowana przez rozciąganie błony (ang. <i>stretch-activated</i>)	100 pS w 200 mM KCl	Cl ⁻ /K ⁺ = 10:1	?	<i>Nicotiana</i> – mezofil	regulacja turgoru	22
Tonoplast		otwieranie – wzrost stężenia Ca ²⁺ w cytoplazmie	?	?	A-9-C	<i>Charophyta</i>	regulacja stężenia Cl ⁻ w cytoplazmie	41,49
jw.		zależna od napięcia	?	?	?	<i>Chara</i>	?	69
jw.	?		30 pS w 130:15 mM Cl ⁻	NO ⁻ /Cl ⁻ = 2	A-9-C	pęcherzyki z <i>Chara corallina</i>	wypływ Cl ⁻ z wakuoli do cytoplazmy	71
Zewnętrzna błona na mitochondria		zamykanie – różnica potencjałów różna od 0 mV	3,9 nS w 1 mM KCl	słabo selektywny dla anionów	?	rośliny wyższe i grzyby	?	50,64

K ⁺	Błona komórkowa	Otwarcie – depolaryzacja (<i>outwards rectifiers</i>)	20–65 pS w 100 mM K ⁺	Tl ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > TEA ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , Cs ⁺ , Ba ⁺ , Al ³⁺ , TEA ⁺ , Ca ²⁺ zewnętrzny i cytoplazmatyczny	rośliny wyższe głony	Repolaryzacja błony redukcja turgoru w komórcie	2,3,5–7,14,15, 18,23,33,37, 40,52,56–58, 63,66,68
jw.		otwarcie – depolaryzacja	34 pS w 100 mM KCl	wysoka selektywność dla kationów	Niewrażliwe na, TEA ⁺ , Ba ⁺ , Cs ⁺	<i>Amaryllidaceae</i> ?	?	69
jw.		jw.	120 pS w 130 mM KCl	K ⁺ /Na ⁺ = 30	?	pęcherzyki z <i>Acetabularia</i>	?	10, 11
jw.		otwarcie – hyperpolaryzacja (<i>inward rectifiers</i>)	5–10 pS w 100:10 KCl	K ⁺ > Rb ⁺ > NH ₄ ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺ > Cs ⁺ > TEA ⁺	Al ³⁺ , Ca ²⁺ cytoplazmatyczny	<i>Nitella</i> , <i>Avena</i> – pobieranie K ⁺ przy mezoofil, komórki szparki		15,21,57,58, 61,66
K ⁺	jw.	aktywowana przez rozciąganie błony (ang. <i>stretch-activated</i>)	36 pS w 170 mM CsCl	Cs ⁺ /Cl ⁻ = 1,6	?	drożdże	regulacja turgoru	28
	Tonoplast	zależna od potencjału tonoplastu	60–80 pS w 100 mM KCl	zmienna, niewielka selektywność względem kationów	Zn ²⁺ , A-9-C, DIDS, Ba ²⁺ , TEA ⁺	liczne głony i rośliny wyższe	utrzymywanie stałego potencjału tonoplastu; regulacja sięgnięcia jonów w cytoplazmie	32,33
jw.		gwałtowne otwarcie przy PD różnym od 0 mV	30–40 pS w 100 mM KCl	słaba selektywność względem kationów	0,3 μM Ca ²⁺	<i>Beta</i> – korzeń	?	31,34
jw.		zamknięcie przy PD różnym od –10 mV; niezbędne sięgnięcie 1 mM Ca ²⁺ w cytoplazmie	435 pS w 300 mM KCl	Cs ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺ K ⁺ /Cl ⁻ > 9	Li ⁺ aktywowane przez 100 μM DIDS	drożdże	?	67,74
jw.		zamykanie przy PD –100 mV – –150 mV	170 pS w 150 mM KCl	K ⁺ /Cl ⁻ = 7,0	TEA ⁺	pęcherzyki z <i>Chara</i>	?	9, 39,44,48,71
H ⁺	Błona komórkowa	otwieranie przy wysokim pH środowiska	?	?	DCCD	<i>Chara</i>	?	13

¹⁾Różnice we wrażliwości obu opisanych kanałów Ca²⁺ na inhibitory mogą wynikać z odmienności technik, stosowanych do uzyskania protoplastów, ²⁾ u *Neurospora* – niewrażliwe na heparynę.

komórkowego w wyniku znacznego wypływu jonów K^+ i Cl^- . Dlatego też zmiany potencjału błonowego mogą być istotnym czynnikiem w redukcji ciśnienia turgorowego jako reakcji na szok hypoosmotyczny. Wydają się również mieć znaczenie w reakcji roślin na zranienia, stymulując procesy gojenia i wzrost poziomu oddychania. Wzrostowi stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia – przy udziale kanałów jonowych – przypisuje się reakcję rośliny na nagłe zmiany temperatury [51]. Sugeruje się, że kanały wapniowe w siateczce wewnątrzplazmatycznej mogą kontrolować aktywność wrzeciona mitotycznego [77]. Stwierdzono wzrost pobierania jonów wapnia przez komórki *Mougeotia* po naświetleniu światłem czerwonym, co sugeruje związek pomiędzy kanałami jonowymi i fitochromem [45,46,47]. Kanały potasowe są prawdopodobnie związane z początkową reakcją na regulatory wzrostu roślin [67]. Mogą także brać udział w uwalnianiu jonów potasu podczas zamykania aparatów szparkowych [60,35]. Wszystkie powyżej przytoczone obserwacje i stwierdzenia wymagają dalszych badań i pełnego potwierdzenia. W trakcie badań nad kanałami roślinnymi zdołano wyróżnić kilkanaście ich klas, podjąć próby ich charakterystyki oraz zasugerować udział w konkretnych procesach komórkowych.

III. POSTULOWANY UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH W RUCHU CHLOROPLASTÓW U *MOUGEOTIA*

Jedną z prób określenia udziału kanałów jonowych w określonych procesach komórkowych są badania, dotyczące ruchu chloroplastów w glonie *Mougeotia*. Komórka glonu zawiera pojedynczy, centralnie położony, wstęgowatego kształtu chloroplast, usytuowany wzdłuż dłuższej osi komórki. Zależnie od natężenia padającego światła, przemieszcza się on w położenie prostopadłe lub równoległe do kierunku padania światła. W procesie tym aktywny jest czerwony i niebieski zakres widma świetlnego. Reakcja na światło czerwone związana jest z obecnością fitochromu [76]. Mechanizm przekazywania bodźca od fotoreceptora (fitochrom) do systemu efektorowego, w którym postuluje się udział struktur aktomiozynowych [27], jest nieznan. Sugeruje się, że w przekazywaniu bodźca mogą pośredniczyć jony wapnia [46]. Podanie jonoforu wapniowego A23187 w określone miejsce na powierzchni komórki powodowało ściśle zlokalizowane przemieszczenie chloroplastu. Naświetlanie światłem czerwonym (R) wywoływało wzrost pobierania Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego; po działaniu światłem dalekiej czerwieni (FR) ten efekt nie występował. W regulacji ruchu chloroplastów postulowany jest udział wewnątrzkomórkowych wakuol taninowych, zawierających jony Ca^{2+} . Przyjmując wpływ jonów wapniowych na ruch chloroplastów założono istnienie oraz zaangażowanie w tym procesie białek kanałowych, transportujących wapń. Próbę ich wykrycia podjęto metodą *patch-clamp*. Efektem tych badań było stwierdzenie występowania dwóch kanałów jonowych o przewodności 30 i 65 pS w błonie komórkowej *Mougeotia*. Były one aktywowane światłem czerwonym w czasie 2–5 min [46]. Światło dalekiej czerwieni odwracało reakcję, jeżeli było stosowane bezpośrednio po świetle czerwonym. W innym wypadku nie wywoływało efektu. Wynik ten sugerował, że fitochrom jest czynnikiem aktywującym wykryte kanały. Jednakże aktywacja kanału nie jest bezpośrednim następstwem zmian fitochromowych. Wydaje się, że jest ona inicjowana przez inny proces regulowany fitochromowo. Wskazuje na to długość czasu niezbędnego do aktywacji białka kanałowego. W celu identyfikacji tych białek zastosowano inhibitory. Wykazano, że badane

białka są wrażliwe na 5 mM BaCl_2 i 10 mM TEA^+ , co charakteryzuje je jako kanały potasowe. Dodanie jonoforu wapniowego A23187 (10 $\mu\text{M/l}$) w obecności jonów Ca^{2+} wywoływało reakcję identyczną jak po zadziałaniu światła czerwonego. Warunkiem koniecznym było jednak wyższe stężenie jonów Ca^{2+} na zewnątrz komórki niż w jej wnętrzu. W przeciwnym razie nie dochodziło do aktywacji kanałów. Działanie jonoforu może wskazywać, że stymulacja tych kanałów następuje poprzez jony wapnia. Jeśli jednak światło czerwone wywołuje aktywność opisywanych kanałów pomimo braku jonów Ca^{2+} na zewnątrz komórki, musi dochodzić do ich uwalniania z wewnętrznych magazynów. TMB-8 – inhibitor uwalniania jonów wapniowych ze struktur wewnątrzkomórkowych zahamował aktywność badanych kanałów potasowych [44]. W związku z tym autorzy zaproponowali mechanizm aktywacji tych białek zapoczątkowywany przejściem fitochromu w formę aktywną pod wpływem światła czerwonego. Aktywna forma fitochromu wywoływałaby wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, uwalnianych z wakuol taninowych lub pobieranych ze środowiska zewnętrznego. Wysokie stężenie jonów wapnia oddziałuje, z kolei, na kanały potasowe poprzez aktywowaną wapniem kinazę białkową [46]. Jednakże TMB-8 nie wywoływało hamowania ruchu chloroplastów pomimo hamowania aktywności stymulowanych wapniem kanałów potasowych. Mogłoby to wskazywać na brak zależności pomiędzy aktywnością tych kanałów i ruchem chloroplastów u *Mougeotia*. Można przypuszczać, że pomimo zastosowania TMB-8 może nadal występować pewien poziom stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, wynikający z niecałkowitego hamowania przez inhibitor wydzielania tych jonów z wewnątrzkomórkowych magazynów. Możliwe jest też, że dla wywołania ruchu chloroplastów niezbędne jest dużo niższe stężenie jonów Ca^{2+} niż dla aktywacji kanałów K^+ . Dlatego pozostająca w komórce niewielka ilość jonów wapnia może mieć kluczowe znaczenie dla stymulacji obu procesów, pozwalając na rozpoczęcie przemieszczenia chloroplastu, nie wywołując aktywacji kanałów [45]. Autorzy tych prac postulują schemat zależności pomiędzy wszystkimi opisanymi elementami ruchu chloroplastu i aktywacji kanałów, który jest przedstawiony w pracy Ślesaka i Gabryś, zamieszczonej w tym samym tomie *Postępów Biologii Komórki* (str. 80, rys. 3 w [65]). Zaobserwowano także pewne podobieństwo widma czynnościowego światła aktywującego kanały oraz wywołującego ruch chloroplastu. Maksimum aktywacji kanałów potasowych występuje przy 660 nm, natomiast silny jej spadek przy 740 nm. Przy krótszych długościach światła od 460 do 540 nm również dochodzi do aktywacji kanałów, słabszej niż dla 660 nm. W widmie czynnościowym dla ruchu chloroplastów maksimum jest przy 660 nm i mniejsze przy 460 nm [47]. Możliwe jest zatem zaangażowanie w tym procesie dwóch odmiennych fotoreceptorów [25]. Nie znany jest dotychczas receptor światła niebieskiego. Nie udało się znaleźć jednoznacznego związku pomiędzy ruchem chloroplastu u *Mougeotia* i aktywnością kanałów potasowych stymulowanych jonami wapnia, co może wskazywać na rozdzielność obu zjawisk.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że wiedza na temat roślinnych kanałów jonowych jest bardzo niepełna i stworzenie spójnego obrazu ich funkcjonowania i roli w procesach komórkowych u roślin wymaga jeszcze licznych i długotrwałych badań.

LITERATURA

- [1]ALEXANDRE J, LASALLES J-P, KADO RT. IP₃ opens calcium channels of the red beet vacuole tonoplast. [w]:Plant Membrane Transport: The Current Position. Proceedings of the 8th International Workshop on Plant Membrane Transport, J. Dainty, M.I. de Michelis, E. Marre, F. Rasi-Coldogno (red.)Elsevier, Venice, June, 1989; 249–254.
- [2]AZIMOV RR, BERESTOVSKY GN. Multiple conductance states of single K⁺ channel of *Nitellopsis* cells. *Biofizika* 1988; **66**: 153–155.
- [3]AZIMOV RR, GELETYUK VI, BERESTOVSKY GN. Single potential-dependent K⁺ channel of the cells of the alga *Nitellopsis obtusa*. *Biophysics* 1987; **32**: 82–88.
- [4]BARBAS JA, RUBIO N, PEDROSO E, PONGS O, FERRUS A. Antibodies against *Drosophila* potassium channels indentify membrane proteins across species. *Molecular Brain Research* 1989; **5**: 171–176.
- [5]BEILBY MJ. Potassium channels at *Chara* plasmalemma. *J Exp Bot* 1985; **36**: 228–239.
- [6]BEILBY MJ. Factors controlling the K⁺ conductance in *Chara*. *J Membrane Biol* 1986a; **93**: 187–193.
- [7]BEILBY MJ. Potassium channels and different states of *Chara* plasmalemma. *J Membrane Biol* 1986b; **89**: 241–249.
- [8]BERESTOVSKY GN, ALEKSANDROV AA. The cluster structure and gate mechanism of reconstructed calcium channel of the cells characean algae. *Biophysics* 1983; **28**: 865–870.
- [9]BERTL A. Current-voltage relationships of a sodium-sensitive potassium channel in the tonoplast of *Chara corallina*. *J Membrane Biol* 1989; **109**: 9–19.
- [10]BERTL A, GRADMANN D. Current-voltage relationships of potassium channels in the plasmalemma of *Acetabularia*. *J Membrane Biol* 1987; **99**: 41–49.
- [11]BERTL A, KLIEBER HG, GRADMANN D. Slow kinetics of a potassium channel in *Acetabularia*. *J Membrane Biol* 1988; **102**: 141–152.
- [12]BISSON MA, WALKER NA. The *Chara* plasmalemma at high pH. Electrical measurement show a rapid specific passive uniport of H⁺ or OH⁻. *J Membrane Biol* 1980; **81**: 1–7.
- [13]BISSON MA, WALKER NA. The hyperpolarization of the *Chara* membrane at high pH: effects of potassium, internal pH and DCCD. *J Exp Bot* 1981; **32**: 951–971.
- [14]BLATT MR. Potassium-dependent, bipolar gating of K⁺ channels in guard cells. *J Membrane Biol* 1988; **102**: 235–246.
- [15]BUSH DS, HEDRICH R, SCHROEDER JI, JONES RL. Channel-mediated K⁺ flux in barley aleurone protoplasts. *Planta* 1988; **176**: 368–377.
- [16]CANUT H, CARRASCO A, GRAZIANA A, BOUDET AM, RANJEVA R. Inositol triphosphate-stimulated calcium release from *Acer* microsomal fractions involves the uptake of potassium. *FEBS Letters* 1989; **249**: 105–107.
- [17]COLEMAN HA. Chloride currents in *Chara* – a patch clamp study. *J Membrane Biol* 1986; **93**: 55–61.
- [18]COLEMAN HA, FINDLAY GP. Ion channels in the membrane of *Chara inflanta*. *J Membrane Biol* 1985; **83**: 109–118.
- [19]COLOMBO R, CERANA R, LADO P, PERES A. Voltage-dependent channels permeable to K⁺ and Na⁺ in the membrane of *Acer pseudoplatanus* vacuoles. *J Membrane Biol* 1988; **103**: 227–236.
- [20]COYAUD L, KUKDJAN A, KADO R, HEDRICH R. Ion channels and ATP-driven pumps involved in ion trasport across the tonoplast of sugarbeet vacuoles. *Biochim Biophys Acta* 1987; **902**: 263–268.
- [21]FAIRLEY-GRENOT KA, ASSMANN SM. Permeation of Ca²⁺ through K⁺ channels of *Vicia faba* guard cells. *J Membrane Biol* 1992; **128**: 103–113.
- [22]FALKE LC, EDWARDS KL, PICKARD BG, MISLER S. A stretch-activated anion channel in tobacco protoplasts. *FEBS Letters* 1988; **237**: 141–144.
- [23]FINDLAY GP, COLEMAN HA. Potassium channels in the membrane of *Hydrodictyon africanum*. *J Membrane Biol* 1983; **75**: 241–251.
- [24]FLÜGGE UI, BENZ R. Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Letters* 1984; **169**: 85–89.
- [25]GABRYŚ H, WALCZAK T, HAUPT W. Blue-light -induced chloroplast orientation in *Mougeotia*. Evidence for a separate sensor pigment beside phytochrome. *Planta* 1984; **160**: 21–24.
- [26]GRAZIANA A, POSSET M, RANJEVA R, HETHERINGTON AM, LAZDUNSKY M. Ca²⁺ channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca²⁺ entry into protoplasts. *Biochemistry* 1988; **27**: 764–768.
- [27]GRÖLIG F, WAGNER G. Light-dependent chloroplast reorientations in *Mougeotia* and *Mesotaenium*: biased by pigment-regulated plasmalemma anchorage sites to actin filaments. *Bot Acta* 1987; **101**: 2–6.

- [28]GUSTIN M, ZHOU X-L, MARTINAC B, KUNG C. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 1988; **242**: 762–765.
- [29]HANSEN U-P, FISAHN J. I/V-curve studies of the control of a K⁺ transporter in *Nitella* by temperature. *J Membrane Biol* 1987; **98**: 1–13.
- [30]HARVEY HJ, VENIS MA, TREWAVAS AJ. Partial purification of a protein from maize (*Zea mays*) coleoptile membranes binding the Ca²⁺ channel antagonist verapamil. *Biochem J* 1989; **257**: 95–100.
- [31]HEDRICH R, BARBIER-BRYGOO H, FELLE H, FLÜGGUE UI, LUTTGE U, MAATHIUS FJM, MARK S, PRINS HBA, RASCHKE K, SCHNABL H, SCHROEDER JI, STRUVE I, TAIZ L, ZEIGLER P. General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch-clamp survey of ion channels and proton pumps. *Bot Acta* 1988; **101**: 7–13.
- [32]HEDRICH R, FLÜGGUE UI, FERNANDEZ JM. Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Letters* 1986; **204**: 228–232.
- [33]HEDRICH R, KURKDJIAN A. Characterization of anion-permeable channel from sugar beet vacuoles: effect of inhibitors. *EMBO Journal* 1988; **7**: 3661–3666.
- [34]HEDRICH R, NEHER E. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 1987; **329**: 833–836.
- [35]HEDRICH R, SCHROEDER JI. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1989; **40**: 539–569.
- [36]HOSOIS I, IINO M, SHIMAZAKI K. Outward-rectifying K⁺ channels in stomatal guard cell of protoplasts. *Plant and Cell Physiology* 1988; **29**: 907–911.
- [37]IJIJIMA T, HAGIWARA S. Voltage-dependent K⁺ channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 441–445.
- [38]KATAEV AA, ZHERELOVA OM, BERESTOVSKY GN. Ca²⁺-induced activation and irreversible inactivation of chloride channels in perfused plasmalemma of *Nitellopsis obtusa*. *Gen Physiol Biophysics* 1984; **3**: 447–462.
- [39]KATSUHARA M, MIMURA T, TAZAWA M. Patch-clamp study on a Ca²⁺-regulated K⁺ channel in the tonoplast of brackish *Characeae Lamprothamium succinctum*. *Plant and Cell Physiol* 1989; **30**: 549–555.
- [40]KETCHUM KA, SHREIB A, POOLE RJ. Characterization of potassium-dependent currents in protoplasts of corn suspension cells. *Plant Physiol* 1989; **89**: 1184–1192.
- [41]KIKUYAMA M, ODA K, SHIMMEN T, HAYAMA T, TAZAWA M. Potassium and chloride effluxes during excitation of *Characeae* cells. *Plant Cell Physiol* 1984; **25**: 965–974.
- [42]KOLB, H-A, KÖHLER K, MARTINOIA R. Single potassium channels in membranes of isolated mesophyll barley vacuoles. *J Membrane Biol* 1987; **95**: 163–169.
- [43]KOROHODA W. Białka integralne błon komórkowych. *Wszechświat* 1992; **93,11**: 278–283.
- [44]LAVIER DR, WALKER NA. Steady-state voltage dependent gating and conduction kinetics of single channels in the membrane of cytoplasmic drops of *Chara australis*. *J Membrane Biol* 1987; **100**: 31–42.
- [45]LEW RR, SERLIN BS, SCHAUF CL, STOCTON ME. Calcium activation of *Mougeotia* potassium channels. *Plant Physiol* 1990a; **92**: 831–836.
- [46]LEW RR, SERLIN BS, SCHAUF CL, STOCTON ME. Red light regulates calcium-activated potassium channels in *Mougeotia* plasma membrane. *Plant Physiol* 1990b; **92**: 822–836.
- [47]LEW RR, KRASNOSHTEIN F, SERLIN BS, SCHAUF CL. Phytochrom activation of K⁺ channels and chloroplast movement in *Mougeotia*. *Plant Physiology* 1992; **98**: 1511–1514.
- [48]LÜHRING H. Recording of single K⁺ channels in the membrane of cytoplasmic drop of *Chara australis*. *Protoplasma* 1986; **133**: 19–28.
- [49]LUNEVSKY, VZ, ZHERELOVA OM, VOSTRIKOV IY, BERESTOVSKY GN. Excitation of *Characeae* cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J Membrane Biol* 1983; **72**: 43–58.
- [50]MANNELLA CA, COLOMBINI M, FRANK J. Structural and functional evidence for multiple channel complex in the outer membrane of *Nerospora crassa* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2243–2247.
- [51]MINORSKY PV, SPANSWICK RM. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant, Cell and Environment* 1989; **12**: 137–143.
- [52]MORAN N, EHRENSTEIN G, IWASA K, MISCHKE C, BARE C, SATTER R. Potassium channels in motor cells of *Samanea saman*. A patch-clamp study. *Plant Physiol* 1988; **88**: 643–648.
- [53]NEHER E, SAKMANN B. Technika stabilizacji potencjału skrawka błony komórkowej. *Świat Nauki* 1992; **5(9)**: 30–38.
- [54]RANJEVA R, CARRASCO A, BOUDET AM. Inositol triphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells. *FEBS Letters* 1988; **230**: 137–141.
- [55]SATTER R, MORAN N. Ionic channels in plant cell membranes. *Physiol Plant* 1988; **72**: 816–820.

- [56]SCHAUF CL, WILSON KJ. Properties of single K^+ channels in *Asclepias tuberosa* protoplasts. *Plant Physiol* 1987; **85**: 413–418.
- [57]SCHROEDER JI. K^+ transport properties of K^+ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J Gen Physiol* 1988; **92**: 667–683.
- [58]SCHROEDER JI. Quantitative analysis of outward rectifying K^+ channels currents in guard cell protoplasts from *Vicia faba*. *J Membrane Biol* 1989; **107**: 229–235.
- [59]SCHROEDER JI, HAGIWARA S. Cytosolic calcium regulates ion channels in plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 1989; **338**: 427–430.
- [60]SCHROEDER JI, HEDRICH R, FERNANDEZ JM. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 1984; **312**: 361–362.
- [61]SHIINA T, TAZAWA M. Ca^{2+} -dependent Cl^- efflux in tonoplast-free cells of *Nitellopsis obtusa*. *J Membrane Biol* 1988; **106**: 135–139.
- [62]SHIINA T, WAYNE R, LIM TUNG HY, TAZAWA M. Possible involvement of protein phosphorylation/dephosphorylation in the modulation of Ca^{2+} channel in tonoplast-free cells of *Nitellopsis*. *J Membrane Biol* 1988; **102**: 255–264.
- [63]SHIMMEN T, TAZAWA M. Activation of K^+ -channels in membrane excitation of *Nitella axilliformis*. *Plant Cell Physiol* 1983; **24**: 1511–1524.
- [64]SMACK DP, COLOMBINI M. Voltage-dependent channels found in the membrane fraction of corn mitochondria. *Plant Physiol* 1985; **79**: 1094–1097.
- [65]ŚLESIAK I, GABRYŚ H. Wapń jako wtórny przekaźnik w fotoindukowanych ruchach wewnątrzkomórkowych w komórce roślinnej. *Post Biol Kom* 1993; **20**, supl. 2: 75–85.
- [66]SOKOLIK AI, YURIN VM. Potassium channels in the plasmalemma of *Nitella* cells at rest. *J Membrane Biol* 1986; **89**: 9–22.
- [67]TANIFUJI M, SATO M, WADA Y, ANRAKU Y, KASAI M. Gating behaviors of a voltage-dependent and Ca^{2+} -activated cation channel of yeast vacuolar membrane incorporated into planar lipid bilayer. *J Membrane Biol* 1988; **106**: 47–55.
- [68]TESTER M. Blocade of potassium channels in the plasmalemma of *Cara corallina* by tetraethylammonium, Ba^{2+} , Na^+ and Cs^+ . *J Membrane Biol* 1988; **105**: 77–85.
- [69]TESTER M. Tansley review no. 21. Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies. *New Phytol* 1990; **114**: 305–340.
- [70]THIEL G, MACROBBIE EAC, BLATT MR. Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control. *J Membrane Biol* 1992; **126**: 1–18.
- [71]TYERMAN SD, FINDLAY GP. Current-voltage curves of single Cl^- channels which coexist with two types of K^+ channels in the tonoplast of *Chara corallina*. *J Exp Biol* 1989; **40**: 105–117.
- [72]TYERMAN SD, FINDLAY GP. Inward membrane current in *Chara inflanta*. I. A voltage- and time-dependent Cl^- component. *J Membrane Biol* 1986a; **89**: 139–152.
- [73]TYERMAN SD, FINDLAY GP. Inward membrane current in *Chara inflanta*. II. Effects of pH, Cl^- -channel blockers and NH_4^+ , and significance for the hyperpolarized state. *J Membrane Biol* 1986b; **89**: 153–161.
- [74]WADA Y, OHSUMI Y, TANIFUJI M, KASAI M, ANRAKU Y. Vacuolar ion channel of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1987; **262**: 17260–17263.
- [75]WAGENKNECHT T, GRASSUCCI R, FRANK J, SAITO A, INUI M, FLEISCHER S. Three-dimensional architecture of the calcium channel structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989; **338**: 167–170.
- [76]WAGNER G, KLEIN K. Mechanism of chloroplast movement in *Mougeotia*. *Protoplasma* 1981; **109**: 169–185.
- [77]WICK SM, HEPLER PK. Localisation of Ca^{2+} -containing antimonate precipitates during mitosis. *J Cell Biol* 1980; **86**: 500–513.
- [78]ZHERELOVA OM. Protein kinase C is involved in regulation of Ca^{2+} channels in plasmalemma of *Nitella syncarpa*. *FEBS Letters* 1989; **242**: 330–332.

WAPŃ JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK W FOTOINDUKOWANYCH RUCHACH WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W KOMÓRCIE ROŚLINNEJ

CALCIUM AS A SECOND MESSENGER IN PHOTOINDUCED INTRACELLULAR MOVEMENTS IN THE PLANT CELL

Ireneusz ŚLESIAK, Halina GABRYŚ

Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. W artykule przedyskutowano problem, czy wapń pełni funkcję wtórnego przekaźnika w wewnątrzkomórkowych ruchach roślin. Zanalizowano szczegółowo rolę wapnia w indukowanych światłem przemieszczeniach chloroplastów oraz w płynięciu cytoplazmy.

Słowa kluczowe: płynięcie cytoplazmy, ruch chloroplastów, światło, wapń, wtórny przekaźnik.

Summary. The problem has been discussed if calcium has a function of a second messenger in intracellular plant movements. The role of calcium in light-induced translocations of chloroplasts and in the cytoplasmic streaming has been considered.

Key words: calcium, chloroplast movement, cytoplasmic streaming, light, secondary messenger.

Stosowane skróty: A23187 – jonofor wapniowy, ATP – adenozyntrifosforan, $(Ca^{2+})_c$ – poziom jonów wapnia w cytoplazmie, $(Ca^{2+})_z$ – zewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia, Bay K8644 – agonista kanałów wapniowych, CM – kalmomodulina, CTC – chlorotetracyklina, DCMU – dichlorofenyldimetylomocznik, ER – retikulum endoplazmatyczne, EGTA – kwas etyleno-glikol-bis-(aminoetyl eter)-N, N, N', N'-czterooctowy, I – inozytol, IP – 1-monofosfoinozytol, IP₂ – 1, 4-bisfosfoinozytol, IP₃ – 1, 4, 5-trisfosfoinozytol, IP₄ – 1, 3, 4, 5-tetrafosfoinozytol, PA – kwas fosfatydowy, P_{fr} – forma fitochromu absorbująca promieniowanie dalekiej czerwieni (730 nm), P_r – forma fitochromu absorbująca światło czerwone (630 nm), PI – 1-monofosfofosfatydylinozytol, PIP₂ – 4, 5-bisfosfofosfatydylinozytol, PDE – fosfodiesteraza, R – światło czerwone (630 nm), TFP – trifluoroperazylna, TMB-8 – chlorowodorek [8-(dietylamino)oktyl-3, 4, 5-trimetoksybenzoenu], W-7 – chlorowodorek [N-(6-aminoheksyl)-5-chloro-1-naftalenosulfonamidul].

Od ponad dziesięciu lat wzrasta zainteresowanie rolą wapnia jako czynnika regulującego funkcje komórki. Obok fosforanów inozytolu, głównie 1, 4, 5-trisfosforanu inozytolu (IP₃) i diacylglicerolu (DAG), jony wapniowe stanowią nieodzowne ogniwo podczas przekazu rozmaitych sygnałów ze środowiska do wnętrza komórki [3, 15, 16]. Pierwsze hipotezy postulujące taką rolę Ca^{2+} u roślin pochodzą z prac Haupta i Weisenseela [14]. Badania

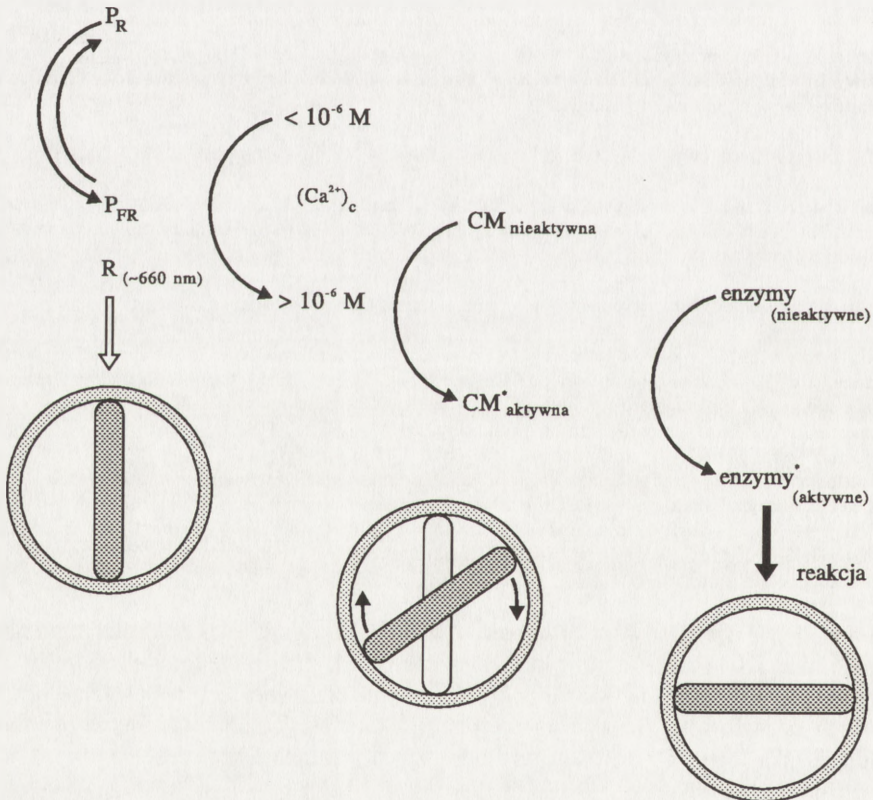
dotyczące materiału roślinnego są nieporównywalnie skromniejsze, niż ich odpowiedniki wykonane na materiale zwierzęcym. Pomimo tego funkcje Ca^{2+} jako tzw. wtórnego przekaźnika (ang. *second messenger*) w roślinach doczekały się już w literaturze dość wyczerpującego omówienia [4, 15, 16, 23, 43].

ŚWIATŁO JAKO AGONISTA

Obok fitohormonów, siły gravitacji i bodźców mechanicznych światło jest agonistą wielu reakcji fizjologicznych komórki roślinnej [16,19]. Oznacza to, że stymuluje ono określoną odpowiedź badanego układu, np. ruchową. Cały proces przekazu sygnału świetlnego można schematycznie przedstawić następująco:

bodziec ♦ PERCEPCJA → TRANSDUKCJA → WZMOCNIENIE → WTÓRNE PRZEKAŹNIKI SYGNAŁU → UKŁAD EFEKTOROWY ♦ reakcja.

W rozpatrywanym przypadku, jeśli bodźcem jest światło, za percepcję odpowiedzialny jest określony fotoreceptor [37]. Przetworzenie bodźca świetlnego na inny sygnał zachodzi



Rys. 1. Hipotetyczna kaskada biochemiczna z udziałem fitochromu zaproponowana przez Haupta i Weisenseela [6] oraz ruch chloroplastu *Mougeotia* w świetle czerwonym (strzałką zaznaczono kierunek światła czerwonego (R) padającego na komórkę).

prawdopodobnie w obrębie kompleksu błony komórkowej [43, 46]. Powstały sygnał wywołuje kaskadę reakcji, w której uczestniczą jony wapnia [11, 12, 48].

Wiele efektów morfogenetycznych wywoływanych jest światłem czerwonym, inne natomiast indukuje wyłącznie promieniowanie krótkofalowe. W tym drugim przypadku hipotetycznym fotoreceptorem jest tzw. kryptochrom, maksimum absorpcji wykazujący dla bliskiego ultrafioletu (UV-A) i światła niebieskiego z maksimum ok. 450 nm; w zakresie długofalowym funkcjonuje układ fitochromowy (rys. 1) [19, 37]. Znane są również reakcje, w których zaangażowane są obydwa systemy fotoreceptorowe [26]. Dotychczas znacznie więcej badań poświęcono zjawiskom fotomorfogenetycznym regulowanym przez fitochrom i ewentualnej roli Ca^{2+} w tej regulacji (przegląd literatury podaje praca [43]). Opisy procesów ruchowych, na które ma wpływ tylko światło niebieskie w powiązaniu z regulacją wapniową, reprezentowane są w literaturze znacznie skromniej [41, 52].

CO TO ZNACZY WTÓRNY PRZEKAŹNIK?

Poziom spoczynkowy $(\text{Ca}^{2+})_c$ w przeciętnej komórce roślinnej jest rzędu 10^{-7} M. Bardzo duża różnica stężeń istnieje pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym: koncentracja $(\text{Ca}^{2+})_z$ jest tysiąc do 10 tys. razy większa niż w cytoplazmie. Znaczne ilości Ca^{2+} mogą być związane w ścianie komórkowej [29]. Ponadto rozmaite jest rozmieszczenie wapnia w poszczególnych przedziałach komórkowych (rys. 2). Po zadziałaniu odpowiedniego bodźca dochodzi do gwałtownego, przejściowego wzrostu stężenia $(\text{Ca}^{2+})_c$ do stanu 10^{-6} – 10^{-5} M [4, 7, 16]. Utrzymywanie stałego, niskiego poziomu $(\text{Ca}^{2+})_c$ stanowi dla komórki kwestię życia i śmierci. Stężenia rzędu $10 \mu\text{M}$ mogą po dłuższym czasie działać cytotoksycznie [16]. Przejściowy wzrost poziomu $(\text{Ca}^{2+})_c$ stanowi istotę działania tego jonu w charakterze wtórnego przekaźnika. Takie zmiany pociągają za sobą aktywację białek wiążących wapń, głównie kalmoduliny (CM). Następnie kompleksy CM-Ca potrafią aktywować wiele enzymów, np. kinaz białkowych [23, 49]. Końcowym etapem takiej kaskady biochemicznej jest fosforylacja białek efektorowych, przykładowo białek cytoszkieletu. W efekcie obserwujemy określoną reakcję ruchową badanego układu [49]. Wzmocnienie pierwotnego czynnika indukującego (światła) poprzez uruchomienie odpowiedniego szlaku informacyjnego jest podstawową funkcją wtórnego przekaźnika [49]. W jaki jednak sposób można przekonać się, że informacja przekazywana za pomocą wapnia jest konieczna do zajścia jakiejś reakcji fizjologicznej? Kilka istotnych wytycznych podał Jaffe [18]:

1. Naturalny agonista (w omawianym przypadku światło) wywołuje mierzalny wzrost poziomu $(\text{Ca}^{2+})_c$, co można wykazać stosując fluorescencyjne indykatory wapnia, np. fura-2, indo-1 [44].

2. Działanie czynnikami uniemożliwiającymi wzrost $(\text{Ca}^{2+})_c$ znosi działanie pierwotnego agonisty. Bada się np. wpływ substancji blokujących kanały wapniowe, takich jak La^{3+} , nifedypina, verapamil, czy chelatorów, np. EGTA [43, 51].

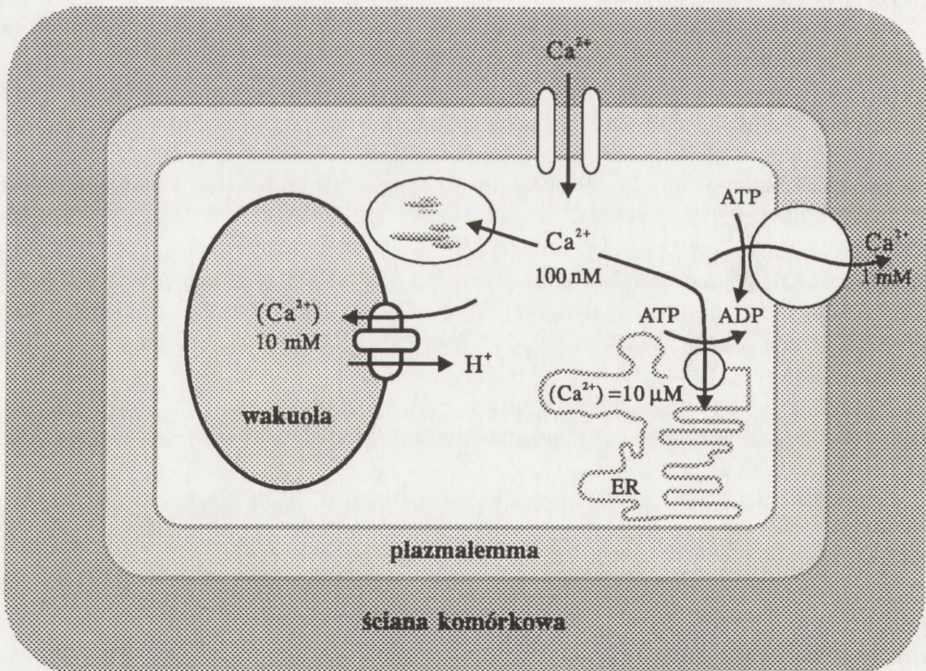
3. Eksperymentalne wywołanie wzrostu poziomu $(\text{Ca}^{2+})_c$ stymuluje określoną reakcję fizjologiczną w nieobecności naturalnego agonisty. W przypadku zjawisk fotoindukowanych można stosować w warunkach ciemności jonofory wapniowe, np. A23187 i obserwować, czy spodziewana reakcja wystąpiła [51] lub działać na komórki agonistami kanałów wapniowych, np. Bay K8644 [32].

Wyniki dotychczasowych badań zmierzających do wyjaśnienia roli wapnia w systemie przekazywania informacji w komórkach roślinnych nie dostarczają jeszcze jednoznacznych odpowiedzi na postawione pytania, a dyskutowane schematy są wysoce hipotetyczne. W tym artykule ograniczyliśmy się do dwóch typowych przykładów: fototranslokacji chloroplastów i płynięcia cytoplazmy.

RUCHY CHLOROPLASTÓW

Mougeotia

Fotoindukowane zmiany położenia chloroplastów w komórce są charakterystyczne dla wielu gatunków roślin [13]. Organizmem dość szczegółowo zanalizowanym pod kątem roli Ca^{2+} w rotacji płytkowatego chloroplastu jest *Mougeotia scalaris*, nitkowata zielonica z rodziny *Zygnemaceae* [17, 47]. W *Mougeotia* podobnie jak w pokrewnym jej *Mesotaenium* zidentyfikowano dwa niezależne fotoreceptory: fitochrom i kryptochrom [8, 20]. Układ efektorowy stanowi cytoszkielet aktynomiozynowy [9, 48]. W 1976 roku Haupt i Weisenseel zaproponowali kaskadowy proces, który przy zaangażowaniu fitochromu prowadzi do obrotu chloroplastu (rys. 1). Doświadczenia sprawdzające tę hipotezę wskazywały początkowo, że wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie jest wynikiem fotostymulowanego transportu wapnia ze środowiska zewnętrznego komórki. Stwierdzono, że obecność jonów wapnia w środowisku



Rys. 2. Rozmieszczenie wapnia w komórce roślinnej (wg [7] zmienione)

jest niezbędna do reakcji chloroplastu na światło [47]. Następnie, stosując $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wykazano, że światło czerwone stymuluje pobieranie Ca^{2+} oraz że efekt R jest odwracalny daleką czerwienią w sposób typowy dla reakcji fitochromowych [6]. Wynik ten interpretowano dwojako: powstała w wyniku fototransformacji forma P_{fr} działa na kanały jonowe błony komórkowej, bądź też sam kompleks chromoforowobiałkowy fitochromu jest aktywowanym światłem kanałem wapniowym [6]. W ostatnich badaniach z zastosowaniem techniki *patch-clamp* nie stwierdzono istnienia takiego kanału w plazmalemmie. Wykazano natomiast obecność aktywowanych światłem czerwonym kanałów potasowych zależnych od wapnia [21, 22]. W ten sposób potwierdzono pośrednie oddziaływanie fitochromu na kanały jonowe plazmalemmy.

Dalsze badania fotoindukowanego transportu wapnia przez plazmalemmę przyniosły kontrowersyjne wyniki: pomiary przepływu przeprowadzone przy użyciu mureksydu, absorpcyjnego wskaźnika Ca^{2+} , wskazywały na dominację wypływu wapnia z komórki [31]. Sprzeczność z pomiarami $^{45}\text{Ca}^{2+}$ autor wyjaśnił następująco: jednocześnie z niewielkim stymulowanym R wpływem Ca^{2+} do komórki zachodzi wydzielenie do cytoplazmy znacznych ilości wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Wzrost $(\text{Ca}^{2+})_c$ powoduje uruchomienie pomp wapniowych i wypływ wapnia z komórki obserwowany w doświadczeniu z mureksydem.

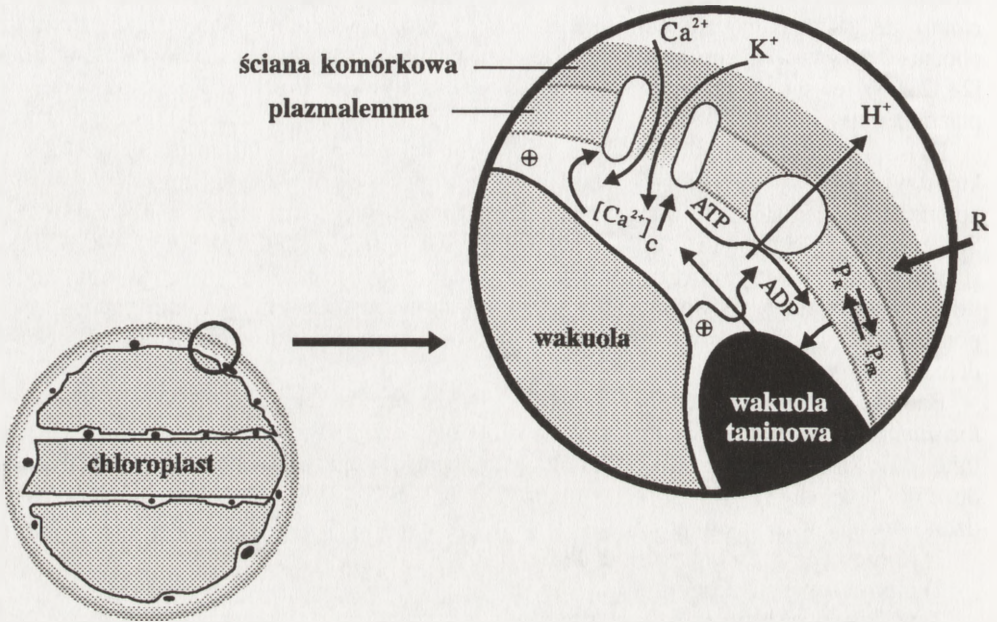
Badając możliwości magazynowania Ca^{2+} w komórce wykazano, że *Mougeotia* i *Meso-taenium* mają specjalne struktury tzw. wakuole taninowe (ang. *tanine vesicles*) lub fysody (ang. *physodes*), które oprócz polifenolowych związków garbnikowych zawierają również duże ilości wapnia [10, 17, 36, 42]. Analizę zawartości Ca^{2+} w tych strukturach przeprowadzono stosując różne metody:

- 1) fluorescencyjne z chlorotetracykliną (CTC) [17],
- 2) mikroskopię elektronową [42],
- 3) mikroanalizę rentgenowską [30].

Doświadczenia z indo-1 pokazały, że naświetlanie światłem UV-A powodowało spadek zawartości wapnia w wakuolach taninowych niezależnie od zawartości Ca^{2+} w medium hodowlanym [32]. Podobne wyniki uzyskano dla światła czerwonego (R), stosując CTC [17]. Po naświetleniu poziom $(\text{Ca}^{2+})_c$ wzrasta, co zgodnie ze schematem na rysunku 1 umożliwia rotację chloroplastu *Mougeotia*.

Z innych wyników na uwagę zasługuje przyśpieszenie fotoindukowanej reakcji ruchowej chloroplastu *Mougeotia* w obecności Bay K8644, agonisty zwierzęcych kanałów wapniowych [32]. Wynik ten jest argumentem na rzecz istnienia kanału wapniowego w błonie *Mougeotia*. Pozostaje on jednak w sprzeczności ze wspomnianymi już wynikami Lewa i wsp., którzy stosując *patch-clamp* i odpowiednie inhibitory kanałów jonowych nie stwierdzili istnienia kanału Ca^{2+} [21, 22]. Lew i wsp. zaproponowali możliwość uczestnictwa w mechanizmie obrotu chloroplastu *Mougeotia* zarówno wapnia pochodzącego ze środowiska, jak i Ca^{2+} z wnętrza komórki, w powiązaniu z aktywnością kanału potasowego plazmalemmy. Autorzy ci przypuszczają, że światło czerwone, prawdopodobnie poprzez fototransformację fitochromu, prowadzi do uwolnienia Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, np. wakuol taninowych. To następnie powoduje aktywację kanału potasowego zależnego od wapnia. Wzrost $(\text{Ca}^{2+})_c$ stymuluje również pompę protonową, a przez kanał K^+ mogą także dodatkowo przenikać jony wapniowe z zewnątrz. Sumarycznie przedstawia to rysunek 3 [21, 22]. Zgodnie z tym hipotetycznym modelem Ca^{2+} pochodziłyby częściowo także ze środowiska, tak jak pokazały to wcześniej omawiane eksperymenty z $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Innymi argumentami przemawiającymi za zaangażowaniem wapnia są doświadczenia wskazujące na udział kalmoduliny w procesie reorientacji chloroplastu [17, 50]. Inhibitory CM, trifluoroperazyna (TFP) i W-7 wyraźnie hamują rotację [50]. Aktywacja tego białka zachodzi tylko przy odpowiednio podwyższonym poziomie $(Ca^{2+})_c$. Kompleks CM-Ca może



Rys. 3. Proponowany schemat regulacji ruchu chloroplastu *Mougeotia* przez fitochrom i zależny od wapnia kanał potasowy; znak "+" oznacza stymulację (wg [22] zmienione)

aktywować odpowiednie enzymy [23]. Na przykład kalmodulina wyizolowana z *Mesotaenium* stymulowała aktywność fosfodiesterazy z mózgu wołu, a efekt ten był znoszony przez TFP [17].

Mimo dużej liczby prac kwestia roli wapnia i przede wszystkim źródeł jego pochodzenia nadal nie jest ostatecznie rozstrzygnięta. Niejasna pozostaje droga od fitochromu do mobilizacji Ca^{2+} ze źródeł wewnątrzkomórkowych. Doświadczenia z jonami Li^+ – inhibitor fosfatazy 1-fosforanu inozytoli w cyklu fosforanów inozytoli [3] – wskazują, że być może tak jak w pewnych komórkach zwierzęcych, uwalnianie Ca^{2+} z przestrzeni wewnątrzkomórkowych (głównie ER) zachodzi za pośrednictwem polifosforanów inozytoli [43].

Haupt sformułował problemy wymagające wyjaśnienia w całym łańcuchu reakcji od bodźca świetlnego do rotacji chloroplastu *Mougeotia* [11]:

- 1) w jaki sposób aktywność Ca^{2+} jest kontrolowana przez P_{fr} ?
- 2) na jakiej drodze ruch chloroplastu jest indukowany przez fotoreceptor światła niebieskiego?
- 3) Czy układ mechanochemiczny jest kontrolowany przez kompleks wapni/kalmodulina? W jaki sposób zachodzi interakcja aktyna-miozyna?

Lemna trisulca

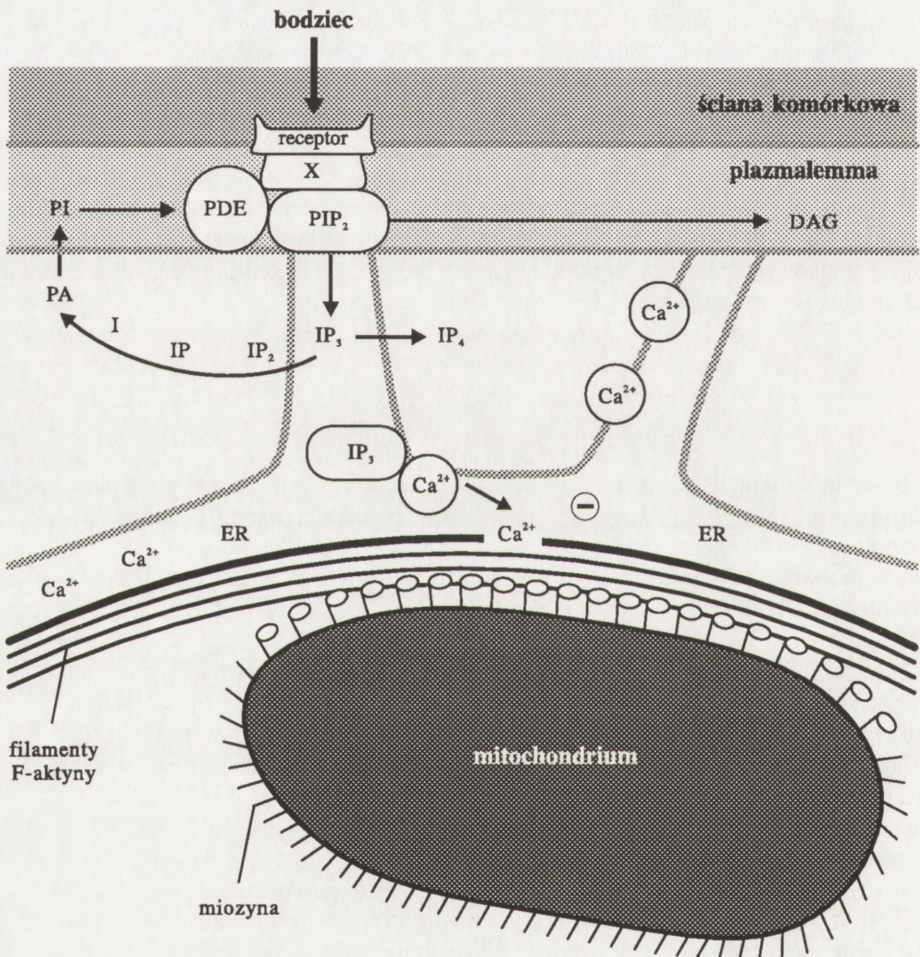
W gatunkach wrażliwych na światło niebieskie mechanizm ruchu chloroplastów poznany został znacznie słabiej. Dotychczas ukazały się na ten temat tylko dwie prace [41,52]. Obecność jonów Ca^{2+} w środowisku była konieczna do wyindukowania zmiany położenia chloroplastów w komórkach *Eremosphaera viridis*. Poza tym zastosowanie jonoforu, przy obecności Ca^{2+} w medium, wywoływało reakcję ruchową w ciemności, czyli przy braku naturalnego agonisty [52]. W kolejnych eksperymentach badano wpływ ciągłego i impulsowego światła niebieskiego (450 nm) na ruch chloroplastów *Lemna trisulca* [41]. Usunięcie wapnia ze środowiska komórki wywoływało zaburzenia w przebiegu reakcji chloroplastów na światło silne, natomiast reakcja na światło słabe przebiegała normalnie. Wynik ten wskazuje na możliwość różnego mechanizmu obu typów reakcji. Stężenie Ca^{2+} w tkance modyfikowano stosując EGTA, jonofor wapniowy A23187 i La^{3+} . Zaburzenia w przebiegu reakcji otrzymano dopiero po długim czasie inkubacji (12 h) w obecności EGTA lub La^{3+} . Wskazuje to, że napływ jonów wapnia do komórki nie jest istotnym elementem regulacyjnym w mechanizmie reakcji. Jonofor stosowany w ciemności nie wywoływał reakcji chloroplastów w przeciwieństwie do wyników otrzymanych dla *Mougeotia* i *Eremosphaera*. Tylko warunki drastycznie zmieniające stężenia Ca^{2+} wewnątrz komórki (zastosowanie jonoforu w kombinacji z EGTA lub La^{3+}) znacznie obniżały amplitudę reakcji na błyski światła niebieskiego. Jeśli zatem jony wapnia uczestniczą w regulacji odpowiedzi chloroplastów na światło, to pochodzą one z magazynów wewnątrzkomórkowych. Zastosowanie TFP wyraźnie znosiło reakcję ruchową na impuls. Wynik ten potwierdza rolę wapnia oraz ewentualny udział kalmoduliny w tym procesie.

RUCH CYTOPLAZMY

Badania Williamsona i Ashleya prowadzone na komórkach międzywęźli glonów z rodziny *Characeae* pokazały, że potencjał czynnościowy powoduje wzrost koncentracji (Ca^{2+})_c z poziomu spoczynkowego 0,2–0,4 μM do 6–40 μM. Co więcej, podniesienie stężenia cytoplazmatycznego wapnia wywołuje gwałtowne zahamowanie płynięcia cytoplazmy [53]. We włoskach pręcikowych *Tradescantia* podwyższone (Ca^{2+})_c także hamowało ruch cytoplazmy [5].

Na szczególną uwagę zasługują badania Allen i wsp. [1, 2] nad ruchem ziarnistości cytoplazmatycznych u *Acetabularia*. Wynika z nich, że fosforany inozytoli: IP_2 , IP_3 , IP_4 silnie wstrzymują ruch cytoplazmy. Podobnie transport wprowadzonej w drodze mikroiniekcji karboksylfluoresceiny (CF) w komórkach włosków pręcikowych *Setcresea purpurea* był wydawnie hamowany przez IP_2 i IP_3 [45]. Wyindukowany skutek działania czynników zewnętrznych, np. hormonów, cykl fosforanów inozytoli i powstały w jego wyniku IP_3 uważa się za wtórny przekaźnik w wielu komórkach zwierzęcych, a także roślinnych [3,7]. Stwierdzono, że IP_3 powoduje uwalnianie Ca^{2+} ze zbiorników wewnątrzkomórkowych, zwłaszcza ER [3]. W roślinach zaobserwowano podobne efekty. IP_3 powodował uwalnianie Ca^{2+} z frakcji mikrosomalnej hypokotyli dyni [7], z koleoptyli kukurydzy [28], pęcherzyków wakuolarnych z korzeni owsa [34], z wakuoli u *Neurospora* [33]. Allen przypuszcza, że u *Acetabularia* działanie określonego czynnika zewnętrznego (np. światła) powoduje transdukcję

bodźca i powstanie fosforanów inozytoli, w tym IP_3 , który jest w stanie mobilizować Ca^{2+} ze specjalnych organelli – kalciosomów (ang. *calciosome*) – rysunek 4. Wzrost poziomu jonów wapnia powodowałby zahamowanie ruchu cytoplazmy, prawdopodobnie na zasadzie podobnej jak u *Nitella*, czyli związania n jonów Ca^{2+} do kompleksu aktynomiozynowego i uniemożliwienia tym samym hydrolizy ATP [40]. Nadal brakuje bezpośrednich badań nad oddziaływaniem światła na płynięcie cytoplazmy i funkcję wapnia w tym procesie. Dla *Vallisneria gigantea* wykryto regulację poziomu $(Ca^{2+})_c$ przez fitochrom. Światło czerwone stymulowało wypływ Ca^{2+} z protoplastów *Vallisneria*, tym samym obniżało $(Ca^{2+})_c$ i przyczyniało się do wzrostu ruchliwości cytoplazmy. Daleka czerwień wywoływała efekt odwrotny [39]. Stężenie wapnia w komórkach określano jednak pośrednio, obserwując zmiany absorpcji mureksydu w środowisku. Niektórzy badacze uważają, że wyniki uzyskane tą



Rys. 4. Schemat sugerujący interakcje pomiędzy metabolitami cyklu fosforanów inozytoli i Ca^{2+} a układem motorycznym działającym w ruchu cytoplazmy; znak "-" oznacza inhibicję (wg [2] zmienione)

metodą nie są całkiem wiarygodne i należy je ostrożnie interpretować [43]. Inne badania pokazały, że światło niebieskie pobudza ruch cytoplazmy u *Vallisneria* i również przyczynia się do wypływu Ca^{2+} z komórek. W komórkach, gdzie ruch cytoplazmy występował tylko na świetle, płynięcie cytoplazmy było także indukowane w ciemności poprzez dodanie do środowiska EGTA [38]. Ostatnie dane uzyskane z płynięcia cytoplazmy u *Nitella flexilis* również wykazały stymulujący wpływ światła niebieskiego na szybkość ruchu cytoplazmy. Efekt ten był znoszony przez DCMU, z czego autorzy wyciągnęli wniosek o zaangażowaniu – w zwiększanie ruchliwości cytoplazmy – procesu fotosyntezy. Zaproponowano hipotezę tłumaczącą obserwowany efekt obniżeniem $(\text{Ca}^{2+})_c$ na skutek pobierania jonów wapnia przez chloroplasty [27]. W kontekście tych wyników warto też przytoczyć rezultaty eksperymentów Millera i Sanders na *Nitellopsis*, choć nie dotyczą one bezpośrednio ruchów cytoplazmy [25]. Naświetlanie tego glonu powodowało spadek $(\text{Ca}^{2+})_c$ mierzony za pomocą mikroelektrody. Efekt ten był odwracalny w ciemności. W poprzednio omawianych przypadkach światło wywoływało wzrost $(\text{Ca}^{2+})_c$. Natomiast w *Nitellopsis* mamy do czynienia ze zmniejszeniem puli cytoplazmatycznego wapnia. Podobnie jak u *Nitella* wykazano, że proces ten jest powiązany z fotosyntezą: DCMU przeciwdziało spadkowi $(\text{Ca}^{2+})_c$ pod wpływem światła. Zdaniem autorów świadczy to o pobieraniu Ca^{2+} przez chloroplasty. Ta ewentualność jest możliwa, gdyż akumulację Ca^{2+} na świetle wykazano m.in. dla chloroplastów szpinaku [24].

PORÓWNANIE DZIAŁANIA WAPNIA W RUCHACH CHLOROPLASTÓW I CYTOPLAZMY

W odróżnieniu od *Mougeotia*, gdzie większość danych przemawia za tym, że ruch chloroplastu następuje przy podniesionej koncentracji $(\text{Ca}^{2+})_c$, przedstawione porównawczo wyniki z płynięcia cytoplazmy pokazują, że wzrost $(\text{Ca}^{2+})_c$ wcale nie musi stymulować określonej reakcji ruchowej, ale wręcz przeciwnie – hamuje ją. Główny problem zawiera się w pytaniu: Jeżeli zarówno w ruchach cytoplazmy, jak i fotoindukowanym przemieszczaniu się chloroplastów aparatem motorycznym jest układ zawierający aktynę [1, 9, 41], to dlaczego regulacja fototranslokacji chloroplastów i płynięcia cytoplazmy przez Ca^{2+} jest zupełnie różna?

PODSUMOWANIE

W omawianych pracach dotyczących płynięcia cytoplazmy i ruchu chloroplastów brak jest bezpośrednich dowodów na istnienie związku pomiędzy działaniem światła, a zmianami stężenia Ca^{2+} . Wydaje się, że dalsze badania roli Ca^{2+} w fotomorfogenezie roślin powinny być prowadzone z zastosowaniem metod pozwalających na bezpośredni pomiar stężenia wapnia w komórce. Tego typu doświadczenie wykonano ostatnio w przypadku regulowanego przez fitochrom procesu pęcznienia protoplastów pszenicy [35]. Zastosowano specjalne sondy z Ca^{2+} i IP_3 (ang. *caged probes*), które po wnikięciu do komórki i fotolizie wywołanej impulsem światła UV uwalniały Ca^{2+} i IP_3 . Okazało się, że w ten sposób wywołany sztuczny wzrost stężenia wolnego wapnia i trisfosforanu inozytolu, w warunkach ciemnościowych (!), stymulował pęcznienie protoplastów. Identyczny efekt otrzymano naświetlając protoplasty światłem czerwonym. Pęcznienie poprzedzone było przejściowym wzrostem stężenia Ca^{2+} wewnątrz protoplastu, co wykazano stosując wskaźnik fluorescencyjny Fluo-3. Taki wynik wskazuje na udział Ca^{2+} i IP_3 w przekazywaniu sygnału świetlnego w komórkach roślinnych.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają serdeczne podziękowania Profesorowi dr hab. Włodzimierzowi Korohodzie za cenne wskazówki i dyskusje.

Praca była częściowo finansowana z grantu KBN 1042/P2/92/03.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN NS, O'CONNOR SA. Inhibition of intracellular particle motions in *Acetabularia acetabulum* L. by phosphoinositides. [w] *Inositol Metabolism in Plants* Wiley-Liss, Inc. 1990; 301–310.
- [2] ALLEN NS, SCHUM JH. Endoplasmic reticulum, calciosomes and their possible roles in signal transduction. *Protoplasma* 1990; **154**: 172–178.
- [3] BERRIDGE MJ, IRVINE RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; **341**: 197–205.
- [4] BIAŁCZYK J, LECHOWSKI Z. Rola wapnia w funkcjonowaniu systemów informacyjnych komórki roślinnej. *Wiad Bot* 1990; **34**: 11–30.
- [5] DORRE M, PICARD A. Release of Ca^{2+} from intracellular pools stops cytoplasmic streaming in *Tradescantia* staminal hairs. *Experientia* 1980; **36**: 1291–1292.
- [6] DREYER EM, WEISENSEEL MH. Phytochrome-mediated uptake of calcium in *Mougeotia* cells. *Planta* 1979; **146**: 31–39.
- [7] DROBAK BK. The plant phosphoinositide system. *Biochem J* 1992; **228**: 697–712.
- [8] GABRYŚ H. Dwa układy fotoreceptorowe sterujące ruchem chloroplastu w glonie *Mougeotia*. *Post Biol Kom* 1986; **13**: 35–50.
- [9] GROLIG F, WAGNER G. Light-dependent chloroplast reorientations in *Mougeotia* and *Mesotaenium*: biased pigment-regulated plasmalemma anchorage sites to actin filaments? *Botanica Acta* 1987; **101**: 2–6.
- [10] GROLIG F, WAGNER G. Characterization of the isolated calcium-binding vesicles from the green alga *Mougeotia scalaris*, and their relevance to chloroplast movement. *Planta* 1988; **177**: 169–177.
- [11] HAUPT W. Introduction to Photosensory Transduction Chains. [w] *Biophysics of photoreceptors and photomovements in microorganisms*. Lenci F, Ghetti F, Colombetti G, Häder D-P, Song P-S [red.] Plenum Press, New York, 1991: 7–19.
- [12] HAUPT W. Umweltsignale steuern das Verhalten der Organismen. Erlanger Universitätsreden, Nr 24/1988, str. 23
- [13] HAUPT W, SCHEUERLEIN R. Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment* 1990; **13**: 595–614.
- [14] HAUPT W, WEISENSEEL MH. Physiological evidence and some thoughts on localized responses, intracellular localization and action of phytochrome. [w] *Light and Plant development*. Smith H [red.] Butterworths, Boston 1976: 63–74.
- [15] HEPLER PH. Calcium and development. [w] *Proceeding of the XIV International Botanical Congress, Greuter W, Zimmer B [red.] Koeltz, Königstein/Taunus* 1988; 225–240
- [16] HEPLER PK, WAYNE RO. Calcium and plant development. *Ann Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 397–439.
- [17] JACOBSHAGEN S. Calcium pools, calmodulin and light-regulated chloroplast movements in *Mougeotia* and *Mesotaenium*. [w] *Molecular and cellular aspects in plant development*. Trewavas AJ (red.) Plenum Publishing Corporation 1986: 201–209.
- [18] JAFFE LF. Calcium explosions as triggers of development. *Ann NY Acad Sci* 1980; **339**: 86–101.
- [19] KOPCEWICZ J, TRETYN A, CYMERSKI M. Fitochrom i morfogeneza roślin. PWN Sp. z. o. o., Warszawa 1992; 251.
- [20] KRAML M, HERRMAN H. Red-blue interaction in *Mesotaenium* chloroplast movement: blue seems to stabilize the transient memory of the phytochrome signal. *Photochem Photobiol* 1991; **53**: 255–259.
- [21] LEW RR, SERLIN BS, SCHAUF CL, STOCKTON ME. Red light regulates calcium-activated potassium channels. *Plant Physiol* 1990; **92**: 82–830.
- [22] LEW RR, SERLIN BS, SCHAUF CL, STOCKTON ME. Calcium activation of *Mougeotia* potassium channels. *Plant Physiol* 1990; **92**: 831–836.
- [23] MARMED. The role of calcium in signal transduction. [w] *Second Messenger in Plant Growth and Development*. Alan R. Liss, Inc. 1989: 57–58.
- [24] MELKONIAN B, BURCHERT M, KREIMER G, LATZKO E. Binding and possible function of calcium in the chloroplast. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 1990; **9**: 38–46
- [25] MILLER AJ, SANDERS D. Depletion of cytosolic free calcium induced by photosynthesis. *Nature* 1987; **326**: 397–400

- [26] MOHR H. Coaction between pigment systems. [w] Photomorphogenesis in Plants. Kendrick RE, Kronenberg GHM, Martinus Nyhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1986: 547–564.
- [27] PLIETH C, HANSEN U-P. Light dependent of protoplasmic streaming in *Nitella flexilis* L. as measured by means of laser-velocimetry. *Planta* 1992; **188**: 332–339.
- [28] REDDY ASN, POOVIAH BW. 1, 4, 5-trisphosphate induced calcium release from corn microsomes. *J Biochem* 1987; **101**: 569–573
- [29] REID RJ, SMITH FA. Measurement of calcium fluxes in plants using ^{45}Ca . *Planta* 1992; **186**: 558–566
- [30] ROSSBACHER R, WAGNER G. X-ray microanalysis of calcium fixed and in shock-frozen hydrated green algal cells: *Mougeotia*, *Spirogyra* and *Zygnema*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B3 1984: 664–666.
- [31] ROUX SJ. Ca^{2+} and phytochrome action in plants. *Bioscience* 1984; **34**: 25–29.
- [32] RUSS U, GROLIG F, WAGNER G. Changes of cytoplasmic free Ca^{2+} in the green alga *Mougeotia scalaris* as monitored with indo-1, and their effect on the velocity of chloroplast movements. *Planta* 1991; **184**: 105–112.
- [33] SANDERS D, MILLER AJ, BLACKFORD S, BROSNAN JM, JOHANNES E. Cytosolic free calcium homeostasis in plants. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 1990; **9**: 20–39.
- [34] SCHUMAKER KS, SZE K. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane-vesicles of oat root. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3944–3946.
- [35] SHACKLOCK PS, READ ND, TREWAVAS AJ. Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* 1992; **358**: 753–755.
- [36] SCHÖNBOHM E, MEYER-WEGENER J, SCHÖNBOHM E. No evidence for Ca^{2+} -influx as essential link in the signal transduction chains of either light-oriented chloroplast movements or of P_{fr} -mediated chloroplast anchorage in *Mougeotia*. *Photochem Photobiol* 1990; **5**: 331–341.
- [37] SONG P-S. Molecular properties of biological light sensors. [w] Biophysics of photoreceptors and photomovements in microorganisms. Lenci F, Ghetti F, Colombetti G, Häder DP, Song P-S., [red.] New York: Plenum Press 1991: 21–41.
- [38] TAKAGI S, NAGAIR. Regulation of cytoplasmic streaming in *Vallisneria mesophyll* cells. *J Cell Sci* 1983; **62**: 385–405.
- [39] TAKAGI S, NAGAIR. Light-affected Ca^{2+} fluxes in protoplasts from *Vallisneria mesophyll* cells. *Plant Physiol* 1988; **88**: 228–232.
- [40] TAKAMATSU A, TOMOKAZU A, YOSHIMI T. Ca^{2+} effect on protoplasmic streaming in *Nitella internodal* cell. *Biophys J* 1993; **64**: 182–186.
- [41] TLALKA M, GABRYŚ H. Influence of calcium on blue-light-induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* 1993; **189**: 491–498.
- [42] TRETYN A, GROLIG F, MAGDOWSKI G, WAGNER G. Electron microscopic characterization of calcium-binding physodes in the green alga *Mougeotia scalaris*. *Histochemistry* 1992; **97**: 487–492.
- [43] TRETYN A, WAGNER G, KENDRICK RE. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem Photobiol* 1991; **54**: 1135–1155.
- [44] TSIEN RY. New tetracarboxylate chelators for fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium concentrations. [w] Optical methods in cell physiology. De Weer P, Salzberg BM [red.] John Wiley & Sons Inc. 1986: 327–345.
- [45] TUCKER EB. Inositol bisphosphate and inositol trisphosphate inhibit cell-to-cell passage of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta* 1988; **174**: 358–363.
- [46] WADA M, KADOTA A. Photomorphogenesis in lower green plants. *Ann Rev Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 169–191.
- [47] WAGNER G, KLEIN K. Differential effect of calcium on chloroplast movement in *Mougeotia*. *Photochem Photobiol* 1978; **27**: 137–140.
- [48] WAGNER G, KLEIN K. Mechanism of chloroplast movement in *Mougeotia*. *Protoplasma* 1981; **109**: 169–185.
- [49] WAGNER G, RUSS U, QADER H. Calcium, a regulator of cytoskeletal activity and cellular competence. [w] The Cytoskeleton of the Algae. Menzel D. [red.] CRC Press, Boca Raton, FL. 1992: 411–424.
- [50] WAGNER G, VALENTIN P, DIETER P, MARME D. Identification of calmodulin in the green alga *Mougeotia* and its possible function in chloroplast reorientational movement. *Planta* 1984; **162**: 62–67.
- [51] WAYNE R, HEPLER PK. The role of calcium ions in phytochrome-mediated germination of spores of *Onoclea sensibilis* L. *Planta* 1984; **160**: 12–20.
- [52] WEIDINGER M, RUPPEL HG. Ca^{2+} requirement for blue-light induced chloroplast translocation in *Eremosphaera viridis*. *Protoplasma* 1985; **124**: 184–187.
- [53] WILLIAMSON RE, ASHLEY CC. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in alga *Chara*. *Nature* 1982; **296**: 647–651.

MECHANIZMY INDUKOWANYCH ŚWIATŁEM RUCHÓW CHLOROPLASTÓW

MECHANISMS OF LIGHT-INDUCED CHLOROPLAST MOVEMENTS

Przemysław MALEC

Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Układ białek kurczliwych aktyny i miozyny odgrywa kluczową rolę w indukowanych światłem ruchach chloroplastów. Aktyna roślinna wykazuje wysoki stopień homologii z aktyną komórek zwierzęcych. Miozyny roślinne przejawiają znaczne zróżnicowanie międzygatunkowe pod względem budowy molekularnej. W artykule omówiono wyniki prac nad mechanizmem ruchu chloroplastów w komórkach roślinnych. Przedstawiono również dane świadczące o wpływie światła na architekturę cytoszkieletu aktynowego u roślin oraz współczesne poglądy na regulację roślinnego układu aktomiozynowego.

Summary. The actin/myosin contractile system plays a key role in light-induced chloroplast translocations. The plant actin shows a high degree of homology to actins from animal cells. Plant myosins demonstrate a broad differentiation of the molecular structure between plant species. This article shortly reviews recent data on molecular mechanisms involved in light-induced chloroplast positioning in various plant species. Light-induced intracellular F-actin architecture modification as well as regulation of the actomyosin system in plants are discussed.

WPROWADZENIE

Indukowane światłem ruchy chloroplastów mają charakter przystosowania roślin do zmieniających się warunków oświetlenia w środowisku. Ich konsekwencją są zmiany położenia chloroplastów wewnątrz komórki roślinnej zależne od kierunku, natężenia oraz składu spektralnego padającego światła. Wyróżnić można dwa typy odpowiedzi chloroplastów na światło. Pierwszy może być skorelowany z natężeniami oświetlenia poniżej punktu wysycenia fotosyntezy i jest związany z przyjmowaniem przez chloroplasty położenia umożliwiającego absorpcję jak największych ilości energii (ang. *low fluence rate response*, LFR). Drugi typ odpowiedzi występuje w zakresie natężeń światła powyżej fotosyntetycznego punktu wysycenia. W warunkach takich chloroplasty przyjmują pozycję zapewniającą minimalizację absorbowanej energii świetlnej (ang. *high fluence rate response*, HFR), co wiąże się prawdopodobnie z ochroną aparatu fotosyntetycznego przed uszkodzeniem [78, 87].

Zmiana orientacji lub rozmieszczenia chloroplastów może być realizowana na różne sposoby, zależnie od gatunku rośliny, a także ilości i kształtu organelli. Szczegółowe informacje na ten temat zawarte są w licznych artykułach przeglądowych [18, 20, 21, 76, 78].

Począwszy od klasycznej monografii Senna indukowane światłem ruchy chloroplastów stały się przedmiotem zainteresowania przede wszystkim fotobiologii [76, 78, 85]. Stwierdzono, że w przeważającej większości przebadanych gatunków roślin kluczową rolę w generowaniu reakcji ruchowej chloroplastów odgrywa światło niebieskie, a widma działania zarówno LFR, jak i HFR pokrywają się z tzw. widmem kryptochromowym związanym prawdopodobnie z chromoforami flawinowymi [85, 86]. W nielicznych przypadkach (glony *Mougeotia* i *Mesotaenium*, paproć *Adiantum capillus veneris*) odpowiedź LFR może być wywołana przez światło czerwone o długości fali ok. 660 nm. Przeprowadzone badania potwierdziły zaangażowanie fitochromu jako fotoreceptora w tym procesie [80]. W indukcji HFR chloroplastów tych gatunków postuluje się udział fitochromu i kryptochromu [20]. Doświadczenia z zastosowaniem światła spolaryzowanego, jak również badania strukturalne dowiodły, że cząsteczki fotoreceptora zlokalizowane są w peryferyjnej warstwie cytoplazmy, w pobliżu błony komórkowej i wykazują orientację dichroiczną [19, 86].

Na podstawie wyników otrzymanych przy zastosowaniu techniki mikrowiązek świetlnych stwierdzono, że reakcje orientacyjne chloroplastów zależą od gradientu absorpcji aktywnego fizjologicznie światła w komórce [20, 78]. Według przyjętej hipotezy powoduje on powstanie przestrzennego zróżnicowania stężeń fotoproduktów będących elementami łańcucha transdukcji i amplifikacji sygnału [78].

Nagromadzone wyniki wskazują, że układ białek kurczliwych: aktyny i miozyny pełni rolę aparatu ruchowego (efektora) w reakcjach chloroplastów na światło. Jednak ze względu na znaczne trudności metodyczne (obecność ściany komórkowej, wysoka aktywność proteolityczna w tkankach roślinnych, bardzo mała zawartość miozyny w cytoplazmie komórki roślinnej) [71] dopiero ostatnie lata przyniosły więcej informacji na temat molekularnych mechanizmów wewnątrzkomórkowych ruchów roślinnych. W artykule niniejszym przedstawiono niektóre, istotne z punktu widzenia fizjologii ruchów chloroplastów, dane na temat struktury i lokalizacji układu aktomiozynowego w komórkach roślinnych oraz przegląd literatury dotyczącej mechanizmu wspomnianych wyżej ruchów wewnątrzkomórkowych, jak również współczesne poglądy na temat regulacji aktywności ruchowej na poziomie molekularnym.

2. STRUKTURA AKTYNY I MIOZINY ROŚLINNEJ ORAZ ICH LOKALIZACJA W KOMÓRCIE

Aktyna stanowi 4–6% masy białek zawartych w komórce roślinnej [42]. Wykazuje ona wysoki stopień homologii z aktyną komórek zwierzęcych [41, 71]. Obecnie zidentyfikowano i sklonowano geny kodujące aktynę kilku gatunków roślin [41]. Stwierdzono występowanie wielogenowych rodzin oraz obecność izoform, także w obrębie jednego gatunku [10, 45, 51, 62]. Duże molekularne podobieństwo do aktyny zwierzęcej umożliwia jej identyfikację w ekstraktach białkowych z komórek roślinnych metodami immunochemicznymi [16] (tab. 1). Jak wykazały badania przy użyciu znakowanej fluorescencyjnie falloidyny, aktyna tworzy w komórce roślinnej uporządkowany cytoskielet [9, 65, 71]. Komórki olbrzymie *Characeae*

zawierają wiązki filamentów aktynowych ułożone w ektoplazmie równoległe do długiej osi komórki [28]. Podobne struktury występują również w łagiewkach pyłkowych oraz włoskach epidermalnych roślin wyższych [52, 53]. W komórkach epidermy i miększu wyróżnić można filanty kortykalne (ułożone podbłonowo i równoległe do osi długiej komórki) oraz krótsze wiązki filamentów tworzących skomplikowaną architekturę cytoszkieletu wewnętrznego [50]. Obecność filamentów aktynowych wykazano również w pasmach cytoplazmy przechodzących przez wakuolę (ang. *transvacuolar strands*) [41]. Jak dotąd nie zidentyfikowano w komórkach roślinnych białek analogicznych do białek wiążących aktynę występujących w komórkach zwierzęcych [71]. Pojedyncze dane wskazują na obecność białek podobnych do troponiny-T [40] oraz spektryny [42].

Miozyna roślinna została po raz pierwszy wyizolowana w latach siedemdziesiątych z glonu *Nitella flexilis* [29]. Oczyszczone preparaty otrzymano z pomidora [74], szpinaku [47] i grochu

TABELA 1. Wartości masy cząsteczkowej niektórych aktyń roślinnych

Gatunek rośliny	Masa aktyny	Autorzy
<i>Lycopersicon esculentum</i>	42 kDa	Vahey et al. [74]
<i>Glycine max</i>	45 kDa	Shah et al. [62]
<i>Heracleum sosnowskyi</i>	42 kDa	Turkina et al. [73]
<i>Pisum sativum</i>	43 kDa	Ma i Yen [42]
<i>Petunia hybrida</i>	43 kDa	McLean et al. [45]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	45 kDa	Hanstein et al. [16]
<i>Mougeotia scalaris</i>	45 kDa	Grolig et al. [12]

[42]. Wykazywały one zdolność wiązania aktyny i hydrolizy ATP *in vitro*. Badania utrudniają niezwykle małe ilości miozyny w komórkach roślinnych. Dlatego też bardzo niewiele wiadomo na temat budowy tego białka. Nie zostały dotąd zidentyfikowane geny kodujące miozynę u roślin [67]. Nieliczne wyniki (tab. 2), oparte głównie na badaniach metodami immunochemicznymi, świadczą o

dużym zróżnicowaniu międzygatunkowym. Masa cząsteczkowa łańcucha ciężkiego miozyny roślinnych waha się od ok. 100 kDa (*Chara*, pomidor) do ok. 200 kDa (*Arabidopsis*, szpinak). Dane wskazują na obecność zarówno białek o budowie analogicznej do znanych z komórek zwierzęcych miozyny zawierających dwa łańcuchy ciężkie w cząsteczce (miozyna II) [81] oraz podobnych do opisanych w komórkach *Acanthamoeba castellanii* [1,36] i kosmkach jelitowych [46] miozyny jednołańcuchowych (miozyna I) [55]. W glonach *Chara* i *Ernodesmis* stwierdzono równoczesne występowanie dwóch łańcuchów ciężkich o różnej masie cząsteczkowej [12,39]. Nietypowe wartości masy łańcucha ciężkiego (groch, fasola, pszenica) świadczą o możliwości występowania również miozyny o odmiennej budowie [8]. W przeciwieństwie do cytoszkieletu aktynowego lokalizacja miozyny w komórkach roślinnych znana jest dużo słabiej. Chociaż w dwóch wypadkach wykazano *in vitro* zdolność miozyny roślinnych do tworzenia filamentów o długości 0,2–0,4 μm [42, 47], nie stwierdzono występowania filamentów miozynowych *in vivo*. Wiele interesujących wyników przyniosło odkrycie krzyżowej reaktywności miozyny roślinnych z niektórymi poli- i monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko całemu cząsteczkom lub określonym determinantom miozyny zwierzęcych [49,82]. Stosując metody immunofluorescencyjne stwierdzono obecność miozyny w aktywnie poruszającej się endoplazmie komórek olbrzymich *Characeae* [12,58]. Swoista fluorescencja lokalizowała się zarówno na powierzchni ziarnistości endoplazmatycznych, jak i przemieszczających się pasm endoplazmy. Nie wykazano tam natomiast aktyny [12]. Nehez i wsp. oczyścili i scharakteryzowali miozynę związaną z chloroplastami liści szpinaku, oceniając jej zawartość na 1,6–2,0% całkowitej masy białek w izolowanej frakcji chloroplastów [47]. Heslop-Harrison i Heslop-Harrison zidentyfikowali miozynę związaną z

powierzchnią organelli (amyloplasty, jądra wegetatywne) izolowanych z łagiewek pyłkowych kilku gatunków traw, za pomocą poliklonalnej surowicy skierowanej przeciw miozynie wołowej [22]. Na powierzchni izolowanych chloroplastów zielenicy *Ernodesmis verticillata*, które in vivo poruszają się w endoplazmie, również stwierdzono występowanie specyficznej immunofluorescencji [39].

TABELA 2. Masa cząsteczkowa podjednostek niektórych miozyn roślinnych

Gatunek rośliny	Masa łańcucha ciężkiego	Masa łańcuchów lekkich	Autorzy
<i>Nitella flexilis</i>	200 kDa	–	Kato i Tonomura [29]
<i>Egeria densa</i>	200 kDa	–	Ohsuka i Inoue [48]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	110 kDa	16 i 14 kDa	Vahey et al. [75]
<i>Heracleum sosnowskyi</i>	100 kDa	–	Turkina et al. [73]
<i>Chara australis</i>	200 i 110 kDa	–	Grolig et al. [12]
<i>Spinacea oleracea</i>	200 kDa	20 kDa	Nehez et al. [47]
<i>Pisum sativum</i>	170 kDa	17 i 14 kDa	Ma i Yen [42]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	200 kDa	–	Qiao et al. [58]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	170 kDa	–	
<i>Triticum aestivum</i>	170 kDa	–	
<i>Ernodesmis verticillata</i>	220 kDa i 85 kDa	–	LaClaire [39]
<i>Chara corralina</i>	–	18 kDa	McCurdy i Harmon [43]

3. ROLA UKŁADU AKTOMIOZYNOWEGO W INDUKOWANYCH ŚWIATŁEM RUCHACH CHLOROPLASTÓW

Dokładniejsze badania aparatu ruchowego zostały przeprowadzone głównie na dwóch glonach *Vaucheria sessilis* i *Mougeotia scalaris* oraz komórkach protonemy paproci *Adiantum capillus veneris*.

W glonie *Vaucheria* występuje wielopasmowy przepływ cytoplazmy, a chloroplasty poruszają się równolegle do długiej osi komórki razem z innymi organellami [5]. Komórki nieoświetlone wykazują obecność równoległych pasm w ektoplazmie, wzdłuż których poruszają się organelle. Dekoracja fragmentami S1 miozyny mięśniowej królika ujawniła, że pasma te są wiązkami filamentów aktynowych [78]. Cytochalazyna B odwracalnie hamuje przepływ cytoplazmy przez zaburzenie struktury filamentów [6]. Punktowe oświetlenie światłem niebieskim o natężeniu nie wyższym niż 400 mW/m² powoduje agregację chloroplastów w oświetlonym rejonie komórki [5]. Badania z zastosowaniem mikroskopii interferencyjnej wykazały, że pod działaniem światła niebieskiego ektoplazmatyczne wiązki filamentów aktynowych ulegają destabilizacji i rozgałęzianiu w kierunku wnętrza komórki. Ostatecznie formuje się gęsta sieć cienkich wiązek mikrofilamentów, w której chloroplasty są unieruchamiane. Wyłączenie oświetlenia lub zwiększenie jego natężenia powyżej 400 mW/m² powoduje po czasie ok. 10 min destabilizację powstałej sieci aktynowej, odtworzenie wiązek mikrofilamentów w ektoplazmie i przywrócenie pierwotnego ruchu organelli. Zatem światło pełni w tym układzie rolę czynnika zmieniającego architekturę cytoszkieletu aktynowego [6].

Glon *Mougeotia* ma płytkowaty chloroplast wykazujący rotację wewnątrz komórki wywołowaną przez światło czerwone i niebieskie [15, 18]. Ruch ten może być odwracalnie hamowany cytochalazyną B i nieodwracalnie przez inhibitor grup sulfhydrylowych N-etylo-maleimid [80]. Filamenty aktynowe *Mougeotia* zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w ekstraktach komórkowych oraz rozgniatających protoplastach przy zastosowaniu dekoracji ciężką meromiozyną [14]. Mikroskopia elektronowa, a także barwienie znakowaną fluorescencyjnie falloidyną ujawniły obecność filamentów aktynowych w podbłonowej warstwie cytoplazmy, zlokalizowanych głównie wzdłuż krawędzi chloroplastu *Mougeotia*. Brak jednak jakichkolwiek danych na temat miozyny [11,13]. Według obecnie przyjętej hipotezy zmiana położenia chloroplastu *Mougeotia* może być kontrolowana zarówno przez interakcję akty-na/miozyna, jak i poprzez indukowaną światłem zmianę architektury cytoszkieletu aktynowe-go [11,15]. Grolig i Wagner postulują, że istotną rolę w tym procesie może odgrywać modulowana światłem zmiana miejsca zakotwiczenia filamentów aktynowych do błony komórkowej, zaś kierunek rotacji wyznaczany jest przez zwiększone prawdopodobieństwo interakcji krawędzi chloroplastu z mikrofilamentami korykalnymi [11,78].

Chloroplasty w rosnących protonemach paproci *Adiantum capillus-veneris* wykazują w ciemności przypadkowe ruchy błądzące, które mogą być hamowane przez cytochalazynę B i N-etylo-maleimid, nie są natomiast wrażliwe na kolchicynę [26]. F-aktyna była zlokalizowana przy użyciu znakowanej fluorescencyjnie falloidyny [25,64]. Występuje ona w korykalnej warstwie cytoplazmy i składa się z wiązek filamentów ułożonych równoległe do osi długiej komórki oraz sieci krótszych i cieńszych filamentów rozmieszczonych bezkierunkowo [26]. Podczas oświetlenia słabym światłem czerwonym lub niebieskim chloroplasty ustawiają się pod błoną komórkową prostopadle do kierunku padającego światła (LFR). Światło silne powoduje gromadzenie się chloroplastów w miejscach o słabszym oświetleniu (HFR) [84]. Reakcje te w każdym przypadku powodują zatrzymanie ruchu chloroplastów w określonej pozycji [78]. Kadota i Wada wykazali, że oświetlenie komórki powoduje reorganizację cytoszkieletu aktynowego. Po 4-godzinnym oświetleniu spolaryzowanym światłem czerwonym lub niebieskim o natężeniu 200–400 mW/m² autorzy ci obserwowali pierścienie uformo-wane z F-aktyny na krawędziach chloroplastów od strony błony komórkowej. Jednocześnie zanikały cieńsze, bezkierunkowo rozmieszczone filamente w korykalnej warstwie cytopla-zmy. Nie stwierdzono występowania struktur pierścieniowych bez chloroplastów. Badania z zastosowaniem techniki mikrowiązek świetlnych wykazały, że pierścienie aktynowe tworzą się po wejściu chloroplastu w oświetlony obszar komórki i zanikają, zanim chloroplast opuści dane miejsce po wyłączeniu światła [24]. Obserwowane reorganizacje cytoszkieletu aktyno-wego mają miejsce również przy indukowanej światłem niebieskim odpowiedzi HFR. Autorzy postulują, że ruchy błądzące chloroplastów w ciemności odbywają się dzięki zlokalizowanej na ich powierzchni miozynie, a strukturalne zmiany w cytoszkielecie aktynowym mogą zatrzymywać chloroplasty i ustawiać je w określonej pozycji [24, 25]. Ostatnie badania dowiodły, że w rosnących protonemach *Adiantum* struktura cytoszkieletu zarówno aktyno-wego, jak i tubularnego może być łatwo modyfikowana w zależności od kierunku i natężenia, a także składu spektralnego padającego światła [77].

W liściach wyższych roślin wodnych *Egeria densa*, *Elodea canadensis* i *Hydrilla verti-cillata* chloroplasty biorą udział w występującym stale ruchu cytoplazmy. Witztum i Parthasarathy stwierdzili, że światło białe o natężeniu 3 W/m² powoduje skupianie się chloroplastów w biegunowych częściach komórek. Zjawisko to jest hamowane przez cytochalazynę B [83]. Zastosowanie znakowanej fluorescencyjnie falloidyny ujawniło istnienie nieregularnej sieci

aktywnej zlokalizowanej w kortykalnej warstwie cytoplazmy, nie ulegającej istotnym zmianom pod wpływem oświetlenia. Autorzy ci postulują, że ruch chloroplastów warunkowany jest przez miozynę związaną z ich powierzchnią, a jego kierunek wyznaczają gradienty nieznanego bliżej fotoproduktu [83].

4. REGULACJA UKŁADU AKTOMIOZYNOWEGO W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Regulacja aktywności ATP-azowej miozyny, jak i polimeryzacja/depolimeryzacja aktyny w komórkach roślinnych należą do bardzo słabo poznanych procesów [59,71]. Obserwowana przez wielu autorów wrażliwość wewnątrzkomórkowych ruchów roślinnych na zmiany poziomu wolnych jonów wapnia stała się podstawą do wysunięcia hipotez o zaangażowaniu białek wiążących wapń, jak np. kalmodulina, w kontroli ruchu cytoplazmy wywołanego uszkodzeniem mechanicznym u *Ernodesmis* [38,78], indukowanej światłem rotacji chloroplastu *Mougeotia* [18,72,79], fototranslokacji chloroplastów roślin wyższych [68], jak również w procesach przepływu cytoplazmy w komórkach glonów *Characeae* [27] i łagiewkach pyłkowych [32, 33, 34, 35]. Obserwuje się hamujący wpływ wapnia na przepływ cytoplazmy w komórkach roślinnych [27]. Jest to zatem działanie przeciwne do poznanej wcześniej roli wapnia w regulacji układu aktomiozynowego mięśni zwierząt [81] oraz komórek pierwotniaków [30,36]. W komórkach epidermy i miększu *Vallisneria gigantea* indukowana światłem translokacja chloroplastów jest prawdopodobnie kontrolowana przez zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia. Stwierdzono, że obniżenie jego poziomu w cytoplazmie wywołuje efekt analogiczny do działania światła niebieskiego [66]. Odwracalna fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny, katalizowana przez zależną od kalmoduliny specyficzną kinazę serynowo/treoninową (ang. *myosin light chain kinase*, MLCK) jest jednym z procesów kontrolujących ruch w komórkach zwierzęcych [4, 37, 61]. Tominaga i wsp. zaproponowali model kontroli przepływu cytoplazmy w komórkach *Characeae* oparty na procesie zależnej od jonów wapniowych fosforylacji/defosforylacji lekkiego łańcucha miozyny endoplazmatycznej [63, 69, 70]. W roku 1987 w komórkach soi została po raz pierwszy opisana serynowo/treoninowa kinaza aktywowana bezpośrednio przez jony wapniowe bez udziału kalmoduliny (ang. *calcium dependent protein kinase*, CDPK) [17]. W latach następnych wykazano jej działanie w komórkach licznych gatunków roślin wszystkich grup systematycznych [23, 56, 57], w tym m.in. w glonie *Mougeotia scalaris* [60]. Badania strukturalne przeprowadzone na łagiewkach pyłkowych *Tradescantia virginiana*, komórkach korzeniowych *Allium* [57] oraz komórkach olbrzymich *Characeae* [44] dowiodły, że CDPK zlokalizowana jest wzdłuż filamentów F-aktyny. Depolimeryzacja aktyny poprzez działanie cytochalazyną B powodowała również rozpad uporządkowanej struktury CDPK [57]. Stwierdzono jednocześnie brak zdolności CDPK do wiązania i fosforylacji oczyszczonej aktyny królika *in vitro* [59]. Badania biochemiczne CDPK dowiodły obecności sekwencji homologicznych zarówno z kalmoduliną (obszar wiązania wapnia), jak i MLCK (region miejsca aktywnego) [59]. W roku 1992 McCurdy i Harmon stwierdzili, że w komórkach *Chara corallina* podniesienie poziomu wolnych jonów wapniowych powodowało fosforylację kilkunastu białek o różnej masie cząsteczkowej. Fosforylacja ta była hamowana przez dodanie monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko CDPK soi. Jeden z fosforylowanych polipeptydów o masie 18 kDa jest rozpozna-

wany przez monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko lekkim łańcuchom miozyny kurcząca. Jednocześnie nie stwierdzono fosforylacji łańcuchów ciężkich [43]. Wyniki te sugerują, że CDPK w komórkach roślinnych może działać jako analog mięśniowej kinazy lekkiego łańcucha miozyny oraz że prawdopodobna fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny *Characeae* powoduje spadek jej aktywności ATP-azowej i w konsekwencji zatrzymanie przepływu cytoplazmy [43].

Cytoskielet aktynowy komórek roślinnych charakteryzuje się względnie wysoką dynamiką, szczególnie w organach rosnących [71,78]. Jak dotychczas nie zostały poznane mechanizmy prowadzące do zmian struktury mikrofilamentów u roślin. Nieliczne wyniki wskazują, że proces ten może być również kontrolowany zmianami stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia [71], analogicznie jak w komórkach zwierzęcych [56]. W glonie *Vaucheria sessilis* zaobserwowano lokalną hiperpolaryzację błony w oświetlonym rejonie komórki poprzedzającą formowanie się sieci aktynowej (zob. wyżej) [78]. W łagiewkach pyłkowych *Tradescantia virginiana* wykazano obecność związanych z błoną komórkową kanałów wapniowych regulowanych zmianami polaryzacji błony [71].

5. ZAKOŃCZENIE

Przedstawiony powyżej przegląd literatury dotyczącej roli układu aktomiozynowego jako systemu efektorowego w indukowanych światłem ruchach chloroplastów świadczy o postępie, jaki dokonuje się w ostatnich latach w tej dziedzinie badań. Jednak wiele zagadnień pozostaje dotychczas niewyjaśnionych, np. nie scharakteryzowano jak dotąd miozyny w żadnym z gatunków roślin stanowiących tradycyjny obiekt badań nad reakcjami chloroplastów na światło. Bardzo skąpe jeszcze informacje na temat miozyny roślinnych wskazują na duże zróżnicowanie międzygatunkowe tej klasy białek. Konsekwencją tego zróżnicowania może być występowanie wielu mechanizmów regulacji ruchu na poziomie molekularnym, analogicznie do komórek zwierzęcych [2, 8, 37, 67]. W najbliższej przyszłości prowadzone będą zapewne badania przy zastosowaniu metod biologii molekularnej mające na celu szczegółowe poznanie struktury poszczególnych podjednostek miozyny roślinnych, jak również dalsze badania fizjologiczne dotyczące mechanizmów kontroli aparatu ruchowego odpowiedzialnego za indukowane światłem przemieszczenia chloroplastów w komórkach glonów i roślin wyższych.

LITERATURA

- [1] ADAMS RJ, POLLARD TD. Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature* 1986; **322**: 754–756.
- [2] ADAMS RJ, POLLARD TD. Membrane-bound myosin-I provides new mechanisms in cell motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989; **14**: 178–182.
- [3] ADAMS RJ, POLLARD TD. Binding of myosin-I to membrane lipids. *Nature* 1989; **340**: 565–568.
- [4] ADELSTEIN RS. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann Rev Biochem* 1980; **49**: 921–956.
- [5] BLATT MR, BRIGGS WR. Blue-light-induced cortical fiber reticulation concomitant with chloroplast aggregation in the alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 1980; **147**: 355–362.

- [6] BLATT MR, WESSELLS NK, BRIGGS WR. Actin and cortical fiber reticulation in the siphonaceous alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 1980; **147**: 363–375.
- [7] CHEN JCW, KAMIYA N. Localization of myosin in the internodal cell of *Nitella* as suggested by differential treatment with N-ethylmaleimide. *Cell Struct Funct* 1975; **1**: 1–9.
- [8] CHENEY RE, MOOSEKER MS. Unconventional myosins. *Curr Op Cell Biol* 1992; **4**: 27–35.
- [9] CONDEELIS JS. The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of *Amaryllis beladonna*. *Exp Cell Res* 1974; **88**: 435–439.
- [10] GIULIANO G, HOFFMAN NE, KO K, SCOLNIK PA, CASHMORE AR. A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. *EMBO J* 1988; **7**: 3635–3642.
- [11] GROLIG F, WAGNER G. Light-dependent chloroplast reorientations in *Mougeotia* and *Mesotanium*: biased by pigment-regulated plasmalemma anchorage sites to actin filaments? *Bot Acta* 1987; **101**: 2–6.
- [12] GROLIG F, WILLIAMSON RE, PARKE J, MILLER CH, ANDERTON BH. Myosin and Ca-sensitive streaming in the alga *Chara*: detection of two polypeptides reacting with a monoclonal anti-myosin and their localization in the streaming endoplasm. *Eur J Cell Biol* 1988; **47**: 22–31.
- [13] GROLIG F. The cytoskeleton of the *Zygnemataceae*. (w)The cytoskeleton of the algae, Mentzel D, Boca Raton FL (red.) CRC Press, 1992: 165–194.
- [14] GROLIG F, WEIGANG-KOHLER K, WAGNER G. Different extent of F-actin bundling in walled cells and in protoplasts of *Mougeotia scalaris*. *Protoplasma* 1990; **157**: 225–230.
- [15] HANSTEIN CH, GROLIG F, WAGNER G. Immunolocalization of cytosolic phytochrome in the green alga *Mougeotia*. *Bot Acta* 1992; **105**: 55–62.
- [16] HANSTEIN CH, LANGE U, SCHNEIDER-POETSCH HAW, GROLIG F, WAGNER G. Detection of actin and localization of phytochrome in the green alga *Mougeotia* by monoclonal antibodies. *Acta Histochem* 1992; Suppl.-Band XLI: 223–230.
- [17] HARMON AC, PUTNAM-EVANS C, CORMIER MJ. A calcium-dependent, but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol* 1987; **83**: 830–837.
- [18] HAUPT W. Light-mediated movement of chloroplasts. *Ann Rev Plant Physiol* 1982; **33**: 205–233.
- [19] HAUPT W. Wavelength-dependent action dichroism: a theoretical consideration. *Photochem Photobiol* 1984; **39**: 107–110.
- [20] HAUPT W, SCHEUERLEIN R. Chloroplast movement. *Plant Cell Environm* 1990; **13**: 595–614.
- [21] HAUPT W, SCHONBOHM E. Light-oriented chloroplast movements. (w) Photobiology of Microorganisms, Halldal P. (red.) London: Wiley Interscience, 1970: 283–307.
- [22] HESLOP-HARRISON J, HESLOP-HARRISON Y. Myosin associated with the surfaces of organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. *J Cell Sci.* 1989; **94**: 319–325.
- [23] JINSART W, TERNAI B, POLYA GM. Inhibition and activation of wheat embryo calcium dependent protein kinase and inhibition of avian myosin light chain kinase by long chain aliphatic amphiphiles. *Plant Sci* 1991; **78**: 165–175.
- [24] KADOTA A, WADA M. Photoinduction of circular F-actin on chloroplast in a fern protonemal cell. *Protoplasma* 1989; **151**: 171–174.
- [25] KADOTA A, WADA M. Circular Arrangement of cortical F-actin around the subapical region of a tip-growing fern protonemal cell. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 1183–1186.
- [26] KADOTA A, WADA M. Reorganization of the cortical cytoskeleton in tip-growing fern protonemal cells during phytochrome-mediated phototropism and blue light-induced apical swelling. *Protoplasma* 1992; **166**: 35–41.
- [27] KAMIYA N. Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. *Ann Rev Plant Physiol* 1981; **32**: 205–236.
- [28] KAMIYA N. Algae as a treasure house for cytoskeleton research. (w) The Cytoskeleton of the Algae, Mentzel D, (red.) Boca Raton: CRC Press, 1992: 425–433.
- [29] KATO T, TONOMURA Y. Identification of myosin in *Nitella flexilis*. *J Biochem* 1977; **82**: 777–782.
- [30] KOHAMA K, SHIMMEN T. Inhibitory Ca-control of movement of beads coated *Physarum* myosin along actin-cables in *Chara* internodal cells. *Protoplasma* 1985; **129**: 88–91.
- [31] KOHNO T, OKAGAKI T, KOHAMA K, SHIMMEN T. Pollen tube extract supports the movement of actin filaments in vitro. *Protoplasma* 1991; **161**: 75–77.
- [32] KOHNO T, SHIMMEN T. Ca-induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* 1987; **141**: 177–179.
- [33] KOHNO T, SHIMMEN T. Accelerated sliding of pollen tube organelles along *Characeae* actin bundles regulated by Ca. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1539–1543.
- [34] KOHNO T, SHIMMEN T. Mechanism of Ca inhibition of cytoplasmic streaming in lily pollen tubes. *J Cell Sci* 1988; **91**: 501–509.

- [35] KOHNO T, CHAEN S, SCHIMMEN T. Characterization of the translocator associated with pollen tube organelles. *Protoplasma* 1990; **154**: 179–183.
- [36] KORN ED, HAMMER JA. Myosins of nonmuscle cells. *Ann. Rev Biophys Chem* 1988; **17**: 23–45.
- [37] KUŹNICKI J. Phosphorylation of myosin in non-muscle and smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1986; **204**: 169–176.
- [38] LA CLAIRE JW. Cell motility during wound healing in giant algal cells: contraction in detergent-permeabilized cell models of *Ernodosmis*. *Eur J Cell Biol* 1984; **33**: 180–189.
- [39] LA CLAIRE JW. Immunolocalization of myosin in intact and wounded cells of the green alga *Ernodosmis verticillata* (Kützinger) Borgesen. *Planta* 1991; **184**: 209–217.
- [40] LIMSS, BORISY GE. Widespread occurrence of anti-troponin T crossreactive components in non-muscle cells. *J Cell Sci* 1986; **85**: 1–19.
- [41] LLOYD C. Actin in plants. *J Cell Sci* 1988; **90**: 185–188.
- [42] MA YZ, YEN LF. Actin and myosin in pea tendrils. *Plant Physiol* 1989; **89**: 586–589.
- [43] MCCURDY DW, HARMON AC. Phosphorylation of a putative myosin light chain in *Chara* by calcium-dependent protein kinase. *Protoplasma* 1992; **171**: 85–88.
- [44] MCCURDY DW, HARMON AC. Calcium dependent protein kinase in the green alga *Chara*. *Planta* 1992; **188**: 54–61.
- [45] MCLEAN M, GERATS AGM, BAIRD WV, MEAGHER RB. Six actin gene subfamilies map to five chromosomes of *Petunia hybrida*. *J Heredity* 1990; **81**: 341–346.
- [46] MOOSEKER MS, COLEMAN TS. The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus (brush border myosin-I) is a mechanoenzyme. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2395–2400.
- [47] NEHEZ R, FAZEKAS E, SARVARI I, OVARY L, SZEKESY-HERMAN V. Purification and characterization of myosin from isolated chloroplasts of spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.). *Acta Agronom Hung* 1989; **38**: 231–240.
- [48] OHSUKA K, INOUE A. Identification of myosin in a flowering plant *Egeria densa*. *J Biochem* 1979; **85**: 375–378.
- [49] PARKE J, MILLER CH, ANDERTON BH. Higher plant myosin heavy-chain identified using a monoclonal antibody. *Eur J Cell Biol* 1986; **41**: 9–13.
- [50] PARTHASARATHY MV. F-actin architecture in coleoptile epidermal cells. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 1–12.
- [51] PEARSON L, MEAGHER RB. Diverse soybean actin transcripts contain a large intron in the 5' untranslated leader: Structural similarity to vertebrate muscle actin genes. *Plant Molec Biol* 1990; **14**: 513–526.
- [52] PERDUE TD, PARTHASARATHY MV. In situ localization of F-actin in pollen tubes. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 13–20.
- [53] PIERSON ES, DERKSEN J, TRAAS JA. Organization of microfilaments and microtubules in pollen tubes grown in vitro or in vivo in various angiosperms. *Eur J Cell Biol* 1986; **41**: 14–18.
- [54] POLLARD TD, CRAIG SW. Mechanism of actin polymerization. *Trends Biochem Sci* 1982; **7**: 55–58.
- [55] POLLARD TD, DOBERSTEIN SK, ZOT HG. Myosin-I. *Ann Rev Physiol* 1991; **53**: 653–681.
- [56] POLYA GM, MINICHELLO J, NOTT R, KLUCIS E, KEANE PJ. Differential inhibition of plant calcium dependent protein kinases by long chain fatty acids and other amphiphiles. *Plant Sci* 1990; **71**: 45–54.
- [57] PUTNAM-EVANS C, HARMON AC, PALEVITZ BA, FECHHEIMER M, CORMIER MJ. Calcium-dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989; **12**: 12–22.
- [58] QIAOL, GROLIGF, JABLONSKY PP, WILLIAMSON RE. Myosin heavy chains: detection by immunoblotting in higher plants and localization by immunofluorescence in the alga *Chara*. *Cell Biol Int Rep* 1989; **13**: 107–117.
- [59] ROBERTS DM, HARMON AC. Calcium - modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 375–414.
- [60] ROBERTSD. Detection of a calcium-activated protein kinase in *Mougeotia* by using synthetic peptide substrates. *Protoplasma* 1989; **91**: 1613–1619.
- [61] SELLERS JR, SPUDICH JA, SHEETZ MP. Light chain phosphorylation regulates the movement of smooth muscle myosin on actin filaments. *J Cell Biol* 1985; **101**: 1897–1902.
- [62] SHAH DM, HIGHTOWER RC, MEAGHER RB. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 1022–1026.
- [63] SHIMMEN T, YANO M. Active sliding movement of latex beads coated with skeletal muscle myosin on *Chara* actin bundles. *Protoplasma* 1984; **121**: 132–137.
- [64] SONOBE S, SHIBAOKA H. Cortical fine actin filaments in higher plant cells visualized by rhodamine-phalloidin after pretreatment with m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester. *Protoplasma* 1989; **148**: 80–86.
- [65] STAIGER CJ, SCHLIWA M. Actin localization and functions in higher plants. *Protoplasma* 1987; **132**: 129–136.

- [66] TAKAGI S, YAMAMOTO KT, FURUYA M, NAGAI R. Cooperative regulation of cytoplasmic streaming and Ca fluxes by Pfr and photosynthesis in *Vallisneria* mesophyll cells. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1702–1708.
- [67] TITUS M. Myosins. *Curr Op Cell Biol* 1993; **5**: 77–81.
- [68] TLAŁKA M, GABRYŚ H. Influence of calcium on blue light-induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* 1993; **189**: 491–498.
- [69] TOMINAGA Y, TAZAWA M. Reversible inhibition of cytoplasmic streaming by intracellular Ca in tonoplast-free cells of *Chara australis*. *Protoplasma* 1981; **109**: 103–111.
- [70] TOMINAGAY, WAYNE R, TUNG HYL, TAZAWA M. Phosphorylation-dephosphorylation is involved in Ca-controlled cytoplasmic streaming of characean cells. *Protoplasma* 1987; **136**: 161–169.
- [71] TRAAS JA. The plasma membrane-associated cytoskeleton. (w) *The Plant Plasma Membrane*, Larsson C, Moller IM, (red.) Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 269–292.
- [72] TRETYN A, GROLIG F, MAGDOWSKI G, WAGNER G. Electron microscopic characterization of calcium-binding physodes in the green alga *Mougeotia scalaris*. *Histochem* 1992; **97**: 487–492.
- [73] TURKINA MV, KULIKOVA AL, SOKOLOV OI, BOGATYREV VA, KURSANOV AL. Actin and myosin filaments from the conducting tissues of *Heracleum sosnowskyi*. *Plant Physiol Biochem* 1987; **25**: 689–696.
- [74] VAHEY M, SCORDILIS S. Contractile proteins from the tomato. *Can J Bot* 1980; **58**: 797–801.
- [75] VAHEY M, TITUS M, TRAUTWEIN R, SCORDILIS S. Tomato actin and myosin: contractile proteins from a higher land plant. *Cell Motil* 1982; **2**: 131–147.
- [76] WADA M, KADOTA A. Photomorphogenesis in lower green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 169–191.
- [77] WADA M, MURATA T, SHIBATA M. Changes in microtubule and microfibril arrangement during polarotropism in *Adiantum protonemata*. *Bot Mag Tokyo* 1990; **103**: 391–401.
- [78] WADA M, GROLIG F, HAUPT W. Light-oriented chloroplast positioning. Contribution to progress in photobiology. *J Photochem Photobiol* 1993; **B 17**: 3–25.
- [79] WAGNER G, RUSS U, QUADER H. Calcium, a regulator of cytoskeletal activity and cellular competence. (w) *The Cytoskeleton of the Algae*, Mentzel D, (red.) Boca Raton: CRC Press, 1992: 411–424.
- [80] WAGNER G, KLEIN K. Mechanism of chloroplast movement in *Mougeotia*. *Protoplasma* 1981; **109**: 169–185.
- [81] WARRICK HM, SPUDICH JA. Myosin structure and function in cell motility. *Ann Rev Cell Biol* 1987; **3**: 379–42
- [82] WILLIAMSON RE, PERKIN JL, MCCURDY DW, CRAIG S, HURLEY UA. Production and use of monoclonal antibodies to study the cytoskeleton and other components of the cortical cytoplasm of *Chara*. *Eur J Cell Biol* 1986; **41**: 1–8.
- [83] WITZTUM A, PARTHASARATHY MV. Role of actin in chloroplast clustering and banding in leaves of *Egeria*, *Elodea* and *Hydrilla*. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 21–26.
- [84] YATSUHASHI H, WADA M. High-fluence rate responses in the light-oriented chloroplast movement in *Adiantum protonemata*. *Plant Sci* 1990; **68**: 87–94.
- [85] ZURZYCKI J. The action spectrum for the light dependent movements of chloroplasts in *Lemna trisulca* L. *Acta Soc Bot Pol* 1962; **XXXI**: 489–538.
- [86] ZURZYCKI J. Primary reactions in the chloroplast rearrangements. *Acta Protozool* 1972; **11**: 189–199.
- [87] ZURZYCKI J. Light-adaptation phenomena of the photosynthetic apparatus at the cellular level. *Pol Ecol Stud* 1981; **7**: 365–376.

RUCHY LATERALNE PODBŁONOWEJ SIECI AKTYNOWEJ W KOMÓRKACH RUCHLIWYCH

LATERAL MOVEMENTS OF THE SUBMEMBRANOUS ACTIN NETWORK IN MOTILE CELLS

Andrzej GRĘBECKI

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Warszawa

Streszczenie. Kortyczny cytoszkielet aktynowy ameb i ameboidalnych komórek tkankowych nieprzerwanie przesuwa się od ich zrelaksowanej krawędzi przedniej ku miejscom o wyższej aktywności skurczowej. Podczas migracji komórek obkurcza się on ku miejscom ich przyczepu do podłoża, a podczas cytokinezy ku bruzdzie podziałowej. Teoria ogólnego przepływu kortykalnego głosi, że aktywna sieć filamentów. Biegunowa relaksacja jest zjawiskiem biomechanicznym i polega na cyklicznym odrywaniu się kolejnych warstw powstającej sieci aktynowej od błony plazmatycznej i ich wycofywaniu spod przedniej krawędzi komórki. Zjawisko to jest zapewne regulowane przez białka z rodziny gelsoliny, destabilizujące kompleks kortykalny pod kontrolą wolnych jonów Ca. Siłę napędową przesuwu kortykalnego cytoszkieletu przypisuje się interakcji aktyny z miozyna II w kurczących się tylnych i środkowych okolicach komórek oraz z miozyna I pod ich przednimi krawędziami.

Słowa kluczowe: ruchy komórkowe, korteks komórkowy, sieć aktynowa, miozyny

Summary. The cortical actin cytoskeleton of amoebae and amoeboid tissue cells steadily moves from the relaxed frontal cell edge toward the contracting areas. During migration it is retracted toward the cell-to-substratum attachment sites, and toward the division furrow during cytokinesis. Theory of the general cortical flow claims actin being polymerized at the relaxed cell pole, and then transferred to the contraction sites as a ready for function network of filaments. The polar relaxation is a biomechanical phenomenon produced by a cyclic detachment of consecutive layers of the reassembled actin network from the plasma membrane, and their retreat away from the frontal edge. This phenomenon is probably regulated by proteins from the gelsolin family, degrading the cortical complex under control of free Ca ions. The driving force of the cortical cytoskeleton sliding is attributed to the interaction of actin with myosin II in the contracting posterior and central cell regions, and myosin I at their frontal edges.

Keywords: cell movements, cell cortex, actin network, myosins

WPROWADZENIE

Zjawiska ruchowe, które będą przedmiotem tego artykułu, są charakterystyczne dla komórek ameboidalnych, zarówno pierwotniaczych jak i tkankowych. Cechą wyróżniającą ruch amebowy jest brak narządów motorycznych o stałym składzie i stałej pozycji w komórce, bowiem samo wykonanie czynności ruchowej prowadzi do dezintegracji struktury, która ją

spełniła. Efektor musi następnie zostać odbudowany w nowym miejscu. Budulec jest więc nieustannie transportowany z miejsc dezintegracji aparatu ruchowego w tyle komórki do miejsc jego rekonstrukcji w strefie czołowej. Prawidłowości te obserwujemy zarówno na poziomie makromorfologii, jak ultrastruktury i składu molekularnego komórki amebowej. Podstawowym jej objawem jest solifikacja żelu aktynowego i depolimeryzacja filamentów w wyniku skurczu, transport monomerów aktyny przez strumień cytoplazmy i ich repolimeryzacja pod przednią krawędzią komórki. Komórka o tak dalece posuniętej wewnętrznej płynności strukturalnej nie może oczywiście przesuwać się po podłożu jako zwarty blok. Ruch postępowy całości wymaga bowiem także przemieszczania się względem siebie poszczególnych warstw cytoplazmy. Podstawowe znaczenie mają ruchy warstwy kortykalnej, a zwłaszcza wchodzącej w jej skład podbłonowej sieci aktynowej.

RUCHY PODBŁONOWEJ WARSTWY KURCZLIWEJ U AMEB

Cytoskielet ameb jest zbudowany z trójwymiarowej sieci aktynowej. Sieć ta tworzy pod błoną warstewkę przejrzystego żelu o grubości ok. 1 μm , pozbawioną organelli i zwaną hialoplazmą. Głębsze warstwy ektoplazmy, zwane granuloplazmą, są także żelem związanym z siecią podbłonową, ale obfitują w organelle widoczne jako ziarnistości w mikroskopie świetlnym. Ziarnistości ektoplazmy są więc naturalnymi znacznikami, które pozwalają śledzić przyżyciowo ruchy podbłonowego cytoskieletu aktynowego.

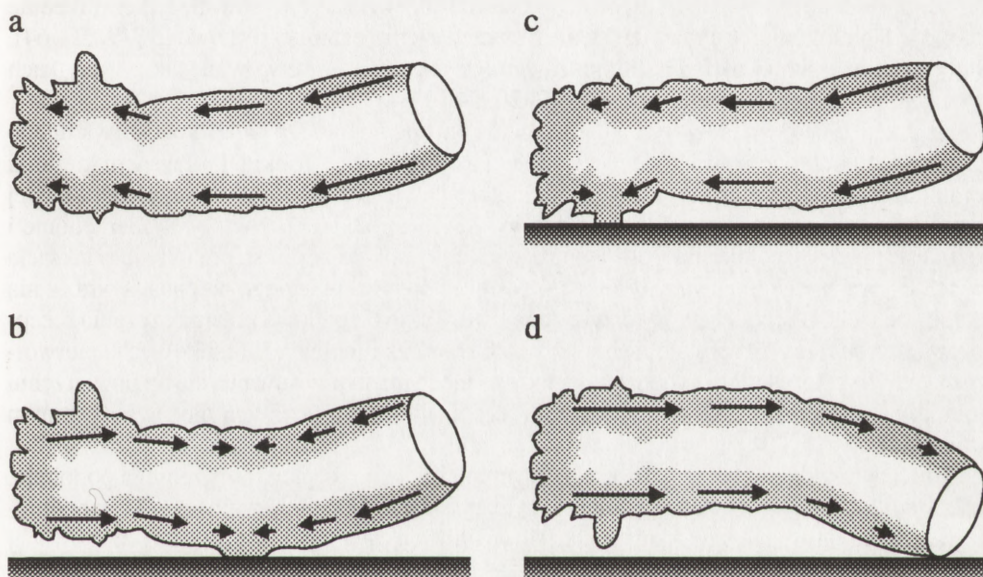
W klasycznej literaturze żel ektoplazmatyczny opisywano jako cylinder o nieruchomych ścianach bocznych. Wyjątkiem miały być tylko dwa z pozoru różne i niezależne zjawiska ruchowe, jedno w zamkniętym tylnym końcu cylindra, a drugie u jego otwartego końca przedniego. W wycofującej się tylnej krawędzi komórki cała ektoplazma siłą rzeczy posuwa się zgodnie z kierunkiem lokomocji. W przodzie natomiast ektoplazma może odsuwać się ruchem wstecznym od krawędzi przedniej (pod którą jest stale wytwarzana z napływającej endoplazmy wskutek żelifikacji aktyny, tzn. jej polimeryzacji i sieciowania filamentów). W strefie czołowej obserwujemy więc trójwymiarową pętlę ruchu, utworzoną przez napływ endoplazmy środkiem oraz odpływ materiału wzdłuż ścian w postaci ektoplazmatycznego żelu. Cała figura przypomina swą postacią fontannę i jest nazywana ruchem fontannowym.

Prowadzone przez nas filmowe analizy ruchu ziarnistości ektoplazmatycznych u ameb rozmaicie przyczepionych do podłoża oraz pozbawionych przyczepu [38–40] zaprzeczyły tradycyjnym wyobrażeniom o stacjonarności korteksu wzdłuż ścian cylindra. Ameba zawieszona w środowisku oczywiście nie może się przemieszczać, skoro pozbawiona jest kontaktu ze stałym podłożem. Mimo to cytoskieletalny motor w jej wnętrzu nadal pracuje, aczkolwiek "na jałowym biegu". Endoplazma, jak zwykle, płynie środkiem do przodu, natomiast żel ektoplazmatyczny cofa się w tych warunkach aż do samego tyłu ameby (rys. 1 A). Ruch fontannowy nie ogranicza się więc teraz do strefy przedniej, lecz ogarnia całą komórkę. Profile prędkości ogólnego wstecznego przesuwu obserwowanego pod błoną dowodzą równomiernej aktywności skurczowej całego korteksu, poza krawędzią czołową.

Ten pierwotny wzorzec ruchu kortykalnego, właściwy dla ameb w zawieszynie, ulega zmianie, gdy nawiążą one kontakt z podłożem i podejmą ruch migracyjny. *Amoeba proteus* i ameby pokrewne tworzą zwykle przyczepy do podłoża pomiędzy przednimi a środkowymi okolicami swojej dolnej powierzchni. Wówczas peryferyjna warstwa cytoplazmy obkurcza

się od obu wolnych końców komórki, przedniego i tylnego, ku miejscom przyczepu (rys. 1 B). Także w tym wypadku analiza prędkości wskazuje, że ten dośrodkowy przesuw jest wynikiem jednorodnego skurczu całej warstwy korytkalnej. Zatem, ruch postępowy ektoplazmy w tylnej części ameby oraz jej wsteczny ruch z przodu w strefie fontannowej wcale nie są dwoma niezależnymi zjawiskami. Są to zaś tylko dwa lokalne przejawy tego samego procesu – jednolitego obkurczania się całego korytkalnego cytoszkieletu w kierunku dośrodkowym.

Zdarza się czasem, na podłożach naturalnych zapewne o wiele częściej niż na szkle, że migrujące ameby przytwierdzają się na jakiś czas tylko przednim albo tylko tylnym końcem ciała. Wówczas podbłonowy cytoszkielet odpowiednio przemieszcza się jako całość, do przodu albo do tyłu (rys. 1 C, D).



Rys. 1. Rozkład kierunków i prędkości przesuwu warstwy korytkalnej (zaznaczony strzałkami odpowiedniej długości) u ameb zawieszonych w środowisku wodnym (A), migrujących normalnie po podłożu z centralnie ułożoną strefą adhezji (B) oraz przytwierdzonych do podłoża tylnym końcem ciała (C) bądź przednim (D), schemat według Grębeckiego [43]

TEORIA OGÓLNEGO PRZEPIYU KORYTKALNEGO W KOMÓRKACH RUCHLIWYCH

Przedstawiony tu empiryczny opis zachowania się podbłonowej warstwy kurczliwej u ameb został później wykorzystany (wraz z pomiarami parametrów ruchu) do matematycznego modelowania i komputerowej symulacji dynamiki cytoszkieletu *Amoeba proteus* [18]. Co ważniejsze, obserwacje te i interpretacje weszły w skład ogólnej teorii przepływu korytkalnego Braya i White'a [8]. Autorzy ci uogólnili znaczną liczbę wcześniejszych danych wskazu-

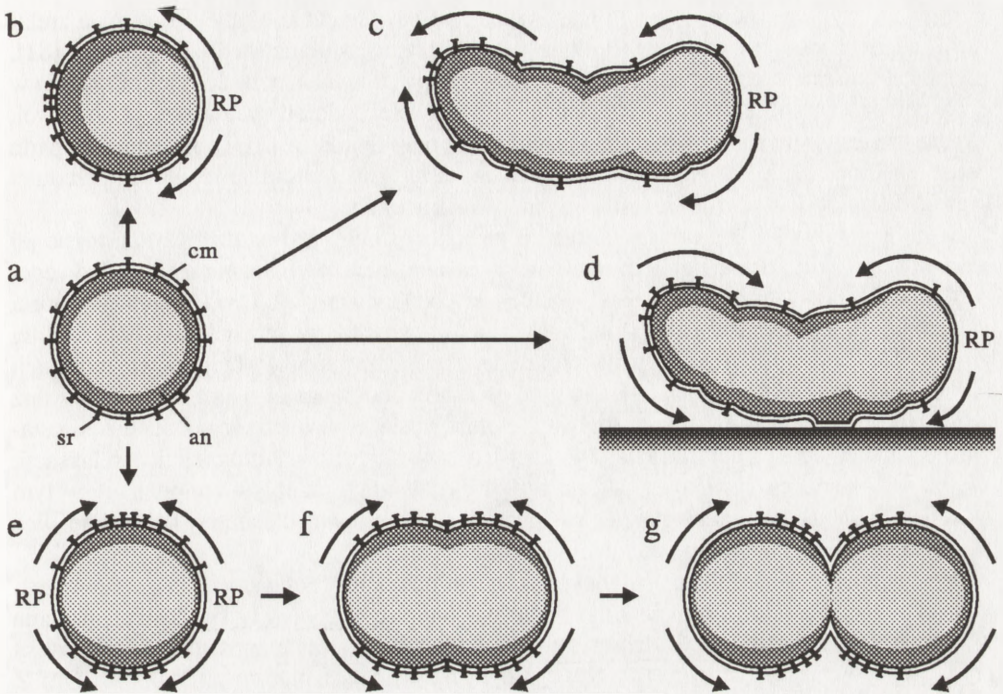
jących, że wielu funkcjom ruchowym rozmaitych komórek towarzyszy wsteczny transport struktur bogatych w cytoszkieletną aktynę. Zaświadczyły o tym także nowsze obserwacje, szczególnie obfite w ostatnich paru latach.

Rozliczne wypustki tworzone przez czołowe lamellipodia pełnących fibroblastów regularnie zsuwają się do tyłu. Zachowują się tak zarówno pofałdowania powierzchni (*ruffles*) wraz ze swą aktynową wyściółką [1], jak i mikrokolce (*microspikes*) zawierające osiową wiązkę filamentów aktynowych [57]. Poza podbłonowymi strukturami aktynowymi wstęchnemu transportowi podlegają również włókna naprężeniowe (*stress fibres*) w głębi cytoplazmy [27]. Ogólnie fibroblast, który rozpląszcza się na podłożu, a następnie migruje, nieprzerwanie wytwarza aktynowy cytoszkielec na swym obwodzie, pod krawędzią posuwającą się po podłożu, po czym powstające struktury aktynowe wciąż się zsuwają ku środkowym okolicom komórki [16, 19, 86]. W polimorfonuklearnych leukocytach oraz w limfocytach przesuwały się stopniowo ku tyłowi takie elementy konturu, jak wypustki wysuwane przez przednie krawędzie tych komórek oraz pierścieniowe przewężenia ciała komórkowego [49, 50, 64]. Stały ruch dośrodkowy różnych struktur zawierających aktynę obserwowano także w płytkach krwi [6] i w stożkach wzrostu neuronów [7, 20, 54].

Na przedstawionym dalej (rys. 2) schemacie koncepcji ogólnego przepływu kortykałnego zaznaczono podbłonową warstwę cytoszkieletu aktynowego, ośrodki jej relaksacji, kierunki jej przesunięć, błonę plazmatyczną oraz receptory powierzchniowe. W nieaktywnej kulistej komórce pozostającej w stanie zawiesiny (rys. 2 A) wszystkie te struktury są nieruchome i rozmieszczone równomiernie. Jeśli jednak w jakimś punkcie korteksu pojawi się relaksacja (rys. 2 B), warstwa kurczliwa zacznie się przesuwać do przeciwnego bieguna, a wraz z nią skupią się wokół niego receptory powierzchniowe. Takie biegunowe przemieszczenia receptorów (ang. *capping*) obserwuje się u wszystkich komórek ruchliwych, tkankowych i pierwotniaczych. Współczesny stan wiedzy i poglądy na mechanizm przesuwania się na powierzchni komórek składników błony plazmatycznej i receptorów przedstawiałem niedawno w innym artykule [43].

Ruch cytoszkieletu, wraz z towarzyszącym mu ruchem receptorów, przebiega podobnie, jeśli w środowisku zawieszono są komórki spolaryzowane morfologicznie (rys. 2 C); podbłonowa sieć aktynowa nieprzerwanie zsuwa się wzdłuż ich całej powierzchni, od zrelaksowanej krawędzi przedniej do tylnego krańca. Gdy zaś taka komórka nawiąże kontakt z podłożem, jej kortykałny cytoszkielec obkurcza się do miejsc adhezji wytworzonych na jej spodniej powierzchni (rys. 2 D). Wpływ przyczepu komórki do podłoża na charakter przemieszczeń jej korteksu jest więc w ogólnym modelu Braya i White'a identyczny z opisanym przez nas wcześniej zachowaniem się peryferyjnej warstwy kurczliwej u ameb (por. rys. 1 A, B z rys. 2 C, D).

Bray i White [8] stosują swoją teorię również do przemieszczeń warstw kortykałnych w czasie podziału komórkowego. Wychodzą z założenia, że cytokineza zaczyna się od wytworzenia dwóch przeciwstawnych biegunów relaksacji (rys. 2 E). Nie jest to zgodne z poglądem, że zapoczątkowuje ją skurcz równikowy [46, 74]. Inicjacja cytokinezy przez biegunową relaksację jednak również zawsze miała i nadal ma zwolenników [3, 22, 102]. Można spodziewać się w takim razie, że kortykałna sieć aktynowa powinna zsuwać się z obydwóch biegunów w kierunku równika (rys. 2 F). Wynikająca stąd akumulacja aktyny na równiku prowadzi do powstania tam pierścienia kurczliwego, a w następstwie bruzdy podziałowej (rys. 2 G).



Rys. 2. Schemat teorii Braya i White'a [8] według Grębeckiego [43]: zaznaczono błonę komórkową (cm), rozmieszczenie sieci aktynowej (an) i receptorów powierzchniowych (sr) w komórce swobodnie zawieszonej i niespolaryzowanej (A) oraz przesuwanie się tych struktur (strzałki) w następstwie biegunowej relaksacji (RP) komórki nieróżnicowanej (B), spolaryzowanej morfologicznie (C), migrującej po podłożu (D) i dzielącej się (E-G)

Taki charakter ruchu podbłonowego cytoszkieletu w komórkach podziałowych zapewne oznacza, że sieć mikrofilamentów jest wytwarzana w drodze polimeryzacji aktyny na biegunach i przenoszona do równika jako struktura już uformowana. Niedawno istotnie wykazano, że filamenty fluorescencyjnie oznakowane w późnej metafazie, wędrują w anafazie w kierunku powstającej bruzdy podziałowej drogą kortykalną [11, 12]. Teoria przepływu kortykalnego przeciwstawia się więc pogładowi, że polimeryzacja aktyny zachodzi na miejscu, tam gdzie powstaje siła napędowa. Głosi ona, że cytoszkielet nie jest budowany w miejscu skurczu, ale w zrelaksowanych okolicach dzielących się komórek, podobnie jak w strefie czołowej migrującej ameby.

BIEGUNOWA RELAKSACJA KOMPLEKSU KORTYKALNEGO

Kluczową przesłanką koncepcji przepływu kortykalnego według Braya i White'a [8] jest więc stwierdzenie, że aktywność skurczowa peryferyjnej sieci aktynowej nie jest rozłożona wzdłuż obwodu komórki równomiernie, lecz biegunowo. Powstałe stąd różnice naprężeń w

warstwie korykalnej powodują jej przesunięcia pod powierzchnią błony, od bieguna zrelaksowanego do okolic o wyższej efektywności skurczu. Podobnie według Spudicha [81], asymetria skurczu w korykalnej sieci aktywnej *Dictyostelium*, a zwłaszcza jej relaksacja w czole pełzającej komórki, wywołuje wsteczny przesuw całej podbłonowej warstwy kurczliwej. Koncepcje te wysuwane przez Braya i White'a [8] oraz Spudicha [81], a następnie poparte przez Vasilieva [96], bez wątplenia opierają się na tej samej zasadzie relaksacji przedniej krawędzi komórki, która już wcześniej była wykryta u ameb.

Idea biegunowości skurczu i relaksacji u pełzającej ameby jest bardzo stara, a różne jej warianty stanowiły o istocie głównych hipotez objaśniających mechanizm ruchu amebowego. Tak więc klasyczna teoria zakładała, że skurcz jest zlokalizowany w tylnym biegunie komórki [28, 66], a ogromnie kontrowersyjna inna hipoteza głosiła, że w przednim [2]; według współczesnej teorii ogólnego skurczu korykalnego należy zaś mówić o biegunowej relaksacji bieguna przedniego [33, 36, 37, 84]. Ciągły skurcz całej podbłonowej sieci aktywnej wzdłuż tylnych i bocznych krawędzi ciała ameby utrzymuje wysokie wewnętrzne ciśnienie hydrostatyczne. Jednak sama przednia krawędź wykazuje objawy miejscowej funkcjonalnej relaksacji. Wynikły stąd spadek ciśnienia w strefie czołowej powoduje przepływ endoplazmy w tym właśnie kierunku. Lokalizacja i rozległość ośrodka relaksacji w czole ameby kontroluje więc zarówno kierunek, jak i tempo ruchu tej komórki.

Funkcjonalne znaczenie tej lokalnej relaksacji w przedniej strefie ameby poznano wcześniej niż jej strukturalne i molekularne podłoże. Pierwsze przyczyniły się do tego badania Korohody [58, 61, 62], który pokazał, że punktowe oddziaływanie anestetyków na korteks kurczliwy prowadzi do wytworzenia nowej nibynóżki w miejscu przez nie zrelaksowanym. Z kolei w naszych doświadczeniach zastosowaliśmy w charakterze bodźców skurczowych albo relaksujących, miejscowe naświetlanie albo zaciemnianie wybranych sektorów na powierzchni ameby [35, 36]. Okazało się, że naświetlenie samego przodu komórki hamuje jej ruch, a jego zaciemnienie pobudza lokomocję. Odwrotnie jest po przyłożeniu takich samych bodźców do jakiegokolwiek innego obszaru w korteksie – tam warunki skurczowe przyspieszają migrację komórki, rozkurczowe zaś ją zwalniają. Oznacza to, że cała warstwa korykalna *Amoeba proteus* znajduje się w stanie ciągłego skurczu z wyjątkiem strefy czołowej, która jest zrelaksowana. W związku z tym należało spodziewać się w komórce ameby wstecznego przesuwu podbłonowej sieci aktywnej od zrelaksowanego frontu w stronę kurczących się środkowych i tylnych okolic ciała komórkowego, co jak już wyżej mówiliśmy, istotnie udało się nam niebawem wykazać [38].

Tak więc, zgodnie z założeniami teorii przepływu korykalnego, ogólny skurcz podbłonowej sieci aktywnej powoduje jej ciągle wycofywanie spod zrelaksowanej przedniej krawędzi komórki. Nie wydaje się jednak, aby była to relaksacja w biochemicznym sensie tego słowa. Raczej ma ona biomechaniczny charakter. Trudno bowiem byłoby pogodzić intensywny ruch cytoszkieletu w przodzie pełzających komórek, w strefie fontannowej ameb i w lamellipodiach fibroblastów, z relaksacją samego napędu aktomiozynowego. Można tam raczej spodziewać się upośledzenia transmisji wytwarzanej siły napędowej. Świadczy o tym lokalny brak sprzężenia pomiędzy ruchem cytoszkieletu, który usuwa się do tyłu, gdy reszta cytoplazmy i błona plazmatyczna płyną do przodu.

ROZRYWANIE ZWIĄZKU CYTOSZKIELETU Z BŁONĄ W STREFIE CZOŁOWEJ AMEB I INNYCH KOMÓREK RUCHLIWYCH

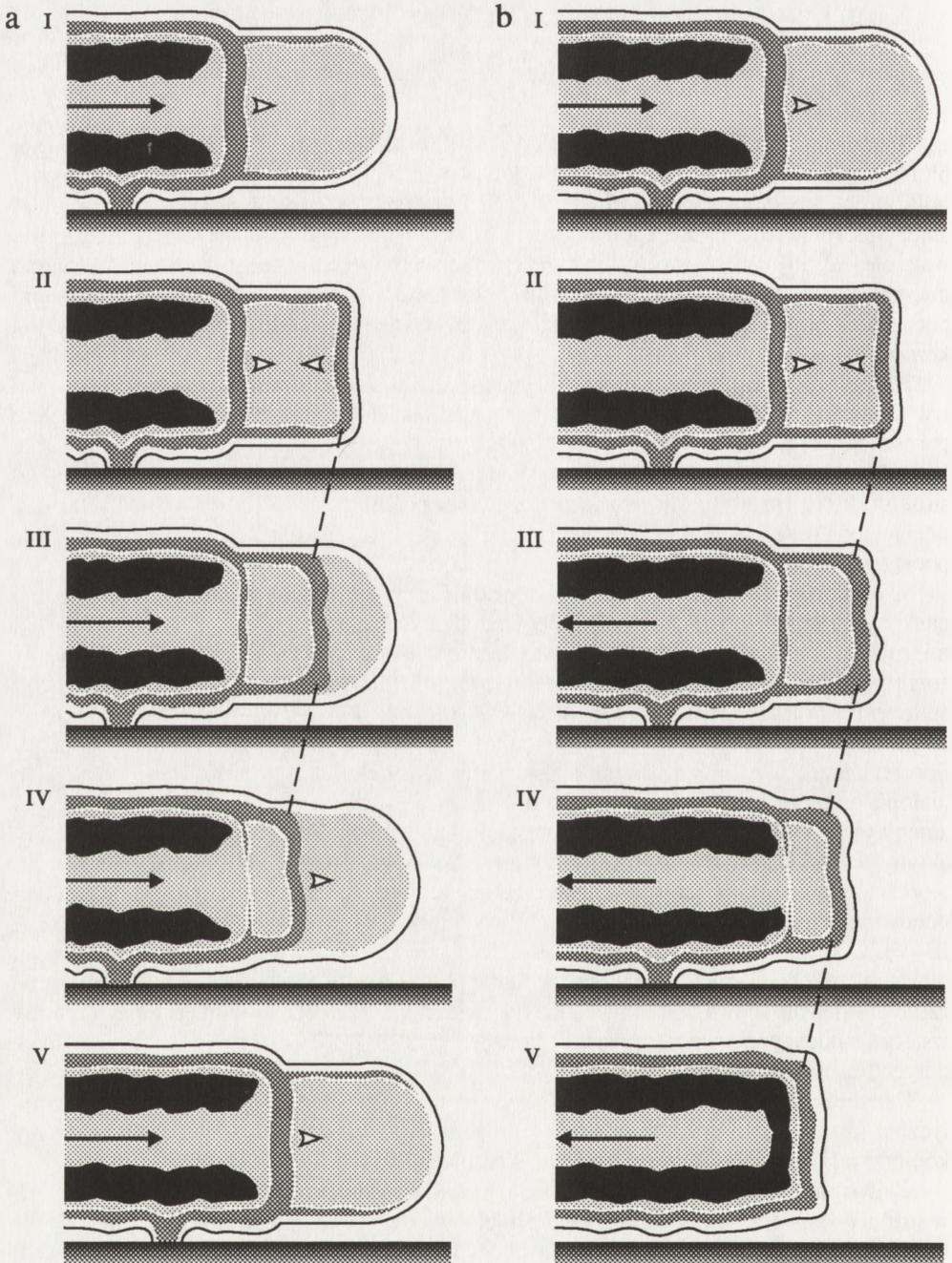
Transmisją siły mechanicznej pomiędzy korteksem kurczliwym *Amoeba proteus* a jej błoną eksperymentalnie przerywaliśmy w określonym miejscu wstrzykując między te warstwy mikrokrople oleju parafinowego [31, 56]. U niektórych osobników tego samego gatunku ameb obserwowaliśmy także spontaniczne, lokalne rozepchnięcie obu warstw przez fuzujące wakuole [32, 56]. W obydwóch sytuacjach, w miejscach mechanicznego rozerwania kontaktu między cytoszkieletem a błoną, natychmiast powstawały nowe strefy czołowe, co pośrednio potwierdza przypuszczenie o biomechanicznym charakterze relaksacji przedniej krawędzi komórki.

Badania ultrastrukturalne prowadzone ponad 10 lat temu jednocześnie w naszej pracowni i w Bonn [34, 82, 100] wykazały, że w wierzchołkach wiodących nibynóżek normalnie poruszających się ameb, kortykalna sieć aktynowa rzeczywiście nie przylega do błony, ale jest od niej o kilka μm odsunięta. Przestrzeń tę wypełnia przejrzysta hialoplazma wolna od struktur, które zostały odfiltrowane przez głębiej położoną sieć aktynową. Sieć ta zatem, pozbawiona w czole ameby mechanicznego związku z błoną, może się wycofywać nie pociągając za sobą innych struktur.

W ostatnich paru latach magnetyczna rejestracja i cyfrowe wzmacnianie obrazu pozwoliły nam wykazać, że separacja cytoszkieletu od błony plazmatycznej w przedniej krawędzi migrujących ameb nie jest stanem ciągłym, lecz zjawiskiem powtarzającym się cyklicznie. U ameb poddanych łagodnemu szokowi cieplnemu [45, 59] oraz podczas ruchu normalnego i endocytozy [41, 42] kolejne warstwy sieci aktynowej odrywają się mniej więcej co 2 sekundy od przedniej krawędzi i wycofują się z prędkością kilku $\mu\text{m/s}$. Napływająca endoplazma jest tłoczona przez wytworzone w ten sposób sito aktynowe i jako odfiltrowana przejrzysta hialoplazma wypełnia przestrzeń między cytoszkieletem a błoną, co powoduje ekspansję czoła ameby (rys. 3 A I). Wykazano już wcześniej metodami fluorescencyjnymi, że monomery aktyny przenikają przez taki filtr, po czym repolimeryzują pod błoną [26, 83] (rys. 3 A II). Korteks, odtworzony w ten sposób pod przednią krawędzią, natychmiast odrywa się od niej ponownie (rys. 3 A II–III), a czoło ameby wykonuje następny "krok" do przodu (rys. 3 A III–V). Czynniki relaksujące faworyzują odrywanie się warstwy kurczliwej spod błony i dlatego w sterowaniu ruchem amebowym funkcjonują jako bodźce dodatnie. Gdy zaś w strefie czołowej sieć aktynowa od błony się nie oderwie (rys. 3 B I–III), to jej nieustanny przesuw wsteczny pociągnie za sobą przednią krawędź (rys. 3 B III–V) i spowoduje wycofanie dotychczas rosnącej nibynóżki [41].

Taki mechanizm relaksacji tłumaczy więc z jednej strony ruch cytoplazmy i błony plazmatycznej (a w konsekwencji całej ameby) do przodu, a zarazem przesuwanie się wewnątrz komórki jej podbłonowego cytoszkieletu aktynowego do tyłu.

Zjawisko niewątpliwie bardzo podobne do wycofywania kolejnych warstw kurczliwych w strefie czołowej ameb, zostało już wcześniej wykryte u fibroblastów przez Heatha [52]. W trakcie rozplaszczania się i lokomocji tych komórek, pod górną powierzchnią ich lamelli przesuwają się jeden za drugim do tyłu koncentryczne łuki złożone ze skondensowanej sieci aktynowej. Ruch ich jest skoordynowany z ruchami receptorów na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Podobne łuki aktynowe pojawiają się także w keratynocytach, aczkolwiek



Rys. 3. Kolejne stadia cyklu odklejania się korykalnej warstwy kurczliwej spod błony komórkowej i jej odbudowy w przodzie rosnącej nibynóżki *Amoeba proteus* (A) oraz wycofanie się tejże nibynóżki w razie ustabilizowania związku błony z cytoszkieletem (B), według Grębeckiego [41]

poruszają się one wstecznie tylko w stosunku do krawędzi tych komórek, ale nie względem podłoża [91]. W fibroblastach łuki aktywne wycofują się z prędkością 0,1–0,2 $\mu\text{m/s}$, tj. 10–50 razy wolniej niż w strefach czołowych ameb swobodnie żyjących. Rzecz jednak znamienne, że wymiary i prędkości migracji ameby i fibroblastu różnią się o taki właśnie rząd wielkości.

Pomimo tych różnic pomiędzy amebami, fibroblastami i keratynocytami, ogólny obraz wstecznego przesuwania się podbłonowej warstwy aktywnej wzdłuż peryferii komórki przedstawiony w teorii Braya i White'a [8] należy uzupełnić rytmicznym wycofywaniem kolejnych jej słojów spod przednich krawędzi migrujących komórek.

REGULACJA DYNAMIKI KOMPLEKSU KORTYKALNEGO W PRZEDNIEJ KRAWĘDZI KOMÓREK AMEBOIDALNYCH

Cykliczne uwalnianie kurczliwych warstw kortykalnych spod przedniej krawędzi komórek ameboidalnych jest prawdopodobnie związane z miejscowym wzrostem stężenia wolnych jonów wapnia. Wskazywało na to już nawet znacznie wcześniejsze odkrycie, że aktywny żel ameb ulega solifikacji w mikromolarnych stężeniach wolnego Ca, zarówno *in vitro*, jak i we wnętrzu komórki [88, 90]. Ekworyna, naturalny luminofor świecący w obecności jonów wapnia, wykazuje pulsacje ich stężenia w strefie czołowej migrującej ameby *Chaos carolinensis* [89]. Oceniono, że rozbłyski ekworyny następują co 1–4 s [104], co odpowiada częstotliwości odklejania kolejnych warstw aktywnych spod błony komórkowej obserwowanej przez nas u tego samego gatunku ameb [41]. Wydaje się więc, że wapń jest inicjatorem serii zjawisk, które prowadzą najpierw do osłabienia lub rozerwania kontaktu cytoszkieletu z błoną, a następnie do jego wycofania w głąb komórki.

Przypuszczenie to znajduje pośrednie poparcie w badaniach różnych komórek w trakcie reagowania na bodźce. Dodatnia reakcja chemotaktyczna ameb *Dictyostelium* na cAMP wydaje się skorelowana ze wzrostem poziomu wolnego wapnia w nibynózkach orientujących się w stronę źródła bodźca [23, 77, 101]. Wewnątrzkomórkowe gradienty Ca ulegają przejściowym modyfikacjom także u *Amoeba proteus* w trakcie zmian kierunku ruchu tej ameby [29]. Wzrost zewnętrznego stężenia jonów wapnia przy przedniej krawędzi epitelocytów pobudza aktywność ich lamellipodiów [85], a wzrost ich wewnętrznego stężenia wykazywano w czołowych strefach leukocytów w toku fagocytozy [76] i chemotaksji [94] oraz u fibroblastów poddanych działaniu pola elektrycznego [69].

Wapń pełni tylko funkcję sygnałową w kontroli stabilności kompleksu kortykálnego w przednich krawędziach komórek ruchliwych. Periodyczne ustanawianie i osłabianie związku sieci aktywnej z błoną plazmatyczną zależy bezpośrednio od aktywności niektórych białek związanych z aktyną, przede wszystkim profiliny i gelsoliny. Profilina jest szeroko rozpowszechniona w wielu tkankach organizmów wyższych, a spośród niższych jest znana u ameb – *Acanthamoeba castellanii* [75] i *Amoeba proteus* [80], amebowego stadium *Dictyostelium discoideum* [51] oraz u śluzowca *Physarum polycephalum* [70]. Profilina łączy się z monomerami aktyny w kompleks zwany profilaktyną, niezdolny do polimeryzacji [95], regulując w ten sposób odbudowę filamentów pod błoną. Gelsolina i białka jej pokrewne wiążą się wzdłuż filamentów aktyny i rozcinają je degradując strukturę sieci aktywnej. Ta funkcja gelsoliny zależy właśnie od wzrostu stężenia wolnych jonów wapnia.

Gelsolina wraz z profiliną jest głównym regulatorem dynamiki podbłonowej sieci aktywnej w makrofagów w trakcie ich reakcji na bodźce i ruchu [47]. Dodatni bodziec zewnętrzny uwalnia jony Ca z rezerwy w peryferyjnych warstwach cytoplazmy makrofaga. Gelsolina reaguje wówczas z filamentami i rozcina je na krótsze odcinki. Osłabienie lub zniszczenie struktury sieci aktywnej na pobudzonym obszarze korteksu komórkowego wywołuje oderwanie się warstwy kurczliwej od błony plazmatycznej. Prowadzi to ostatecznie do wysunięcia nibynóżki w kierunku źródła bodźca. Najnowsze badania wskazują, że w leukocytach polimorfonuklearnych gelsoliny brakuje w ustabilizowanej sieci aktywnej tworzącej cytoszkielet kortykalny, obfituje zaś w nią labilna pula aktyny endoplazmatycznej [99]. Można więc sobie wyobrazić bogaty w gelsolinę strumień endoplazmy napływający do stref czołowych komórek ruchliwych i powodujący tam miejscową dezintegrację związku cytoszkieletu z błoną plazmatyczną [44].

Gelsolina jest rozpowszechniona w wielu rodzajach komórek tkankowych. Dwa inne białka blisko z nią spokrewnione pod względem budowy i właściwości wyizolowano ze śluzowców bezkomórkowych i komórkowych: fragminę z *Physarum* [48, 55] oraz sewerynę z *Dictyostelium* [10]. Nie sprawdzono do tej pory obecności białek z rodziny gelsoliny u ameb właściwych. Jest jednak znamienne, że iniekcja fragminy otrzymanej z *Physarum* pod błonę *Amoeba proteus* powoduje miejscowe oderwanie się warstwy kurczliwej i jej wycofanie spod błony, a w następstwie utworzenie nowego czoła lokomocji [25]. Sugeruje to, że być może, także u wielkich ameb słodkowodnych białka z rodziny gelsoliny degradują strukturę sieci aktywnej w strefach czołowych, umożliwiając w ten sposób zarówno przepływ cytoplazmy i ruch przedniej krawędzi komórki do przodu, jak i zsuwanie się podbłonowego cytoszkieletu do tyłu.

POGLĄDY NA CHARAKTER NAPĘDU LATERALNYCH RUCHÓW CYTOSZKIELETU PODBŁONOWEGO

Współcześnie spotyka się dwa objaśnienia wstecznego odpływu aktyny spod przedniej krawędzi komórek ruchliwych. Jedno z nich opiera się na samym sposobie polimeryzacji aktyny pod błoną komórkową, drugie zaś na interakcji aktyny z miozynomami.

Dwadzieścia lat temu zauważono u *Acanthamoeba* [72], a później u fibroblastów [79], że kortykalne filamenty aktywne są ustawione prostopadle do błony i zwrócone ku niej "brodatymi" końcami (ang. *barbed ends*), które są odpowiedzialne za przyłączanie następnym monomerów, a zatem za przyrost filamentu. Filament przyrasta więc przez interkalację nowych podjednostek pomiędzy końcami brodatymi a błoną. Jednocześnie na przeciwległym jego końcu, "zaostrzonym" (*pointed end*) przeważa dysocjacja aktyny do cytoplazmy. Zatem, nawet jeśli oba te procesy są zrównoważone i długość filamentu się nie zmienia, wszystkie uprzednio wbudowane podjednostki muszą odsuwać się od błony ku wnętrzu komórki w miarę przyłączania nowych monomerów.

Zjawisko to, zwane po angielsku *treadmilling*, bywa uważane za przyczynę wstecznego ruchu kortykalnej aktyny w lamellipodiach fibroblastów i szczytach nibynóżek ameb. Stwierdzono istotnie, że fluorescencyjnie oznakowane monomery aktywne po iniekcji do wnętrza fibroblastu i wbudowaniu w cytoszkielet przedniej krawędzi lamellipodium zaczynają przesuwać się do tyłu [98]. Prędkość ich wędrówki jest jednak dziesięciokrotnie niższa od

wycofywania się łuków aktynowych pod powierzchnią lamelli [53]. Oceniano również siłę wytwarzaną przez *treadmilling*, a okazała się ona także o jeden rząd wielkości niższa niż potrzebna dla wywołania deformacji błony komórkowej [14].

Jeżeli *treadmilling* miałby być właściwą przyczyną obserwowanych wstecznych ruchów cytoszkieletu w korteksie fibroblastu, to inkorporacja nowych podjednostek aktyny powinna zachodzić tylko pod przednią krawędzią lamellipodium, a dysocjacja monomerów tylko u jego nasady. Stwierdzono, że istotnie polimeryzacja jest ograniczona do bardzo wąskiej strefy przedniej [68, 87]. Depolimeryzacja zachodzi jednak równomiernie w całym lamellipodium fibroblastów i keratynocytów, co zapewne oznacza, że filamenty aktynowe są krótkie, a ich orientacja względem błony przypadkowa [91, 92]. Rzeczywiście, filamenty aktynowe wcale nie muszą przylegać do błony jednym końcem, ale równie często są z nią połączone lateralnie zarówno u ameb [30, 82], jak i w komórkach *Metazoa* [93].

Wszystkie te obiekcje przemawiają przeciwko przypisaniu zjawisku *treadmilling* roli motoru napędzającego wsteczny ruch podbłonowego cytoszkieletu. Polimeryzacja aktyny pod przednią krawędzią pełną komórki zapewne nie jest źródłem energii dla wycofywania korteksu, ale tylko kompensuje spowodowane nim ubytki materiału kurczliwego. Natomiast za źródło siły napędowej przeważna część autorów uważa skurcz sieci aktynowej wywołany jej interakcją z miozyną [14, 20, 21, 44, 53, 67, 73, 81, 91].

Zgadając się zasadniczo z takim poglądem trzeba jednak liczyć się z faktem, że w niemięśniowych komórkach ruchliwych rozmieszczenie klasycznej dwugłówkowej miozyny II nie pokrywa się ściśle z topografią ruchów. Ruch wsteczny kortykałnej warstwy aktynowej zaczyna się z przodu od samej krawędzi komórki, gdzie brakuje miozyny II. U *Amoeba proteus* filamenty miozynowe występują w tyle ciała i w wycofywanych nibynózkach, natomiast w okolicach przednich miozyny II nie daje się wykryć ani w mikroskopie elektronowym w formie grubych filamentów [82], ani metodami immunocytochemicznymi [9, 83]. Dokładnie takie samo rozmieszczenie miozyny II stwierdzano u *Acanthamoeba* [5, 103] i u *Dictyostelium* [23, 105]. W fibroblastach miozynę II znajduje się w wycofywanej części ogonowej, wzdłuż ścian bocznych i w lamelli, ale nie w lamellipodiach [15].

Siłę motoryczną napędzającą ruch cytoszkieletu w strefach czołowych, gdzie nie ma miozyny II, przypisuje się obecnie najczęściej interakcji aktyny z innymi miozynami, ogólnie znanymi jako miozyna I występująca w kilku izoformach (zwanych też miozynami niekonwencjonalnymi). Wykryli je 20 lat temu u *Acanthamoeba* Pollard i Korn [72]. Wkrótce potem znaleziono je u *Dictyostelium*, a obecnie znane są w tkankach kręgowców, owadów, u glonów i drożdży (por. [13, 60, 73]).

Miozyny I nie tworzą filamentów i są jednogłówkowe. Mają więc nie dwa, ale tylko jedno miejsce dynamicznego wiązania z aktyną zdolne do przesuwania się wzdłuż jej filamentów. Często jednak miozyny I zawierają ponadto inne miejsce wiązania aktyny mogące przyłączać się statycznie do innego filamentu, zawsze zaś trzecie miejsce kotwiczące miozynę do wewnętrznej powierzchni błony. Dzięki temu cząsteczki miozyny I *in vitro* mogą ślizgać się wzdłuż filamentów aktynowych [78], spinać je w sieć [65], a także wywoływać przesuwanie się filamentów aktyny wzdłuż błon albo nawzajem względem siebie [106].

Spudich [81] i Pollard [73] sugerują w związku z tym kilka sposobów napędzania ruchu cytoszkieletu i błon przez miozyny I w żywych komórkach. Najważniejszym z nich wydaje się wywoływanie ślizgania się filamentów aktynowych po wewnętrznej powierzchni błony (lub odwrotnie, przesuwanie struktur błonowych wzdłuż filamentów). Jest wielce znamienne, że w komórkach ameboidalnych, gdzie miozyna II występuje w okolicach tylnych i środko-

wych, miozyna I jest rozmieszczona w strefach przednich. Ten właśnie rozkład obu miozyn został opisany u *Dictyostelium* [24], u *Acanthamoeba* [5, 103] oraz w fibroblastach [15, 97]. Interakcja aktyny z miozyną I wydaje się więc najbardziej prawdopodobnym rozwiązaniem zagadkowej kwestii, jaki motor porusza sieć aktynową pod przednią krawędzią wędrującej komórki.

Taki podział miejsc i ról miozyny II i miozyny I w niemięśniowej komórce ruchliwej znajduje piękne potwierdzenie w badaniach mutantu *Dictyostelium*, który zawiera miozynę I, ale jest pozbawiony miozyny II. W związku z tym może on wytwarzać nibynóżki w przodzie ciała i dokonywać fagocytozy [17], ale nie może przenosić receptorów powierzchniowych do tyłu komórki [71], a jego wyizolowany cytoskielet jest niezdolny do skurczu w obecności Mg i ATP [63].

LITERATURA

- [1] ABERCROMBIE M, HEAYSAN JEM, PEGRUM SM. The locomotion of fibroblasts in culture. II. "Ruffling". *Exp Cell Res* 1970; **60**: 437–444.
- [2] ALLEN RD. A new theory of amoeboid movement and endoplasmic streaming. *Exp Cell Res (Suppl.)* 1961; **8**: 17–31.
- [3] ASNES CF, SCHROEDER TE. Cell cleavage: Ultrastructural evidence against equatorial stimulation by astral microtubules. *Exp Cell Res* 1979; **122**: 327–338.
- [4] BAINES IC, KORN ED. Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1895–1904.
- [5] BAINES IC, BRZESKA H, KORN ED. Differential localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1193–1203.
- [6] BEHNKE O, BRAY D. Surface movements during the spreading of blood platelets. *Eur J Cell Biol* 1988; **46**: 207–216.
- [7] BRAY D, CHAPMAN K. Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci* 1985; **5**: 3204–3213.
- [8] BRAY D, WHITE JG. Cortical flow in animal cells. *Science* 1988; **239**: 881–888.
- [9] BRIX K, REINECKE A, STOCKEM W. Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. III. Influence of microinjected antibodies on the organization and function of the microfilament system. *Eur J Cell Biol* 1990; **51**: 279–284.
- [10] BROWN SS, YAMAMOTO K, SPUDICH JA. A 40,000 dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca-dependent manner. *J Cell Biol* 1982; **93**: 205–210.
- [11] CAO LG, WANG YL. Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. I. Recruitment of preexisting actin filaments into the cleavage furrow. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1089–1095.
- [12] CAO LG, WANG YL. Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1905–1911.
- [13] CHENEY RE, MOOSEKER MS. Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 27–35.
- [14] COOPER JA. The role of actin polymerization in cell motility. *Ann Rev Physiol* 1991; **53**: 585–605.
- [15] CONRAD PA, GIULIANO KA, FISHER G, COLLINS K, MATSUDAIRA PT, TAYLOR DL. Relative distribution of actin, myosin I, and myosin II during the wound healing response of fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; **120**: 1381–1391.
- [16] DEBIASIO RL, WANG LL, FISHER GW, TAYLOR DL. The dynamic distribution of fluorescent analogs of actin and myosin in protrusions at the leading edge of migrating Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 1988; **107**: 2631–2645.
- [17] De LOZANNE A, SPUDICH JA. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 1987; **236**: 1086–1091.
- [18] DEMBO M. Mechanics and control of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. *Biophys J* 1989; **55**: 1053–1080.
- [19] FISHER G, CONRAD PA, DEBIASIO RL, TAYLOR DL. Centripetal transport of cytoplasm, actin and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts. *Cell Motil Cytosk* 1988; **11**: 235–247.

- [20] FORSCHER P, SMITH SJ. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1505–1516.
- [21] FUKUI Y. Toward a new concept of cell motility: Cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int Rev Cytol* 1993; **144**: 85–127.
- [22] FUKUI Y, INOUE S. Cell division in *Dictyostelium* with special emphasis on actomyosin organization in cytokinesis. *Cell Motil Cytosk* 1991; **18**: 41–54.
- [23] FUKUI Y, YUMURAS. Actomyosin dynamics in chemotactic amoeboid movement of *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytosk* 1986; **6**: 662–673.
- [24] FUKUI Y, LYNCH TJ, BRZESKA H, KORN ED. Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium amoebae*. *Nature* 1989; **341**: 328–331.
- [25] GAWLITTA W, HINSSEN H, STOCKEM W. The influence of an actinmodulating protein (AM-protein) from *Physarum polycephalum* on the cell motility of *Amoeba proteus*. *Eur J Cell Biol* 1980; **23**: 43–52.
- [26] GAWLITTA W, STOCKEM W, WEHLAND J, WEBER K. Organization and spatial arrangement of fluorescein-labeled native actin microinjected into normal locomoting and experimentally influenced *Amoeba proteus*. *Cell Tiss Res* 1980; **206**: 181–191.
- [27] GIULIANO KA, TAYLOR DL. Formation, transport, contraction and disassembly of stress fibers in fibroblasts. *Cell Motil Cytoskel* 1990; **16**: 14–21.
- [28] GOLDACRE RJ. The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback. *Exp Cell Res (Suppl.)* 1961; **8**: 1–16.
- [29] GOLLNICK F, MEYER R, STOCKEM W. Visualization and measurement of calcium transients in *Amoeba proteus* by fura-2 fluorescence. *Eur J Cell Biol* 1991; **55**: 262–271.
- [30] GOODLOE-HOLLAND CM, LUNA EJ. A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. III. Plasma membrane fragments bind predominantly to the sides of actin filaments. *J Cell Biol* 1984; **99**: 71–78.
- [31] GRĘBECKA L. Changes of motor polarization in *Amoeba proteus* as induced by oil injections. *Acta Protozool* 1977; **16**: 107–120.
- [32] GRĘBECKA L. Frontal cap formation and origin of monotactic forms of *Amoeba proteus* under culture conditions. *Acta Protozool* 1978; **17**: 191–202.
- [33] GRĘBECKA L. Polarity of the motor functions in *Amoeba proteus*. I. Locomotory behaviour. *Acta Protozool* 1988; **27**: 83–96.
- [34] GRĘBECKA L, HREBENDA B. Topography of cortical layer in *Amoeba proteus* as related to the dynamic morphology of moving cell. *Acta Protozool* 1979; **18**: 493–502.
- [35] GRĘBECKI A. Behaviour of *Amoeba proteus* exposed to light-shade difference. *Protistologica* 1980; **16**: 103–116.
- [36] GRĘBECKI A. Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications. *Eur J Cell Biol* 1981; **24**: 163–175.
- [37] GRĘBECKI A. Supramolecular aspects of amoeboid movement. Progress in Protozoology. Proc VI Int Congr Protozool. *Acta Protozool* (special issue) 1982; **1**: 117–130.
- [38] GRĘBECKI A. Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. I. Behaviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon. *Protoplasma* 1984; **123**: 116–134.
- [39] GRĘBECKI A. Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. II. Ectoplasmic and surface movements in polytactic and heterotactic amoebae. *Protoplasma* 1985; **127**: 31–45.
- [40] GRĘBECKI A. Locomotion of *Saccamoeba limax*. *Arch Protistenkd* 1987; **134**: 347–365.
- [41] GRĘBECKI A. Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement. *Protoplasma* 1990; **154**: 98–111.
- [42] GRĘBECKI A. Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae. *Protoplasma* 1991; **160**: 144–158.
- [43] GRĘBECKI A. Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych. *Kosmos* 1992; **41**: 7–38.
- [44] GRĘBECKI A. Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae. *Int Rev Cytol* 199; **148**: 37–80.
- [45] GRĘBECKI A, KWIATKOWSKA EM. Dynamics of the membrane-cortex contacts demonstrated in vivo in *Amoeba proteus* pretreated by heat. *Eur J Protistol* 1988; **23**: 262–272.
- [46] HARRIS AK, GEWALT SL. Stimulation testing of mechanisms for inducing the formation of the contractile ring in cytokinesis. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2215–2223.
- [47] HARTWIG JH, YIN HL. The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. *Cell Motil Cytosk* 1988; **10**: 117–126.
- [48] HASEGAWA T, TAKAHASHI S, HAYASHI H, HATANO S. Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor of the formation of actin filaments. *Biochemistry* 1980; **19**: 2677–2683.

- [49] HASTON WS. F-actin distribution in polymorphonuclear leucocytes. *J Cell Sci* 1987; **88**: 495–501.
- [50] HASTON WS, SHIELDS JM. Contraction waves in lymphocyte locomotion. *J Cell Sci* 1984; **68**: 227–241.
- [51] HAUGWITZ M, NOEGEL AA, RIEGER D, LOTTSPEICH F, SCHLEICHER M. *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* 1991; **100**: 481–489.
- [52] HEATH JP. Arcs: curved microfilament bundles beneath the dorsal surface of the leading lamellae of moving chick embryo fibroblasts. *Cell Biol Int Rep* 1981; **5**: 975–980.
- [53] HEATH JP, HOLIFIELD BF. Cell locomotion: New research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motil Cytosk* 1991; **18**: 245–257.
- [54] HEIDEMANN SR, LAMOUREUX P, BUXBAUM RE. Growth cone behavior and production of traction force. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1949–1957.
- [55] HINSSSEN H. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification. *Eur J Cell Biol* 1981; **23**: 225–233.
- [56] HREBENDA B, GRĘBECKA L. Ultrastructure of the frontal cap of monotactic forms of *Amoeba proteus*. *Cytobiologie* 1978; **17**: 62–72.
- [57] IZZARD CS. A precursor of the focal contact in cultured fibroblasts. *Cell Motil Cytosk* 1988; **10**: 137–142.
- [58] KALISZ B, KOROHODA W. Experimental study on locomotion of *Amoeba proteus*. I. Movements in the nucleated and anucleated fragments of the amoebae after removal of the part of their cytoplasm. *Acta Protozool* 1976; **15**: 345–361.
- [59] KŁOPOCKA W, STOCKEM W, GRĘBECKI A. Fine structure and distribution of contractile layers in *Amoeba proteus* preincubated at high temperature. *Protoplasma* 1988; **147**: 117–124.
- [60] KORN ED. *Acanthamoeba* myosin I: Past, present and future. *Curr Topics Membr* 1991; **38**: 13–30.
- [61] KOROHODA W. Positive chemotactic reactions of *Amoeba proteus* to general anaesthetics. *Acta Protozool* 1972; **11**: 333–336.
- [62] KOROHODA W. Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of *Amoeba proteus* and its bearing on the theories of amoeboid movement. *Cytobiologie* 1977; **14**: 338–349.
- [63] KUCZMARSKIER, PALIVOSL, AGUADOC, YAOZ. Stopped-flow measurement of cytoskeletal contraction: *Dictyostelium* myosin II is specifically required for contraction of amoeba cytoskeleton. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1191–1199.
- [64] LACKIE JM. Cell Movement and Cell Behaviour. Allen and Unwin. Winchester, 1986.
- [65] LYNCH TJ, ALBANESI JP, KORN ED, ROBINSON EA, BOWERS B, FUJISAKI H. ATPase activities and actin-binding properties of subfragments of *Acanthamoeba* myosin IA. *J Biol Chem* 1986; **261**: 17156–17162.
- [66] MAST SO. Structure, movement, locomotion and stimulation in *Amoeba*. *J Morph* 1926; **42**: 347–425.
- [67] MITCHISON T, KIRSCHNER M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1988; **1**: 761–772.
- [68] OKABE S, HIROKAWA N. Incorporation and turnover of biotin-labeled actin microinjected into fibroblastic cells: An immunoelectron microscopic study. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1581–1595.
- [69] ONUMA EK, HUI SW. Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol* 1988; **106**: 2067–2075.
- [70] OZAKI K, HATANO S. Mechanism of regulation of actin polymerization by *Physarum* profilin. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1919–1925.
- [71] PASTERNAK C, SPUDICH JA, ELSON EL. Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin. *Nature* 1989; **341**: 549–551.
- [72] POLLARD TD, KORN ED. *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem* 1973; **248**: 4682–4690.
- [73] POLLARD TD, DOBERSTEIN SK, ZOT HG. Myosin I. *Annu Rev Physiol* 1991; **53**: 653–681.
- [74] RAPPAPORT R. Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol* 1986; **105**: 245–281.
- [75] REICHSTEIN E, KORN ED. *Acanthamoeba* profilin. A protein of low molecular weight from *Acanthamoeba castellanii* that inhibits actin nucleation. *J Biol Chem* 1979; **254**: 6174–6179.
- [76] SAWYER DW, SULLIVAN JA, MANDELL GL. Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis. *Science* 1985; **230**: 663–666.
- [77] SCHLATTERER C, KNOLL G, MALCHOW D. Intracellular calcium during chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*: a new fura-2 derivative avoids sequestration of the indicator and allows long-term calcium measurements. *Eur J Cell Biol* 1992; **58**: 172–181.
- [78] SHEETZ MP, SPUDICH JA. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* 1983; **303**: 31–35.
- [79] SMALL J.V. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J Cell Biol* 1981; **90**: 222–235.

- [80] SONOBE S, TAKAHASHI S, HATANO S, KURODA K. Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization. *J Biol Chem* 1986; **261**: 14837–14843.
- [81] SPUDICH JA. In pursuit of myosin function. *Cell Regul* 1989; **1**: 1–11.
- [82] STOCKEM W, HOFFMANN HU, GAWLITTA W. Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*. *Cell Tiss Res* 1982; **221**: 505–519.
- [83] STOCKEM W, NAIB-MAJANI W, WOHLFARTH-BOTTERMANN KE, OSBORN M, WEBER K. Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIX. Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in *Amoeba proteus*. *Eur J Cell Biol* 1983; **29**: 171–178.
- [84] STOCKEM W, KLOPOCKA W. Ameboid movement and related phenomena. *Int Rev Cytol* 1988; **112**: 137–183.
- [85] STROHMEIER R, BEREITER-HAHN J. Control of cell shape and locomotion by external calcium. *Exp Cell Res* 1984; **154**: 412–420.
- [86] SVITKINA TM, NEYFAKH AA, BERSHADSKY A. Actin cytoskeleton of spread fibroblasts appears to assemble at the cell edge. *J Cell Sci* 1986; **82**: 235–248.
- [87] SYMONS MH, MITCHISON TJ. Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol* 1991; **114**: 503–513.
- [88] TAYLOR DL. The contractile basis of amoeboid movement. IV. The viscoelasticity and contractility of *Amoeba* cytoplasm in vivo. *Exp Cell Res* 1977; **105**: 413–426.
- [89] TAYLOR DL, BLINKS JR, REYNOLDS G. The contractile basis of amoeboid movement. VIII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis, and capping. *J Cell Biol* 1980; **86**: 599–607.
- [90] TAYLOR DL, CONDEELIS JS, MOORE PL, ALLEN RD. The contractile basis of amoeboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm. *J Cell Biol* 1973; **59**: 378–394.
- [91] THERIOT JA, MITCHISON TJ. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 1991; **352**: 126–131.
- [92] THERIOT JA, MITCHISON TJ. Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 1992; **118**: 367–377.
- [93] TILNEY LG. Interactions between actin filaments and membranes give spatial organization to cells. *Modern Cell Biol* 1983; **2**: 163–199.
- [94] TRUETT AP, VERGHESE MV, DILLON RB, SNYDERMAN R. Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1549–1553.
- [95] TSENG PC, POLLARD TD. Mechanism of action of *Acanthamoeba* profilin: Demonstration of actin species specificity and regulation by micromolar concentrations of $MgCl_2$. *J Cell Biol* 1982; **94**: 213–218.
- [96] VASILIEV JM. Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J Cell Sci* 1991; **98**: 1–4.
- [97] WAGNER MC, BARYLKO B, ALBANESI JP. Tissue distribution and subcellular localization of mammalian myosin I. *J Cell Biol* 1992; **119**: 163–170.
- [98] WANG YL. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* 1985; **101**: 597–602.
- [99] WATTS RG, HOWARD TH. Evidence for a gelsolin-rich, labile F-actin pool in human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Motil Cytoskel* 1992; **21**: 25–37.
- [100] WEHLAND J, WEBER K, GAWLITTA W, STOCKEM W. Effects of the actin binding protein DNAase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of *Amoeba proteus*. *Cell Tiss Res* 1979; **199**: 353–372.
- [101] WICK U, MALCHOW D, GERISCH G. Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Biol Int Rep* 1978; **2**: 71–79.
- [102] WOLPERT L. The mechanisms and mechanics of cleavage. *Int Rev Cytol* 1960; **10**: 163–216.
- [103] YONEMURA S, POLLARD TD. The localization of myosin I and myosin II in *Acanthamoeba* by fluorescence microscopy. *J Cell Sci* 1992; **102**: 629–642.
- [104] YOSHIMOTO Y, HIRAMOTO Y. Observation of intracellular Ca with aequorin luminescence. *Int Rev Cytol* 1991; **129**: 45–73.
- [105] YUMURA S, FUKUI Y. Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in *Dictyostelium*. *Nature* 1985; **314**: 194–196.
- [106] ZOT HG, DOBERSTEIN SK, POLLARD TD. Myosin-I moves actin filaments on a phospholipid substrate: Implications for membrane targeting. *J Cell Biol* 1992; **116**: 367–376.

RUCHY WEWNĄTRZKOMÓRKOWE GRANUL BARWNIKOWYCH W CHROMATOFORACH I KOMÓRKACH MELANOMA

INTRACELLULAR MOVEMENT OF PIGMENT GRANULES IN CHROMATOPHORES AND MELANOMA CELLS

Marta MICHALIK

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego Uniwersytetu
Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Jednym z częściej wykorzystywanych modeli do badań ruchów wewnątrzkomórkowych są chromatofory, szczególnie ze skóry ryb i płazów, oraz komórki melanoma. W artykule przedstawiono wyniki prac prowadzonych w celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów transportu granul barwnikowych w chromatoforach i modelowych układach bezkomórkowych. Opisano aktualny stan wiedzy na temat identyfikacji kinezyn i dynein cytoplazmatycznych w chromatoforach oraz określenia ich udziału w transporcie wewnątrzkomórkowym. Omówiono także prace zmierzające do zbadania roli cAMP i jonów wapniowych w regulacji transportu ziarnistości barwnikowych w chromatoforach.

Summary: Chromatophores, in particular from skin of fishes or amphibians, and melanoma cells, are often used as models for research on intracellular movements. Results of works aimed at the explanation of molecular mechanisms of intracellular transport of pigment granules in chromatophores are reviewed. The actual state of research on identification of the role of kinesins and cytoplasmic dyneins is discussed and works concerned with the regulation of intracellular transport in chromatophores by cAMP and calcium ions are considered.

WSTĘP

Chromatofory, czyli komórki barwnikowe, są komórkami pochodzenia ektodermalnego występującymi powszechnie w skórze właściwej kręgowców, w otrzewnej, oponach mózgowo-rdzeniowych, w ścianie gałki ocznej. Zawierają one w cytoplazmie ziarenka różnych barwników (granule barwnikowe). Skupianie lub rozpraszanie tych ziarenek wywołuje zmianę barwy lub jej natężenia. Zależnie od rodzaju barwnika obecnego w komórce dzielimy chromatofory na: melanofory zawierające brązowy barwnik – melaninę, erytrofory – czerwony barwnik i ksantofory z żółtym barwnikiem. Erytrofory i ksantofory noszą wspólną nazwę lipoforów, gdyż zawarte w nich pigmenty rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych [36,46].

Narzędziem szczególnie obfitym w różne typy chromatoforów jest skóra niższych kręgowców, zwłaszcza wielu ryb i płazów. Barwa skóry tych zwierząt jest wynikiem kombinacji stanów skupienia i rozproszenia ziarenek barwnikowych (chromatosomów) w różnych typach chromatoforów oraz ich rozmieszczenia przestrzennego. Zmiana zabarwienia skóry zachodzi pod wpływem różnych bodźców: światła, temperatury, dotyku itp. Chromatofory mogą być kontrolowane przez nerwy lub hormony.

CHROMATOFORY JAKO MODEL W BADANIACH RUCHÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Chromatofory są wygodnym modelem do badania ruchów wewnątrzkomórkowych z kilku powodów:

a) Komórki te, szczególnie ze skóry płazów i łusek ryb, są łatwe do izolacji i hodowli *in vitro*, nawet w temperaturze pokojowej [18,24,46,60].

b) Stosując odpowiednie detergenty można z komórek barwnikowych otrzymać modele komórkowe o perforowanej błonie komórkowej, zawierające nienaruszony układ cytoszkieletu i białek kurczliwych. W takich modelach ziarenka barwnikowe przemieszczają się podobnie jak w nietkniętych komórkach. Znacznie łatwiej można w nich analizować mechanizm ruchów wewnątrzkomórkowych, wprowadzając różne inhibitory, metabolity, przeciwciała, niezdolne do przechodzenia przez nieuszkodzoną błonę żywej komórki [31,32,41,47,54].

c) Granule barwnikowe przemieszczają się w komórce w dwu przeciwnych kierunkach: gdy transport ziarenek barwnika zachodzi ku obrzeżom wypustek komórki, powoduje rozproszenie barwnika, a gdy transport ziarenek barwnika odbywa się ku ciału komórki, powoduje agregację w nim barwnika [9,36,44,46].

d) Ruchy granul barwnikowych odbywają się z dużą szybkością, od 3 do 8 $\mu\text{m/s}$ i mogą być powtarzane wielokrotnie w szybkim następstwie czasu po sobie [31,45,47].

e) Ruchy granul barwnikowych *in vivo* są pod kontrolą nerwową i hormonalną, a jak wykazano w badaniach *in vitro*, mogą być regulowane przez szereg związków chemicznych. Epinefryna np. wywołuje agregację, a kofeina dyspersję barwnika w izolowanych komórkach [31,45].

Komórki barwnikowe były od dawna przedmiotem zainteresowania wielu badaczy, którzy starali się wyjaśnić mechanizm wewnątrzkomórkowych ruchów w komórkach zwierzęcych.

Badania nad transportem granul barwnikowych w chromatoforach prowadzone były w kilku aspektach. Dotyczyły one:

1) opisu ruchu granul barwnikowych i identyfikacji składników cytoszkieletu, które zaangażowane są w tym transporcie;

2) wyjaśnienia mechanizmów regulacji ruchów dośrodkowych i odśrodkowych w komórkach chromatoforów;

3) określenia charakteru oddziaływań między cytoszkieletem a granulami barwnikowymi oraz w jaki sposób energia chemiczna jest przemieniana na energię kinetyczną konieczną do ruchu tych organelli.

Badania ruchów granul barwnikowych prowadzone były różnymi, stale udoskonalanymi metodami, począwszy od obserwacji w mikroskopie kontrastowo-fazowym, poprzez filmowanie poklatkowe w mikroskopie Nomarskiego, a od połowy lat osiemdziesiątych z wyko-

rzystaniem wprowadzonego przez Allena systemu wzmocnienia obrazu zwanego AVEC (Allen's Video Enhancing Contrast) [3,19]. Zastosowanie mikroskopii elektronowej, autoradiografii oraz wykorzystanie metod immunofluorescencji i *immunoblotingu* pozwoliło na identyfikację elementów cytoszkieletu związanych z przemieszczaniem ziarenek barwnikowych i wykrycie białek odpowiedzialnych za ten ruch oraz białek regulatorowych [2,24,34,37,39,52].

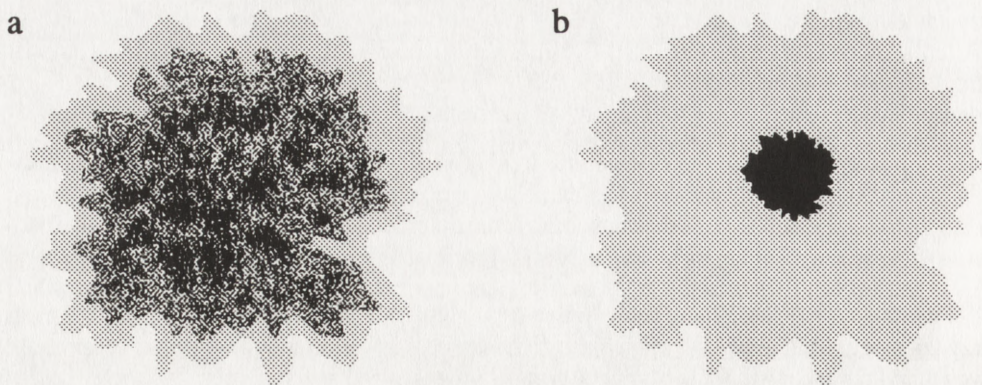
RUCHY GRANUL BARWNIKOWYCH

Przemieszczanie się granul barwnikowych w chromatoforach obserwowano już w latach trzydziestych. Matthews [30] stwierdził, że zmiany zabarwienia w skórze ryb związane są z wewnątrzkomórkowym ruchem tysięcy granul barwnikowych w melanoforach skóry. Rozjaśnienie, a nawet zanik barwy, jest wynikiem skupiania się ziarenek barwnika w ciałach komórek, natomiast równomierne rozproszenie granul barwnikowych w całej cytoplazmie melanoforów wywołuje lub nasila określoną barwę. Autor ten zasugerował, że chromatofory mogą być doskonałym obiektem do badań ruchów w cytoplazmie komórki.

Dopiero 30 lat później, niezależnie w kilku pracowniach, rozpoczęto badania mechanizmu ruchu ziarnistości barwnikowych w chromatoforach. Posłużono się metodą fotometrii całych komórek. Wykazano, że komórki te zawierają bardzo liczne mikrotubule, wzdłuż których odbywa się ruch ziarnistości barwnikowych [7,16,27,28,66]. Zastosowanie do badań czynników, które powodują depolimeryzację mikrotubul, takich jak: kolchicyna, winblastyna, oziębianie lub podwyższone ciśnienie hydrostatyczne, potwierdziło udział mikrotubul w ruchu granul barwnikowych. Rozbicie mikrotubul w chromatoforach powodowało zanik ruchu granul barwnikowych, usunięcie zaś czynnika uszkadzającego mikrotubule umożliwiało repolimeryzację mikrotubul i przywracało równocześnie zdolność ruchu ziarenek barwnikowych [6,34,50,66].

Jakkolwiek w różnych pracowniach uzyskano zgodne wyniki, że granule barwnikowe są zasocjowane z mikrotubulami, to otrzymano rozbieżne rezultaty badań gęstości i rozmieszczenia mikrotubul w chromatoforach w stanie dyspersji i agregacji barwnika. Murphy i Tilney wykazali, że liczba i rozmieszczenie mikrotubul są takie same w komórkach, w których barwnik jest rozproszony, jak w komórkach z barwnikiem zagregowanym w środku chromatoforu [34]. Natomiast Schliwa i wsp. obserwowali zmiany liczby mikrotubul w zależności od rozmieszczenia ziarenek barwnika w komórce [44,49,51,52]. W melanoforach *Pterophyllum scalare* w stanie rozproszenia barwnika w cytoplazmie komórki liczba mikrotubul wynosiła ok. 2400. Wraz z agregacją barwnika we wnętrzu komórki liczba mikrotubul malała do ok. 1000. Część mikrotubul ulegała depolimeryzacji [52].

Rozmieszczenie mikrotubul w chromatoforach jest bardzo charakterystyczne. Związane jest ono z ich tworzeniem się, które rozpoczyna się od aparatu centralnego w środku komórki (MTOC – *microtubule organizing center*) i postępuje ku obrzeżom komórki. Końce "+" mikrotubul, na których stale zachodzi ich polimeryzacja, znajdują się na peryferiach komórki, zaś końce "-", na których zachodzi depolimeryzacja, są zgrupowane w ciele chromatoforu [10]. Strukturalna polarność mikrotubul nadaje kierunek przenoszeniu granul barwnikowych. Agregacja barwnika w komórce związana jest z przesuwaniami granul od końca "+" do "-" mikrotubuli, dyspersja zaś wiąże się z przemieszczaniem granul barwnikowych od końca "-" do końca "+" mikrotubuli [31,39,46].



Rys. 1. Schemat chromatoforu z ziarnistościami barwnikowymi: a) rozproszonymi, b) zagregowanymi w ciele komórki

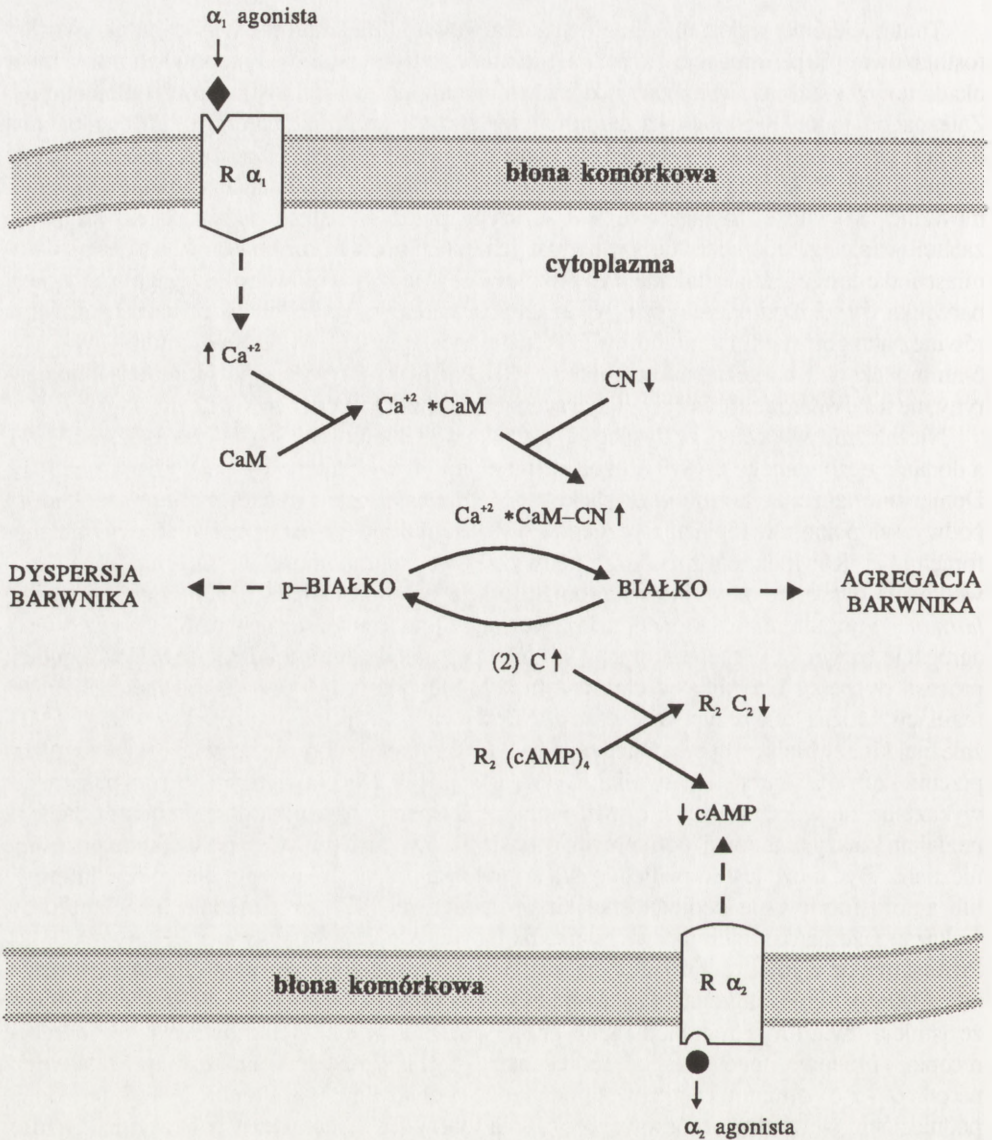
BADANIA DOTYCZĄCE REGULACJI RUCHÓW GRANUL BARWNIKOWYCH

W wielu pracowniach wykazano, że chromatofory reagują na szerokie spektrum neurotransmiterów. W melanoforach agregacja pigmentu zachodzi w odpowiedzi na działanie związków, które są agonistami α -adrenergicznymi [12,29,61,65] i dopaminowymi [13]. Dyspersję barwnika w izolowanych chromatoforach wywołują związki, które są agonistami α -adrenergicznymi [33], cholinergicznymi [65] i histaminowymi [13]. Jak wykazano w licznych doniesieniach, w odpowiedzi komórki na działanie hormonów i neurotransmiterów dochodzi do zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie podstawowej. Pobudzenie przez hormon odpowiednich receptorów błonowych doprowadza do aktywacji fosfolipazy C i hydrolizy fosfatydylo-inozytoli-4,5-bisfosforanu. W wyniku tej degradacji powstają dwa związki o charakterze wtórnych przekaźników informacji: inozytolo-trisfosforan oraz diacylglicerol. Czynnikiem uwalniającym jony Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych, pozamitochondrialnych magazynów komórki jest inozytolo-trisfosforan. Jakkolwiek do chwili obecnej pozostaje niewyjaśniony mechanizm tego procesu i nieznane są jakościowe zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek barwnikowych, to udział jonów wapnia w przemieszczaniu się granul barwnikowych w chromatoforach wydaje się bezsporny. Luby-Phels i Porter wykazali (przy zastosowaniu jonoforu A 23187), że w hodowli *in vitro* w buforze pozbawionym Ca^{2+} erytrofory nie wykazują agregacji barwnika i że minimalne stężenie jonów Ca^{2+} wymagane do agregacji barwnika w tych komórkach wynosi $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ [23]. Podobne rezultaty otrzymano w badaniach prowadzonych na innych chromatoforach [32,57]. Obserwacje te wskazują, że stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie odpowiedzialne jest za ukierunkowanie ruchu granul barwnikowych i może odgrywać znaczącą rolę w regulacji tego procesu w komórce. Jak wiadomo z wcześniejszych prac, jony Ca^{2+} jako drugi informator w układzie przekazywania sygnału, mogą być wiązane przez kalmodulinę, która przechodząc w formę aktywnej stymuluje CaM-Ca-zależne kinazy białkowe bądź fosfatazy fosfoproteinowe.

Thaler i Haimo wykazali, że agregacja barwnika w melanoforach wymaga aktywności fosfatazowej [60]. Agregacja barwnika, ale nie jego dyspersja, była hamowana przez kwas okadainowy w stężeniu wymaganym do zahamowania aktywności fosfatazowej kalcineuryny. Zależna od jonów wapnia i kalmoduliny fosfataza, zwana kalcineuryną, jest endogenną fosfatazą pośredniczącą w agregacji barwnika w melanoforach. Obecność kalcineuryny w melanoforach wykazano metodą immunofluorescencyjną [60]. Wykazano również, że zahamowanie aktywności fosfatazowej kalcineuryny przez swoiste przeciwciała powodowało zahamowanie agregacji barwnika w poddanych lisie modelach chromatoforów [59,60], natomiast dodanie egzogennej kalcineuryny (izolowanej z mózgu wołowego) wzmagало agregację barwnika w tych komórkach [60]. Agregację barwnika w żywych melanoforach hamowano również antagonistami kalmoduliny TFP (trifluoperazyną), CZM (kalmidizolium), W-7 (N-6-aminoheksyl-1-naftalenosulfonamidem) [60]. Zarówno aktywacja, jak i inhibicja kalcineuryny nie miały natomiast wpływu na dyspersję barwnika [59,60].

Niezależnie wykazano, że dyspersja barwnika w melanoforach jest zależna od cAMP [14], a dodanie egzogennej cAMP do hodowli melanoforów indukuje dyspersję barwnika [41]. Doniesiono także, że hormon przysadkowy MSH (*melanocyte stimulating hormone*), który podwyższa poziom cytoplazmatycznego cAMP, stymuluje dyspersję barwników w melanoforach [17]. Również teofilina, która podwyższa wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, powodowała dyspersję barwnika w chromatoforach, natomiast MCH (*melanin concentrating hormone*) i noradrenalina, które obniżają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, wywoływały agregację barwnika w melanoforach [58]. Chociaż udowodniono udział cAMP w regulacji procesu dyspersji barwnika w chromatoforach, niewyjaśniony pozostawał mechanizm tej regulacji. Można było przypuszczać, że cAMP wywiera swój efekt poprzez aktywację cAMP-zależnej kinazy białkowej odpowiedzialnej za fosforylację białka, które pełni rolę w regulacji przemieszczania ziarenek barwnika. Lynch i wsp. [24,25] potwierdzili to przypuszczenie wykazując, że w ksantoforach cAMP indukuje dyspersję barwnika poprzez fosforylację, z udziałem kinazy białkowej, polipeptydu o masie 57 kDa. Struktura tego polipeptydu pozostaje nieznana. Być może jest to podjednostka kompleksu przenośnikowego, białko regulatorowe lub autofosforylowana podjednostka kinazy białkowej [47]. Na modelach melanoforów wykazano, że białko inhibitorowe kinazy białkowej A wstrzymuje dyspersję barwnika [42]. Przedstawione wyniki badań wskazują, że dyspersja barwnika w chromatoforach jest zależna od cAMP, natomiast agregacja barwnika wymaga udziału jonów Ca^{2+} . Sugerowano zatem, że istnieją dwie drogi regulacji ruchu granul barwnikowych, stymulowane przez odrębne receptory błonowe, np. α_1 - i α_2 -adrenoreceptory [4,21]. Wewnątrzkomórkowe procesy zależne od α_1 - i α_2 -adrenoreceptorów są odmienne. Pobudzenie α_1 -adrenoreceptora powoduje podniesienie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , natomiast pobudzenie α_2 -adrenoreceptora obniża poziom cAMP [11].

Thaler i Haimo [61] zastosowali szereg związków, które są agonistami lub antagonistami receptorów α_1 - i α_2 -adrenergicznych, aby sprawdzić, jak pobudzenie tylko jednego z receptorów wpływa na przemieszczanie barwnika w melanoforach (rys. 2). W komórkach z rozproszonym barwnikiem, w których zablokowano receptory α_1 -adrenergiczne antagonistą (prazosin), agregacja barwnika była prawie zupełnie zahamowana zarówno po stymulacji α_1 -agonistą (PHE, MOX), jak i α_2 -agonistą (CLO, TL-99). Podobnie zablokowanie α_2 -adrenoreceptorów całkowicie hamowało agregację barwnika, nawet po stymulacji komórek α_1 -agonistą. Stąd wniosek autorów, że pobudzenie tylko jednego z adrenoreceptorów, a zatem zmiana stężenia tylko jednego z przenośników informacji (jonów Ca^{2+} lub cAMP), jest



Rys. 2. Model adrenergicznej regulacji ruchu granul barwnikowych w melanoforach, rysunek wg [61] zmodyfikowany: R_1, R_2 – receptory adrenergiczne α_1 i α_2 , CaM – kalmodulina, CN – kalcineuryna, R_2C_2 – fosfokinaza A (R – podjednostka regulatorowa, C – podjednostka katalityczna), \uparrow – zwiększenie, \downarrow – zmniejszenie aktywności lub stężenia

niewystarczająca do wywołania agregacji barwnika, a maksymalna agregacja zachodzi w melanoforach tylko przy równoczesnym obniżeniu poziomu cAMP i podwyższeniu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Współdziałanie obu przekaźników drugiego rzędu jest zatem konieczne do regulacji ruchów granul barwnikowych. Autorzy ci zaproponowali model

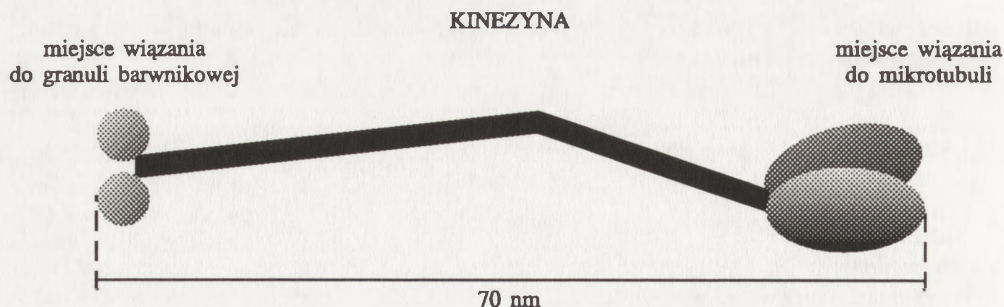
adrenergicznej regulacji ruchu granul barwnikowych w melanoforach, który schematycznie przedstawiony jest na rysunku 2.

BADANIA DOTYCZĄCE MECHANIZMU RUCHÓW GRANUL BARWNIKOWYCH

Rozdział i Haimo [41,42] podjęli próbę wyjaśnienia, czy mechanizm dwukierunkowego ruchu granul barwnikowych jest taki sam w obie strony, czy też agregacja i dyspersja barwnika aktywowane i regulowane są w odmienny sposób. Wykazali, że agregacja i dyspersja barwnika w melanoforach zachodzą tylko w obecności ATP, ale mają różne zapotrzebowanie na ATP. Agregacja barwnika może być zapoczątkowana w niższym stężeniu ATP (1 μM) niż dyspersja (40 μM). W dodatku agregację można wywołać nawet przez dodanie ADP, natomiast dyspersję barwnika można wywołać trifosforowym analogiem ATP - ATP γS . Stearns i Ochs [57] podali, że inne niż ATP nukleotydo-trifosforany (CTP, ITP, GTP, UTP) mogą dostarczać energii do ruchów granul barwnikowych, ale inni badacze nie potwierdzają tych doniesień podkreślając, że do przemieszczania ziarn barwnikowych wzdłuż mikrotubul konieczna jest hydroliza ATP z udziałem ATP-azy [9,20,32,41,46].

Postęp w wyjaśnieniu molekularnych podstaw ruchu granul barwnikowych przyszedł wraz z oczyszczeniem białek, które stanowią "molekularny motor" wewnątrzkomórkowych ruchów wzdłuż mikrotubul. Jednym z nich jest kinezyrna. Białko to odkryto podczas badań nad transportem ziarnistości neurosekrecyjnych w aksonie kałamarnicy [62]. Białko to o masie 380 kDa zawiera 4 polipeptydy: 2 łańcuchy ciężkie (Mw 124 000) i 2 łańcuchy lekkie (Mw 64 000) [8]. Łańcuch ciężki zawiera N-końcową, globularną domnę, w której zlokalizowane jest miejsce wiązania cząsteczki kinezyzny do mikrotubuli [67]. Drugi koniec cząsteczki kinezyzny może wiązać się z transportowaną cząstką (rys. 3). Kinezyrna jest mechanochemiczną ATP-azą. Cząsteczka kinezyzny może przesuwać się wzdłuż mikrotubuli, od jej końca "-" do końca "+" transportując związaną ze sobą cząstkę i wykorzystując energię uwolnioną ze zhydrolizowanego ATP [48,55,56]. Badania w modelowym układzie pozakomórkowym, prowadzone głównie na oczyszczonej kinezyrnie z komórek nerwowych, wykazały, że kinezyrna zaadsorbowana na powierzchni szkła lub plastyku może przesuwać związaną ze sobą mikrotubulę [62]. Wzdłuż mikrotubul cząsteczki kinezyzny przesuują się transportując w kierunku końca "+" lateksowe kulki lub częściowo oczyszczone organelle komórkowe [62,63,64]. Jak dotychczas nie prowadzono podobnych badań modelowych w układzie pozakomórkowym w odniesieniu do transportu ziarnistości barwnikowych. Radionov i wsp. wykazali udział kinezyzny w ruchu granul barwnikowych w melanoforach [39]. Zastosowali oni poliklonalne przeciwciała przeciw łańcuchowi ciężkiemu kinezyzny, które hamują zależny od kinezyzny ruch wzdłuż mikrotubul w układzie bezkomórkowym, do badań roli kinezyzny w transporcie granul barwnikowych w melanoforach. Wykazali, że mikroiniekcja tych przeciwciał do melanoforów powodowała całkowite zahamowanie dyspersji barwnika, nie wywierała natomiast wpływu na jego agregację. Stwierdzili więc, że transport granul barwnikowych w komórce w kierunku odśrodkowym odbywa się z udziałem kinezyzny, zgodnie z kierunkiem jej przemieszczania się od końca "-" do "+" mikrotubuli. Wykazali również, że w ruchu dośrodkowym ziarnistości barwnikowych nie uczestniczy kinezyrna [39].

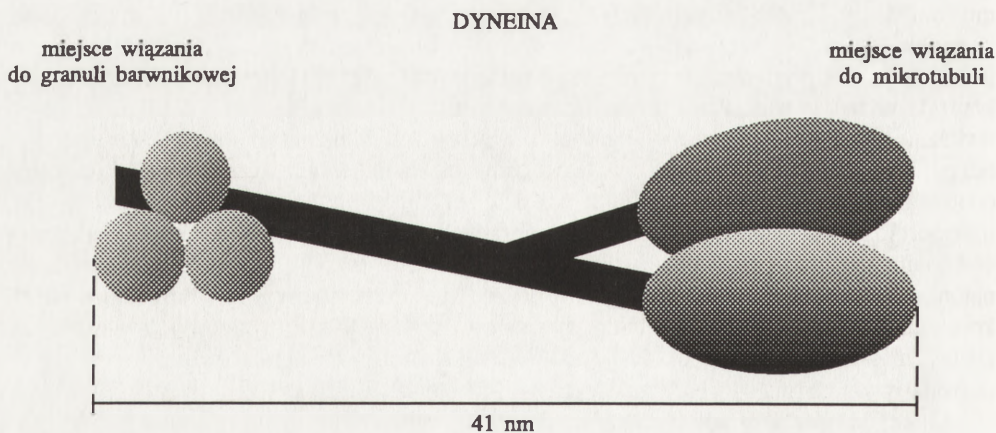
Kinezyrna okazała się motorem tylko dla ruchu wzdłuż mikrotubul od końca "-" do "+". Zaczęto zatem poszukiwać białek odpowiedzialnych za ruch w przeciwnym kierunku. Jedno



Rys. 3. Schemat budowy cząsteczki kinezyzny

z białek związanych z cytoplazmatycznymi mikrotubulami, MAP1C, wykazywało zdolność ruchu wzdłuż mikrotubuli od jej końca "+" do "-". Białko MAP1C o masie ok. 1000 kDa, złożone z kilku polipeptydów, podobnie jak kinezyzna może globularną główką wiązać się z mikrotubulą, a do drugiego końca cząsteczki przyłączać transportowaną granulę i przemieszczać ją wzdłuż mikrotubuli w kierunku przeciwnym niż kinezyzna. Do ruchu wymaga ATP. Białko MAP1C okazało się cytoplazmatyczną dyneiną podobną w swej strukturze i funkcji do dyneiny obecnej w wiciach i rzęskach [15,26,38,43,55]. Budowę cząsteczki dyneiny cytoplazmatycznej przedstawiono schematycznie na rysunku 4.

Ostatnio w kilku pracowniach wykazano, że inhibitory ATPazy dyneiny (wanadian oraz EHNA=erytho-9-[3-(2-hydroksynonyl)]adenina) blokują agregację pigmentu w melanofozach [9,35] i erytroforach [5] oraz komórkach melanoma [37]. Potwierdza to, że dyneina bierze udział w transporcie granул barwnikowych zasocjowanych z mikrotubulami. Niektórzy badacze podważają wartość tych doświadczeń podkreślając małą specyficzność tych inhibitorów [53]. Obecność dyneiny w komórkach melanoma, jej lokalizację wzdłuż mikrotubul oraz jej udział w agregacji barwnika w komórce wykazali Ogawa i wsp. metodą barwienia immuno-

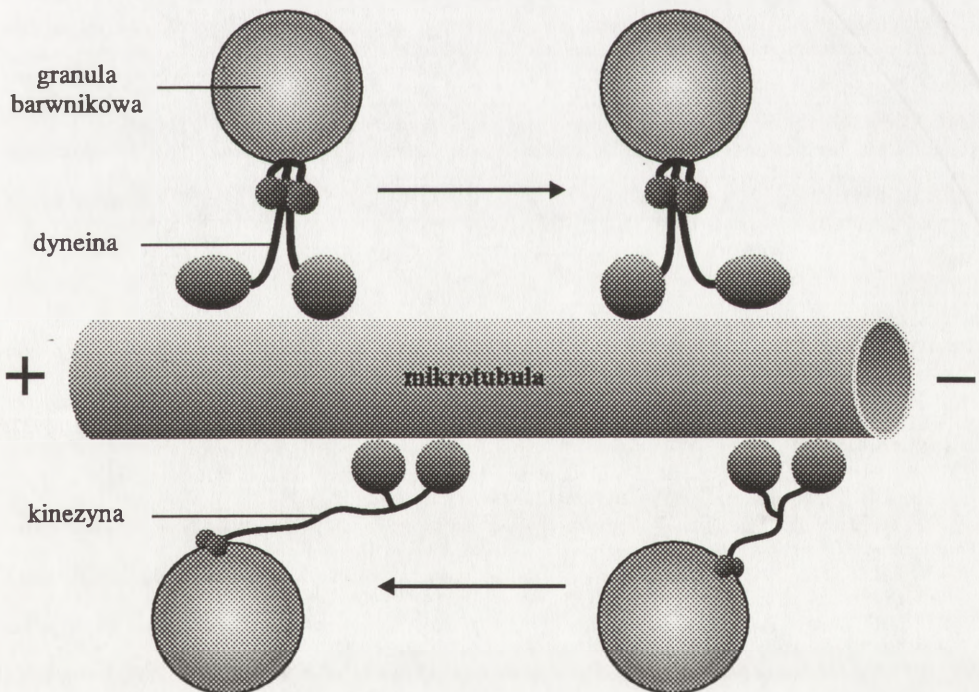


Rys. 4. Schemat budowy cząsteczki dyneiny cytoplazmatycznej

fluorescencyjnego oraz *immunoblotingu* [37]. Praca ta potwierdza udział dyneiny w transporcie granul barwnikowych. Przytoczone rezultaty badań wskazują na udział zarówno kinezy, jak i dyneiny w przemieszczaniu ziarenek barwnikowych w chromatoforach. Transport ziarnistości barwnikowych do wnętrza komórki, czyli agregacja odbywa się z udziałem dyneiny, od końca "+" do końca "-" mikrotubuli, przemieszczanie zaś granul w kierunku przeciwnym, czyli dyspersja barwnika, zachodzi z udziałem kinezy (rys. 5).

Akijama i Matsumoto [1] stwierdzili, że mikroiniekcja związanych z falloidyną antyaktynowych przeciwciał do rybiej komórki barwnikowej blokowała przemieszczanie się ziarnistości barwnika. Sugeruje to zaangażowanie aktyny w wewnątrzkomórkowych ruchach granul barwnikowych. Późniejsze badania tych samych autorów wykazały obecność także miozyny w komórkach barwnikowych [2]. Obok wcześniej postulowanej translokacji ziarnistości barwnikowych wzdłuż mikrotubuli z udziałem kinezy i dyneiny autorzy ci zasugerowali translokację zależną od mikrofilamentów aktynowych z udziałem jednogłówek miozyny I.

Transport granul barwnikowych w chromatoforach wykazuje wiele cech wspólnych z transportem w aksonach neuronów, w komórkach gruczołowych i niektórych komórkach roślinnych. Ze względu jednak na łatwą izolację chromatoforów i dogodność obserwacji przemieszczania barwnych granul są one doskonałym obiektem do badań ruchów wewnątrzkomórkowych i należy sądzić, że w najbliższych latach wzrośnie liczba prac dotyczących ruchów granul barwnikowych w chromatoforach i komórkach melanoma.



Rys. 5. Schemat przemieszczania granul barwnikowych wzdłuż mikrotubuli

LITERATURA

- [1] AKIYAMA T, MATSUMOTO J. The blockade of pigment displacement in swordtail erythrocytes by microinjection of anti-actin antibody. *J Exp Zool* 1983; **227**: 405–411.
- [2] AKIYAMA T, MATSUMOTO J, HIRAI S. Myosin and actin in melanophore-like variants of goldfish erythrocytes: their intracellular distribution and possible association with pigment translocation. *Cell Tissue Res* 1990; **259**: 239–246.
- [3] ALLEN RD, ALLEN NS, TRAVIS J. Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil* 1981; **1**: 292–302.
- [4] ANDERSSON RGG, KARLSSON JO, GRUNDSTROM N. Adrenergic nerves and the alpha₂-adrenoceptor system regulating melanosome aggregation within fish melanophores. *Acta Physiol Scand* 1984; **121**: 173–179.
- [5] BECKERLE MC, PORTER KR. Inhibitors of dynein activity block intracellular transport in erythrocytes. *Nature* 1982; **295**: 701–703.
- [6] BECKERLE MC, PORTER KR. Analysis of the role of microtubules and actin in erythrocyte intracellular motility. *J Cell Biol* 1983; **96**: 354–362.
- [7] BIKLE D, TILNEY LG, PORTER KR. Microtubules and pigment migration in the melanophores of *Fundulus heteroclitus* L. *Protoplasma* 1966; **61**: 322–345.
- [8] BLOOM GS, WAGNER MC, PFISTER KK, BRADY ST. Native structure and physical properties of bovine brain kinesin, and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 1988; **27**: 3409–3416.
- [9] CLARK TG, ROSENBAUM JL. Pigment particle translocation in detergent-permeabilized melanophores of *Fundulus heteroclitus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4655–4659.
- [10] EUTENEUER U. Implications of microtubule polarity for microtubule function. [w] Cell and molecular biology of the cytoskeleton. Shay JW (red.) Plenum Press, New York 1986: 179–202.
- [11] EXTON JK. Mechanisms involved in α -adrenergic phenomena. *Am J Physiol* 1985; **248**: E633–E647.
- [12] FUJII R, MIYASHITA Y. Receptor mechanisms in fish chromatophores. I. Alpha nature of adrenoceptors mediating melanosome aggregation in guppy melanophores. *Comp Biochem Physiol* 1975; **51C**: 171–178.
- [13] FERNANDO MM, GROVE DJ. Melanophore aggregation in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) II. In vitro effects of adrenergic drugs. *Comp Biochem Physiol* 1974; **48A**: 723–732.
- [14] GESCHWIND II, HOROWITZ JM, MIKUCKIS GM, DEWEY RD. Ionophoretic release of cyclic AMP and dispersion of melanosomes within a single melanophore. *J Cell Biol* 1977; **74**: 928–943.
- [15] GIBBONS IR. Dynein ATPases as microtubule motors. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15837–15840.
- [16] GREEN L. Mechanisms of movement of granules in melanocytes of *Fundulus heteroclitus* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; **59**: 1179–1186.
- [17] GRUNDSTROM N, KARLSSON JOG, ANDERSSON RGG. The control of granule movement in fish melanophores. *Acta Physiol Scand* 1985; **125**: 415–422.
- [18] HAIMO LT, ROZDZIAL MM. Lysed chromatophores: A model system for the study of bidirectional organelle transport. *Meth Cell Biol* 1989; **31**: 3–24.
- [19] INOUE S. Video image processing greatly enhances contrast, quality and speed in polarization-based microscopy. *J Cell Biol* 1981; **89**: 346–356.
- [20] JUNQUIERA LC, RAKER E, PORTER KR. Studies on pigment migration in the melanophore of the teleost *Fundulus heteroclitus* (L.). *Arch Hist Jpn* 1974; **36**: 337–366.
- [21] KARLSSON JOG, GRUNDSTROM N, WIKBERG JES, FRIEDMAN R, ANDERSSON RGG. The effect of pertussis toxin on alpha₂-adrenoceptor-mediated pigment migration in fish melanophores. *Life Sciences* 1985; **37**: 1043–1049.
- [22] LUBY KJ, PORTER KR. The control of pigment migration in isolated erythrocytes of *Holocentrus ascensionis* (Osbeck). I. Energy requirements. *Cell* 1980; **21**: 13–23.
- [23] LUBY-PHELPS KJ, PORTER KR. The control of pigment migration in isolated erythrocytes of *Holocentrus ascensionis* (Osbeck). II. The role of calcium. *Cell* 1982; **29**: 441–450.
- [24] LYNCH TJ, TAYLOR JD, TCHEN TT. Regulation of pigment organelle translocation. I. Phosphorylation of the organelle-associated protein p57. *J Biol Chem* 1986; **261**: 4204–4211.
- [25] LYNCH TJ, WU B-Y, TAYLOR JD, TCHEN TT. Regulation of pigment organelle translocation. II. Participation of a cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1986; **261**: 4212–4216.
- [26] MACRAE TH. Microtubule organization by cross-linking and bundling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1160**: 145–155.
- [27] MALAWISTA SE. On the action of colchicine. The melanocyte model. *J Exp Med* 1965; **122**: 361–367.

- [28] MALAWISTA SE. Cytochalasin B reversibly inhibits melanin granule movement in melanocytes. *Nature* 1971; **234**: 354–355.
- [29] MATSUMOTO J, WATANABE Y, OBIKA M, HADLEY ME. Mechanisms controlling pigment transport movements within swordtail (*Xiphophorus helleri*) erythrocytes in primary cell culture. *Comp Biochem Physiol* 1978; **61A**: 509–517.
- [30] MATTHEWS SA. Observations on pigment migration within the fish melanophore. *J Exp Zool* 1931; **58**: 471–476.
- [31] McNIVEN MA, PORTER KR. Chromatophores—models for studying cytomatrix translocations. *J Cell Biol* 1984; **99**: 152–158.
- [32] McNIVEN MA, WARD JB. Calcium regulation of pigment transport in vitro. *J Cell Biol* 1988; **106**: 111–125.
- [33] MIYASHITA Y, FUJII R. Receptor mechanisms in fish chromatophores. II. Evidence for beta adrenoreceptors mediating melanosome dispersion in guppy melanophores. *Comp Biochem Physiol* 1975; **51C**: 179–187.
- [34] MURPHY DB, TILNEY LG. The role of microtubules in movement of pigment granules in teleost melanophores. *J Cell Biol* 1974; **61**: 757–779.
- [35] NEGISHI S, FERNANDEZ HRC, OBIKA M. The effect of dynein ATPase inhibitors on melanosome translocation within melanophores of the Medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 1985; **2**: 469–475.
- [36] OBIKA M. Intracellular transport of pigment granules in fish chromatophores. *Zool Sci* 1986; **3**: 1–11.
- [37] OGAWA K, HOSOYA H, YOKOTA E, KOBAYASHI T, WAKAMATSU Y, OZATO K, NEGISHI S, OBIKA M. Melanoma dynein: evidence that dynein is a general "motor" for microtubule-associated cell motilities. *Eur J Cell Biol* 1987; **43**: 3–9.
- [38] PASCHAL BM, OBAR RA, VALLEE RB. Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin. *Nature* 1989; **342**: 569–573.
- [39] RODIONOV VI, GYOEVA FK, GELFAND VI. Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4956–4960.
- [40] RODIONOV VI, GYOEVA FK, KASHINA AS, KUZNETSOV SA, GELFAND VI. Microtubule-associated proteins and microtubule-based translocators have different binding sites on tubulin molecule. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5702–5707.
- [41] ROZDZIAL MM, HAIMO LT. Reactivated melanophore motility: differential regulation and nucleotide requirements of bidirectional pigment granule transport. *J Cell Biol* 1986a; **103**: 2755–2764.
- [42] ROZDZIAL MM, HAIMO LT. Bidirectional pigment granule movements of melanophores are regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell* 1986b; **47**: 1061–1070.
- [43] SATIR P, GOLTZ JS, WOLKOFF AW. Microtubule-based cell motility: the role of microtubules in cell motility and differentiation. *Cancer Investigation* 1990; **8**: 685–690.
- [44] SCHLIWA M. Microtubular apparatus of melanophores. Three-dimensional organization. *J Cell Biol* 1978; **76**: 605–614.
- [45] SCHLIWA M. Microtubule-dependent intracellular transport in chromatophores. [w] International Cell Biology. Schweiger HG (red.) New York: Springer-Verlag, 1981: 275–285.
- [46] SCHLIWA M. Mechanisms of intracellular organelle transport. *Cell Mus Motil* 1984; **5**: 1–82.
- [47] SCHLIWA M. Review Article: Permeabilized cell models for the study of granule transport in pigment cells. *Pigment Cell Res* 1987; **1**: 65–68.
- [48] SCHLIWA M. Head and tail. *Cell* 1989; **56**: 719–720.
- [49] SCHLIWA M, BEREITER-HAHN J. Pigment movements in fish: morphological and physiological studies. II. Cell shape and microtubules. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1973; **147**: 107–125.
- [50] SCHLIWA M, BEREITER-HAHN J. Pigment movements in fish: morphological and physiological studies. III. The effects of colchicine and vinblastine. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1973; **147**: 127–147.
- [51] SCHLIWA M, EUTENEUER U. A microtubule independent component may be involved in granule transport in pigment cells. *Nature* 1978; **273**: 556–558.
- [52] SCHLIWA M, EUTENEUER U, HERZOG W, WEBER K. Evidence for rapid structural and functional changes of the melanophore microtubule-organizing center upon pigment movements. *J Cell Biol* 1979; **83**: 623–632.
- [53] SCHLIWA M, EZZELL RM, EUTENEUER U. Erythro-9-(3-[2-hydroxyonyl])adenine is an effective inhibitor of cell motility and actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6044–6048.
- [54] SCHLIWA M, VAN BLERKOM J. Structural interaction of cytoskeleton components. *J Cell Biol* 1981; **90**: 222–235.
- [55] SCHROER TA, SCHNAPP BJ, REESE TS, SHEETZ MP. The role of kinesin and other soluble factors in organelle movement along microtubules. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1785–1792.
- [56] SHEETZ MP. Kinesin structure and function. [w] Kinesin, dynein and microtubule dynamics. Alan R, (red.) *Cell Movement* 1989; **2**: 277–285.

- [57] STEARNS ME, OCHS RL. A functional in vitro model for studies of intracellular motility in digitonin-permeabilized erythrocytes. *J Cell Biol* 1982; **94**: 727–739.
- [58] SVENSSON SPS, NORBERG T, ANDERSSON RGG, GRUNDSTROM N, KARLSSON JOG. MCH-induced pigment aggregation in teleost melanophores is associated with a cAMP reduction. *Life Sciences* 1991; **48**: 2043–2046.
- [59] TASH JS, KRINKS M, PATEL J, MEANS RL, KLEE CB, MEANS AR. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1625–1633.
- [60] THALER CD, HAIMOLT. Regulation of organelle transport in melanophores by calcineurin. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1939–1948.
- [61] THALER CD, HAIMOLT. Control of organelle transport in melanophores: regulation of Ca^{+2} and cAMP levels. *Cell Motil Cytoskelet* 1992; **22**: 175–184.
- [62] VALE RD, REESE TS, SHEETZ MP. Identification of a novel force-generating protein, kinesin involved in microtubule-based motility. *Cell* 1985; **42**: 39–50.
- [63] VALE RD, SCHNAPP BJ, MITCHISON TJ, STEUER E, REESE TS, SHEETZ MP. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 1985b; **43**: 623–632.
- [64] VALE RD, SCHNAPP BJ, REESE TS, SHEETZ MP. Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 1985d; **40**: 559–569.
- [65] VISCONTI MA, CASTRUCCI MDL, VALENTE D. A study of melanophore receptors of *Papiliochromis ramierezi* (Teleostei, Cichlidae). *Comp Biochem Physiol* 1984; **77C**: 161–165.
- [66] WIKSWO MA, NOVALES RR. Effect of colchicine on microtubules in the melanophores of *Fundulus heteroclitus*. *J Ultrastruct Res* 1972; **41**: 189–201.
- [67] YANG JT, LAYMON RA, GOLDSTEIN LSB. A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding studies. *Cell* 1989; **56**: 879–889.

ZJAWISKO KONTAKTOWEGO NAPROWADZANIA KOMÓREK

CONTACT GUIDANCE OF CELLS

Jarosław CZYŻ

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ, Kraków

Streszczenie. Przedstawiono aktualnie prowadzone badania genety, mechanizmów oraz znaczenia kontaktowego naprowadzania komórek. Omówiono hipotezy wyjaśniające wpływ właściwości fizycznych i chemicznych podłoża na morfologię i zachowanie komórek, a także przykłady roli naprowadzania przez kontakt w embriogenezie i morfogenezie.

Słowa kluczowe: naprowadzanie przez kontakt, ruchy komórkowe

Summary. The contemporary research on mechanisms and role of contact guidance has been presented. The hypotheses explaining the influence of physical and chemical properties of substratum on morphology of cells grown in cultures have been discussed, and the examples of the role of contact guidance in morphogenesis and embryogenesis have been described.

Key words: contact guidance, cell motility

I. WSTĘP

Budowa anatomiczna organizmu zwierzęcego jest wynikiem działania mechanizmów regulacyjnych, które wywołując określone reakcje komórek prowadzą do tworzenia i utrzymywania wyspecjalizowanych struktur wielokomórkowych. Reakcje komórek na bodźce określone są zarówno przez ich właściwości, związane np. ze stanem fizjologicznym, jak i przez jakość i natężenie sygnału. Wśród czynników działających na komórki w strukturach wielokomórkowych dużą rolę przypisuje się wzajemnym oddziaływaniom komórek z ich bezpośrednim otoczeniem. Jedną z cech mikrośrodowiska komórek *in vivo* jest anizotropia właściwości chemicznych i fizycznych, która wywołuje zmiany morfologii i kierunku ruchu prawidłowych komórek zwierzęcych. Oddziaływania tego typu leżą u podstaw zjawiska naprowadzania przez kontakt. Uważa się, iż są one szczególnie ważne w czasie embriogenezy i morfogenezy, gdyż mogą samodzielnie kierować procesami tworzenia i utrzymywania struktur właściwych organizmom wielokomórkowym [26, 27].

II. BADANIA REAKCJI PRAWIDŁOWYCH KOMÓREK ZWIERZĘCYCH NA ANIZOTROPIĘ WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH PODŁOŻA

Pierwsze doniesienia na temat reakcji komórek na rzeźbę podłoża pochodzą z początku wieku [33], jednak dopiero doświadczenia P. Weissa wykonane w latach czterdziestych i pięćdziesiątych wykazały powszechność tego zjawiska [57,58,59]. Zaproponował on kilka modeli doświadczalnych pozwalających na badanie wpływu właściwości podłoża na kształt i kierunek ruchu komórek. Hodując komórki w sieci włókien fibryny ze skrzepu zaobserwował, iż wraz ze wzrostem stopnia orientacji włókien wywołanej rozciąganiem skrzepu następuje polaryzacja kształtu komórek. Autor badał także zachowanie się komórek na łuskach rybich, których charakterystyczną cechą są zorientowane równolegle włókna kolagenu oraz na powierzchniach pokrytych pasmami silikonu lub mikrorówkami. We wszystkich tych doświadczeniach obserwował zmianę kształtu komórek z wielokątnego na dwubiegunowy. Zjawisko to uznał za efekt działania sił porządkujących (np. włókna fibryny) [59] lub wydzielania przez komórki zorientowanych liniowo makrocząsteczek [56,57]. Zasugerował również, iż w wypadku komórek hodowanych na podłożu pokrytym mikrorówkami zachowanie się komórek może być wynikiem wrażliwości komórek na rzeźbę podłoża [59].

Curtis [13] hodując komórki na włóknach silikonowych obserwował ich orientowanie się w kierunku osi długiej włókien, nie stwierdził jednak odkładania białek na ich powierzchni. Na tej podstawie zasugerował, że reakcja komórek na właściwości rzeźby podłoża ma bezpośredni charakter.

Powyżej opisane doświadczenia wykazały wpływ właściwości mikrośrodowiska na zachowanie się komórek, nie doprowadziły jednak do wyjaśnienia zjawiska. Wynikało to ze złożoności układów doświadczalnych, która uniemożliwiała przeprowadzenie pomiarów ilościowych. Postęp w badaniach nad zjawiskiem naprowadzania kontaktowego zaznaczył się w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych wraz z rozwojem wiedzy o strukturze cytoszkieletu oraz jego funkcjach w procesach ruchowych. Ważne było także opracowanie nowych technik doświadczalnych, umożliwiających rozdzielenie wpływów różnych czynników na komórki oraz projektowanie układów doświadczalnych o określonych parametrach [4,9,10,11,12,14].

Nowych danych dotyczących mechanizmu reakcji komórek na właściwości fizyczne podłoża dostarczyły doświadczenia Dunna i Heatha [17]. Badali oni zachowanie się komórek hodowanych na włóknach szklanych oraz na styku dwóch płaszczyzn nachylonych w stosunku do siebie pod różnym kątem. Wykazali, iż nasilenie reakcji komórek jest odwrotnie proporcjonalne do średnicy włókna i wprost proporcjonalne do kąta nachylenia płaszczyzn. Zaobserwowali również przechodzenie komórek z jednej powierzchni na drugą, gdy kąt pomiędzy powierzchniami nie był większy niż 16 stopni. Według autorów wynika to ze sztywności wypustek zawierających cytoszkielet i trudności zginania struktur o charakterze włókien naprężeniowych. Wypustka znajdująca się w innej płaszczyźnie niż ciało komórki musiałaby mieć cytoszkielet, którego organizacja nie wykazywałaby ciągłości z cytoszkieletem ciała komórki. Jeśli kształt podłoża ogranicza w jednym z kierunków długość struktur cytoszkieletu, może to doprowadzić do dominacji struktur zorientowanych w innym kierunku. Spowoduje to zmianę polaryzacji kształtu komórki i kierunku jej ruchu [17].

Dunn i Clark [9, 17] uzyskali wyniki wskazujące na wpływ kąta, jaki tworzy powierzchnia, na której znajduje się komórka, ze ścianą przeszkody, na prawdopodobieństwo jej pokonania przez komórkę. Kąt wklęsły (pomiędzy niższą płaszczyzną a ścianą przeszkody) jest łatwiej pokonywany niż kąt wypukły (pomiędzy wyższą płaszczyzną a ścianą przeszkody). Wiązać się to może z koniecznością znacznieszego zgięcia wypustki. Jednocześnie wykazano [9] zależność reakcji komórek od właściwości chemicznych obu płaszczyzn.

Ohara i Buck [48] zaobserwowali, że komórka ma zdolność przekraczania rowków o szerokości mniejszej niż jej długość. Obserwacje te były zgodne z hipotezą Dunna i Heatha zakładającą rolę sztywności cytoszkieletu [17]. Hipoteza ta nie tłumaczy, w jaki sposób komórki dopasowują swój kształt i kierunek ruchu do kierunku przebiegających pod nimi rowków. Według Ohary i Bucka za orientację komórek w takim układzie doświadczalnym odpowiedzialne są ograniczenia w tworzeniu kontaktów zogniskowanych (ang. *focal contacts*). W ich wyniku struktury utworzone wzdłuż rowków wykazują silniejszą adhezję niż struktury utworzone w poprzek rowków. Wywołuje to reakcję komórki polegającą na jej rozplaszczeniu w kierunku równoległym do osi przeszkód.

W ostatnim czasie niektórzy autorzy podważyli wnioski Ohary i Bucka. Wykazano [20] że komórki mają zdolność tworzenia kontaktów zogniskowanych zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz rowków o głębokości 0,69 μm . Meyle i wsp. zaobserwowali dopasowanie kształtu błony komórkowej do tak płytkich rowków [45]. Także zależność reakcji komórek od głębokości rowków potwierdza obserwacje Meyle'a [11]. Komórki epitelialne MDCK, rosnące jako kolonia nie wnikają do wnętrza rowków i nie wykazują przy tym zorientowania migracji [10].

Brunette [5] badał zachowanie się komórek hodowanych na podłożu o podwójnym rowkowaniu. Wewnątrz większych rowków (szer. > 100 μm , głęb. 92 μm) znajdowały się mniejsze rowki (szer. 4,7 μm) ustawione skośnie względem osi rowków większych. Komórki ustawiały się wzdłuż rowków mniejszych tylko wtedy, gdy brak było rowków większych. Stwierdził też, iż wbrew obserwacjom Dunna i Heatha lamellipodia komórek mogą ulegać znacznym odkształceniom. Sugerował on przypadkową (statystyczną) zdolność komórek do pokonywania przeszkód wynikających z ukształtowania podłoża.

Clark i wsp. [9,10] zaobserwowali, że im większa przeszkoda, tym mniej komórek może ją pokonać. Jednocześnie autorzy ci potwierdzili wcześniejsze doniesienia Brunette o zdolności komórek do odkształceń lamellipodium [6]. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowali zależność reakcji komórki na rzeźbę podłoża od stopnia, w jakim przeszkoda zmienia prawdopodobieństwo utworzenia przez komórkę wypustki mogącej zapoczątkować ruch komórki w danym kierunku [9,10]. Głównym czynnikiem może być sztywność struktur cytoszkieletalnych postulowana m.in. przez Dunna i Heatha [9, 17] oraz dążenie komórki do zminimalizowania zniekształcenia cytoszkieletu.

III. WPŁYW CIĄGŁYCH I NIECIĄGŁYCH GRADIENTÓW ADHEZYJNOŚCI NA POLARYZACJĘ KSZTAŁTU I KIERUNKU RUCHU KOMÓREK

Wykazanie reakcji komórek na właściwości fizyczne i chemiczne podłoża skłoniło badaczy do opracowania układów doświadczalnych ułatwiających badanie wpływu anizotropii adhezji podłoża na zachowanie komórek.

Carter [7] uzyskał ciągły gradient adhezyności przez napylenie palladu na powierzchnię pokrytą octanem celulozy. Komórki hodowane na tak przygotowanym podłożu wędrowały od obszaru o mniejszej adhezyności do obszaru o większej adhezyności, tak jak to przewidywali Gustafson i Wolpert [25]. Zjawisko to Carter nazwał haptotaksją. Dunn [19], obserwując zachowanie komórek hodowanych na równoległych pasmach octanu celulozy i szkła zauważył, że komórki wykazywały polaryzację kształtu na pojedynczym paśmie szkła o szerokości 15 μm , jednak nie wykazywały tej reakcji na wielokrotnych pasmach o szerokości 10 μm . Podobne wyniki otrzymali Clark i wsp. [12] hodując komórki na pasmach o zróżnicowanej adhezyności i szerokości od 4 do 50 μm . Wykazali oni stopniowy charakter reakcji komórek BHK na zmieniające się szerokości pasm. Komórki nie reagują na pasma o szerokości 4 μm , jednak wraz ze wzrostem ich szerokości reakcja komórek się nasila. Komórki epitelialne MDCK maksimum reakcji osiągają już przy niewielkich szerokościach pasm [12]. Na tej podstawie autorzy zasugerowali, że za takie zachowanie komórek odpowiedzialne są wypustki wysuwane ponad obszarami o małej adhezyności. Dzięki nim komórki są w stanie pokonać tego typu przeszkodę, jednak wydajność takiego ruchu zależy od szerokości pasm o małej adhezyności [37]. Różnice w reakcjach komórek pochodzących z różnych linii mogą być efektem różnej długości tworzących się wypustek. Na przykład aksony niektórych neuronów są w stanie pokonywać przeszkody o szerokości do 50 μm . [30]

Podstawowy mechanizm reakcji na ciągłe i nieciągłe gradienty adhezyności jest podobny. W obu wypadkach może on zależeć od prawdopodobieństwa ukierunkowania przez daną wypustkę ruchu komórki. Jest ono mniejsze dla wypustek wysuwanych w kierunku obszarów o mniejszej adhezyności. Wypustki przyłączone do tych obszarów są łatwiej wycofywane, a zatem trudniej im ukierunkować ruch komórki [25]. W wypadku gradientów nieciągłych prawdopodobieństwo to zwiększa się, jeśli wypustka wysunięta w kierunku obszaru o małej adhezyności może osiągnąć pasmo dużej adhezyności.

IV. ZACHOWANIE SIĘ KOMÓREK NA ŻELACH KOLAGENOWYCH I FIBRONEKTYNIE

Równoległe z badaniami zachowania się komórek na podłożach sztucznych prowadzone były prace mające na celu opisanie i wyjaśnienie mechanizmów rządzących zachowaniem komórek w warunkach naśladujących sytuację *in vivo*. Wśród nich na uwagę zasługują doświadczenia z wykorzystaniem żeli kolagenowych. Kolagen jest białkiem powszechnie występującym w macierzy międzykomórkowej. Określenie natury oddziaływań zachodzących między tym białkiem a komórkami jest ważne dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw wielu procesów zachodzących *in vivo*.

Równoległe zorientowane włókna kolagenu wywierają na komórki podobny wpływ jak równoległe przeszkody natury fizycznej lub chemicznej [16,18,21,34,40,56,58]. Komórki hodowane w takich warunkach są słabiej rozplaszczane, bardziej spolaryzowane, często przybierają kształt wrzecionowaty [34]. Takie kształty komórek odzwierciedlają znaczną anizotropowość fizyczną i chemiczną żeli kolagenowych. Dunn i Ebenthal [18] uważają, iż za orientację kształtu i ruchu komórek odpowiada układ przestrzenny włókien kolagenu. Nie leżą one w jednej płaszczyźnie i mogą przez to powodować konieczności odkształceń cytoszkieletu przyłączonej do nich komórki. Autorzy ci zakładają więc wrażliwość komórek

na anizotropię fizycznych właściwości podłoża. Zgodne to jest z wnioskami Clarka [9,10] i wynikami doświadczeń Heatha [34]. Według Armstronga [2] na polaryzację kształtu komórek zgodną z kierunkiem przebiegu włókien kolagenu może mieć wpływ kierunkowa anizotropia elastyczności żelu. Włókna kolagenu są znacznie bardziej odporne na działanie sił działających w kierunku równoległym do osi włókna niż w kierunku prostopadłym.

Z punktu widzenia embriologii interesujące było stwierdzenie, że interakcje pomiędzy komórką a żelem mają charakter wzajemny, tzn. nie tylko ułożenie włókien wpływa na polaryzację komórki, lecz także siły wytwarzane przez komórki mogą powodować orientację włókien kolagenu [31,40,52]. Obserwacja ta pozwala sugerować mechanizm powstawania wysoko zorganizowanych struktur związany z właściwościami mechanicznymi komórek. Według Klebe' a i wsp. [40] receptory klasy integryn mające zdolność oddziaływać zarówno z kolagenem, jak i fibronektyną mogą pełnić rolę pośredników w przenoszeniu do wnętrza komórki informacji o przestrzennej organizacji tych białek [39,41]. Dopasowanie wiązek filamentów aktynowych do kierunku orientacji struktur włóknistych podłoża może powodować dalsze ich uporządkowanie poprzez działanie sił wytwarzanych przez zorientowane struktury cytoszkieletu komórki. Hipoteza ta poparta jest wynikami wskazującymi na wpływ układu fibronektyny związanej z podłożem na rozmieszczenie receptora w błonie oraz na uporządkowanie filamentów aktynowych wewnątrz komórki [35,36,49]. Pozwala ona także wyjaśnić zachowanie komórek hodowanych na spolaryzowanych liniowo pasmach fibronektyny adsorbowanych na szkle. Komórki hodowane w takich warunkach wykazują polaryzację kształtu zgodną z ich kierunkiem [55].

Pasma fibronektyny mogą jednakże stanowić przeszkody, które pomimo nanometrowych wymiarów mogą wpływać na orientację komórki. Ciągłe gradienty stężenia tego białka mogą wywoływać reakcje haptotaktyczne, a nieciągłe – reakcje analogiczne do opisanych przez Clarka [12].

V. PORÓWNANIE MECHANIZMÓW REAKCJI KOMÓREK NA FIZYCZNE I CHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI PODŁOŻA

Reakcje komórek na czynniki wywołujące polaryzację ich kształtu i kierunku ruchu związane są z właściwościami cytoszkieletu. Mają one charakter statystyczny i są efektem zmiany prawdopodobieństwa utworzenia przez komórkę wypustki zdolnej do ukierunkowania jej ruchu. W wypadku reakcji komórek na właściwości fizyczne podłoża zmiana ta następuje w wyniku zaburzenia struktury przestrzennej cytoszkieletu lub oddzielenia cytoszkieletu wypustki od cytoszkieletu ciała komórki [9,10,17]. Właściwości chemiczne podłoża wpływają na zdolność komórek do organizacji struktur cytoszkieletu, zaangażowanych w procesach ruchowych. Wynika to z roli stabilnych kontaktów receptorów błonowych z podłożem w tworzeniu aparatu lokomotorycznego komórki [12].

Na korelację pomiędzy organizacją cytoszkieletu a podatnością komórek na działanie omawianych czynników wskazują wyniki badań nad komórkami charakteryzującymi się labilnym cytoszkieletem, takimi jak komórki nowotworowe lub leukocyty wielojądrzaste [9,23]. Wykazano brak reakcji tych komórek na przeszkody w warunkach, w których inne typy komórek wykazują silną reakcję [23]. W wypadku komórek nowotworowych to właśnie brak reakcji na anizotropię właściwości fizycznych i chemicznych podłoża zwrócił uwagę

badaczy na ich cytoszkielecie, co doprowadziło do odkrycia różnic w jego organizacji w porównaniu z komórkami prawidłowymi [1]. Wyniki badań Middletona i Clarka [10,46] dotyczące zależnego od kontaktu rozpląszczenia komórek epitelialnych wskazywać mogą na wpływ anizotropii naprężeń panujących wewnątrz komórki na jej zdolność do migracji w danym kierunku. Clark i wsp. wykazali [10], iż kontakty między komórkami pozwalają przezwyciężyć im wpływ przeszkód natury zarówno fizycznej, jak i chemicznej. Można przypuszczać, że początkowo reakcja komórki wywołwana jest wyłącznie przez właściwości podłoża, które wymuszają równoległe ułożenie wiązek mikrofilamentów. Struktury te będąc elementami kurczliwymi prowadzą do nierównomiernego rozkładu naprężeń panujących w komórce. Sprzyja to, niezależnie od bezpośredniego wpływu podłoża, wysuwaniu wypustek w kierunku równoległym do przebiegu struktur cytoszkieletu. Podobne zjawisko może występować w układach ze zorientowanymi włóknami kolagenu lub depozycjami fibronektyny [18,55]. Komórki rosnące w koloniach wykazują mniejszą reakcję na właściwości podłoża, gdyż oddziaływania międzykomórkowe zmniejszają wpływ oddziaływań z podłożem na organizację cytoszkieletu.

VI. NATURA I GENEZA SZLAKÓW MIGRACYJNYCH IN VIVO

W porównaniu do cechujących się znacznym stopniem uproszczenia układów doświadczalnych *in vitro*, warunki, w jakich znajdują się komórki i ich zespoły w organizmach żywych, są bardzo złożone. Dlatego interpretacja wyników uzyskanych w badaniach *in vivo* jest stosunkowo trudna.

Dużą rolę w regulacji migracji komórek w ustroju przypisuje się macierzy międzykomórkowej, która stanowi bezpośrednie środowisko komórek. Ważny jest jej skład, a w szczególności wzajemny stosunek białek strukturalnych i kwasu hialuronowego, ilość białek zapewniających adhezję (fibronektyny, lamininy) oraz stopień organizacji przestrzennej elementów strukturalnych [2].

Rola kwasu hialuronowego w ukierunkowaniu migracji komórek polegać może na tworzeniu szlaków, wywołujących reakcję haptotaktyczną komórek. Szlaki te mogą być modyfikowane przez komórki mające zdolność rozkładania lub wydzielania kwasu hialuronowego. Wykazano także zapoczątkowanie migracji komórek w momencie wzrostu stężenia tego związku i spadek natężenia migracji wraz z obniżeniem jego stężenia [54].

Podobne funkcje w organizmie pełnią fibronektyny i lamininy. Komórki zdolne do wytwarzania fibronektyny (np. fibroblasty) odkładają to białko wzdłuż przebytej drogi [29]. Depozycje te mogą służyć innym komórkom (np. nerwowym) jako swoiste "drogowskazy". Wykazano obecność tego białka w szlakach migracyjnych wykorzystywanych przez niektóre typy komórek nerwowych [15,47,53]. Komórki wrażliwe na obecność fibronektyny, takie jak mioblasty [8], neurony [38,50], pierwotne komórki zarodka [28], same nie odkładają tego białka, gdyż mogłoby to zaburzyć ich reakcję na już istniejące szlaki [2].

W obrębie macierzy międzykomórkowej komórki migrują wzdłuż dróg wyznaczonych przez oddziaływania mechaniczne między składnikami macierzy a komórkami [22,24,43]. Dodatkowo stabilizacja i usztywnienie struktury macierzy umożliwiają migrację tych typów komórek, których właściwości wymagają sztywnych podłoży [32,44]. Zjawisko to może leżeć u podstaw zależnego od stabilności podłoża mechanizmu regulującego kierunek migracji

komórek. Komórki wykorzystywać mogą system określania kierunku ruchu oparty na istnieniu kanałów o obniżonej zwartości tkanek [42,51]. Kanały tego typu mogą się tworzyć w gęstej tkance w wyniku śmierci niektórych komórek lub lokalnego nagromadzenia elementów strukturalnych macierzy międzykomórkowej. Szlaki migracji komórek mogą być także określone bezpośrednio przez przylegające komórki. Pierwotne komórki zarodka wrażliwe są na orientację komórek, po których wędrują [60], przy czym trudno jak dotąd rozstrzygnąć, który z opisanych poprzednio mechanizmów mógłby być za to zjawisko odpowiedzialny. Podobne zjawiska zaobserwowano w przypadku rozwoju układu nerwowego [3]. W początkowej fazie wrastania aksonów do obszarów nieunerwionych pierwsze wydłużające się aksony są wykorzystywane jako szlaki dla następnych.

VII. PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat nastąpił znaczny postęp w badaniach nad czynnikami regulującymi procesy migracji komórek, w tym nad rolą i mechanizmem zjawiska naprowadzania przez kontakt. Nadal niewiele jednak wiadomo na temat uwarunkowań i przebiegu tych procesów w warunkach *in vivo*. Ich poznanie jest ważne dla postępu wiedzy w embriologii, onkologii i innych dziedzinach nauk biologicznych. Należy zatem oczekiwać nasilenia badań w tej dziedzinie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AMBROSE EJ, BATZDORF U, OSBORN JS, STUART PR. Sub-surface structures in normal and malignant cells. *Nature* 1970; **227**: 397–398.
- [2] ARMSTRONG PB. The control of cell motility during embryogenesis. *Canc Met Rev* 1985; **4**: 59–80.
- [3] BENTLEY D, KESHISHIAN H. Pathfinding by peripheral pioneer neurons in grasshoppers. *Science* 1982; **218**: 1082–1088.
- [4] BRITLAND S, CLARK P, CONOLLY P, MOORES G. Micropatterned substratum adhesiveness: A model for morphogenetic cues controlling cell behavior. *Exp Cell Res* 1992; **198**: 124–129.
- [5] BRUNETTE DM. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 1986; **164**: 11–26.
- [6] BRUNETTE DM. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp Cell Res* 1986; **167**: 203–217.
- [7] CARTER SB. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature* 1967; **213**: 256–260.
- [8] CHIQUET M, EPPENBERGER HM, TURNER DC. Muscle morphogenesis: Evidence for an organizing function of exogenous fibronectin. *Dev Biol* 1981; **88**: 220–235.
- [9] CLARK P, CONNOLLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues. *Development* 1987; **99**: 439–448.
- [10] CLARK P, CONNOLLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Topographical control of cell behaviour II. Multiple Grooved substrata. *Development* 1990; **108**: 635–644.
- [11] CLARK P, CONNOLLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 73–77.
- [12] CLARK P, CONNOLLY P, MOORES GR. Cell guidance by micropatterned adhesiveness *in vitro*. *J Cell Sci* 1992; **103**: 287–292.
- [13] CURTIS ASG, VARDE M. Control of cell behaviour. Topological factors. *J Natl Canc Inst* 1964; **31**: 15–26.
- [14] DOW JAT, CLARK P, CONNOLLY P, CURTIS ASG, WILKINSON CDW. Novel methods for the guidance and monitoring of single cells and simple networks in culture. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 55–79.

- [15] DUBAND JL, THIERY JP. Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. *Dev Biol* 1982; **93**: 308–323.
- [16] DUNN GA. Mutual contact inhibition of extension of chick sensory nerve fibers in vitro. *J Comp Neurol* 1971; **143**: 491–508.
- [17] DUNN GA, HEATH JP. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp Cell Res* 1976; **101**: 1–14.
- [18] DUNN GA, EBENDAL T. Contact guidance on oriented collagen gels. *Exp Cell Res*; **111**: 475–479.
- [19] DUNN GA. Contact guidance of cultured tissue cells: a survey of potentially relevant properties of the substratum. [w] Cell Behaviour, Bellairs R, Curtis A, Dunn G (red.), Cambridge University Press 1982.
- [20] DUNN GA, BROWN AF. Alignment of fibroblasts on grooved substrates. *J Cell Sci* 1986; **83**: 313–340.
- [21] EBENDAL T. The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils in vitro. *Exp Cell Res* 1976; **98**: 159–169.
- [22] EBENDAL T. Extracellular matrix fibrils and cell contacts in the chick embryo. Possible roles in orientation of cell migration and axon extension. *Cell Tis Res* 1977; **175**: 439–458.
- [23] FISHER PE, TICKLE C. Differences in alignment of normal and transformed cells on glass fibres. *Exp Cell Res* 1981; **131**: 407–410.
- [24] FITZHARRIS TP, MARKWALD RR. Cellular migration through the cardiac jelly matrix: A stereoanalysis by highvoltage electron microscopy. *Dev Biol* 1982; **92**: 315–329.
- [25] GUSTAFSON T, WOLPERT L. Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo. Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. *Exp Cell Res* 1961; **24**: 64–79.
- [26] GUSTAFSON T, WOLPERT L. Cellular mechanisms in the morphogenesis of the sea urchin larva. Change in shape of cell sheets. *Exp Cell Res* 1962; **27**: 260–279.
- [27] GUSTAFSON T, WOLPERT L. Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo. Formation of the coelom, the mouth, and the primary pore-canal. *Exp Cell Res* 1963; **29**: 561–582.
- [28] HAESMAN J, HYNES RO, SWAN AP, THOMAS V, WYLIE CC. Primordial germ cells of *Xenopus laevis* embryos: The role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* 1981; **27**: 437–447.
- [29] HALFTER W, LIVERANI D, VIGNY M, MONARD D. Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. *Cell Tis Res* 1990; **262**: 467–481.
- [30] HAMMERBACK JA, LETOURNEAU PC. Neurite extension across regions of low substratum adhesivity: implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding. *Dev Biol* 1986; **117**: 655–662.
- [31] HARRIS AK, STOPAK D, WILD P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981; **290**: 249–251.
- [32] HARRIS A. Traction and its relation to contraction in tissue cell locomotion. [w] Cell Behaviour. Bellairs R, Curtis A, Dunn G. (red.), Cambridge University Press 1982: 109–134
- [33] HARRISON RG. The reaction of embryonic cells to solid structures. *J Exp Zool* 1914; **17**: 521–544.
- [34] HEATH JP, PEACHEY LD. Morphology of fibroblasts on collagen gels: A study using 400 keV electron microscopy and computer graphics. *Cell Mot Cytoskel* 1989; **14**: 382–392.
- [35] HOROWITZ A, DUGGAN K, BUCK C, BECKERLE MC, BURRIDGE K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin – a transmembrane linkage. *Nature* 1986; **320**: 531–533.
- [36] HYNES RO, DESTREE AT. Relationships between fibronectin (LETS protein) and actin. *Cell* 1978; **15**: 875–886.
- [37] IRELAND GW, DOPPING-HEPENTHAL PJ, JORDAN PW, O'NEILL CH. Limitation of substratum size alters cytoskeletal organization and behaviour of Swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Bio Int Rep* 1989; **13**, 1989
- [38] KAVINSKY CJ, GARBER BB. Fibronectin associated with the glial component of the embryonic brain cell cultures. *J Supramol Str* 1979, **11**: 269–281.
- [39] KLEBE RJ. Isolation of collagen dependent cell attachment factor. *Nature* 1974; **250**: 248–251.
- [40] KLEBE RJ, CALDWELL H, MILAM S. Cells transmit spatial information by orienting collagen fibers. *Matrix* 1989; **9**: 451–458.
- [41] KLEINMAN HK, McGOODWIN EB, MARTIN GR, KLEBE RJ, FIETZKE PP, WOOLEY D. Localization of the binding site for cell attachment in the $\alpha 1(I)$ chain of collagen. *J Biol Chem* 1978; **256**: 5642–5646.
- [42] KRAZANEK S, GOLDBERG S. Oriented extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina. *Dev Biol* 1981; **84**: 41–50.
- [43] LOEFBERG J, AHLFORS K, FALLSTROM C. Neural crest cell migration in relation to extracellular matrix organization in the embryonic axolotl trunk. *Dev Biol* 1980; **75**: 148–167.
- [44] MAROUDAS NG. Chemical and mechanical requirements for fibroblast adhesion. *Nature* 1973; **244**: 353–354.
- [45] MEYLE J, von RECUM AF, GIBBESH B, HUTTERMAN W, SCHLAGENHAUF U, SCHULTE W. Fibroblast shape conformation to surface micromorphology. *J App Biomat* 1991; **2**: 273–276.

- [46] MIDDLETON CA. The effect of cell-cell contact on the spreading of pigmented retina epithelial cells in culture. *Exp Cell Res* 1977; **109**: 349–359.
- [47] NEWGREEN D, THIERY JP. Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tis Res* 1980; **211**: 269–291.
- [48] OHARA PT, BUCK RC. Contact guidance in vitro. *Exp Cell Res* 1979; **121**: 235–249.
- [49] ROMAN J, LaCHANCE RM, BROEKELMANN TJ, KENNEDY CJR, WAYNER EA, CARTER WG, McDONALD JA. The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: Implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2529–2543.
- [50] SCHACHNER M, SCHOONMAKER G, HYNES RO. Cellular and subcellular localization of LETS protein in the nervous system. *Brain Res* 1978; **158**: 149–158.
- [51] SILVER J, SAPIRO J. Axonal guidance during development of the optic nerve: the role of pigmented epithelia and other extrinsic factors. *J Comp Neurol* 1981; **202**: 521–538.
- [52] STOPAK D, HARRIS AK. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction I. Tissue culture observations. *Dev Biol* 1982; **90**: 383–398.
- [53] THIERY JP, DUBAND JL, DELOUVEE A. Pathways and mechanisms of avian trunk neural crest cell migration and localization. *Dev Biol* 1982; **93**: 324–343.
- [54] TOOLE BP. Morphogenetic role of glycosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) in brain and other tissues. [w] Neuronal recognition, Baradones SH. (red.) New York: Plenum Press 1976: 275–329
- [55] TURNER DC, LAWTON J, DOLLENMEIER P, ECHRIMANN R, CHIQUET M. Guidance of myogenic cell migration by oriented deposits of fibonectin. *Dev Biol* 1983; **95**: 497–504.
- [56] WEISS P. In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J Exp Zool* 1934; **68**: 393–448.
- [57] WEISS P. Experiments on cell and axon orientation in vitro. The role of colloidal exudates in tissue organization. *J Exp Zool* 1945; **100**: 353–386.
- [58] WEISS P, TAYLOR AC. Fish scales as substratum for uniform orientation of cells in vitro. *Anat Rec* 1956; **124**: 381.
- [59] WEISS P. Cellular dynamics. [w] Biophysical Science – A Study Program. Oncley JL, Schmitt FO, Williams RC, Rosenberg MD, Bolt RH, (red.), New York, London, Sydney: John Wiley & Sons, Inc. 1958: 11–20.
- [60] WYLIE CC, HEASMAN J, SWAN AP, ANDERTON BH. Evidence for substrate guidance of primordial germ cells. *Exp Cell Res* 1979; **121**: 315–324.

WPLYW ESTRÓW FORBOLU NA RUCHY KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

PHORBOL ESTERS INFLUENCE ON ANIMAL CELL MOVEMENT

Zbigniew MADEJA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: W regulacji ruchów niemięśniowych komórek zwierzęcych kluczową rolę odgrywa proces przenoszenia informacji od receptora do systemu efektorowego komórki. Jednym z etapów tego procesu jest aktywacja kinazy białkowej C. Dokonano przeglądu danych na temat wpływu estrów forbolu będących aktywatorami kinazy białkowej C na ruchy komórek zwierzęcych.

Słowa kluczowe: estry forbolu, kinaza białkowa C, ruchy komórek.

Summary: Crucial event in the regulation of non-muscle cell motility is transduction of various extracellular signals. Consequence of signal transduction is activation of protein kinase C. Phorbol esters (protein kinase C activators) influence on the non-muscle cell motility is reviewed.

Key words: phorbol esters, protein kinase C, cell motility.

I. WSTĘP

Jednym z kluczowych zagadnień w badaniach ruchów niemięśniowych komórek zwierzęcych jest mechanizm, poprzez który komórka może reagować na chemotaktyczne i chemokinetyczne sygnały pochodzące ze środowiska. Znamy obecnie wiele czynników o tego typu aktywności, od cAMP w przypadku *Dictyostelium discoideum* [38, 18], poprzez formylowane peptydy aktywujące leukocyty [14], do autokrynych czynników regulujących ruchliwość komórek nowotworowych [21, 22, 33]. Jakkolwiek dalecy jeszcze jesteśmy od pełnego zrozumienia mechanizmu działania tych czynników na ruchy komórek, to jednak w wyniku licznych badań przeprowadzonych na śluzowcu *Dictyostelium discoideum*, leukocytach i komórkach ludzkiego czerniaka [6,12,18,21,22,29,33], znamy obecnie niektóre z elementów tego procesu. Wydaje się, że przynajmniej pierwsze etapy przesyłania sygnału chemotaktycznego są zbliżone do mechanizmu dobrze poznanego w przypadku innych biologicznie aktywnych substancji, a polegającego na aktywacji poprzez kompleks ligand-receptor fosfolipazy C za pośrednictwem białek G. Ten sposób przesyłania sygnału został stosunkowo dobrze określony w wypadku licznych hormonów i neurotransmiterów [4, 16]. Wiadomo, że w

wyniku działania aktywowanej fosfolipazy C następuje hydroliza fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu. Wskutek tej reakcji dochodzi do gwałtownego wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu 1,2-diacylglicerolu, który jest aktywatorem kinazy białkowej C oraz 1,4,5-trifosfoinozytolo stymulującego wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. W rzeczywistości kinaza białkowa C jest aktywowana wspólnie przez 1,2-diacylglicerol i jony wapnia. W formie nieaktywnej kinaza białkowa C jest białkiem cytoplazmy podstawowej. Wzrost stężenia jonów wapnia powoduje jej związanie z wewnątrzkomórkową częścią błony komórkowej, gdzie może być aktywowana przez 1,2-diacylglicerol. Aktywowana kinaza białkowa C może wpływać na szereg enzymów i struktur komórkowych mających związek z aparatem ruchowym komórki. Z tego też względu wykonano wiele badań zmierzających do wyjaśnienia, czy kinaza białkowa C jest rzeczywiście zaangażowana w regulację aktywności ruchowej komórek zwierzęcych.

II. ROLA ESTRÓW FORBOLU W BADANIACH MECHANIZMÓW RUCHÓW KOMÓREK

Wielkim ułatwieniem w badaniach dotyczących funkcji kinazy białkowej C stało się odkrycie stwierdzające, że niektóre z substancji określanych mianem czynników promocji nowotworów są silnymi i specyficznymi aktywatorami tej kinazy białkowej. Początki tych badań sięgają lat trzydziestych i czterdziestych, kiedy to stwierdzono, że olejek krotonowy izolowany z *Croton tiglium* może być czynnikiem promocji nowotworów [3 cyt. za 7]. Jednak dopiero w latach sześćdziesiątych okazało się, że głównym składnikiem olejku krotonowego odpowiedzialnym za jego właściwości tumorogenne są estry forbolu [13, 37 cyt. za 7]. Najaktywniejszym z tej grupy estrów okazał się 12-myristoilo-13-acetyloforbol (PMA), znany również pod nazwą octan-12-O-tetradekanoylforbolu (TPA). Związek ten stał się szybko powszechnie stosowanym narzędziem w badaniach funkcji kinazy białkowej C w procesie przenoszenia informacji od receptora do systemu efektorowego komórki. Należy jednak pamiętać, że indukowana estrami forbolu aktywacja kinazy białkowej C znacznie różni się od stymulacji fizjologicznej. Przede wszystkim w wyniku działania estrów forbolu następuje aktywacja tylko jednego elementu całego systemu przenoszenia sygnału. Ponadto bezpośrednia aktywacja kinazy białkowej C uniezależnia ją od mechanizmów regulujących wcześniejsze etapy procesu przesyłania sygnału (np. regulacja powinowactwa ligand-receptor, ilości receptorów na powierzchni komórki itp.). Inną postulowaną różnicą jest możliwość zmiany środowiska lipidowego i białkowego w otoczeniu enzymu w wyniku zwiększenia przez TPA płynności błony komórkowej [7] oraz możliwość innej lokalizacji enzymu ze względu na zdolność wbudowywania się TPA do wszystkich błon występujących w komórce [36].

III. ZRÓŻNICOWANY WPŁYW ESTRÓW FORBOLU NA RUCHY KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Badania wpływu estrów forbolu na ruchy komórek dostarczyły wyników trudnych do interpretacji, a niekiedy wzajemnie ze sobą sprzecznych. Dodatkowym utrudnieniem przy

porównywaniu rezultatów badań pochodzących z różnych pracowni jest rozmaita metodyka pomiarów prowadząca do uzyskiwania nieporównywalnych wyników (zagadnienia te są szerzej omówione w artykule W. Korohody). Niewątpliwym pozostaje jednak fakt, że estry forbolu wpływają na szeroko rozumianą aktywność ruchową komórek. W licznych badaniach wpływu TPA na rozmaite komórki wykazano, że estry forbolu modyfikują aktywność ruchową: fibroblastów [1,10,35], leukocytów [27], limfocytów [20,25,26], komórek endotelialnych [8,28], komórek glejaka [17], włókniako-mięsaka [10] i rakomięsaka Walkera [40]. Wydaje się, że sposób, w jaki estry forbolu wpływają na aktywność ruchową komórek, zależy od rodzaju badanych komórek, od warunków, w jakich dane doświadczenia były przeprowadzone, i od aktualnego stanu fizjologicznego komórki.

Przy interpretacji wyników badań dotyczących działania estrów forbolu na aktywność ruchową komórek należy brać pod uwagę różny wpływ tych związków na aktywność kinazy białkowej C w zależności od czasu oddziaływania bodźca. O ile początkowym efektem działania TPA jest wzrost aktywności kinazy białkowej C, to wydłużona inkubacja komórek w obecności estrów forbolu powoduje spadek jej aktywności w wyniku procesu *down regulation*. W wypadku fibroblastów i komórek włókniako-mięsaka obniżenie poziomu kinazy białkowej C następuje już po 5-godzinnej inkubacji komórek w obecności 200 nM TPA, a po 24 godzinach jej ilość w homogenacie spada poniżej progu czułości stosowanej metody [10].

Ilustracją takiego wpływu TPA na aktywność ruchową komórek mogą być wyniki dwóch niezależnych zespołów badających wpływ estrów forbolu na ruchy fibroblastów. Adelman-Grill i wsp. [1] badali używając komórki Boydena wpływ trwającej 48 godzin inkubacji fibroblastów ludzkich z 200 nM TPA na ich zdolność do chemotaksji indukowanej działaniem PDGF, EGF i medium uwarunkowanego fibroblastów. Okazało się, że w tym układzie zdolność fibroblastów do wywołanej badanymi czynnikami chemotaksji została wyraźnie zahamowana. Wynik ten interpretowano jako rezultat obniżenia poziomu kinazy białkowej C pod wpływem długotrwałego działania TPA. Dodatkowym argumentem przemawiającym za takim rozumowaniem był fakt, że uważane za dosyć specyficzne inhibitory kinazy C: staurosporyna, sfingozyna i inhibitor H-7 wywoływały identyczny efekt, tzn. zahamowanie chemotaksji. Należy jednak podkreślić, że stosowana metoda pozwalała jedynie na pomiar liczby komórek reagujących na bodźce chemotaktyczne, natomiast niewiele mówiła o rzeczywistej aktywności ruchowej komórek podczas doświadczenia.

Thurston i wsp. [35] badali za pomocą specjalnie zaprojektowanego komputerowego systemu analizy ruchu komórek wpływ TPA na prędkość poruszania się fibroblastów mysich NIH3T3. Okazało się, że już po ok. 1 godzinie od dodania TPA następuje wyraźny wzrost prędkości migracji komórek. Prędkość ta wzrasta do 7–8 godziny od dodania TPA, a następnie zaczyna spadać. Jednakże w badanym przedziale czasu (ok. 20 godzin) nie obniżyła się poniżej prędkości początkowej.

Przedstawione przykłady mogłyby sugerować, że istnieje prosta zależność (przynajmniej w wypadku fibroblastów) pomiędzy poziomem aktywności kinazy białkowej C a aktywnością ruchową komórek. Wzrost aktywności kinazy białkowej C powodowałby zwiększenie aktywności ruchowej komórek, natomiast obniżenie aktywności enzymu zmniejszenie prędkości ruchu komórek i/lub zaburzenia odpowiedzi komórek na bodźce chemotaktyczne. Wydaje się jednak, że zróżnicowany wpływ TPA na aktywność ruchową komórek jest bardziej skomplikowany i nie może być tłumaczony jedynie przez dwuetapowe działanie tego związku na aktywność kinazy białkowej C. Fridman i wsp. [10] badając wpływ TPA na aktywność

ruchową fibroblastów ludzkich w praktycznie identycznych warunkach jak w omawianej pracy Adelmann-Grilla i wsp. [1] otrzymali wyniki dokładnie przeciwstawne. Obserwowali, że preinkubacja fibroblastów z 200 nM TPA przez 48 godzin zwiększa ich reaktywność na sygnały chemotaktyczne. Wydaje się zatem, że sposób, w jaki kinaza białkowa C wpływa na zjawiska ruchowe komórek, musi być zależny od aktualnego stanu fizjologicznego badanych komórek (np. od fazy cyklu komórkowego) [1,26].

Interesującą interpretację wpływu estrów forbolu na aktywność ruchową komórek zaproponowali Ross i wsp. [27]. Autorzy badali, stosując metodę bezpośredniej obserwacji komórek, wpływ TPA na kształt i aktywność ruchową neutrofilii. Stwierdzono, że podczas gdy formylowane peptydy będące chemoatraktantami dla neutrofilii indukują charakterystyczne spolaryzowanie komórki docelowej, to TPA powoduje jedynie niespolaryzowane ruchy charakteryzujące się przypadkowym tworzeniem i wycofywaniem wypustek. Co ciekawsze, równoczesne działanie peptydu fNLPNTL i TPA powoduje zahamowanie indukowanej przez peptyd polaryzacji komórki. Jeżeli jednak preinkubowane z TPA neutrofile podda się odpowiednio silnemu działaniu bodźca chemotaktycznego (podając fNLPNTL za pomocą mikropipetki), to są one w stanie wytworzyć polaryzację komórki, jednakże bez wydajnej lokomocji. Autorzy obserwowali również zróżnicowany rozkład F-aktyny w komórce. W komórkach stymulowanych fNLPNTL występowała silna fluorescencja znakowanej NBD-fallacydyną F-aktyny w przedniej części komórki i słabsza w części tylnej. Natomiast w komórkach aktywowanych 10^{-9} M TPA miała miejsce równomierna akumulacja F-aktyny pod błoną komórkową. Na podstawie otrzymanych wyników autorzy zaproponowali hipotezę, że istnieją dwa, odrębnie regulowane typy ruchów neutrofilii. Ruchy spolaryzowane związane z lokomocją komórki oraz niespolaryzowane, związane jedynie ze zmianami jej kształtu. Pierwszy z nich indukowany działaniem peptydów chemotaktycznych byłby zatem związany przede wszystkim z funkcją lokomocyjną komórki, natomiast drugi, indukowany działaniem TPA, byłby związany z takimi funkcjami komórki, jak pinocytoza, fagocytoza czy egzocytoza [19,27]. Przedstawione wyniki sugerują również, że komórka może zmieniać rodzaj ruchu pod wpływem odpowiednio silnego kolejnego bodźca, np. dodania TPA do komórek stymulowanych fNLPNTL lub peptydu fNLPNTL do komórek aktywowanych TPA.

IV. MOŻLIWE MECHANIZMY WPŁYWU ESTRÓW FORBOLU NA RUCHY KOMÓREK

Mimo że wiele obserwacji wskazuje na udział kinazy białkowej C w regulacji aktywności ruchowej komórek, to w dalszym ciągu niewiele wiemy o rzeczywistym mechanizmie tego procesu. Wiadomo, że estry forbolu modyfikując aktywność kinazy białkowej C wpływają na liczne procesy, które są związane z aparatem ruchowym komórki (tab. 1).

Atrakcyjnie z punktu widzenia możliwości wyjaśnienia wpływu TPA na procesy regulacji aktywności ruchowej komórek przedstawia się fakt, iż kinaza białkowa C katalizuje reakcję fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny [23]. W komórkach mięśni gładkich i komórkach niemięśniowych enzymem regulującym interakcję aktyny z miozyną jest zależna od wapnia i kalmoduliny kinaza lekkiego łańcucha miozyny (MLCK). Enzym ten fosforyluje lekki łańcuch miozyny przeprowadzając ją w formę aktywną. Z drugiej strony ten sam łańcuch może być również fosforylowany w innym miejscu przez kinazę białkową C. Fosforylacja ta zmniejsza indukowaną działaniem MLCK aktywność ATP-azową miozyny [15,24]. Przyjęcie

takiego mechanizmu pozwalałoby na bezpośrednie powiązanie działania estrów forbolu i kinazy białkowej C z aparatem ruchowym komórki. Niestety, znaczenie fosforylacji przez kinazę białkową C lekkiego łańcucha miozyny w procesach regulowania aktywności ruchowej komórek niemięśniowych jest wciąż niewyjaśnione.

TABELA 1.

Efekt działania TPA	Literatura
1. Reorganizacja filamentów aktynowych:	
a/ Rozpad włókien napięziowych oraz organizacja F-aktyny w struktury w kształcie kropek (<i>actin dots</i>) w fibroblastach BALB/c 3T3	[32]
b/ Zmiana rozkładu F-aktyny w ludzkich neutrofilach (opis w tekście)	[27]
2. Stymulacja polimeryzacji aktyny w ludzkich neutrofilach i limfocytach	[9,20]
3. Stymulacja polimeryzacji tubuliny w spoczynkowych fibroblastach embrionów mysich	[2]
4. Fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny w:	
a/ ludzkich płytkach krwi	[23]
b/ komórkach mięśni gładkich	[15,24]
5. Indukcja rozplaszczania mysich makrofagów	[30]
6. Stymulacja pinoocytozy w ludzkich neutrofilach	[19]
7. Zmiana powinowactwa receptorów dla chemoatraktantów (opis w tekście)	[5]
8. Stymulacja antyportu Na^+/H^+ w komórkach BALB/c 3T3	[11]
9. Depolaryzacja błony komórkowej granulocytów	[34]

Zupełnie inne wytłumaczenie mechanizmu działania TPA na ruchy komórek opiera się na spostrzeżeniu, że estry forbolu działając za pośrednictwem kinazy białkowej C mogą wpływać na powinowactwo receptorów komórkowych do chemoatraktantów. Sugestie takie można oprzeć na badaniach prowadzonych na dwóch liniach komórkowych (M-27 i H-59), wywodzących się z raka płuca Lewisa [5]. Zasadniczą różnicę pomiędzy tymi liniami stanowi miejsce tworzenia przez nie przerzutów. Komórki linii M-27 kolonizują płuca, natomiast linii H-59 wątrobę. Ponadto stwierdzono, że 6-peptyd VGVAPG (część cząsteczki elastyny będąca chemoatraktantem dla monocytów) wykazuje aktywność chemotaktyczną tylko w stosunku do linii M-27. Ponieważ płuca są organem bogatym w elastynę, wydaje się, że jej degradacja, a następnie wykorzystanie produktów tej degradacji jako chemoatraktantów może ułatwić proces kolonizacji płuc przez komórki linii M-27. Interesujące jest, że inkubacja komórek linii H-59 (komórek, które nie reagują na peptyd VGVAPG) z TPA powoduje zwiększenie powinowactwa receptora do tego peptydu i w efekcie odpowiedź chemotaktyczną. Potraktowanie komórek linii M-27 inhibitorem kinazy białkowej C staurosporyną powoduje natomiast zmniejszenie powinowactwa receptora do liganda i uniemożliwia odpowiedź chemotaktyczną komórki. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że wpływ TPA na ruch komórek nie musi być koniecznie związany z działaniem kinazy białkowej C na wewnętrzny układ ruchowy, lecz może wynikać z modulacji wrażliwości komórek na bodźce zewnątrzkomórkowe.

V. PODSUMOWANIE

W artykule omówiono rolę estrów forbolu w badaniach funkcji kinazy białkowej C w regulacji ruchów komórek zwierzęcych, a także wykorzystanie takich inhibitorów kinazy

białkowej C, jak: sfingozyna, staurosporyna, H-7 [1]. Specyficzność tych inhibitorów jest jednak często kwestionowana, ponieważ hamują także kinazy białkowe zależne od cAMP i cGMP [40].

Omówione w tym artykule doświadczenia wskazują, że estry forbolu mogą być użytecznym narzędziem w badaniach mechanizmów ruchu komórki, lecz pełne wyjaśnienie sposobu ich działania wymaga dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ADELMANN-GRILL BC, WACHF, BEHR J, KRIEG T. Involvement of protein kinase C in signal transduction during fibroblast chemotaxis to platelet-derived growth factor and a fragment of fibronectin. *Eur J Cell Biol* 1989; **50**: 128–131.
- [2] BALL RL, ALBRECHT T, THOMPSON WC, JAMES O, CARNEY DH. Thrombin, epidermal growth factor, and phorbol myristate acetate stimulate tubulin polymerization in quiescent cells – a potential link to mitogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1992; **23**: 265–278.
- [3] BERENBLUM I. The co-carcinogenic actions of croton resin. *Cancer Res* 1941; **1**: 44–48.
- [4] BIRENBAUMER L, BROWN AM. G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am Rev Respir Dis* 1990; **141**: S106–S114.
- [5] BLOOD CH, ZETTER BR. Membrane-bound protein kinase C modulates receptor affinity and chemotactic responsiveness of Lewis lung carcinoma sublines to an elastin-derived peptide. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10614–10620.
- [6] BOMINAAR AA, KESEBKE F, SNAAR-JAGALSKA E, PETERS DJM, SHAAP P, VAN HAASTERT PJM. Abberant chemotaxis and differentiation in *Dictyostelium* mutant *fgdC* with a defective regulation of receptor-stimulated phosphoinositidase C. *J Cell Sci* 1991; **100**: 825–831.
- [7] CASTANGA M. Phorbol esters as signal transducers and tumor promoters. *Biol Cell* 1987; **59**: 3–14.
- [8] DAVIET I, HERBERT JM, MAFFRAND JP. Involvement of protein kinase C in the mitogenic and chemotaxis effects of basic fibroblast growth factor on bovine cerebral cortex capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 1990; **259**: 315–317.
- [9] DOWNEY GP, KIN CHAN C, GRINSTEIN S. Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of G-proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; **164**: 700–705.
- [10] FRIDMAN R, LACAL JC, REICH R, BONFIL DR, AHN C. Differential effects of phorbol ester on the in vitro invasiveness of malignant and non-malignant human fibroblast cells. *J Cell Physiol* 1990; **142**: 55–60.
- [11] GILLIES RJ, MARTINEZ R, SNEIDER JM, HOYER PB. Sphingosine inhibits phorbol 12-myristate 13-acetate-, but not serum-induced, activation of Na^+/H^+ exchange in mammalian cells. *J Cell Physiol* 1989; **139**: 125–130.
- [12] HALL AL, WARREN V, CONDEELIS J. Transduction of the chemotactic signal to the actin cytoskeleton of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 1989; **136**: 517–525.
- [13] HECKER E. Toxic, inflammatory and co-carcinogenic principles from croton oil. *Angew Chem Int Ed* 1962; **3**: 602–603.
- [14] HUANG AJ, SILVERSTEIN SC. Mechanisms of neutrophil migration across endothelium. [w] *Endothelial Cell Dysfunctions*, Simonescu N, Simonescu M (red.), New York, Plenum Press 1992: 201–231.
- [15] IKEBE M, HARTSHORNE DJ, ELZINGA M. Phosphorylation of 20.000 dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1987; **262**: 9569–9573.
- [16] JAKENS, LEACH KL, CHEEK TR. Receptor-mediated stimulation of phosphoinositide metabolism and protein kinase C. *Cancer Cells* 1990; **2**: 401–405.
- [17] JANIK P, SZANIAWSKA B, MIŁOSZEWSKA J, PIETRUSZEWSKA E, KOWALCZYK D. The role of protein kinase C in migration of rat glioma cells from spheroid cultures. *Cancer Lett*; w druku.
- [18] JONES JG, SEGALL J, CONDEELIS J. Molecular analysis of amoeboid chemotaxis: Parallel observations in amoeboid phagocytes and metastatic tumor cells. [w] *Cell Motility Factors*, Goldberg ID, (red.), Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag 1992; 1–16.
- [19] KELLER HU. Diacylglycerols and PMA are particularly effective stimulators of fluid pinocytosis in human neutrophils. *J Cell Physiol* 1990; **145**: 465–471.
- [20] KELLER HU, NIGGLI V, ZIMMERMANN A. Diacylglycerols and PMA induce actin polymerization and distinct shape changes in lymphocytes: relation to fluid pinocytosis and locomotion. *J Cell Sci* 1989; **93**: 457–465.

- [21] KOHN EC, LIOTTA LA, SCHIFFMANN E. Autocrine motility factor stimulates a three-fold increase in inositoltrisphosphate in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **166**: 757–764.
- [22] NABI IR, WATANABE H, RAZ A. Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992; **11**: 5–20.
- [23] NAKA M, NISHIKAWA M, ADELSTEIN RS, HIKADA H. Phorbol ester-induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of myosin light chains. *Nature* 1983; **306**: 490–492.
- [24] NISHIKAWA M, SELLERS JR, ADELSTEIN RS, HIDAHA H. Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by light chain kinase. *J Biol Chem* 1984; **259**: 8808–8814.
- [25] PILARA AM, SAYERS TJ. Chemotaxis of rat peripheral blood large granular lymphocytes to activators of protein kinase C. [w] *Natural Killer Cells and Host Defense*. Ades EW, Lopez C (red.) 5th Int Natural Killer Cell Workshop, Hilton Head, SC, 1988. Basel, Krager 1989: 84–87.
- [26] RATNER S. Lymphocyte migration through extracellular matrix. *Invasion Metastasis* 1992; **12**: 82–100.
- [27] ROOS FJ, ZIMMERMANN A, KELLER HU. Effect of phorbol myristate acetate and the chemotactic peptide fMLPNTL on shape and movement of human neutrophils. *J Cell Sci* 1987; **88**: 399–406.
- [28] ROSEN EM, JAKEN S, CARLEY W, LUCKETT PM, SETTER E, BHARAGAVA M, GOLDBERG ID. Regulation of motility in bovine brain endothelial cells. *J Cell Physiol* 1991; **146**: 325–335.
- [29] SHEFCYK J, YASSIN R, VOLPI M, MOLSKI TFP, NACCACHE PH, MUNOZ JJ, BECKER RL, FENSTEIN MB, SHA'AFI RI. Pertussis toxin but not cholera toxin inhibits the stimulated increase in actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils: role of the "G proteins" in stimulation response coupling. *Biochem Biophys Res Comm* 1985; **126**: 174–181.
- [30] SMITH BM, STURM RJ, CARCHMAN RA. Calcium modulation of phorbol ester-induced alterations in murine macrophage morphology. *Cancer Res* 1983; **43**: 3385–3391.
- [31] SMITH CD, COX CC, SNYDERMAN R. Receptor coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein. *Science* 1986; **232**: 97–100.
- [32] SOBUE K, FUJIO Y, KANDA K. Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 482–486.
- [33] STRACKE ML, AZNAVOORIAN SA, BECKNER ME, LIOTTA LA, SHIFFMANN LA. Cell motility, a principal requirement for metastasis. [w] *Cell Motility Factors*, ID Goldberg (red.) Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag 1992: 147–162.
- [34] SULLIVAN R, MELNICK DA, MALECH HL, MESHULAM T, SIMSON ER, LAZZARI KG, PROTO PJ, GADENNE AS, LEAVITT JL, GRIFFIN JD. The effects of phorbol myristate acetate and chemotactic peptide on transmembrane potentials and cytosolic free calcium in mature granulocytes evolve sequentially as the cells differentiate. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1274–1281.
- [35] THURSTON G, SPADINGER I, PALCIC B. Computer automation in measurement and analysis of cell motility in vitro. [w] *Cell Motility Factors*. Goldberg ID (red.) Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag 1991: 206–222.
- [36] TRAN PL, DEUGNIER MA. Intracellular localization of 12-O-3-dansylamino-TPA in C3H-10T1/2 mouse cell line. *Carcinogenesis* 1985; **6**: 434–439.
- [37] VAN DUUREN BL, ORRIS L, ARROYO E. Tumour-enhancing activity of the active principles of *Croton tiglium* L. *Nature* 1963; **200**: 1115–1116.
- [38] VARNUM B, SOLL DR. Chemoresponsiveness to cAMP and to folic acid during growth, development and dedifferentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* 1981; **18**: 151–160.
- [39] WILSON AK, POLLENZ RS, CHISCHOLM RL, DE LANEROLLE P. The role of myosin I and II in cell motility. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992; **11**: 79–91.
- [40] ZIMMERMANN A, KELLER H. Effects of staurosporine, K252a and other structurally related protein kinase inhibitors on shape and locomotion of Walker carcinosarcoma cells. *Br J Cancer* 1992; **66**: 1077–1082.

ELEKTROTAKSJE I KIERUNKOWY WZROST NEURONÓW W POLU ELEKTRYCZNYM

ELECTROTAXIS AND NEURAL CELLS' GROWTH ORIENTATION IN AN APPLIED ELECTRIC FIELD

Ewa STEPIEŃ

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego Uniwersytetu
Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie. Komórki nerwowe reagują na zewnętrzne pole elektryczne. Odpowiedź ta objawia się kierunkowym wzrostem neuronów w stronę katody oraz tworzeniem większej liczby rozgałęzień wypustek nerwowych po stronie katodoidalnej komórki. Miejscami, w których zostaje zapoczątkowana reakcja komórek nerwowych, są wierzchołki wzrostu. Reakcja naprowadzania komórek nerwowych w polu elektrycznym jest hamowana przez nieorganiczne blokery kanałów wapniowych (Co^{2+} i La^{3+}). Blokery organiczne, takie jak diltiazem i nifedipina, nie powodują zmiany odpowiedzi. Również konkanawalina A hamuje efekt naprowadzania. Jonofor wapniowy A23187 skojarzony z blokerem kanałów wapniowych (Co^{2+}) powoduje odwrotną reakcję – naprowadzanie komórek nerwowych w stronę anody. Proponuje się, że orientacja komórek nerwowych w polu elektrycznym zależy od lokalnego napływu jonów Ca^{2+} do wierzchołków wzrostu oraz od asymetrycznej dystrybucji komponentów błonowych. Nie wykluczony też jest udział cAMP w regulacji tej odpowiedzi.

Summary. Neural cells react on an applied electric field. Response can be seen as a neurons' growth towards the cathode and branching them on the cathodal side of cells. Growth cones are the places where the reaction is initiated. Inorganic calcium channels blockers (Co^{2+} , La^{3+}) inhibit this response. Concanavalin A is found to abolish this field effects as well. Organic blockers of calcium channels (as diltiazem and nifedipine) do not influence orientation response. Calcium ionophore A23187 combined with calcium channels blocker (Co^{2+}) induces reversed reaction (e.g. turning of neural cells towards the anode). It is suggested that neural cells' orientation in an applied electric field depends on local calcium influx into the growth cones and redistribution of integral membrane proteins. cAMP contribution in this response regulation is thought to be possible.

WSTĘP

W procesie rozwoju i wykształcania się układu nerwowego obserwuje się migrację neuronów, na przykład podczas przemieszczania się komórek tworzących grzebienie nerwowe do miejsc docelowych. Obok migracji komórek występuje wzrost wypustek nerwowych (neurytów) wytwarzanych w kierunku naprowadzającego je bodźca. Cechą wspólną tych dwóch typów reakcji neuronów – ukierunkowanej migracji (taksji) i ukierunkowanego wzrostu (tropizmu) – jest ich reagowanie na zewnętrzne bodźce naprowadzające. Takim bodźcem

może być gradient substancji chemicznej i wówczas zorientowana migracja określana jest jako chemotaksja, natomiast kiedy czynnikiem tym jest gradient adhezyności, używa się terminu haptotaksja. Ukierunkowana migracja w odpowiedzi na gradient potencjału elektrycznego nazywana jest elektrotaksją. Chemotaksja komórek nerwowych jest słabo poznana, ale istnieją dane wskazujące, że komórki nerwowe *in vitro* reagują na gradient nerwowego czynnika wzrostu (NGF) [17]. Neurony są też dogodnym materiałem do obserwacji zjawiska naprowadzania przez kontakt, opisanego w artykule Czyża w tym zeszycie [5].

W ostatnich latach opublikowano wiele nowych doniesień poświęconych reakcji komórek nerwowych na zewnętrzne pole elektryczne. Ich omówieniu poświęcony jest ten artykuł.

ODPOWIEDŹ KOMÓREK NERWOWYCH NA ZEWNĘTRZNE POLE ELEKTRYCZNE

W ciągu ostatnich piętnastu lat opisano reakcję wielu typów komórek na zewnętrzne pole elektryczne. Wyznaczono dla nich wartość progową reakcji, opisano rodzaj tej odpowiedzi oraz scharakteryzowano zjawiska jej towarzyszące, takie jak: zmiana kształtu komórki, przepływ jonów, zmiany powierzchni błony komórkowej i elektroforeza białek powierzchniowych oraz reorganizacja cytoszkieletu.

Reakcja komórek na zewnętrzne pole elektryczne objawia się w dwojaki sposób:

1. Komórki wykazują ukierunkowany wzrost w polu elektrycznym, nazywany dalej elektrotropizmem.
2. Komórki przejawiają zdolności taktyczne – migrują wzdłuż linii sił pola elektrycznego i taka reakcja nosi miano elektrotaksji.

Kierunkowy wzrost, względnie kierunkowa migracja w zewnętrznym polu elektrycznym jest reakcją wykazywaną przez wiele typów komórek [29]. Komórki, takie jak fibroblasty, mioblasty, keratynocyty lub komórki pochodzące z grzebieni nerwowych, które poddano działaniu pola o natężeniu od 1 do 10 V/cm, ustawiają się swoją najdłuższą osią prostopadłe do linii sił pola, natomiast oś kierunku ich migracji jest równoległa do linii sił pola. Temu ustawieniu towarzyszą charakterystyczne zmiany kształtu: rozciągnięcie wzdłuż osi prostopadłej do linii sił pola, zaobserwowane w fibroblastach [30, 31], mioblastach [10, 25, 26], epitelocytach [19], komórkach grzebieni nerwowych [3, 8] i keratynocytach [4]; oraz wytworzenie lamellipodiów w kierunku migracji – zwykle w stronę katody (bieguna ujemnego) zaobserwowane w keratynocytach [4], fibroblastach [9, 30] i epitelocytach [19]. Neurony wytwarzają więcej neurytów od strony katody niż od strony anody [10, 13, 22, 33] i neuryty te są bardziej rozgałęzione [23, 33].

Wiele typów komórek przejawia również zdolności elektrotaktyczne [15, 29]. Migrują one zazwyczaj w kierunku elektrody ujemnej (katody). Prędkość migracji jest różna dla różnych typów komórek. Dla przykładu prędkość migracji keratynocytów wynosi 10–30 $\mu\text{m}/\text{min}$ [4], a dla porównania średnia prędkość migracji fibroblastów wynosi od 0,8 do 0,9 $\mu\text{m}/\text{min}$ [30], komórek grzebieni nerwowych zaś 7 $\mu\text{m}/\text{min}$ [8].

Wartości progu pobudliwości komórek są zbliżone i zawarte są w przedziale od 0,5 do 5 V/cm natężenia pola elektrycznego, co w przeliczeniu na średnicę komórki wynosi od 0,2 do 5 mV [29]. Komórki pochodzące z grzebieni nerwowych przepiórki wykazują ukierunkowaną migrację już przy natężeniu pola 0,07 V/cm, a w przeliczeniu na średnicę komórki różnica

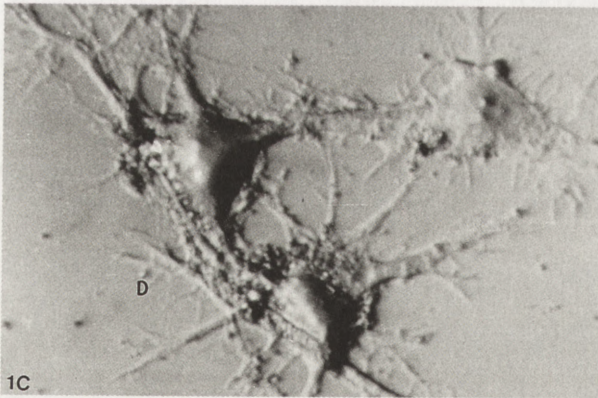
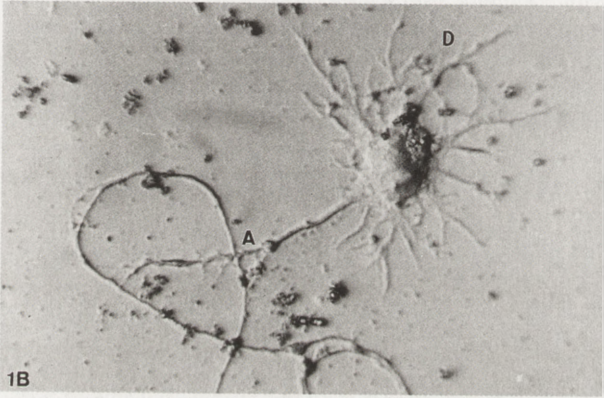
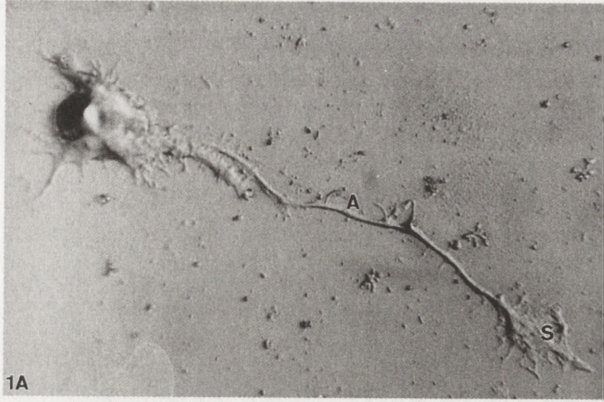
potencjału wynosi 0,4 mV i mieści się w przedziale wartości średniej [8]. Równie niski (0,07 V/cm) próg pobudliwości zaobserwowali Hinkle i in. [10] badając ukierunkowany wzrost neuronów *Xenopus*, co daje 0,35 mV w przeliczeniu na średnicę wierzchołka neurytu równą 50 μm . Wyniki uzyskane w doświadczeniach prowadzonych *in vitro* wykazują, że komórki są wrażliwe na natężenia pola elektrycznego obserwowanego *in vivo* w tkankach zwierzęcych. W swoich przeglądowych artykułach dotyczących występowania endogennego pola elektrycznego w rozwoju embrionalnym Jaffe [12] i Nuccitelli [12, 28, 29] przedstawili przykłady świadczące o tym, że gradient potencjału elektrycznego mierzony w tkankach zwierząt wynosi od 0,01 do 2 V/cm, a więc osiąga takie wartości, że może oddziaływać na komórki *in vivo*.

Czas wystąpienia reakcji taktycznej może wynosić, w przypadku keratynocytów kilka minut [4], w przypadku zaś komórek nerwowych kilkanaście minut [13, 33, 34]. Fibroblasty reagują na pole o wysokim natężeniu (6 V/cm) niemal natychmiast, natomiast dla progowej wartości natężenia pola czas reakcji wydłuża się do 90 min [30]. Stwierdzono również, że komórki nie przyzwyczajają się do pola elektrycznego i po zmianie biegunowości pola następuje odwrócenie kierunku migracji [4, 13].

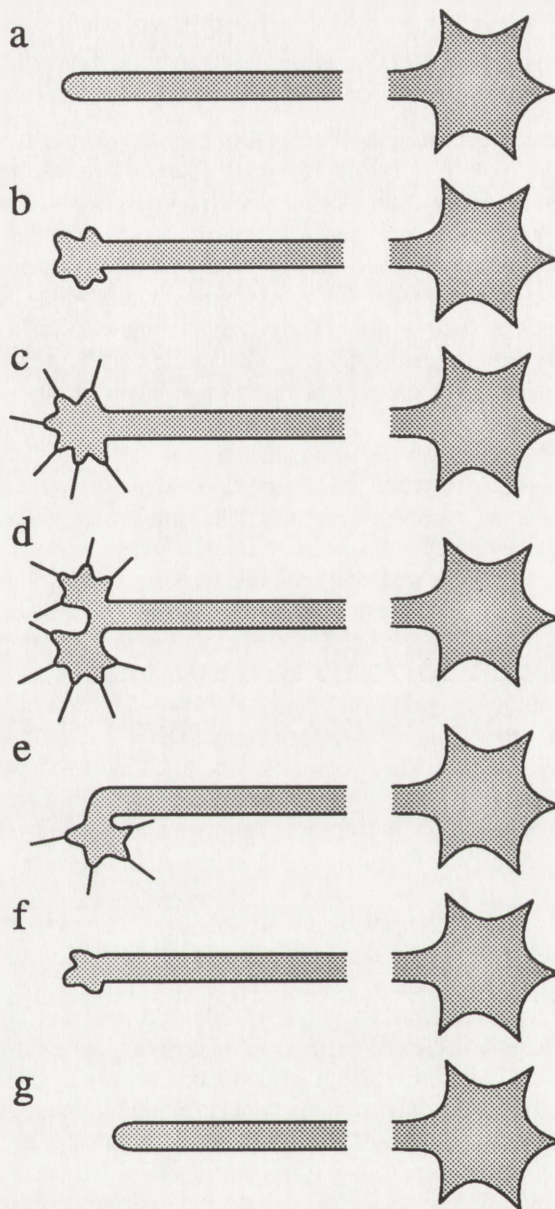
Jedne z pierwszych doświadczeń nad wpływem zewnętrznego pola elektrycznego na komórki nerwowe *in vitro* wykonano wykorzystując wyizolowane eksplanty nerwów [13, 20]. Opisanie reakcji pojedynczych neuronów było więc niemożliwe, gdyż eksplant tworzy populacja zróżnicowanych morfologicznie i funkcjonalnie komórek będących ze sobą w ścisłym kontakcie. Opisywany wówczas ruch i kierunkowy wzrost eksplantu odnosił się do populacji zarówno neuronów, jak i komórek neurogleju.

Zastosowanie pierwotnych hodowli neuronalnych do badania efektu pola elektrycznego *in vitro* pozwala na szczegółowe śledzenie reakcji poszczególnych komórek nerwowych, wykorzystanie ilościowych metod analizy ruchu i kształtu komórek. Pozwala również prześledzić zjawiska zachodzące we wnętrzu pojedynczej komórki. Załączone fotografie (fot. 1A, 1B, 1C) przedstawiają komórki nerwowe wielobiegunowe (z jednym aksonem i wieloma dendrytami), które stanowią większość w ośrodkowym układzie nerwowym. Długie wypustki aksonalne (A) wyraźnie odróżniają się od krótkich wypustek dendrytycznych (D). To morfologiczne kryterium zastosowane do wyróżnienia poszczególnych części neuronu zgodne jest z polaryzacją funkcjonalną komórki. Krótsze wypustki (dendryty) zbierają impulsy nerwowe i przewodzą je do ciała komórki, a za pośrednictwem długich aksonów impulsy są przekazywane do sąsiednich komórek.

Wierzchołki wzrostu (*growth cones*) są aktywnymi ruchowo końcami wydłużających się aksonów i dendrytów. Ich migracja, wzrost i rozgałęzianie warunkuje szereg zjawisk związanych z dojrzwaniem układu nerwowego, takich jak tworzenie się synaps, rozgałęzień dendrytycznych, odnajdywanie ścieżek migracji. Wierzchołki wzrostu neurytów są też tym miejscem, gdzie zostaje zapoczątkowana reakcja komórek nerwowych na pole elektryczne [10, 33]. Zmiany potencjału transmembranowego wywołane przez wysokie zewnętrzne stężenie jonów potasowych [37] lub przez niektóre neurotransmitery [2] również zmieniają morfologię wierzchołków. Proces formowania się wierzchołków wzrostu oraz ich morfologię przedstawia schematycznie rysunek 1.



Fot. 1 (A, B, C) Komórki nerwowe z mózgu ośmiodziowego zarodka kurczątka w hodowli *in vitro*; wyraźnie zaznaczone są wypustki aksonalne (A) i dendrytyczne (D) komórek oraz wierzchołek wzrostu (S); komórki utrwalono aldehydem glutarowym, zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu metalurgicznego do obserwacji powierzchni, stosując oświetlenie boczne za pomocą światłowodu (zdjęcia własne autora)



Rys. 1. Morfologia wierzchołków wzrostu komórek nerwowych: (a) neuryt tępo zakończony, bez lamellipodiów, (b) rozrost i formowanie się wierzchołka w lamellipodium, (c) najczęściej występująca forma wierzchołka wzrostu z licznymi filopodiami, (d) rozgałęzianie i skręcanie wierzchołka (e), oba zjawiska mogą zachodzić spontanicznie lub wywołane są przez bodźce, np. przez pole elektryczne, (f) zatrzymanie wzrostu wierzchołka, (g) wycofanie (retrakcja) wierzchołka (wg [11] zmodyfikowane)

DOMINUJĄCY WZROST KOMÓREK NERWOWYCH W KIERUNKU KATODY (ELEKTROTROPIZM)

Już w latach czterdziestych Marsh i Beams [20] zaobserwowali, że wyizolowane nerwy reagują na zewnętrzne pole elektryczne. Stwierdzili oni wówczas, że po kilkugodzinnej ekspozycji eksplantów nerwów z zarodka kurczenia na pole elektryczne, wypustki komórek nerwowych zmieniały kierunek wzrostu i orientowały się w stronę katody. Temu ukierunkowanemu wzrostowi towarzyszył ruch całego eksplantu w stronę anody. Przeprowadzone ponad 30 lat później doświadczenia Jaffego [13] potwierdziły te obserwacje. Komórki nerwowe *in vitro* umieszczone w polu elektrycznym o niewielkim natężeniu (0,7 V/cm) wykazywały asymetryczny wzrost. Neuryty wydłużały się szybciej w kierunku katody, co po ośmiogodzinnym działaniu pola dało się zaobserwować jako znaczny rozrost eksplantów w stronę elektrody ujemnej.

Wiele przeprowadzonych wcześniej doświadczeń nad elektrotaksjami komórek kończyło się niepowodzeniem, gdyż stosowano metaliczne elektrody, które w bezpośrednim kontakcie z medium hodowlanym wytwarzały szkodliwe dla komórek produkty elektrodowe [15]. Dopiero zastosowanie odpowiednich komór, w których komory zawierające elektrody chlorosrebrne łączyły się ze środowiskiem komórek za pośrednictwem długich na kilka centymetrów mostków agarowych, pozwoliło wyeliminować szkodliwy efekt produktów elektrodowych.

Przepływ medium z prędkością 10–20 $\mu\text{m/s}$ przez komory, który pozwala uniknąć tworzenia się gradientu stężeń jonów w stałym polu elektrycznym, nie zmienia charakterystycznej orientacji komórek nerwowych w polu elektrycznym [33].

Komórki nerwowe naprowadzane polem elektrycznym nie tracą swojej wrażliwości na bodziec. Po zmianie biegunowości pola w przeciagu 1 godziny obserwuje się odwróconą orientację komórek – neuryty wydłużają się w kierunku nowej katody [13, 33]. Sugeruje to, że zewnętrzne pole elektryczne nie powoduje trwałej zmiany polaryzacji wzrostu komórek nerwowych *in vitro*.

Kierunkowy wzrost komórek nerwowych nie ustaje nawet wówczas, gdy ekspozycja na zewnętrzne pole elektryczne przedłuża się do kilku, a nawet kilkunastu godzin [13, 33]. Wzrost lepkości środowiska do 3000 puazów [13] nie hamuje reakcji neuronów na pole elektryczne.

Jak wynika z doświadczeń Patela i Poo [34], komórki nerwowe reagują kierunkowym wzrostem w stronę katody również na impulsowe (nieciągłe) pole elektryczne. Wydłużanie i orientacja neurytów w impulsowym polu są podobne do opisanych reakcji na stałe pole elektryczne i uzależnione są od czasu trwania impulsu, amplitudy oraz częstotliwości impulsów. Minimalną amplitudą jest 2,5 V/cm dla długości impulsu 5 ms i częstotliwości 10 impulsów na sekundę. Obserwacja ta jest o tyle ciekawa, że w żywym organizmie endogenne pole elektryczne wytwarzane w tkankach, a związane z różnicą potencjałów ma charakter nieciągły.

Innym efektem związanym z kierunkowym wzrostem neuronów w polu elektrycznym jest tworzenie rozgałęzień (*branching*) oraz skręcanie (*turning*) w stronę katody neurytów, które przed zastosowaniem zewnętrznego pola elektrycznego obierały przypadkowe kierunki wzrostu [33]. Pole elektryczne indukuje pojawianie się większej liczby rozgałęzień neurytów. McCaig zaobserwował [23], że ok. 50% neuronów *Xenopus laevis* w polu elektrycznym

tworzy rozgałęzienia, przy czym większość z nich pojawia się po katodальной stronie komórki. Po tej stronie zostaje również wytworzonych więcej wypustek przez neurony [33].

Również polaryzacja funkcjonalna i morfologiczna komórek nerwowych zaznacza się w ich reakcji na pole elektryczne. Davenport i McCaig [7] zaobserwowali, że inaczej reagują wierzchołki dendrytów, a inaczej aksonów w komórkach piramidalnych hipokampu szczurów. Wierzchołki wzrostu dendrytów reagują na stymulację wydłużeniem filopodiów po stronie katody i powiększeniem się pola lamellipodium, natomiast wierzchołki wzrostu aksonów nie wykazują ukierunkowanej odpowiedzi.

MIGRACJA KOMÓREK GRZEBIENI NERWOWYCH W KIERUNKU KATODY (ELEKTROTAKSJA)

Grzebienie nerwowe są przejściową strukturą, z której komórki wędrują wzdłuż charakterystycznych ścieżek do miejsc docelowych tworząc zwoje międzykręgowo i współczulne oraz różnicując się w komórki czuciowe i barwnikowe. Stąd zainteresowanie badaczy zjawiskiem naprowadzenia tych komórek. Brak jest dostatecznych dowodów rozstrzygających, czy endogenne pole elektryczne ukierunkowuje ruch tych komórek *in vivo*, jednoznaczne są jednak obserwacje reakcji komórek grzebieni nerwowych w zewnętrznym polu elektrycznym.

Komórki grzebieni nerwowych wykazują zdolności elektrotaktyczne [3, 8] oraz tendencje do ustawiania się prostopadle do kierunku linii sił pola elektrycznego. Zastosowanie techniki zdjęć poklatkowych i cyfrowej analizy obrazu pozwala na ilościowe opisanie parametrów ruchu komórek, dróg ich przemieszczania i kierunków ruchu [8]. Umożliwia również opracowanie matematycznych modeli ruchu komórek, co może być przydatne do opisu mechanizmów naprowadzania komórek i odnajdywania ścieżek migracji (*path finding*).

JONY WAPNIA REGULUJĄ WYDŁUŻANIE SIĘ NEURYTÓW

Zastosowanie fluorescencyjnego wskaźnika jonów wapniowych Fura - 2 pozwala prześledzić zmiany stężeń jonów wapniowych nie tylko w całych komórkach nerwowych, ale także w poszczególnych ich częściach, jądrze, wypustkach i wierzchołkach wzrostu. Stężenie jonów wapnia jest ponad 2 razy większe w wierzchołkach rosnących niż w nierosnących [2]. Ponadto stężenie jonów Ca^{2+} wzdłuż neurytu jest zróżnicowane, w wierzchołkach wzrostu jest większe niż w neurytach w okolicy ciała komórki [2]. Zwiększony poziom jonów wapnia wewnętrznego $[\text{Ca}^{2+}]_i$ towarzyszy nie tylko procesom wzrostu i wydłużania się wierzchołków, ale także procesom zahamowania wzrostu. Ten napływ jonów wapnia do komórki nerwowej może być wywołany przez generowanie potencjału czynnościowego lub występować pod wpływem działania niektórych neurotransmiterów [2, 14].

Zmiany stężenia wapnia wewnętrznego $[\text{Ca}^{2+}]_i$ są ponadto związane z pojawianiem się i wydłużaniem filopodiów na wierzchołkach wzrostu [37]. Po stymulacji neuronu mikroelektrodą ujemną następuje lokalny napływ jonów Ca^{2+} do wierzchołków. Wytworzony w ten sposób gradient jonów Ca^{2+} utrzymuje się przez ok. 10 min, a towarzyszy mu pojawienie się nowych filopodiów na wierzchołkach wzrostu i wydłużenie się już istniejących [6]. Filopodia

zaczynają się wydłużać już 5 min po stymulacji, a po 25 min długość ich zwiększa się prawie dwukrotnie. Napływ jonów Ca^{2+} do komórek nerwowych wywołany użyciem jonoforu wapniowego A23187 powoduje destabilizację filamentów aktynowych w wierzchołkach wzrostu neurytów [22]. Postuluje się, że zmiany poziomu jonów wapnia w wierzchołkach neurytów mogą być konieczne do wywołania zmian w ruchliwości komórek nerwowych.

SUGESTIE DOTYCZĄCE MECHANIZMU ODDZIAŁYWANIA POLA ELEKTRYCZNEGO NA KOMÓRKI NERWOWE

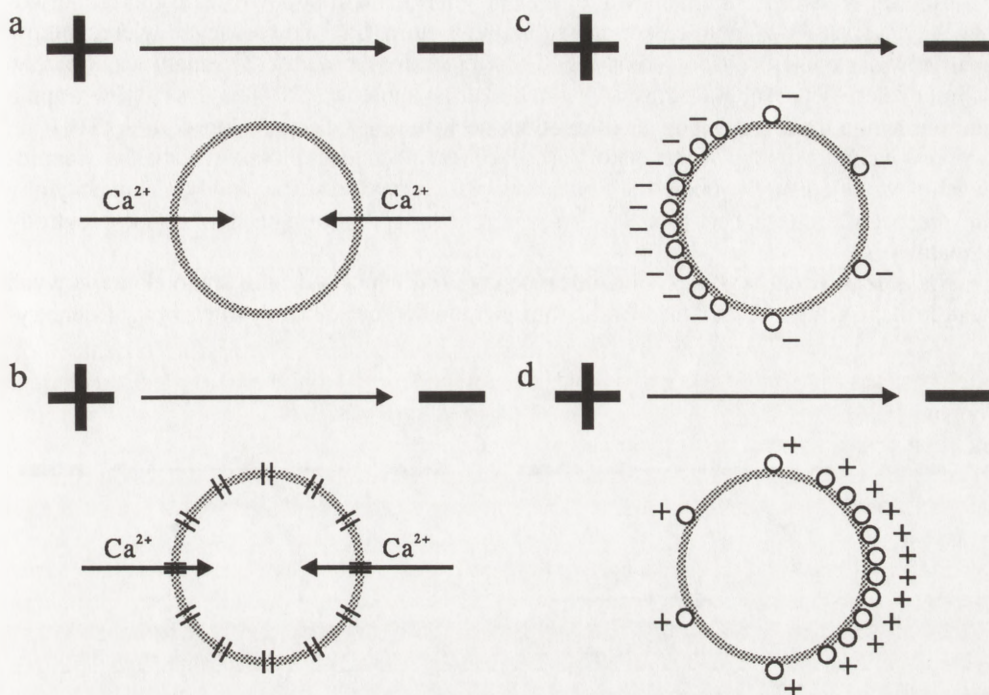
Jednym z proponowanych wyjaśnień, w jaki sposób komórki reagują na tak małe pole elektryczne, rzędu 0,1 mV w przeliczeniu na ich średnicę, jest odpowiedź komórek na gradient potencjału elektrycznego, jaki tworzy się w poprzek komórki [3, 38]. Gradient ten powoduje różnicę w swobodnym przepływie jonów wapnia po stronie anodalnej i katodalnej komórki (rys. 2 A). Opierając się na wynikach doświadczeń dotyczących przepływu jonów Ca^{2+} w zygocie glonu *Pelvetia* Chen i Jaffe [1] zaproponowali, że napływ jonów Ca^{2+} do komórki odbywa się przez niezależne od potencjału membranowego kanały wapniowe. Wówczas strona anodalna komórki ulega hyperpolaryzacji, cytoplazma staje się bardziej ujemna i wewnętrzne siły wymuszające napływ jonów Ca^{2+} do komórki od strony anody rosną, a od strony katody maleją. Zjawisko to zaobserwowano w niewielu wypadkach, m.in. u *Fucus* – glonu, którego zygota podczas rozwoju w polu elektrycznym wytwarza rhyzoid w stronę anody [35].

Robinson [38] sugerował, że napływ jonów Ca^{2+} odbywa się przez zależne od potencjału membranowego kanały wapniowe, które otwierają się po zdepolaryzowanej stronie komórki (stronie katody). Zwiększony napływ jonów Ca^{2+} (rys. 2 B) powodowałby dalszą depolaryzację i wzmocnienie tego efektu.

Alternatywnym mechanizmem tłumaczącym oddziaływanie pola elektrycznego jest asymetryczne rozmieszczenie białek błonowych powodowane ich lateralną elektroforezą w zewnętrznym polu elektrycznym. W 1977 r. Jaffe [11] przedstawił obliczenia wskazujące, że zewnętrzne pole elektryczne może wywołać redystrybucję naładowanych komponentów na powierzchni błony komórkowej. Już spadek napięcia rzędu 0,1 mV na komórkę wywołuje asymetryczny rozkład białek równy 0,1 współczynnika asymetrii, gdy przyjmie się realne wartości współczynników dyfuzji i ruchliwości elektroforetycznej białek w błonach lipidowych (rys. 2 C i D). Jeżeli tymi białkami byłyby białka budujące kanały jonowe, prowadziłyby to do asymetrycznego napływu jonów do komórki.

W komórkach mięśniowych umieszczonych w zewnętrznym polu elektrycznym obserwuje się redystrybucję białek błonowych, takich jak receptory konkanawaliny A i acetylocholinyl [32, 36]. Receptory te gromadzą się po katodalnej stronie komórki. Rezultat ten zaskakuje, gdyż większość glikoprotein obdarzonych jest ładunkiem ujemnym w fizjologicznym pH. Stwierdzono jednak, że potraktowanie komórek neuramidazą, która usuwa kwasy sjałowe z białek i zmienia ich ładunek elektryczny, nie zmienia orientacji mioblastów w polu elektrycznym [26] ani też elektrotropizmu komórek nerwowych [22].

Stosowanie nieorganicznych blokerów kanałów wapniowych, takich jak jony Co^{2+} i La^{3+} , hamuje prostopadłe ustawianie się mioblastów w stosunku do linii sił pola elektrycznego [25, 26]. Znosi też efekt naprowadzania i elektrotaksji komórek nerwowych [22] i keratynocytów

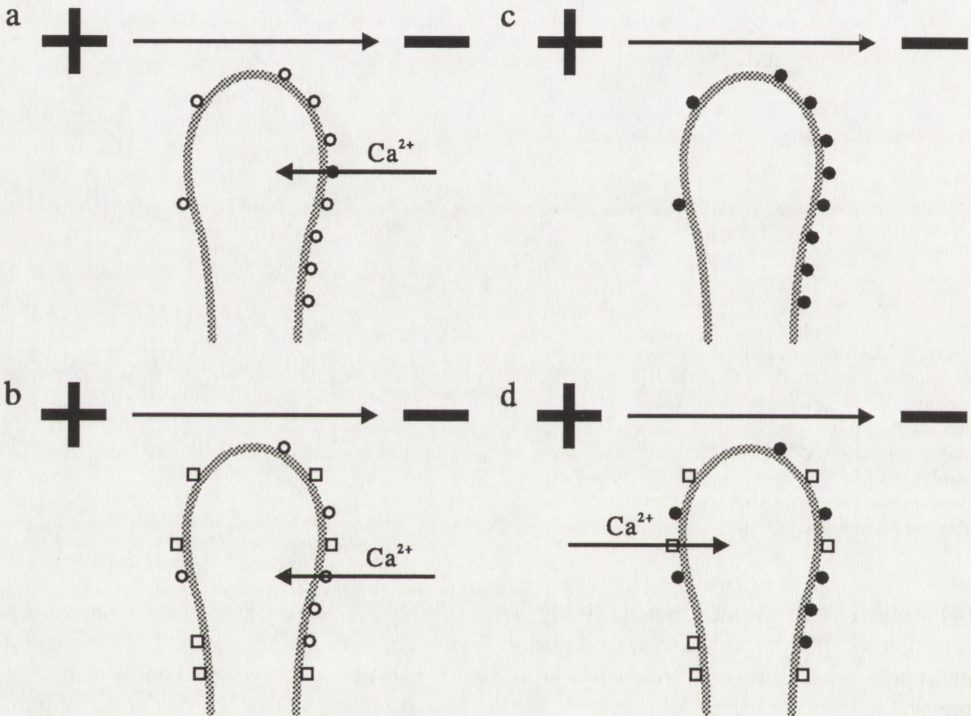


Rys. 2. Mechanizm oddziaływania zewnętrznego pola elektrycznego na komórki: (A) pole elektryczne powoduje powstanie gradientu potencjału elektrycznego, który jest przyczyną hyperpolaryzacji błony komórkowej po stronie anody i depolaryzacji po stronie katody, w ten sposób powstają siły wymuszające asymetryczny (większy po stronie anody) napływ jonów Ca^{2+} do komórki przez potencjałowo niezależne kanały wapniowe; (B) gdyby przyjąć, że napływ jonów Ca^{2+} do komórki odbywa się przez zależne od potencjału kanały wapniowe, wówczas zwiększony napływ zachodzi po stronie zdepolaryzowanej komórki (strona katodalna); (C i D) zewnętrzne pole elektryczne powoduje również redystrybucję naładowanych komponentów błonowych; te obdarzone ładunkiem ujemnym gromadzą się po anodalnej stronie komórki (C), natomiast komponenty naładowane dodatnio gromadzą się po katodalnej stronie (D)

[4] w polu elektrycznym. Onuma i Hui [31] badali wpływ blokerów kanałów wapniowych na migrujące w polu elektrycznym fibroblasty. Wykazali, że organiczny bloker D-600 hamuje efekt polaryzacji kształtu fibroblastów wywołany polem elektrycznym, powoduje zmniejszenie się liczby migrujących komórek z 96% do 13% oraz obniżenie się ich prędkości migracji. Podobny efekt zachodzi, choć z mniejszym nasileniem, w obecności antagonisty kalmoduliny – trifluoroperazyny. Zaobserwowali oni również, że wywołana zewnętrznym polem elektrycznym reorganizacja cytoszkieletu jest zahamowana po dodaniu blokerów kanałów wapniowych (D-600, Co^{2+}) oraz trifluoroperazyny. Takie organiczne blokery jak diltiazem i nifedipina, nie powodują zmiany odpowiedzi komórek nerwowych [22] i mioblastów [26] na zewnętrzne pole elektryczne. Również jonofor wapniowy A23187 nie wpływa na zmianę orientacji neuronów, ale skojarzony z blokerami nieorganicznymi powoduje przeciwną odpowiedź – neurony są naprowadzane w stronę anody.

McCaig w 1989 r. zaproponował następujący mechanizm odpowiedzi komórek nerwowych [22] (rys. 3). W polu elektrycznym napływ jonów Ca^{2+} do rosnących wierzchołków neurytów następuje od strony katody, gdyż od tej strony gromadzą się kanały wapniowe w wyniku lateralnej dyfuzji. Po zastosowaniu blokerów kanałów (Co^{2+}) napływ jonów wapnia nie występuje, brak też odpowiedzi komórek nerwowych. Obecność jonoforu A23187 nie wpływa na zmianę odpowiedzi, natomiast jonofor w obecności blokerów kanałów wapniowych powoduje napływ jonów Ca^{2+} od strony przeciwnej (od strony anody). Tłumaczyłoby to, dlaczego komórki nerwowe są naprowadzane w tych warunkach w stronę elektrody dodatniej.

Nie można jednak wykluczyć udziału receptorów w naprowadzaniu komórek nerwowych w polu elektrycznym. Dodatniemu elektrotropizmowi w stronę katody towarzyszy asymetry-



Rys. 3. Model wyjaśniający mechanizm oddziaływania zewnętrznego pola elektrycznego na komórki nerwowe: (A) napływ jonów Ca^{2+} do wierzchołka wzrostu w polu elektrycznym odbywa się przez kanały wapniowe (○) gromadzące się głównie po stronie katody; (B) po zablokowaniu kanałów wapniowych jonami Co^{2+} (●) napływ jonów wapniowych nie zachodzi i brak jest odpowiedzi komórek; (C) wbudowanie jonoforu wapniowego A23187 (□) nie zakłóca odpowiedzi neuronów; (D) zablokowanie kanałów przez jony Co^{2+} oraz wbudowanie jonoforu powoduje odwróconą reakcję komórek nerwowych (wg [17] zmodyfikowane)

czna dystrybucja receptorów, a zwiążanie ich z konkanawaliną A hamuje efekt naprowadzania [22, 24, 33].

Cykliczny AMP może mieć także udział w regulacji ruchliwości wierzchołków wzrostu neurytów i ich odpowiedzi na czynniki stymulujące [16]. Forskolina, która aktywuje cyklazę adenylową, przyspiesza niemal dwukrotnie wydłużanie się wierzchołków neurytów [24]. Sugeruje to współdziałanie systemów zależnych od cAMP i Ca^{2+} w odpowiedzi komórek nerwowych na czynniki naprowadzające.

PIŚMIENNICTWO

- [1] CHEN TH, JAFFE LF. Effects of membrane potential on calcium fluxes of *Pelvetia* eggs. *Planta (Berl.)* 1978; **140**: 63–67.
- [2] COHAN CS, CONNOR JA, KATER SB. Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *J Neurosci* 1987; **7**(11): 3588–3599.
- [3] COOPER MS, KELLER RE. Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 160–164.
- [4] COOPER MS, SCHLIWA M. Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1384–1399.
- [5] CZYŻ J. Zjawisko kontaktowego naprowadzania komórek. *Postępy Biologii Komórki* 1993; **20**, suplement 2: 125–133.
- [6] DAVENPORT RW, KATER SB. Local increases in intracellular calcium elicit local filopodial responses in *Helisoma* neuronal growth cones. *Neuron* 1992; **9**: 405–416.
- [7] DAVENPORT RW, McCAIG CD. Hippocampal growth cone responses to focally applied electric fields. *J Neurobiol* 1992; **24**: 89–100.
- [8] GRULER H, NUCCITELLI R. Neural crest cell galvanotaxis: new data and a novel approach to the analysis of both galvanotaxis and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; **19**: 121–133.
- [9] HAMADA SH, WITKUS R, GRIFFITH R. Cell surface changes during electromagnetic field exposure. *Exp Cell Biol* 1989; **57**: 1–10.
- [10] HINKLE L, McCAIG CD, ROBINSON KR. The direction of growth of differentiating neurons and myoblasts from embryos in an applied electric field. *J Physiol* 1981; **314**: 121–135.
- [11] JAFFE LF. Electrophoresis along cell membranes. *Nature* 1977; **265**: 600–602.
- [12] JAFFE LF, NUCCITELLI R. Electrical controls of development. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1977; **6**: 445–475.
- [13] JAFFE LF, POO M-m. Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field. *J Exp Zool* 1979; **209**: 115–128.
- [14] KATER SB, MILLS LR. Regulation of growth cone behavior by calcium. *J Neurosci* 1991; **11**(4): 891–899.
- [15] KOROHOODA W. Effect of electric field on cell movement. Tenth School of Biophysics of Membrane Transport. School Proc. Poland, May 4–13, 1990: 178–191.
- [16] LANKFORD KL, LETOURNEAU PC. Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1229–1243.
- [17] LETOURNEAU PC. Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol* 1978; **66**: 183–196.
- [18] LETOURNEAU PC, CYPHER C. Regulation of growth cone motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; **20**: 267–271.
- [19] LUTHER PW, PENG HB, LIN JJ-D. Changes in cell shape and actin distribution induced by constant electric fields. *Nature* 1983; **303**: 61–63.
- [20] MARSH G, BEAMS HW. *In vitro* control of growing chick nerve fibers by applied electric currents. *J Cell Comp Physiol* 1946; **27**: 139–157.
- [21] McCAIG CD. Nerve growth in the absence of growth cone filopodia and the effects of a small applied electric field. *J Cell Sci* 1989; **93**: 715–721.
- [22] McCAIG CD. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small applied electric field. *J Cell Sci* 1989; **93**: 723–730.

- [23] McCAIG CD. Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *J Cell Sci* 1990; **95**: 605–615.
- [24] McCAIG CD. Nerve growth in a small applied electric field and the effects of pharmacological agents on rate and orientation. *J Cell Sci* 1990; **95**: 617–622.
- [25] McCAIG CD, DOVER PJ. On the mechanism of oriented myoblast differentiation in an applied electric field. *Bio Bull* 1989; **176**(S): 140–144.
- [26] McCAIG CD, DOVER PJ. Factors influencing perpendicular elongation of embryonic frog muscle cells in a small applied electric field. *J Cell Sci* 1991; **98**: 497–506.
- [27] McCAIG CD, STEWART R. The effects of melanocortins and electrical fields on neuronal growth. *Exp Neurol* 1992; **116**: 172–179.
- [28] NUCCITELLI R. The involvement of transcellular ion currents and electric fields in pattern formation. [w] Pattern formation. A primer in developmental biology. Malacinski GM, Bryant SV, (red.) Macmillan Publishing Company 1984: 23–46.
- [29] NUCCITELLI R. Physiological electric fields can influence cell motility, growth and polarity. *Adv Cell Biol* 1988; **2**: 213–233.
- [30] NUCCITELLI R, ERICSON CA. Embryonic cell motility can be guided by physiological electric fields. *Exp Cell Res* 1983; **147**: 195–201.
- [31] ONUMA EK, HUI S-w. Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol* 1988; **106**: 2067–2075.
- [32] ORIDA N, POO M-m. Electrophoretic movement and localisation of acetylcholine receptors in the embryonic muscle cell membrane. *Nature* 1978; **275**: 31–35.
- [33] PATEL NB, POO M-m. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *J Neurosci* 1982; **2**: 483–496.
- [34] PATEL NB, POO M-m. Perturbation of the direction of neurite growth by pulsed and focal electric fields. *J Neurosci* 1984; **4**: 2939–2947.
- [35] PENG HB, JAFFE LF. Polarization of fucoid eggs by steady electrical fields. *Dev Biol* 1976; **53**: 277–284.
- [36] POO M-m, ROBINSON KR. Electrophoresis of concanavalin A receptors along embryonic muscle cell membrane. *Nature* 1977; **265**: 602–605.
- [37] REHDER V, KATER SB. Regulation of neuronal growth cone filopodia by intracellular calcium. *J Neurosci* 1992; **12**(8): 3175–3186.
- [38] ROBINSON KR. The responses of cells to electrical fields: a review. *J Cell Biol* 1985; **101**: 2023–2027.

FOTOREAKCJE U ORZEŚKÓW *BLEPHARISMA* I *STENTOR*

PHOTOREACTIONS IN *BLEPHARISMA* AND *STENTOR* CILIATES

Stanisław FABCZAK, Hanna FABCZAK

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie

Streszczenie. Orzęski *Blepharisma japonicum* i *Stentor coeruleus* unikają światła i gromadzą się w zacienionych miejscach (fotodispersja). Zjawisko to zachodzi dzięki występowaniu rewersji ruchu rzęskowego na przemian z płynięciem komórki do przodu, co w rezultacie powoduje zmianę kierunku płynięcia komórki i ucieczkę z oświetlonego obszaru (reakcja fotofobowa). Reakcji fotofobowej u obu orzęsków towarzyszy przejściowa depolaryzacja błony komórkowej (potencjał fotoreceptorowy). Potencjał ten jest zapoczątkowany przez procesy fotochemiczne zachodzące w barwniku komórki. Wielkość tej depolaryzacji rośnie wraz ze wzrostem natężenia bodźca. Potencjał receptorowy o odpowiednio wysokiej amplitudzie może wywołać błonowy potencjał czynnościowy, który przy bodźcach o wyższym natężeniu i dłuższym czasie trwania może przejść w przedłużoną depolaryzację błony. Potencjał czynnościowy i depolaryzacja skorelowane są odpowiednio z momentem wystąpienia i czasem trwania reakcji fotofobowej. Jonowy mechanizm powstawania potencjału fotoreceptorowego nie jest wyjaśniony, natomiast za potencjał czynnościowy u obu omawianych orzęsków są odpowiedzialne jony wapnia.

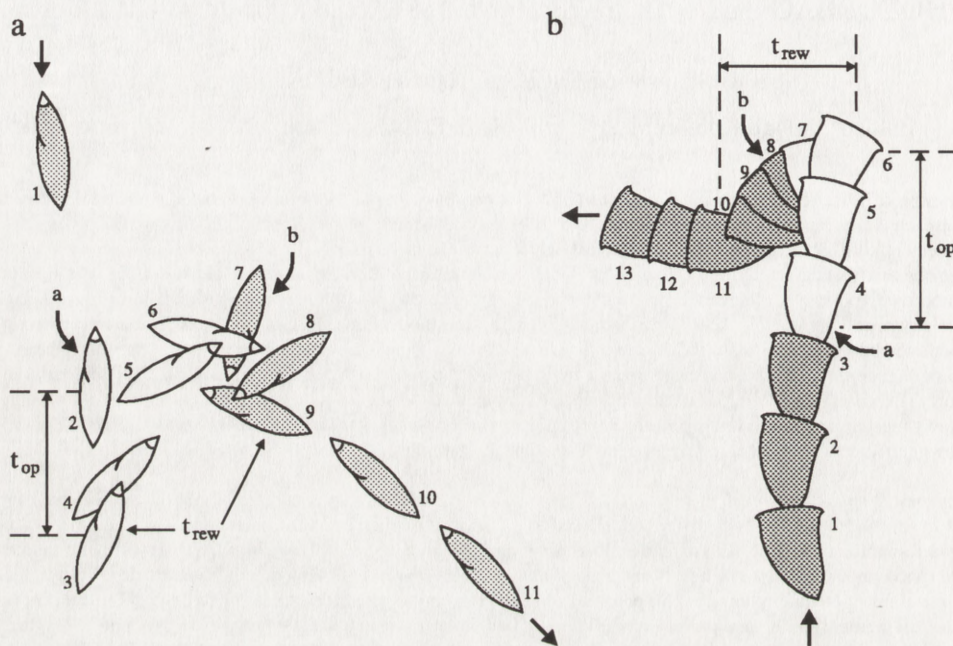
Summary. *Blepharisma japonicum* and related *Stentor coeruleus* ciliates swim away from light (photodispersal) and collect in shaded area. This behavior is attributed to the periods of ciliary reversal interspersed with the periods of forward swimming which results in reorientation of swimming direction and cell movement away from an illuminated field (photophobic reactions). Photostimulation of both *Blepharisma* and *Stentor* elicits a transient depolarization of the membrane potential (photoreceptor potential). The photoreceptor potential is a result of a photochemical process in the cell pigment and its amplitude becomes larger as light intensity is increased. When the receptor potential is high enough to excite the cell membrane, it may induce an action potential and prolonged membrane depolarization. These action potential and prolonged depolarization correspond to a moment of ciliary reversal and period of the cell backward swimming. The ionic nature of the photoreceptor potentials in both cells is not clear yet, whereas action potentials are generated mainly by influx of calcium ions.

I. FOTOREAKCJE KOMÓREK

Reakcje organizmów żywych na działanie bodźców zewnętrznych stanowią jedną z ważniejszych funkcji fizjologicznych, umożliwiających im stały kontakt ze środowiskiem zewnętrznym. Zjawisko reakcji na działanie światła wśród komórek pierwotniaczych jest znane od dosyć dawna. Jennings [18] i niezależnie Mast [23] jako pierwsi obserwowali, że orzęski *Stentor* znajdujące się w nierównomiernie oświetlonym środowisku, gromadzą się głównie w miejscach zacienionych. Później podobne zjawisko, nazywane fotodispersją,

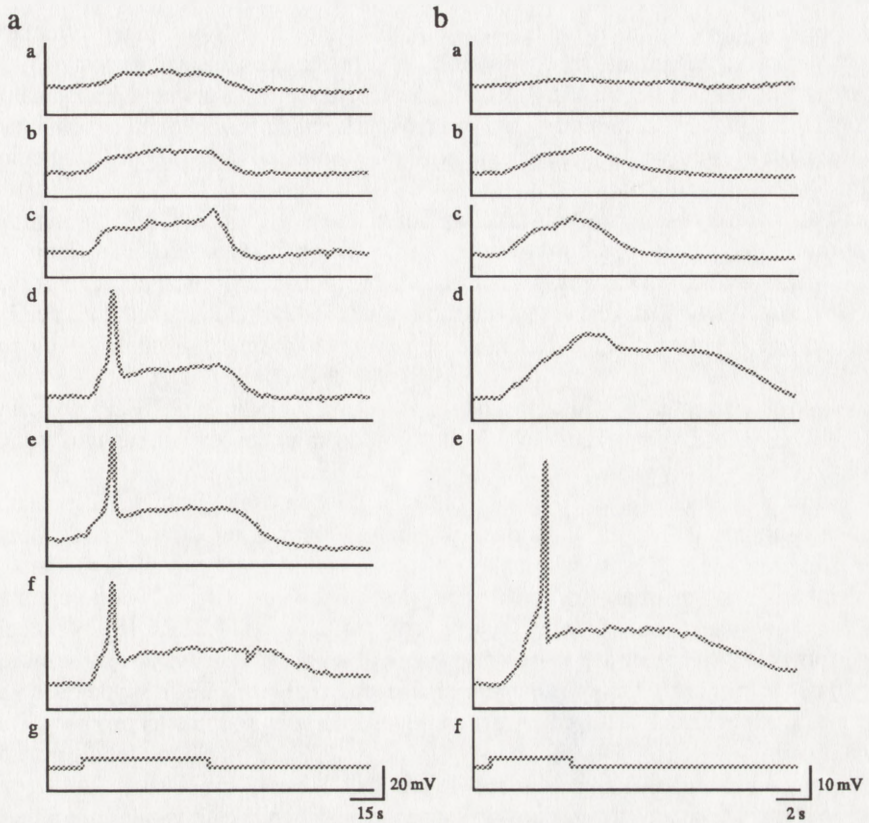
opisane zostało przez Giese [12] dla komórek *Blepharisma*. Na zjawisko fotodispersji u obu pierwotniaków składają się trzy specyficzne reakcje ruchowe, tj. reakcje fotofobowa, fototaktyczna oraz fotokinetyczna. Reakcja fotofobowa składa się, z kolei, z trzech etapów (rys. 1):

- występującego, z pewnym opóźnieniem, zatrzymania się komórki,
- plynięcia komórki przez krótki czas do tyłu (rewersja ruchu rzęskowego),
- ponownego ruchu komórki do przodu w nowym kierunku w stosunku do kierunku pierwotnego [22,25,35,43].



Rys. 1. Schematyczna ilustracja reakcji fotofobowej u orzęsków (A) *Blepharisma* i (B) *Stentor*; swobodnie poruszające się w ciemności komórki (komórki zakropkowane) poddane działaniu światła (komórki niekropkowane) przez określony czas (od strzałki a do strzałki b) reagują, z opóźnieniem (t_{op}), zatrzymaniem się, rewersją ruchu rzęskowego (t_{rew}) i ponownym, w nowym kierunku, ruchem do przodu; pozycje obu orzęsków zostały naszkicowane według oryginalnych zapisów magnetowidowych ruchu komórek w środowisku hodowlanym w temperaturze ok. 10 °C, regularne odstępy czasowe pomiędzy poszczególnymi pozycjami komórek wynoszą ok. 0,3 s

Opóźnienie reakcji fotofobowej i rewersja ruchu rzęskowego są zależne od natężenia bodźca i im wyższe jest natężenie światła, tym krótsze jest opóźnienie i przez dłuższy czas komórki poruszają się do tyłu. Rewersja ruchu rzęskowego, występująca podczas odpowiedzi fotofobowej, jest reakcją typową dla orzęsków i może być wywołana szeregiem innych bodźców. Jennings [18] nazwał ten charakterystyczny sposób zachowania się komórek "reakcją ucieczki". Przebieg reakcji fotofobowej u *Blepharisma* i *Stentor* różni się znacznie od ich odpowiedzi na działanie bodźca mechanicznego, przede wszystkim wielkością opóźnienia, z jakim występuje reakcja. U *Stentor* i *Blepharisma*, podobnie jak u orzęsków nie wykazujących zdolności do fotorecepcji, "reakcja ucieczki" wywołana bodźcem mechani-



Rys. 2. Oscyloskopowy zapis zmian potencjału błonowego (E_{blon}) u (A) *Blepharisma* i (B) *Stentor* podczas stymulacji komórek impulsami światła (I_{stim}); (A): potencjały receptorowy (a–c) i receptorowy łącznie z potencjałem czynnościowym (d–f) wywołane impulsami światła monochromatycznego (580 nm, 45 s) o następujących natężeniach (10^{18} fotonów \cdot m $^{-2}$): (a) 1,39, (b) 2,09, (c) 3,64, (d) 6,76, (e) 10,36, (f) 15,39; spoczynkowy potencjał błonowy w płynie hodowlanym: -58 mV, pH 5,8, 12°C ; (B): zmiany błonowego potencjału spoczynkowego w pojedynczej komórce *Stentor* były indukowane impulsami światła monochromatycznego (610 nm) trwającego 4 s (f) i natężeniach (10^{18} fotonów \cdot m $^{-2}$): (a) 0,32, (b) 0,72, (c) 1,04, (d) 1,75, (e) 3,23; zapisy od (a) do (b) przedstawiają odpowiedź błony w postaci tylko potencjału receptorowego; zapis w (e) – potencjał czynnościowy łącznie z potencjałem receptorowym o amplitudzie ok. 12 mV; spoczynkowy potencjał błonowy w płynie hodowlanym: -53 mV, pH 7,2, $9,2^{\circ}\text{C}$; (C) – schematyczna ilustracja przebiegu w czasie potencjału błonowego (E_{blon}) podczas stymulacji impulsem światła (I_{stim}) z zaznaczeniem opóźnienia potencjału czynnościowego (t_{op}) i czasem trwania opóźnionej depolaryzacji (t_{dep})

cznym pojawia już po kilku milisekundach od momentu zapoczątkowania tej stymulacji [27, 30, 44]. Natomiast opóźnienie reakcji fotofobowej dla komórek *Stentor* wynosi 0,1–0,2 s, a u *Blepharisma* – ok. 1 s [17,22,43]. Tak duże różnice między opóźnieniem reakcji na bodźce świetlny i mechaniczny, pomimo że końcowa reakcja komórki jest taka sama (rewersja ruchu rzęskowego), sugerują, że fototransdukcja może mieć odmienny przebieg niż mechanotransdukcja.

Reakcje fototaktyczne obserwowano, jak dotychczas, tylko w komórkach *Stentor* [36]. Komórki poruszające się w zogniskowanej wiązce światła płyną od źródła światła, wzdłuż linii jego rozchodzenia się zarówno w obszarach, gdzie wiązka jest zbieżna, jak i w tych, gdzie jest rozbieżna. Mechanizm reakcji fototaktycznej nie jest dokładnie zbadany, lecz istnieje przypuszczenie, że reakcja ta może składać się z szeregu kolejnych krótkotrwałych rewersji rzęskowych [40].

Fotokineza występuje u obu orzęsków i polega na zmianie szybkości poruszania się komórek w zależności od natężenia światła; im komórki są silniej oświetlone, tym wyższa jest średnia szybkość ich pływania [16,22,25].

W orzęskach *Blepharisma* i *Stentor* nie cała powierzchnia komórki jest jednakowo wrażliwa na działanie światła. Punktowe oświetlanie różnych rejonów komórki pozwoliło stwierdzić, że z większą łatwością reakcję fotofobową można wywołać oświetlając część frontálną komórki. Natomiast przy posuwaniu się ku tyłowi czułość na światło obniża się, a oświetlanie jej tylnego końca nie wywołuje reakcji fotofobowej [11,22,24,45]. W przeciwieństwie do powyższych obserwacji fotokineza może być wywołana z jednakowym skutkiem bez względu na to, jaka część komórki *Blepharisma* jest oświetlana [22,24]. Wydaje się więc, że procesy powstawania reakcji fotofobowej i fotokinetycznej mają odmienny przebieg. Ponadto, doświadczenia spektroskopowe dostarczyły dowodów na to, że prawdopodobnie inny fotoreceptor jest odpowiedzialny za fotokinezę w komórkach *Stentor* [16]. Analiza widma czynnościowego fotokinezy dla tych orzęsków wykazuje, że maksymalna aktywność fotokinetyczna występuje przy oświetlaniu komórek światłem o długości fali 680 nm. Występowanie reakcji fotofobowych przy tej długości fali u *Blepharisma* i *Stentor* jest znacznie zredukowane (rys. 3) [5,6].

Widmo czynnościowe reakcji fotofobowej dla komórek *Stentor*, wyznaczone z zależności częstotliwości występowania tej reakcji od natężenia bodźca dla różnych długości światła monochromatycznego, wykazuje, że komórki te są najbardziej czułe na światło czerwone, gdzie występuje obszerne maksimum przy 610 nm [35]. Podobne jest również widmo określone dla reakcji fototaktycznej u tego orzęska [36] jak i widmo absorpcyjne zawiesiny całych komórek *Stentor*, czy też preparatów wodnych zawierających wyizolowany pigment – stentorinę [21]. Dla komórek *Blepharisma* zachodzi również analogiczna korelacja, z jednej strony między charakterem widma czynnościowego reakcji fotofobowej i widma określonego dla opóźnienia rewersji ruchu rzęskowego, a z drugiej, z widmem absorpcyjnym pigmentu komórkowego – blefarisminy [13, 34]. Obserwowane więc wyraźne podobieństwa powyższych widm czynnościowych i absorpcyjnych są zgodne z hipotezą, że pigment komórkowy, blefarismina u *Blepharisma*, a stentorina w komórkach *Stentor* są komórkowymi fotoreceptorami, zapoczątkowującymi procesy, które w końcowym efekcie wywołują obserwowane w tych orzęskach fotofobowe reakcje [11,37]. Pigment komórkowy w obu pierwotniakach jest zlokalizowany w specyficznych granulach i jak stwierdzono w badaniach spektroskopowych, zawiera chromofor, będący pochodną hipercyny [11,37]. Te pigmentowe organelle mają średnicę ok. 0,3 μm i nadają komórkom *Stentor* niebieskozielony, a *Blepharisma* – różowy

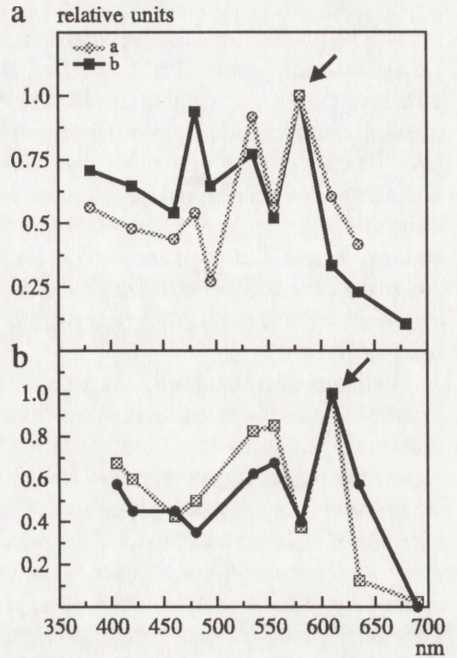
kolor. Granule znajdują się tuż pod ich pelliculą w pobliżu rzęskowych ciałek bazalnych i są rozmieszczone w całej komórce w regularnych rzędach leżących na przemian z rzędami kinet [12,14,20,28,32].

W doświadczeniach z preparatami wodnymi zawierającymi wyizolowane granule pigmentowe z obu orzęsków, zaobserwowano, że w trakcie naświetlenia barwnika następuje wyraźne zakwaszanie roztworu [26,41]. Zjawisko to związane jest z uwalnianiem jonów wodorowych do roztworu podczas fotoaktywacji pigmentu [37,39]. Pokazano także dla całych komórek, że obniżanie pH w środowisku lub wprowadzenie do środowiska protonoforów, FCCP lub TPMP, silnie hamuje fotoreakcje zarówno u *Blepharisma*, jak i u *Stentor* [8,35,36]. Powyższe dane doprowadziły do powstania hipotezy, że deprotonacja barwnika może być wstępnym krokiem w procesie komórkowej transdukcji sygnału świetlnego w tych komórkach i wywołania reakcji fotofobowej w końcowym etapie tego procesu [29,37,40].

Szereg doświadczeń z udziałem blokerów kanałów wapniowych lub wapniowych jonoforów w środowisku wskazuje na istotną rolę również jonów Ca^{2+} w procesie fototransdukcji u *Stentor* i *Blepharisma*. Inkubacja komórek w roztworach o niskim stężeniu Ca^{2+} lub zawierających verapamil, pimozyd czy diltiazem, hamuje występowanie reakcji fotofobowych w badanych orzęskach, a także reakcję fototaktyczną u *Stentor* [2,8]. Odwrotny efekt wywiera obecność w środowisku jonoforu wapniowego, A23187, lub jonomycyny [2,8,31].

II. ZMIANY ELEKTRYCZNE NA BŁONIE

Pierwsze próby badania jonowych mechanizmów reakcji fotofobowej podjęte były w komórkach *Stentor* przy wykorzystaniu wewnątrzkomórkowych mikroelektrod szklanych wprowadzonych do dużej wakuoli [43]. Doświadczenia te pozwalały na rejestrację względnych zmian elektrycznych na błonie komórki i wykazały powstawanie przejściowej depolaryzacji błony (potencjał fotoreceptorowy) podczas skokowego wzrostu natężenia światła. Odpowiednio silna stymulacja światłem mogła wywołać potencjał czynnościowy i rewersję ruchu rzęskowego. Podobne próby pomiarów elektrofizjologicznych przeprowadzono dla komórek *Blepharisma*, jednakże uzyskane wyniki nie były wystarczająco dokładne ze względu na proces szybkiego izolowania mikroelektrody od cytoplazmy oraz intensywnej wakuo-



Rys. 3. Zestawienie widm dla (a) potencjału fotorecepcyjnego, (b) występowania reakcji fotofobowej u (A) *Blepharisma* i (B) *Stentor*, strzałkami oznaczono długość fali, przy której czułość komórek na działanie światła jest największa

lizacji cytoplazmy podczas pomiarów [1]. Usiłowano później ominąć powyższe trudności z rejestracją potencjału błonowego u *Blepharisma*, określając pośrednio ten potencjał na podstawie rozkładu jonów TPP^+ (tetrafenylfosfonianu) na błonie cytoplazmatycznej [15]. TPP^+ łatwo przenika przez tę błonę i rozkład TPP^+ zachodzi zgodnie z formułą Nernsta [19]. Zmiany poziomu tego kationu w środowisku były mierzone za pomocą zewnętrznej elektrody selektywnej dla TPP^+ . Otrzymane rezultaty wskazują jednakże, że metoda ta w przypadku komórek pierwotniaczych nie jest zbyt precyzyjna. Obliczony w tej pracy potencjał spoczynkowy błony komórkowej (ok. -140 mV) u *Blepharisma* wydaje się być zbyt wysoki, a jego zmiany w czasie zbyt wolne. Potencjał błonowy, jak wynika z wcześniejszych pomiarów elektrofizjologicznych u *Blepharisma* [4], nie przekracza, w typowych warunkach doświadczalnych, wartości -60 mV, co również jest obserwowane u *Stentor* [44] i u innych orzęsków [3,27,30].

Dokładniejsze dane dotyczące zmian elektrycznych na błonie u *Stentor* i *Blepharisma* uzyskano ostatnio stosując pomiary elektrofizjologiczne w zmodyfikowanych warunkach doświadczalnych [4,44]. Rejestrację przeprowadzano za pomocą typowych mikroelektrod wewnątrzkomórkowych wprowadzonych bezpośrednio do cytoplazmy komórki znajdującej się w środowisku o obniżonej temperaturze. Adaptowane do ciemności orzęski *Blepharisma* i *Stentor* mają błonowy potencjał spoczynkowy wynoszący ok. -50 mV, generowany głównie przez jony potasu [4,8,44]. Impuls świetlny w takich komórkach wywołuje potencjał fotoreceptorowy, którego amplituda wzrasta wraz z wielkością bodźca aż do wartości nasycenia przy ok. 25 mV [5, 6, 9, 10] (rys. 2). Generacja potencjału receptorowego zachodzi zawsze z opóźnieniem w stosunku do początku impulsu. Opóźnienia w stosowanych warunkach doświadczalnych wynoszą dla *Stentor* średnio ok. $0,5$ s (10°C), a dla *Blepharisma* $-2-5$ s (12°C). Jeżeli stosowany bodziec świetlny jest wystarczająco silny, to amplituda potencjału receptorowego może przekroczyć wartość progową depolaryzacji błony komórki (próg pobudzenia błony) i wywołać potencjał czynnościowy. Szybkość narastania potencjału czynnościowego jest również zależna od siły bodźca i jego opóźnienie względem początku impulsu zmniejsza się wraz ze wzrostem intensywności tego bodźca. W przypadku krótkotrwałych impulsów świetlnych u obu komórek repolaryzacja potencjału czynnościowego jest natychmiastowa. Natomiast bodźce o wydłużonym czasie działania powodują dłuższe w czasie zmiany elektryczne na błonie komórkowej. W tym ostatnim przypadku elektryczna reakcja składa się z potencjałów receptorowego, czynnościowego, a dodatkowo ma jeszcze miejsce tzw. opóźniona depolaryzacja, której czas trwania jest także uzależniony od amplitudy i czasu trwania bodźca. Oświetlenie komórek światłem ciągłym wywołuje podobne odpowiedzi elektryczne błony, jak w przypadku dłuższych impulsów światła z tym, że amplituda opóźnionej depolaryzacji maleje w czasie mimo trwania stymulacji. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z procesem adaptacji komórki do światła ciągłego. Orzęski adaptowane do silnego światła nie generują potencjału fotoreceptorowego i tym samym brak jest reakcji fotofobowej nawet przy stymulacji komórek silnym światłem [8]. Podobne zjawisko adaptacji obserwuje się także w komórkach fotoreceptorowych kręgowców [33].

Analogicznie jak w przypadku widma czynnościowego reakcji fotofobowej widmo czynnościowe określone dla potencjału fotoreceptorowego obu komórek wykazuje, że najwyższa czułość komórki występuje przy świetle czerwonym (rys. 3). Maksymalne amplitudy potencjału receptorowego można uzyskać w komórkach *Stentor* i *Blepharisma*, stymulując je, odpowiednio, światłem monochromatycznym o długości fali 610 lub 580 nm. W podobnym

widmie czynnościowym dla *Blepharisma* występują również trzy wartości maksymalne przy 540, 580 i 600 nm [5, 6].

Analiza przebiegu reakcji fotofobowej obu komórek dokonana w identycznych warunkach jak doświadczenia elektrofizjologiczne (obniżona temperatura) wykazała, że wielkość opóźnienia potencjału czynnościowego i rewersji ruchu rzęskowego są zbliżone, należy więc przypuszczać, że moment generacji potencjału czynnościowego odpowiada początkowi reakcji fotofobowej, a koniec rewersji ruchu rzęskowego – zakończeniu opóźnionej depolaryzacji błony [5,6]. Porównanie widma czynnościowego reakcji fotofobowej z widmem czynnościowym dla reakcji elektrycznej u *Stentor* i *Blepharisma* pozwala stwierdzić, iż obserwowane zmiany w zachowaniu się ruchowym komórek w wyniku działania światła są poprzedzone, jak w przypadku i innych rodzajów stymulacji, zmianą potencjału błonowego komórki.

III. MECHANIZM JONOWY REAKCJI FOTOFOBOWEJ

Rezultaty wstępnych doświadczeń za pomocą techniki potencjostatycznej oraz jonowej substytucji wykazują, że błonowy potencjał czynnościowy określany jest u obu orzęsków głównie przez jony wapnia i nie wykazuje zależności od zmian w stężeniu jonów K^+ lub Cl^- w środowisku [8,44]. Podobne mechanizmy warunkują generację potencjału czynnościowego również u innych orzęsków pozbawionych zdolności fotorecepcyjnych [3,30]. Do tej pory nie udało się jednak wyjaśnić jonowego mechanizmu odpowiedzialnego za wytwarzanie fotoreceptorowego potencjału błonowego u tych pierwotniaków. Wiadomo jedynie, że ten potencjał, generowany przez komórki *Stentor* i *Blepharisma*, charakteryzuje się innymi właściwościami niż typowe potencjały receptorowe obserwowane u orzęsków w odpowiedzi na stymulację mechaniczną. U *Blepharisma* i *Stentor*, jak wspomniano wcześniej, czas poprzedzający generację potencjału receptorowego podczas fotorecepcji jest znacznie dłuższy niż podczas generacji potencjału mechanoreceptorowego. Pokazano również, że komórki *Stentor* stymulowane mechanicznie w warunkach ustalonego potencjału błonowego wytwarzają skierowany do komórki prąd o amplitudzie do 40 nA, podczas gdy oświetlenie komórki indukuje maksymalny prąd ok. 1 nA [45]. Tak niski prąd, w warunkach stałego potencjału, występujący podczas fotorecepcji nie może więc tłumaczyć stosunkowo dużego potencjału fotoreceptorowego. Ponadto, kierunek prądu mechanoreceptorowego w komórkach *Stentor* może być zmieniony na przeciwny przy depolaryzacji błony powyżej 20 mV, natomiast prąd fotoreceptorowy jest całkowicie niezależny od poziomu jej depolaryzacji. U *Blepharisma* również nie obserwuje się wyraźnej zależności wielkości potencjału fotoreceptorowego od zmian stężenia szeregu testowanych jonów [8]. Powyższe fakty wykazują więc, że potencjał fotoreceptorowy badanych organizmów jednokomórkowych, *Stentor* i *Blepharisma*, nie jest wytwarzany przez wzrost przewodnictwa błonowego, tak jak to ma miejsce w przypadku potencjału mechanoreceptorowego, lub też procesu transdukcji sygnałów w komórkach fotoreceptorowych kręgowców [33]. Przypuszczalnie, u tych orzęsków, jak sugeruje się ostatnio, indukowany światłem potencjał receptorowy jest wytwarzany w rezultacie stymulacji aktywnego mechanizmu transportującego jony (pompy jonowej) [45]. Działalność pompy jonowej polegałaby na wymianie jednego H^+ , uwalnianego w wyniku aktywacji chromoforu [37,39], na jeden Ca^{2+} pochodzący ze środowiska. Takie przepływy jonów, w wyniku

działania pompy, wytwarzałyby w efekcie wypadkowy prąd jonowy skierowany do komórki i tym samym następowalaby depolaryzacja błony komórkowej, co faktycznie jest obserwowane w obu omawianych komórkach pierwotniaczych, *Blepharisma* i *Stentor*.

LITERATURA

- [1] COLOMBETTI G, FIORE L, SANTANGELO G, SPEDALE N. Photosensitivity of a ciliated protozoan 1987; 6th European Conference on Ciliate Biology, Denmark; 32.
- [2] CHANG T-H, WALKER EB, SONG P-S. Effect of ionophores and ruthenium red on the phototaxis of *Stentor coeruleus* as measured by simple devices. *Photochem Photobiol* 1981; **33**: 933-936.
- [3] ECKERT R. Bioelectric control of ciliary activity. *Science* 1972; **176**: 473-481.
- [4] FABCZAK S, FABCZAK H. The resting and action membrane potentials of ciliate *Blepharisma japonicum*. *Acta Protozool* 1988; **27**(2): 117-123.
- [5] FABCZAK S, FABCZAK H, TAO N, SONG P-S. Motile and electrical responses of *Stentor coeruleus* to light stimulation. 34th Annual West Central States Biochemistry Conference 1991a; Ames (Iowa), USA; P-27.
- [6] FABCZAK S, FABCZAK H, SONG P-S. Behavioral and membrane potential photoresponses of protozoan *Blepharisma japonicum*. 34th Annual West Central States Biochemistry Conference 1991b; Ames (Iowa), USA; P-12.
- [7] FABCZAK S, TAO N, SONG P-S. Membrane photoreceptor potentials in protozoan *Stentor coeruleus*. 26th Midwest Regional Meeting ACS 1991; Omaha (Nebraska), USA; 24.
- [8] FABCZAK S, FABCZAK H, SONG P-S. The effect of the ionic environment changes on the photoresponses of *Blepharisma* cells. IX Intern Congress Protozool 1993; Berlin, Germany; p-116.
- [9] FABCZAK S, FABCZAK H, TAO N, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. I. An electrophysiological analysis of the photophobic response in *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1992a; (in press).
- [10] FABCZAK S, FABCZAK H, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. II. Electrophysiological characterization of the photomovement response of *Blepharisma japonicum*. *Photochem Photobiol* 1992b; (in press).
- [11] GHETTI F. Photoreception and photomovements in *Blepharisma japonicum*. (w) Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms. F. Lenzi et al. (red.), Plenum Press, New York, 1991; 257-265.
- [12] GIESE AC. The Biology of a Light-Sensitive Protozoan. Stanford University Press, Stanford 1973.
- [13] GUALTIERI P, PASSARELLI V, BARSANTIL L. *In vivo* microspectrophotometric investigation of *Blepharisma japonicum*. *J Photochem Photobiol B* 1989; **3**: 379-383.
- [14] HUANG B, PITELKA DR. The contractile process in the ciliate *Stentor coeruleus*. I. The role of microtubules and filaments. *J Cell Biol* 1957; **57**: 704-728.
- [15] IISHIDA M, UTSUMI K, SUZAKI T, SHIGENAKA Y. Studies on the mechanism of cell elongation in *Blepharisma japonicum*. II. Changes of the membrane potential measured by an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium. *Cell Structure and Function* 1990; **15**: 251-256.
- [16] IWATSUKI K. *Stentor coeruleus* shows positive photokinesis. *Photochem Photobiol* 1991; **55**: 469-471.
- [17] IWATSUKI K, KOBAYASHI Y. The latency of the photophobic response in *Stentor coeruleus* depends upon the ratio of extracellular Ca to K ions. *Comp Biochem Physiol* 1991; (in press).
- [18] JENNINGS H. Contributions to the Study of the Behavior of Lower Organisms. Reactions to light in ciliates and flagellates. Carnegie Institution of Washington 1906: 31-48.
- [19] KAMO M, MURATSUGU M, HONGO R, KOBATAKE Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membrane Biol* 1979; **49**: 105-121.
- [20] KENNEDY JR. The morphology of *Blepharisma undulans* Stein. *J Protozool* 1965; **12**: 542-561.
- [21] KIM I-H, PRUSTI RK, SONG P-S, HADER D-P. Phototaxis and photophobic responses in *Stentor coeruleus*: Action spectrum and role of Ca²⁺ fluxes. *Biochim Biophys Acta* 1984; **799**: 298-304.
- [22] KRAML M, MARWAN W. Photomovement responses of the heterotrichous ciliate *Blepharisma japonicum*. *Photochem Photobiol* 1983; **37**: 313-319.
- [23] MAST SO. Light reactions in lower organisms. I. *Stentor coeruleus*. *J Exptl Biol* 1906; **3**(3): 359-399.
- [24] MATSUOKA T. Distribution of photoreceptors inducing ciliary reversal and swimming acceleration in *Blepharisma japonicum*. *J Exptl Zool* 1983a; **225**: 337-340.
- [25] MATSUOKA T. Negative phototaxis in *Blepharisma japonicum*. *J Protozool* 1983b; **30**: 409-414.

- [26]MATSUOKA T, MURAKAMI Y, FURUKOHI T, ISHIDA M, TANEDA K. Photoreceptor pigment in *Blepharisma*: H⁺ release from red pigment. *Photochem Photobiol* 1992; **56**(3): 399–402.
- [27]NAITOH Y, ECKERT R. Sensory mechanisms in *Paramecium*. II. Ionic bases of the hyperpolarizing mechanoreceptor potential. *J Exp Biol* 1971; **59**: 53–65.
- [28]NEWMANN E. Scanning electron microscopy of the cortex of the ciliate *Stentor coeruleus*. A view from the inside. *J Protozool* 1974; **21**(5): 729–737.
- [29]PASSARELLI V, LENCI F, COLOMBETTI G, BARONE E, NOBILI R. The possible role of H⁺ and Ca²⁺ in photobehavior of *Blepharisma japonicum*. (w) Blue Light Effects in Biological Systems. H. Senger (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1984: 480–483.
- [30]PEYER J.de, MACHEMER H. Hyperpolarizing and depolarizing mechanoreceptor potentials in *Stylonychia*. *J Comp Physiol* 1978; **127**: 255–266.
- [31]PRUSTI RK, SONG P-S. Effects of ionomycin on the photoresponses in *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1986; **43**: 84s.
- [32]RANDALL JT, JACKSON S. Fine structure and function in *Stentor polymorphus*. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; **4**: 807–830.
- [33]RAYER B, NAYNERT M, STIEVE H. Phototransduction; Different mechanisms in vertebrates and invertebrates. *J Photochem Photobiol B* 1990; **7**: 107–148.
- [34]SCEVOLI P, BISI G, COLOMBETTI G, BARONE E, NOBILI R. Phototile responses of *Blepharisma japonicum*. I. Action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments. *J Photochem Photobiol B* 1987; **1**: 75–84.
- [35]SONG P-S, HADER D-P, POFF KL. Step-up photophobic response in the ciliate *Stentor coeruleus*. *Arch Microbiol* 1980a; **126**: 181–186.
- [36]SONG P-S, HADER D-P, POFF KL. Phototactic orientation by the ciliate *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1980b; **32**: 781–786.
- [37]SONG P-S. Photosensory transduction in *Stentor coeruleus* and related organisms. *Biochim Biophys Acta* 1981; **639**: 1–29.
- [38]SONG P-S, WALKER EB, AUERBACH RA, ROBINSON GW. Proton release from *Stentor* photoreceptors in the excited states. *Biophys J* 1981; **35**: 551–555.
- [39]SONG P-S. Protozoan and related photoreceptors. Molecular aspects. *Anu Rev Biophys Bioeng* 1983; **12**: 35–68.
- [40]SONG P-S. Photomovement. (w) The Science of Photobiology. K. C. Smith (red.), Plenum Publ. Co., 1989; 305–346.
- [41]WALKER EB, YOON M, SONG P-S. The pH dependence of photosensory responses in *Stentor coeruleus* and model system. *Biochim Biophys Acta* 1981; **634**: 298–308.
- [42]WOOD DC. Protozoa as models of stimulus transduction. (w) Aneural Systems in Neurobiology. E. Eisenstein (red.), Plenum Press, New York, 1975: 5–23.
- [43]WOOD DC. Action spectrum and electrophysiological responses correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1976; **24**: 261–266.
- [44]WOOD DC. Membrane permeabilities determining resting, action and mechanoreceptor potentials in *Stentor coeruleus*. *J Comp Physiol* 1982; **146**: 537–550.
- [45]WOOD DC. Electrophysiology and photomovement of *Stentor*. (w) Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms. F. Lenci et al. (red.), Plenum Press, New York, 1991: 281–291.

Wydawca: Fundacja Szkoły Zdrowia Publicznego
Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius” w Krakowie
Druk i oprawa: Drukarnia Narodowa w Krakowie

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPEI.TZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PI.ATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Expil Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

Wstęp	1
KOROHODA W.: Badania migracji komórek – wątpliwości i trudności interpretacji	3
PIERZCHALSKA M.: Pęseta optyczna – nowe narzędzie do badania systemów ruchowych komórek	17
DOROSZEWSKI J.: Logiczno-smiotyczne aspekty biologii komórki	23
KORZYŃSKA A., GÓRKIEWICZ M.: Modele ruchu leukocytów w jednorodnym polu bodźcowym	29
LEWARTOWSKI B.: Rola siateczki sarkoplazmatycznej w sprzężeniu elektro-mechanicznym i komórkowym transporcie wapnia w miocytach serca	41
SZEWCZYK A., MIKOŁAJEK B., NAŁĘCZ M. J.: Substancje zmieniające aktywność kanałów potasowych zależnych od ATP	53
TROJAN A.: Rola kanałów jonowych w przemieszczaniu chloroplastów w glonie <i>Mougeotia</i>	65
ŚLESIAK I., GABRYŚ H. Wapń jako wtórny przekaźnik w fotoindukowanych ruchach wewnątrzkomórkowych w komórce roślinnej	75
MALEC P.: Mechanizmy indukowanych światłem ruchów chloroplastów	87
GRĘBECKI A.: Ruchy lateralne podbłonowej sieci aktynowej w komórkach ruchliwych	97
MICHALIK M.: Ruchy wewnątrzkomórkowe granul barwnikowych w chromatoforach i komórkach melanoma	113
CZYŻ J.: Zjawisko kontaktowego naprowadania komórek	125
MADEJA Z.: Wpływ estrów forbolu na ruchy komórek zwierzęcych	135
STĘPIEŃ E.: Elektrotaksje i kierunkowy wzrost neuronów w polu elektrycznym	143
FABCZAK S., FABCZAK H.: Fotoreakcje u orzęsków <i>Blepharisma</i> i <i>Stentor</i>	155

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1994

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1994 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 1 i 2 suplement) na rok 1994:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No as below:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705