

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 13 - NR 2
1986 (97-278)**

Postępy Biologii Komórkowej

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC — sekretarz

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewodnicząca, Aleksandra PRZE-
ŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 545 + 105 egz. Ark. wyd. 14,5. Ark. druk. 11 3/8 + 3/8 wkł. kredowa. Papier druk. sat.
kl. III, 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lutym 1986 r. Podpisano do druku w czerwcu
1986 r. Druk ukończono w lipcu 1986. Zam. 1097/86. Cena 120 zł.

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

STRUKTURA FILAMENTU AKTYNOWEGO I JEJ IMPLIKACJE
BIOLOGICZNE *

STRUCTURE OF ACTIN FILAMENT AND ITS BIOLOGICAL IMPLICATIONS

Hanna STRZELECKA-GOŁASZEWSKA

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

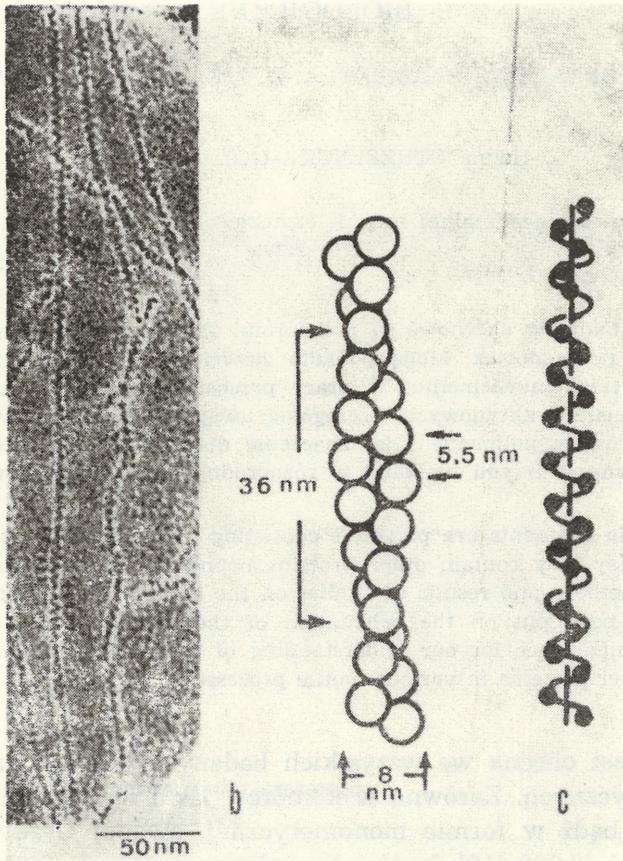
Streszczenie. Filamenty aktynowe są polimerami zbudowanymi z identycznych, monomerycznych podjednostek. Mogą ponadto zawierać inne białka trwale związane z aktynowym trzonem filamentu. W pracy przedstawiono metody i wyniki badań struktury filamentów aktynowych. Szczególną uwagę zwrócono na wzajemną orientację monomerów w polimerze i jej znaczenie dla zrozumienia mechanizmów oddziaływań aktyny z innymi białkami w różnorodnych przejawach ruchliwości.

Summary. Actin filaments are polymers consisting of identical monomeric subunits. In addition, they may contain other proteins bound to the actin core. The article presents the methods and results of studies on the actin filament structure. Emphasis has been put on the orientation of the monomers along the filament axis and its importance for our understanding of the mechanisms of actin interactions with other proteins in various motile processes.

Aktyna jest obecna we wszystkich badanych dotąd rodzajach komórek eukariotycznych. Zarówno w komórce, jak i *in vitro* białko to może występować bądź w formie monomerycznej, zwanej G-aktyną, o masie cząsteczkowej 42 000 [19], bądź jako polimer zwany F-aktyną. Obie formy odwracalnie przechodzą jedna w drugą zależnie od warunków jonowych, temperatury, a także pod wpływem innych białek. W mięśni aktyna występuje w formie polimerów stanowiących trzon tzw. cienkich filamentów, które są strukturami trwałymi. W większości komórek mięśniowych co najmniej 50% aktyny znajduje się w formie monome-

* Referat wygłoszony podczas II Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, Warszawa, 18 - 20 IX 1985 r.

rycznej. Jednak również i w tych komórkach swe funkcjonalne zadania aktyna spełnia głównie w formie polimerów określanych w tym przypadku mianem mikrofilamentów, które wytwarzane są lokalnie z puli monomerów w miarę potrzeb funkcjonalnych komórki [11, 52, 91]. Znajomość struktury filamentu aktynowego jest zatem konieczna dla zrozumienia mechanizmów różnorodnych procesów zachodzących przy udziale tego białka.



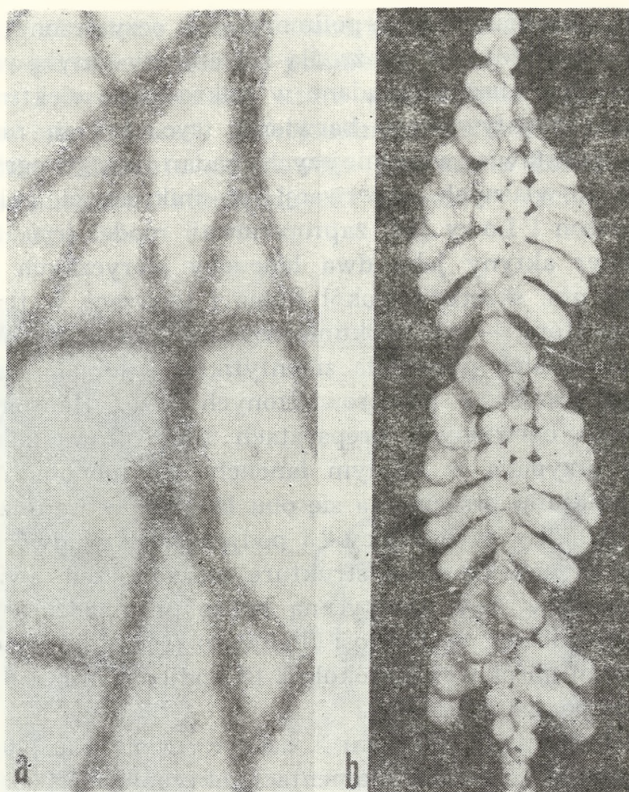
Ryc. 1. Filament aktyny. a. Mikrofotografia filamentów negatywowo barwionych octanem uranylu. Kreski wskazują miejsca, w których widać globularne podjednostki, a strzałki — miejsca przecinania się dwóch łańcuchów podjednostek. Zdjęcie o odwróconym kontraście. b. Schemat ułożenia podjednostek w podwójną, prawoskrętną helisę. c. Lewoskrętna, genetyczna helisa przechodząca przez kolejne sąsiednie podjednostki (według Hanson i Lowy'ego [28])

Filamenty otrzymane przez polimeryzację oczyszczonej aktyny monomerycznej niezależnie od jej źródła i filamenty aktynowe wyizolowane z różnego typu mięśni, oglądane w mikroskopie elektronowym przy użyciu techniki negatywowego barwienia (ryc. 1a), są nierozróżnialne [28, 53]. Na podstawie wcześniejszych badań rentgenograficznych na mięśniu [70] i własnych obserwacji w mikroskopie elektronowym, w 1963 r. Hanson i Lowy [28] zaproponowali model (ryc. 1b) przedstawiający polimer aktyny jako dwa łańcuchy sferycznych podjednostek o średnicy 5,5 nm, skrócone wokół siebie i tworzące w ten sposób podwójną helisę, która — jak udokumentowano [12] — jest prawoskrętna. Średnica podjednostek pozwalała zidentyfikować je jako monomery aktyny. Według pomiarów przeprowadzonych przez Hanson i Lowy'ego na negatywowo barwionych preparatach filamentów, na jeden obrót (skok) helisy przypada w każdym łańcuchu 13 monomerów, odległość zaś między punktami przecinania się obu łańcuchów wzdłuż osi filamentu, czyli okres helisy zawierający 13 podjednostek w dwóch łańcuchach wynosi około 35 nm. Tę samą strukturę można przedstawić jako pojedynczą, lewoskrętną, tzw. genetyczną helisę przechodzącą przez centra kolejnych podjednostek wzdłuż osi filamentu (ryc. 1c). Jej obrót wynosi 5,9 nm; na jeden obrót wypada około 2,16 podjednostki, a 6 obrotów daje jeden okres podwójnej helisy.

W obrazach dyfrakcji promieni X na żywym mięśniu [40, 44, 70] i na zorientowanych w kapilarze filamentach aktynowych [4, 9] znaleziono serie refleksów, których źródłem może być struktura helikalna, zawierająca około 13 podjednostek (centrów rozpraszania) w okresie długości od 35,5 do 37 nm. Zbieżność tych wartości z otrzymanymi przez Hanson i Lowy'ego [28] dowodzi, że struktura filamentów aktynowych nie ulega zasadniczym zmianom podczas ich utrwalania i kontrastowania metodą negatywowego barwienia w celu obserwacji w mikroskopie elektronowym.

Filamenty wykazują strukturalną polarność, którą uwidoczniają kompleksy F-aktyny z miozyną lub subfragmentami cząsteczki miozyny: ciężką meromiozyną i subfragmentem-1, zawierającymi zarówno miejsce aktywności enzymatycznej miozyny, jak i miejsce jej wiązania z aktyną. Na negatywowo barwionych preparatach kompleks taki wygląda jak ciąg grotów strzały, długości około 36 nm, skierowanych w tę samą stronę (ryc. 2). Strukturę „udekorowanego” miozyny filamentu aktynowego można wytłumaczyć tylko i wyłącznie przyłączeniem cząsteczki miozyny do każdego monomeru w polimerze pod tym samym kątem ostrym, co akcentuje skręty helikalnej struktury F-aktyny [41, 55]. Wynika stąd, że każdy monomer w polimerze jest tak samo ukierunkowany w stosunku do osi filamentu.

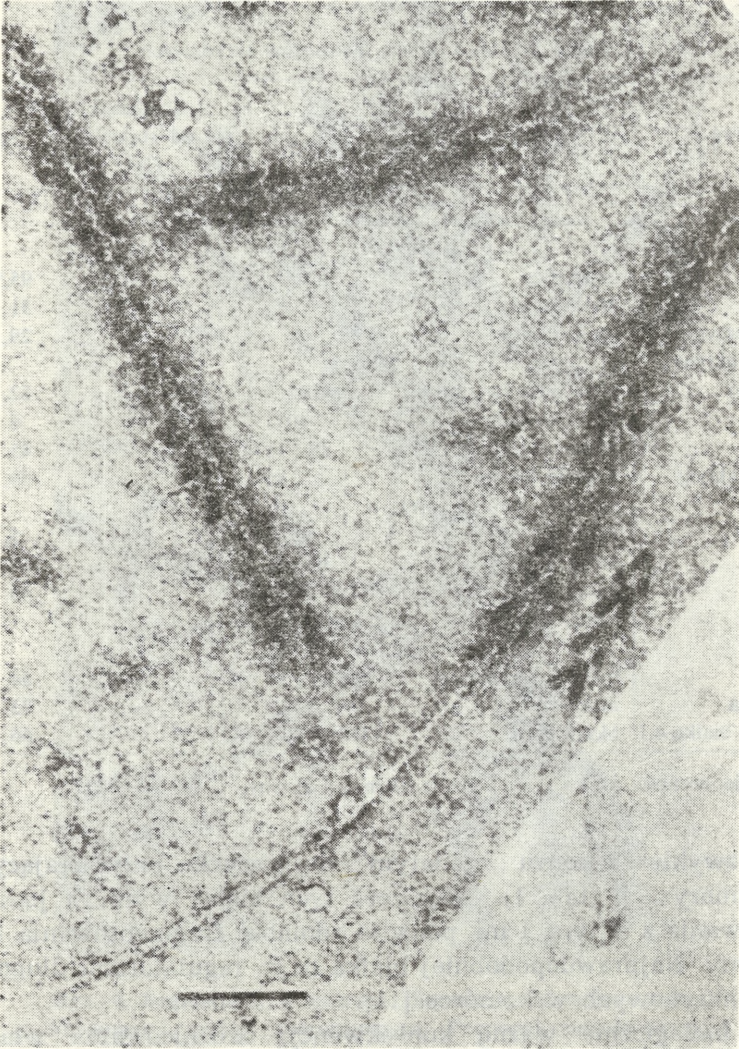
Dodając monomeryczną aktynę do fragmentów F-aktyny „udekorowa-



Ryc. 2. Filamenty aktyny „udekorowane” subfragmentem-1 miozyny. a. Mikrofotografia preparatu negatywno barwionego octanem uranylu. b. Model. Punkty zaznaczone przez A i B odpowiadają dwóm sąsiednim miejscom przecinania się dwóch łańcuchów monomerów aktyny (według Moore’a i DeRosier [55])

nej” ciężką meromiozyną w warunkach jonowych, sprzyjających polimeryzacji, stwierdzono [34, 51, 93], że wzrost polimeru ma charakter jednokierunkowy; przyłączanie dodanych monomerów następuje w znacznie większym stopniu na tzw. „broadym” końcu „udekorowanych” filamentów niż na ich „zaostrowym” końcu wyznaczonym kierunkiem „grotów strzały” (ryc. 3). Przyrost polimeru jest wypadkową dwóch procesów: przyłączania i oddysocjowywania monomerów na końcach polimeru. Różnica szybkości zachodzenia tych reakcji na obu końcach polimeru, udokumentowana również doświadczeniami biochemicznymi [92], jest kolejnym dowodem polarności polimeru i nierównocенności jego dwóch końców.

Nierównocенność końców polimeru sprawia, że nie tylko monomery aktyny w procesie polimeryzacji, lecz również niektóre inne białka reagu-



Ryc. 3. Mikrofotografia pokazująca wybiórcze przyłączanie monomerów aktyny dodanych wraz z 0,1 M KCl do krótkich filamentów „udekorowanych” ciężką meromiozyną, na „brodatych” końcach filamentów. Preparat negatywowo barwiony octanem uranylu. Literami v zaznaczono kierunek ułożenia „grotów strzały” (według Woodrun, Richa i Pollarda [93])

jące z aktyną są wybiórczo przyłączane na jednym z dwóch końców polimeru. Wśród wykrytych w komórkach zarówno mięśniowych, jak i niemięśniowych i stale wykrywanych nowych białek wiążących się z aktyną można wyróżnić całą klasę tzw. białek „zakrywających” (actin-capping proteins), przyłączanych wybiórczo na jednym z końców filamentu akty-

TABELA 1

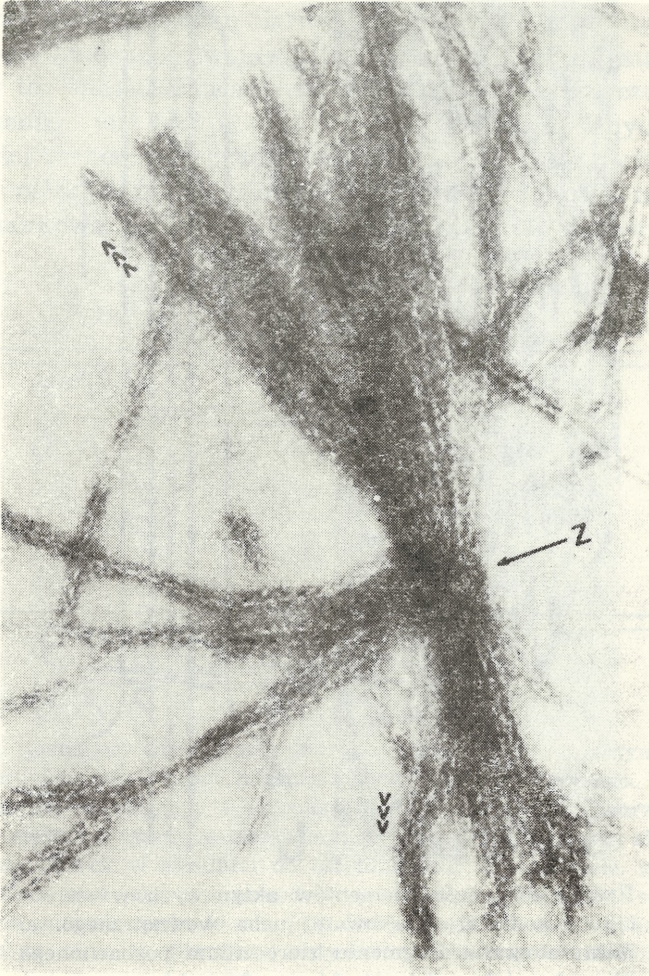
Białka blokujące końce filamentów aktynowych

| Nazwa | Źródło | m.cz. $\times 10^{-3}$ | Zależność od stężenia Ca^{2+} | Autorzy |
|---|--|---------------------------|---------------------------------------|------------|
| Białka blokujące „broadaty” koniec filamentu | | | | |
| Żelsolina | makrofagi | 91 | + | 95,96 |
| „ | płytki krwi | 90 | + | 31, 62, 90 |
| „ (brevina) | osocze krwi | 90 | + | 29, 30 |
| Modulator aktywny (fragmina) | plasmodia <i>Physarum</i> | 42 | + | 32, 37, 38 |
| — | <i>Dictyostelium</i> | 40 | + | 6 |
| — | <i>Acanthamoeba</i> | 28+31 | — | 45 |
| Modulator aktywny | mięśnie gładkie | 85 | + | 39, 75 |
| Villina* | mikrokosmki komórek nabłonka jelita | 95 | + | 5, 10, 23 |
| — | mózg kręgowców | 36+31 | — | 50 |
| „Cap 90” | mózg kręgowców | 90 | + | 46 |
| Białka blokujące „zaostrzony” koniec filamentu | | | | |
| β -aktywnina | mięśnie szkieletowe | 34+37 | — | 54 |
| Akumentyna | makrofagi | 65 | — | 73 |
| Spektryna + białko 4,1 | błony erytrocytów | $(240+220)_2+82$ | — | 66 |

* W nieobecności jonów Ca^{2+} sieciuje filamenty aktywny.

nowego, zwykle na końcu „broadatym”, czyli szybko przyrastającym podczas polimeryzacji (tab. 1). Większość tych białek wymaga jonów Ca^{2+} do reagowania z aktywną i ma ponadto zdolność fragmentowania filamentów aktywny. Najprawdopodobniej białka te są regulatorami długości filamentów aktynowych w komórce [11].

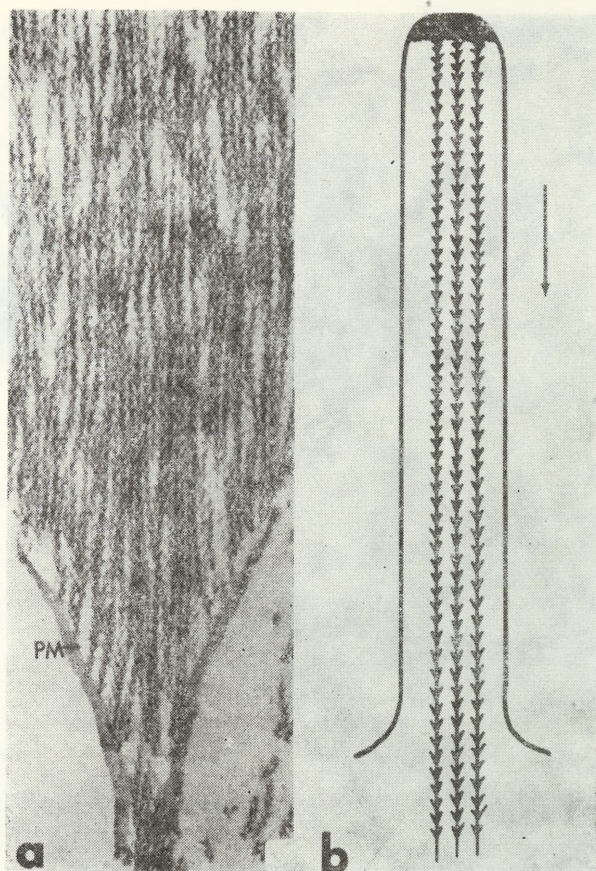
Inną biologicznie ważną konsekwencją zróżnicowania właściwości dwóch końców filamentu aktynowego jest polarne zakotwiczenie filamentów w błonie komórkowej lub takich strukturach wewnątrzkomórkowych, jak np. dyski Z we włóknie mięśnia prążkowanego. Cienkie filamenty, wyizolowane z mięśnia w postaci tzw. segmentów I, w których filamenty pozostają przytwierdzone do fragmentów dysku Z po obu jego stronach, „udekorowane” subfragmentami miozyny, tworzą groty strzały ostrymi końcami skierowane zawsze w stronę przeciwną do dysku Z po każdej jego stronie (ryc. 4). Metodą „dekoracji” subfragmentami miozyny wykazano także jednokierunkową orientację filamentów aktynowych występujących w postaci wiązek w różnego rodzaju takich powierzchniowych wypustkach komórek niemięśniowych, jak mikrokosmki komórek



Ryc. 4. Segment I, w którym filamenty aktynowe „udekorowano” ciężką meromiozyną. Preparat negatywowo barwiony octanem uranylu. Literą Z oznaczono fragment dysku Z łączący filamenty o przeciwnej polarności po obu jego stronach. Literami v zaznaczono kierunek „grotów strzały” (według Huxley’a [41])

nabłonka jelitowego, jaja jeżowca, stereocilia komórek włoskowatych ucha wewnętrznego ssaków, wyrostek akrosomalny plemników bezkręgowców, wzgórek zapłodnieniowy komórki jajowej, filopodia Acanthamoeba, coelomocytów, płytki krwi i komórek w hodowlach tkankowych (odnośniki w [21, 80]).

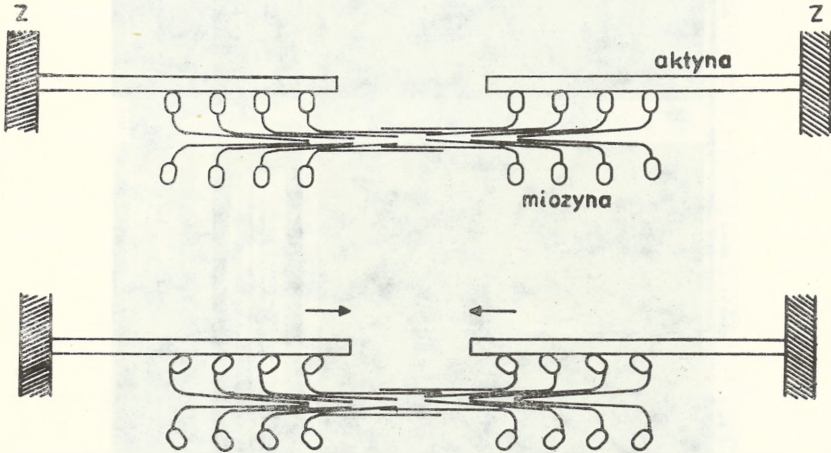
Jak widać na przykładzie zilustrowanym na ryc. 5, groty strzały „udekorowanych” filamentów skierowane są od błony ku wnętrzu ko-



Ryc. 5. Polarność filamentów aktynowych w stereocylium komórki włoskowej ucha wewnętrznego. a. Mikrofotografia fragmentu stereocylium pozbawionego błony komórkowej i potraktowanego subfragmentem-1 miozyny. U podstawy stereocylium widać fragment zachowanej błony komórkowej PM. Preparat negatywowo barwiony octanem uranylu (według Tilney'a, DeRosier i Mulroy'a [81]). b. Schemat pokazujący kierunek „gro-tów strzały”

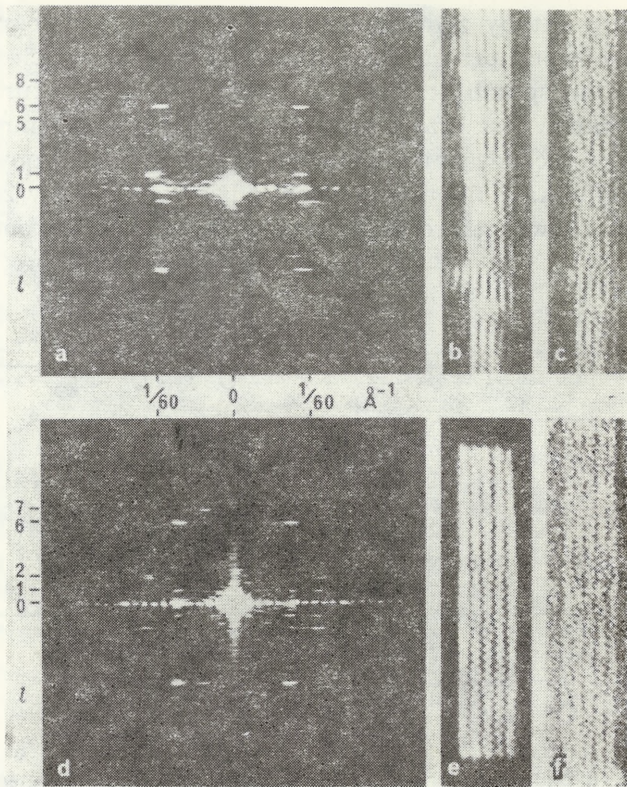
mórki. Przypuszcza się, że w kierunkowym przytwierdzeniu filamentów aktynowych do błony komórkowej lub struktur wewnątrzkomórkowych, takich jak dyski Z w mięśniach szkieletowych, pośredniczą białka wybiórczo reagujące z jednym z końców filamentu [80, 91]. Tego rodzaju strukturalna organizacja polarnych filamentów aktynowych ma podstawowe znaczenie dla ich funkcji w komórce. W mięśni szkieletowych zapewnia sumowanie się sił wytwarzanych w każdej połowce sarkomeru

przy reagowaniu aktyny z dwupolarnymi filamentami miozyny, umożliwiając skoordynowane przesuwanie filamentów aktynowych ku centrum sarkomeru i w ten sposób skracanie się mięśnia podczas skurczu (ryc. 6). Podobny mechanizm jest przypuszczalnie podstawą wielu innych przejawów ruchliwości zachodzącej z udziałem filamentów aktynowych i miozynowych w komórkach niemięśniowych, gdzie rolę dysków Z może spełniać błona komórkowa, mikrotubule oraz różne organelle komórkowe [7].



Ryc. 6. Schemat ilustrujący mechanizm przesuwania filamentów aktynowych ku centrum sarkomeru podczas skurczu mięśnia poprzecznie prążkowanego. Ruch filamentów jest wynikiem sprzężonego z hydrolizą ATP, cyklicznego wytwarzania i dysocjacji połączeń główek miozyny z monomerami aktyny w filamencie aktynowym. Zmiana nachylenia główek w stosunku do osi filamentu w momencie, gdy są one połączone z monomerami aktyny, powoduje przesunięcie filamentu aktynowego w każdym cyklu o odcinek rzędu 10 nm [42]. Dolna część schematu pokazuje stan, którego modelem *in vitro* są filamencie aktynowe udekorowane miozyną lub jej subfragmentami

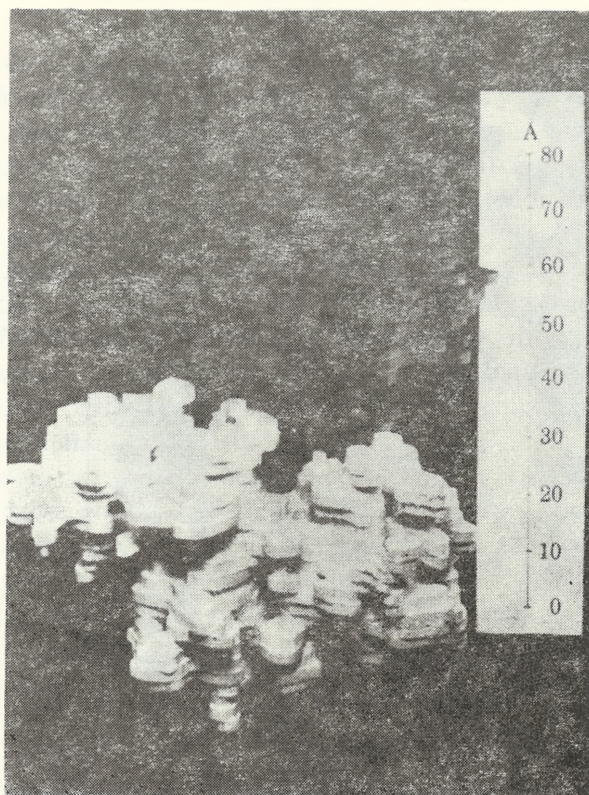
Odmienny, choć również ściśle związany z polarnością filamentów aktynowych jest natomiast mechanizm(y) wytwarzania wspomnianych już tu powierzchniowych wypustek komórkowych, w których nie znaleziono filamentów miozyny. Już sam kierunek ułożenia w nich filamentów aktynowych („zaostrzonym” końcem ku wnętrzu komórki) dowodzi, że powstawanie tych wypustek nie mogłoby być wynikiem oddziaływań między filamentami aktynowymi i miozynowymi, ponieważ — przez analogię do sytuacji w mięśniu — należałoby oczekiwać, że wytwarzane przy tego typu oddziaływaniach siły będą wciągały błonę komórkową do wnętrza komórki, a nie na odwrót [80]. Wiele obserwacji wskazuje, że odgrywa tutaj rolę raczej proces jednokierunkowej polimeryzacji aktyny poprzez wybiórcze przyłączanie monomerów na dystalnym w stosunku do ciała



Ryc. 7. Analiza dyfrakcyjna negatywowo barwionych parakryształów F-aktyny (a-c) i F-aktyny połączonej z tropomiozyną (d-f). W obrazie optycznej dyfrakcji a na parakryształe F-aktyny c widać intensywne refleksy na pierwszej i szóstej linii warstwowej; b — filtrowany obraz parakryształu F-aktyny, tj. obraz parakryształu odtworzony z jego obrazu dyfrakcyjnego po zamaskowaniu refleksów nie odpowiadających helikalnej symetrii filamentu aktynowego. W obrazie optycznej dyfrakcji d na parakryształe, dodatkowo zawierającym tropomiozynę f, widać większą intensywność refleksów na drugiej niż na pierwszej linii warstwowej; e — filtrowany obraz parakryształu f (według Hanson, Ledneva, O'Briena i Bennett [27])

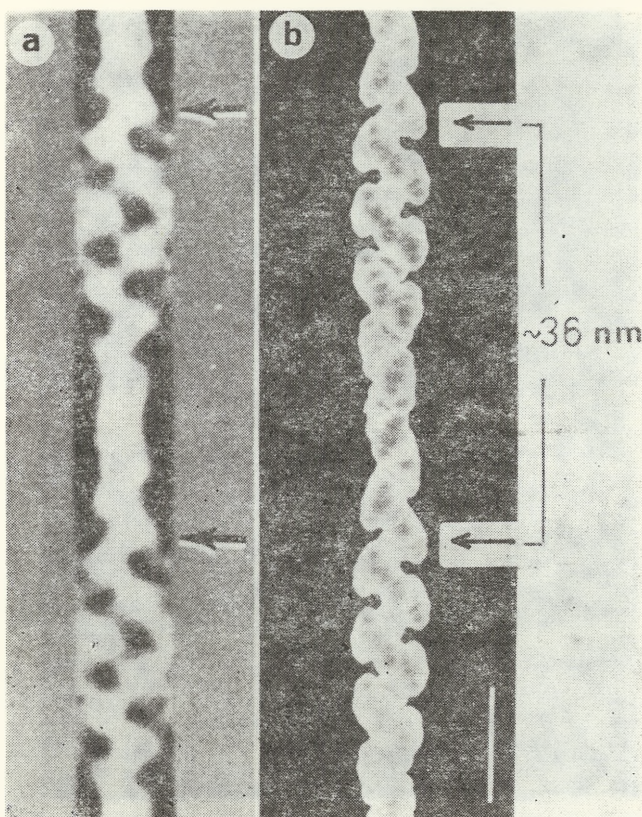
komórki końcu filamentów. Przypuszczalne mechanizmy regulacji tego procesu omawiane są w pracy [11].

W dalszych badaniach struktury filamentu aktynowego wykorzystano właściwość łączenia się filamentów pod wpływem wysokich stężeń CaCl_2 lub MgCl_2 w parakrystaliczne boczne agregaty [26]. Na mikro fotografiach negatywowo barwionych parakryształów (ryc. 7c) widać deli-



Ryc. 8. Trójwymiarowy model monomeru aktyny w kompleksie z DN-azą I wykonany na podstawie rentgenokrytalograficznej analizy kompleksu z rozdzielczością 6 Å. Jaśniejsza część modelu odpowiada aktynie (według Sucka, Kabscha i Mannherza [76])

katne poprzeczne prążkowanie o okresowości około 36 nm, wskazujące na ułożenie filamentów w parakryształe w taki sposób, że miejsca przecinania się dwóch łańcuchów monomerów w ich podwójnej helisie występują na tych samych poziomach wzdłuż osi parakryształu [58]. Ta regularność umożliwia otrzymanie metodą optycznej dyfrakcji regularnych i symetrycznych obrazów dyfrakcyjnych dla fragmentów parakryształu, obejmujących kilka filamentów. Widoczne na dyfraktogramie (ryc. 7a) dwie najsilniejsze linie warstwowe są odbiciami pierwszego i szóstego rzędu od płaszczyzn wyznaczonych okresowością podwójnej helisy [27, 55, 58]. Z intensywności refleksów na liniach warstwowych można metodą transformacji Fouriera obliczyć funkcję rozmieszczenia gęstości optycznej dla „uśrednionego” filamentu w parakryształe i wykonać jego trójwymiarową rekonstrukcję [1]. Podobnej analizie poddawano negaty-

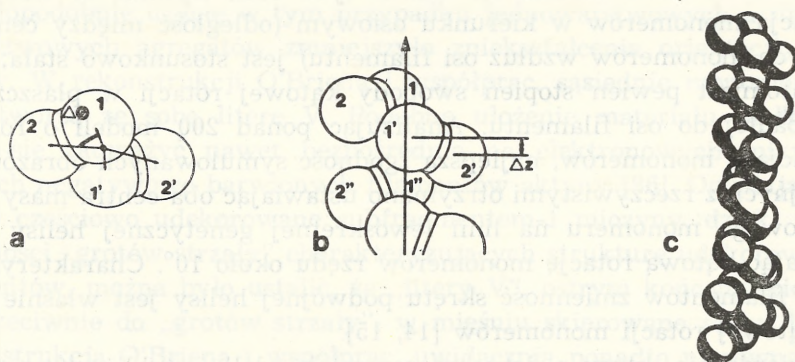


Ryc. 9. Dwuwymiarowa rekonstrukcja uśrednionego filamentu w parakryształe a i skonstruowany na jej podstawie trójwymiarowy model b, w którym kontury filamentu określono za pomocą wzajemnie przenikających się sferycznych elementów różnej wielkości (według Aebi, Fowlera, Buhle i Smitha [1])

wowo barwione kryształy aktyny powstające pod wpływem soli gadolinu, mające postać dwuwarstwowych płaszczyzn regularnie upakowanych monomerów [2, 68]. W tym przypadku, ze względu na brak helikalnej symetrii, do transformacji Fouriera wykorzystano mikrofotografie wykonane przy różnych kątach nachylenia płaszczyzny kryształu w stosunku do wiązki elektronów [1, 72]. Badania te wykazały, że kształt monomerów aktyny odbiega od sferycznego i przypomina raczej elipsę lub klin [55, 72]. Dokładniejszych informacji o kształcie i wymiarach monomeru dostarczyła rentgenokrytalograficzna analiza kryształów aktyny w kompleksie z DN-azą I [48, 69, 76]. Model cząsteczki aktyny skonstruowany na podstawie map gęstości elektronowej, obliczonych z rozdzielczością 6 Å (ryc. 8), pokazuje wyraźnie dwudomenową strukturę monomeru

o wymiarach $6,7 \times 4,0 \times 3,7$ nm i nierówną wielkość obu domen przedzielonych głęboką szczeliną. Ustalenie natomiast wzajemnej orientacji asymetrycznych monomerów w polimerze napotyka na trudności wynikające m. in. z niskiej rozdzielczości (powyżej 2 nm) mikrofotografii negatywowo barwionych obiektów, uniemożliwiającej jednoznaczne określenie konturów poszczególnych monomerów w trójwymiarowej rekonstrukcji polimeru. Niemal we wszystkich modelach opartych na trójwymiarowej rekonstrukcji filamentu z obrazów dyfrakcyjnych negatywowo barwionych parakryształów typu bocznych agregatów, dłuższa oś monomeru jest zorientowana równolegle lub prawie równolegle do osi filamentu [1, 55, 72, 74, 85, 87]. Jest rzeczą charakterystyczną, że ostatnie rekonstrukcje „uśrednionego” filamentu w parakryształe [1, 74, 85, 87], których przykładem jest ryc. 9, coraz bardziej odbiegają od modelu zaproponowanego przez Hanson i Lowy’ego (ryc. 1b) nie tylko ze względu na inny kształt monomerów. Istotniejsza jest różnica polegająca na tym, że uwidoczniają one wyraźniej pojedynczą, lewoskrętną, genetyczną helisę niż podwójną, prawoskrętną helisę o dłuższym okresie, oraz że wyraźniej zaznacza się w nich kontakt między monomerami z dwóch przeciwnych łańcuchów podwójnej helisy niż między monomerami tego samego łańcucha.

Egelman i DeRosier [14, 15], potwierdzając wcześniejsze obserwacje Hanson [26], zwrócili uwagę na to, że filamenty w parakryształe cechuje większy stopień strukturalnego uporządkowania niż pojedyncze filamenty, których obrazy dyfrakcyjne wskazują na znaczną zmienność i przy-



Ryc. 10. Ułożenie monomerów w filamencie aktynowym według Egelmana i DeRosier [14]. a. Widok wzdłuż osi filamentu. Czterema wektorami zaznaczono radialne pozycje dwóch sferycznych domen w dwóch monomerach; kąt między domenami 1 i 1' jest taki sam jak kąt między 2 i 2' i wynosi średnio 167° . b. Widok boczny. Strzałką zaznaczono oś filamentu; osiowe przesunięcie dwóch domen monomeru z wynosi około 10 Å. c. Fragment filamentu

padkowość skrętu podwójnej helisy, czyli liczby monomerów przypadających na jeden obrót helisy. Różnicy tej nie tłumaczy fakt, że każdy wynik uzyskany na parakryształach jest już uśredniony, ponieważ obrazy dyfrakcyjne pojedynczych filamentów „wyciętych” z parakryształu są bardziej zbliżone do uzyskiwanych dla wiązki filamentów w parakryształach niż dla oddzielnych filamentów [15]. Autorzy przytaczają wiele dowodów na to, że zmienność skrętu helisy jest właściwością filamentów, a nie skutkiem deformacji pod wpływem procedury kontrastowania preparatów, oraz że deformacji prowadzącej w tym przypadku do zwiększenia strukturalnego uporządkowania ulegają raczej filamety w parakryształach typu bocznych agregatów [15, 16]. Ryc. 10 pokazuje nowy model filamentu aktywnego zaproponowany przez Egelmana i DeRosier [14] na podstawie analizy obrazów dyfrakcyjnych pojedynczych filamentów. Model uwzględnia dwudomenową budowę monomeru i jego ogólne wymiary określone w badaniach krystalograficznych aktywny w kompleksie z DN-azą I [69, 76]. W konstrukcji modelu posłużono się metodą porównywania obrazów dyfrakcyjnych modelu, w których systematycznie zmieniano orientację podjednostek, z obrazami dyfrakcyjnymi rzeczywistych filamentów. Stwierdzono, że wspólną cechą kilkuset obrazów dyfrakcyjnych prostych odcinków filamentów w negatywowo barwionych preparatach była niska i zmienna względna intensywność refleksów na pierwszej linii warstwowej, których źródłem jest długookresowa prawoskrętna helisa oraz powtarzalność rozmieszczenia intensywności refleksów wzdłuż szóstej i siódmej linii warstwowej, których źródłem jest odpowiednio lewoskrętna genetyczna helisa o okresie 5,9 nm i prawoskrętna genetyczna helisa o okresie 5,1 nm. Z tych cech wynika, że wzajemna orientacja monomerów w kierunku osiowym (odległość między centrami kolejnych monomerów wzdłuż osi filamentu) jest stosunkowo stała; mają one natomiast pewien stopień swobody kątowej rotacji w płaszczyźnie prostopadłej do osi filamentu. Analizując ponad 200 modeli o różnych orientacjach monomerów, najlepszą zgodność symulowanych obrazów dyfrakcyjnych z rzeczywistymi otrzymano ustawiając oba centra masy dwudomenowego monomeru na linii lewoskrętnej genetycznej helisy i dopuszczając kątową rotację monomerów rzędu około 10° . Charakterystyczna dla filamentów zmienność skrętu podwójnej helisy jest właśnie efektem kątowej rotacji monomerów [14, 15].

Stwierdzenie, który z dotychczasowych modeli jest bliższy rzeczywistości, w sposób zasadniczy zależy od średnicy filamentu aktywnego. Modele, w których dłuższa oś monomeru zorientowana jest równolegle do osi filamentu, mają średnicę 6 - 8 nm [55, 72, 74, 76, 87], a model Egelmana i DeRosier, w którym monomery ustawione są niemal prost-

padle do osi filamentu, ma średnicę 9,5 nm. Zdaniem Egelmana i współprac., wyniki pomiarów na parakryształach typu bocznych agregatów mogą być zaniżone wskutek deformacji filamentów przy wytwarzaniu międzyfilamentowych wiązań w parakryształach, w negatywnie barwionych zaś preparatach oddzielnych filamentów barwnik zaciiera zewnętrzne kontury cząsteczek. Średnica mierzona na replikach filamentów uzyskanych metodą szybkiego zamrażania, rytowania i obrotowego napyłania wynosi (po uwzględnieniu poprawki na grubość warstwy metalu) 7-8 nm według [20], a około 7 do 9 nm według [36]. W tym drugim przypadku zastosowano zmodyfikowaną procedurę zmniejszającą możliwość powstawania artefaktów [36]. W najnowszych pomiarach na ultracienkich skrawkach mięśnia przygotowanego do mikroskopii elektronicznej nową metodą, bez odwadniania tkanki, uzyskano wartość 9,5 nm [47]. Argumentem silnie przemawiającym za orientacją monomerów zbliżoną do prostopadłej w stosunku do osi filamentu jest uśrednione radialne rozmieszczenie gęstości wokół osi filamentu aktynowego, obliczone z rentgenogramów żywego mięśnia, wskazujące na średnicę około 10 nm [17].

Model Egelmana i DeRosier skłonił już innych autorów do zgodnej z tym modelem identyfikacji monomerów aktyny w trójwymiarowej rekonstrukcji filamentu aktyny udekorowanego subfragmentem-1 miozyny [79]. Orientację monomerów zbliżoną do proponowanej przez Egelmana i DeRosier pokazuje również zilustrowana na ryc. 11 trójwymiarowa rekonstrukcja F-aktyny w kompleksie z tropomiozyną autorstwa O'Briana i współprac. [59], mimo iż rekonstrukcja ta oparta jest na obrazach dyfrakcyjnych parakryształów typu bocznych agregatów. Prawdopodobnie użycie w tym przypadku jednowarstwowych a nie wielowarstwowych agregatów zmniejszyło zniekształcenia orientacji monomerów. W rekonstrukcji O'Briana i współprac. sąsiednie monomery aktyny tworzą ze sobą literę V. Podobne ułożenie materiału białkowego udało się zauważyć nawet bezpośrednio na elektronowych mikro fotografiach negatywnie barwionych filamentów aktyny [86]. Oglądając filamenty częściowo udekorowane subfragmentem-1 miozyny, dzięki znanej polarności „grotów strzały” charakteryzujących strukturę udekorowanych filamentów, można było ustalić, że „litery V”, ostrym końcem skierowane przeciwnie do „grotów strzały”, w mięśniu skierowane są ku linii Z. Rekonstrukcja O'Briana i współprac. uwidacznia ponadto nierówną wielkość dwóch domen monomeru aktyny i sugeruje, że mniejsza domena jest usytuowana bliżej osi filamentu.

Większość cytowanych badań wykonano na aktynie z mięśni szkieletowych kręgowców. Ze względu na wysoce konserwatywną pierwszorzę-

dową strukturę aktyny [52] nie należy oczekiwać zasadniczych różnic w budowie polimeru zależnie od źródła aktyny i dotychczasowe badania ich nie wykazały. Można jednak spodziewać się drobnych różnic, np. w swobodzie kątovej rotacji monomerów, ponieważ wyniki badań biochemicznych wskazują na różnice w sile wiązań międzymonomerycznych w polimerach różnych izoform aktyny w pewnych warunkach [24, 67]. Rzeczywiście, dla populacji filamentów aktyny pochodzącej z różnych źródeł uzyskano różne średnie wartości skoku helisy [15]. Jak podkreślają Egelman i współprac. [15], możliwość kątovej rotacji monomerów w polimerze może być bardzo istotna m.in. dla funkcjonowania mięśnia, ze względu na zupełnie inną helikalną symetrię filamentów aktynowych i miozynowych. Kątova rotacja zarówno główek miozynowych, jak i monomerów aktyny ułatwiałaby wytworzenie optymalnej liczby międzyfilamentowych połączeń koniecznych dla generacji napięcia lub przesuwania się filamentów aktynowych i miozynowych względem siebie podczas skurczu. Znaczenie zmian orientacji monomerów w filamentach aktyny dla funkcjonowania różnego rodzaju powierzchniowych wypustek komórek niemięśniowych omawiane jest obszernie przez DeRosier i Tilney'a [13]. O ile model Egelman'a i DeRosier, w którym każdy monomer łączy się z dwoma sąsiednimi (ryc. 10c), dopuszcza (i zakłada) możliwość kątovej rotacji monomerów, nadającej filamentom cechę giętkości, wcześniejszy model Hanson i Lowy'ego implikował połączenie każdego monomeru z czterema sąsiednimi (ryc. 1b), co musiałoby prowadzić do znacznego usztywnienia filamentu. Tymczasem wewnątrzfilamentowe ruchy rotacyjne monomerów wykazywano w prowadzonych od dawna dynamicznych badaniach F-aktyny *in vitro* i cienkich filamentów *in vivo* za pomocą różnych technik spektroskopowych (odnośniki w [63, 64], a giętkość filamentów aktynowych uwidoczniło filmując filamente w mikroskopie optycznym [57, 93].

Naturalne filamente aktynowe wyizolowane z mięśni, czyli cienkie filamente oprócz aktyny zawierają tropomiozynę, a cienkie filamente wyizolowane z mięśni szkieletowych również troponinę, która łącznie z tropomiozyną czyni reagowanie aktyny z miozyną zależne od stężenia jonów Ca^{2+} i w ten sposób reguluje proces skurczu mięśni szkieletowych (odnośniki w [11]). Ponieważ obecność tropomiozyny nie zmienia wyglądu filamentów w mikroskopie elektronowym, jeszcze przed wprowadzeniem metody trójwymiarowych rekonstrukcji do badań struktury filamentów, Hanson i Lowy [28] wysunęli więc przypuszczenie, że liniowe polimery wysoce asymetrycznych cząsteczek tropomiozyny, długości około 40 nm i grubości zaledwie około 2 nm, nawinięte na aktynowy trzon filamentu, mieszczą się w rowkach międzyłańcuchami monome-

rów aktyny. Ze stechiometrii obu białek w mięśniu i w ich kompleksie sztucznie wytworzonym *in vitro* wynika, że każdy filament zawiera dwa łańcuchy cząsteczek tropomiozyny. Periodyczne rozmieszczenie troponiny wzdłuż filamentu określone jest z kolei przez miejsce jej wiązania w cząsteczce tropomiozyny (ryc. 1 [11]).

Na dyfrakcyjnych obrazach parakryształów cienkich filamentów obecność tropomiozyny uwidacznia się wzmocnieniem względnej intensywności refleksów na drugiej linii warstwowej (rys. 7d), co wynika z nadania filamentom cech czteropasmowej helisy przez łańcuchy tropomiozyny znajdujące się między dwoma łańcuchami aktyny (podwójna helisa nie może być źródłem silnych odbić drugiego rzędu [27, 58]). Te same szczegóły widać na obrazach dyfrakcji promieni X na mięśniu. Okazało się jednak, że druga „aktynowa” linia warstwowa jest widoczna tylko na rentgenogramach mięśnia w stanie skurczu, a w przypadku mięśnia rozkurzonego zanika [33, 43]. Te zmiany zinterpretowano jako rezultat przesunięcia tropomiozyny z bardziej centralnego położenia między łańcuchami aktyny ku brzegowi rowka między tymi łańcuchami, bowiem przy takim rozmieszczeniu tropomiozyny cechy poczwórnej helisy ulegają zatarciu. To przesunięcie tropomiozyny powiązано z regulacją skurczu mięśnia sugerując, że w położeniu bliższym brzegu rowka tropomiozyna przestrzennie blokuje miejsce wiązania główek miozynowych w aktynie i w ten sposób powoduje rozkurcz [33, 43, 65]. Ciąg reakcji zachodzących z udziałem troponiny, a prowadzących do zmiany położenia tropomiozyny na filamencie cienkim w mięśniu szkieletowym, omawiany jest w [11].

Dla sprawdzenia hipotezy przestrzennego blokowania próbowano dokładnie określić miejsce tropomiozyny w filamencie w stosunku do obszaru kontaktu monomerów aktyny z główkami miozynowymi. W tym

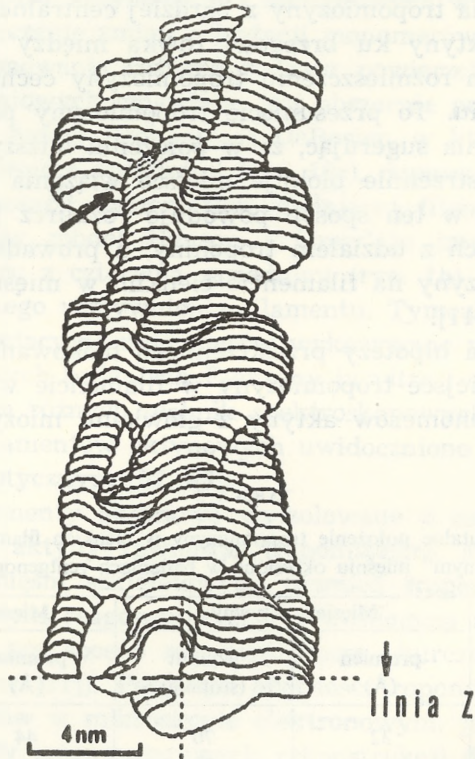
TABELA 2

Średnie radialne i azymutalne położenie tropomiozyny w cienkich filamentach w „aktywnym” i „nieaktywnym” mięśniu określone w badaniach rentgenograficznych

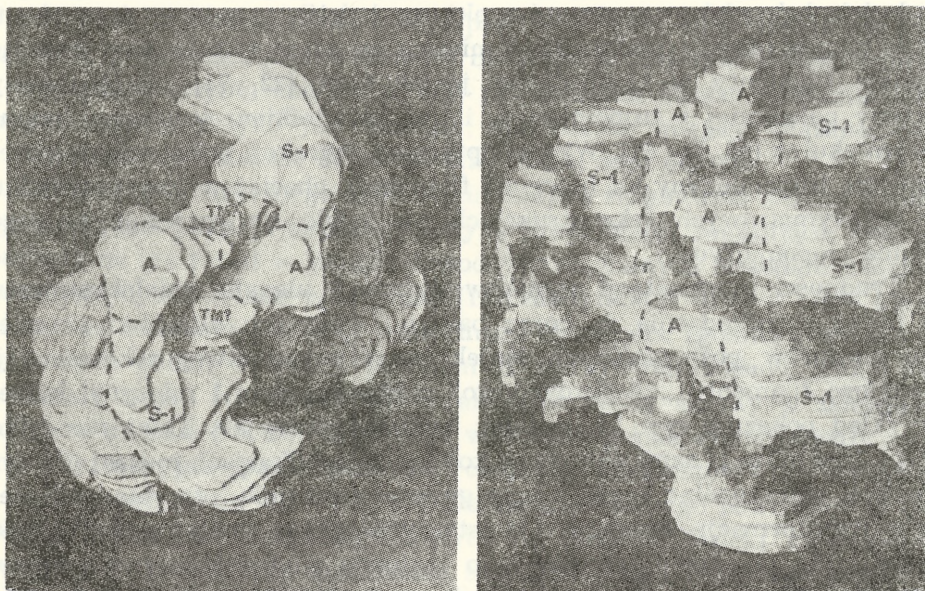
| Autorzy | Mięsień aktywny | | Mięsień nieaktywny | |
|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | promień (Å) | azymut (stopnie) | promień (Å) | azymut (stopnie) |
| Huxley [43] | 32 | 70 | 44 | 46 |
| Haselgrove [33] | — | 70 | — | 50 |
| Parry i Squire [65] | 33–35 | 65–70 | 42–45 | 45–50 |

Azymut jest określony w stosunku do prostej łączącej centra sąsiednich monomerów aktyny w dwóch przeciwnych łańcuchach podwójnej helisy.

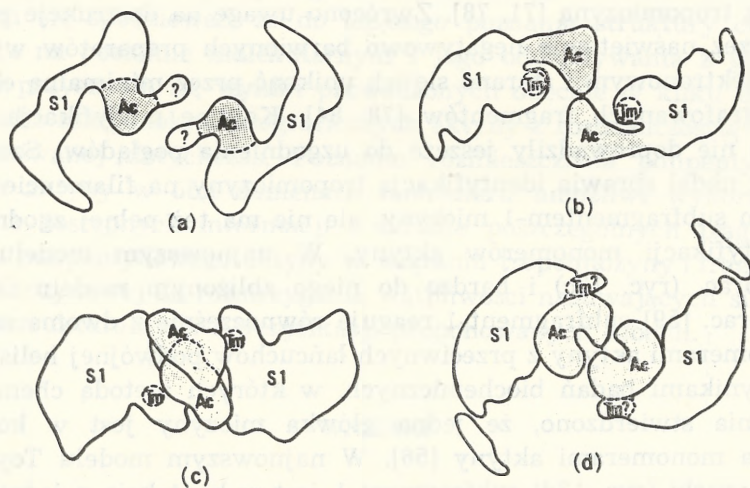
celu porównywano otrzymane metodą optycznej dyfrakcji trójwymiarowe rekonstrukcje filamentów samej aktyny, filamentów zawierających tropomiozynę i troponinę oraz obu tych rodzajów filamentów udekorowanych subfragmentem-1 miozyny [3, 43, 49, 55, 59, 65, 71, 74, 78, 83-85, 87, 89]. Ponieważ średnica cząsteczki tropomiozyny jest na granicy rozdzielczości obrazów mikroskopowych, w ostatnich więc publikacjach [3, 59, 78, 85] do identyfikacji tropomiozyny wykorzystywano informacje z badań rentgenograficznych o średnim radialnym i azymutalnym rozmieszczeniu centrum masy tropomiozyny (tab. 2). Ciągłe pasmo materiału zidentyfikowanego jako tropomiozyna wyjątkowo wyraźnie widoczne jest w trójwymiarowej rekonstrukcji O'Briena i współprac. (ryc. 11), pokazującej tropomiozynę w pozycji „nieblokującej”. Podobnie jak w modelach innych autorów, każdy łańcuch tropomiozyny — rów-



Ryc. 11. Trójwymiarowa komputerowa rekonstrukcja filamentu F-aktyny w kompleksie z tropomiozyną. Grubsza strzałka wskazuje mniejszą domenę monomeru aktyny, do której przyłączona jest tropomiozyna. Tropomiozyna widoczna jest w postaci dwóch ciągłych pasm (jedno z nich jest częściowo zasłonięte przez monomery aktyny) (według O'Briena, Coucha, Johnsona i Morrisa [59])



Ryc. 12. Trójwymiarowy model fragmentu cienkiego filamentu w kompleksie z subfragmentem-1 miozyny. a. Widok wzdłuż osi filamentu. b. Widok z boku. Linia przerywaną zaznaczono przypuszczalnie kontury monomerów aktyny A, tropomiozyny TM i subfragmentu-1 (S-1) (według Taylora i Amos [78])



Ryc. 13. Diagramy ilustrujące obszary kontaktu między monomerami aktyny Ac, tropomiozyna Tm i subfragmentem-1 miozyny S1 w „udekorowanym” filamencie oglądanym wzdłuż osi. a. według Huxley'a [43], znaki zapytania oznaczają przypuszczalną pozycję tropomiozyny; b. według Taylora i Amos [78]; c. według Amos, Huxley'a, Holmesa, Goody i Taylora [3]; d. według Toyoshima i Wakabayashi [85]

niez w pozycji „nieblokującej” — zasocjowany jest tylko z jednym z dwóch łańcuchów monomerów aktyny i ściśle powtarza jego skręt. Stan odpowiadający rozkurczowi mięśnia *in vitro* symulowano badając cienkie filamenty w nieobecności jonów Ca^{2+} [22, 71] lub filamenty aktyny połączonej z tropomiozyną i TnI, składnikiem troponiny hamującym skurcz [59, 61, 87]. Wyniki optycznej dyfrakcji potwierdzają przesunięcie tropomiozyny ku brzegowi filamentu, chociaż w tym przypadku w trójwymiarowych rekonstrukcjach nie udało się rozróżnić ciągłego pasma tropomiozyny.

Trudności interpretacji wyników dyfrakcji ulegają zwielokrotnieniu w miarę przechodzenia do coraz bardziej złożonych układów; określenie konturów poszczególnych białek w trójwymiarowej rekonstrukcji cienkiego filamentu „udekorowanego” subfragmentem-1 miozyny, której przykład pokazuje ryc. 12, jest już bardzo dyskusyjne. Toteż nie tylko różni, lecz także ci sami autorzy w kolejnych publikacjach inaczej identyfikowali poszczególne regiony map gęstości materiału, otrzymanych metodą transformacji Fouriera. Do istotnych zmian interpretacji [71, 79] przyczyniły się nowe informacje o budowie filamentu samej aktyny, a w szczególności określenie ukierunkowania asymetrycznego monomeru aktyny w stosunku do linii Z w mięśni [71, 86]. Usytuowanie tropomiozyny w stosunku do subfragmentu-1 we wcześniejszych modelach (ryc. 13a i odnośnik [87]) okazało się nieprawidłowe, ponieważ identyfikację poszczególnych białek w tych modelach oparto na porównaniu „udekorowanych” filamentów z odwrotnie ukierunkowanymi filamentami samej aktyny z tropomiozyną [71, 78]. Zwrócono uwagę na destrukcje powodowane przez naświetlenie negatywowo barwionych preparatów w mikroskopie elektronowym i starano się ich uniknąć przez minimalną ekspozycję fotografowanych fragmentów [78, 84]. Kolejne modyfikacje modeli (ryc. 13) nie doprowadziły jeszcze do uzgodnienia poglądów. Szczególną trudność nadal sprawia identyfikacja tropomiozyny na filamencie udekorowanym subfragmentem-1 miozyny, ale nie ma też pełnej zgodności co do identyfikacji monomerów aktyny. W najnowszym modelu Amos i współprac. (ryc. 13c) i bardzo do niego zbliżonym modelu O'Briena i współprac. [59] subfragment-1 reaguje równocześnie z dwoma sąsiednimi monomerami aktyny z przeciwnych łańcuchów podwójnej helisy zgodnie z wynikami badań biochemicznych, w których metodą chemicznego sieciowania stwierdzono, że jedna główka miozyny jest w kontakcie z dwoma monomerami aktyny [56]. W najnowszym modelu Toyoshimy i Wakabayashi (ryc. 13d) subfragment-1 jest w kontakcie z jednym monomerem, zgodnie z nowszymi wynikami chemicznego sieciowania, które wykazały stechiometrię 1 : 1 [8, 25, 35, 77]. Wydaje się, że orientacja monomerów aktyny i usytuowanie tropomiozyny jest jednak bardziej

prawidłowa w modelu Amos i współprac. (ryc. 13c). Oba modele nie wykluczają możliwości przestrzennego blokowania wiązania główki miozynowej przez aktynę; chociaż w obu przypadkach obszar kontaktu subfragmentu-1 z aktyną jest rozległy, specyficzne miejsce wiązania jest z pewnością ograniczone do niewielkiej części tego obszaru.

Alternatywą fizycznego blokowania miejsca reagowania aktyny z miozyną jest modyfikacja struktury aktyny przez białka regulujące. Obecne poglądy na ten temat w świetle dowodów otrzymanych metodami biochemicznymi dyskutowane są w pracy [11]. Modyfikacja aktyny może ograniczać się do lokalnej zmiany konformacji monomeru zgodnie z wynikami wczesnych badań dyfrakcji promieni X na żywym mięśniu, które nie wykazały zmian strukturalnych parametrów helisy aktyny w zależności od stanu mięśnia [16, 40]. Możliwość większych zmian sygnalizowały analizy dyfrakcyjne parakryształów cienkich filamentów w obecności i nieobecności jonów Ca^{2+} [22, 60]. Do zagadnienia tego powrócono w ostatnich badaniach rentgenograficznych na mięśniu. Dzięki zwiększeniu dokładności pomiarów i znacznemu skróceniu czasu rejestracji obrazów dyfrakcyjnych przez użycie intensywniejszego, synchrotronowego źródła promieni X, udało się zauważyć zmiany intensywności refleksów odpowiadających lewo- i prawoskrętnej genetycznej helisie aktyny przy przejściu mięśnia ze stanu rozkurczu do izometrycznego skurczu i wykazać, że zmiany te wyprzedzają wzrost napięcia mięśnia [88]. Interpretacja tych obserwacji wymaga dalszych badań.

Można się spodziewać, że do lepszego poznania struktury cienkiego filamentu na poziomie molekularnym i jego oddziaływania z główkami miozyny przyczynią się wyniki prowadzonych obecnie w kilku laboratoriach analiz rentgenokrytalograficznych aktyny z rozdzielczością większą od uzyskiwanej dotychczas. Poznanie rozmieszczenia polipeptydowego łańcucha aktyny w obu domenach monomeru umożliwi wykorzystanie wielu już dostępnych informacji o udziale poszczególnych fragmentów łańcucha polipeptydowego aktyny w wiązaniu tropomiozyny i fragmentów główki miozynowej do rozstrzygnięcia wątpliwości nasuwających się w badaniach strukturalnych i weryfikacji proponowanych modeli.

WNIOSKI

1. Filament aktynowy wykazuje jednokierunkową strukturalną polarność wynikającą z kierunkowego ułożenia monomerów wzdłuż osi filamentu.

2. Jednokierunkowe ułożenie wiązek filamentów w stosunku do dysku Z w mięśniu szkieletowym, a do błony komórkowej w różnego rodzaju

wypustkach komórkowych, jest podstawą generacji kierunkowych sił powodujących skurcz i inne przejawy ruchliwości.

3. Inną konsekwencją polarności filamentu aktynowego jest wybiórcze przyłączanie na jednym z jego końców różnych białek spełniających w komórce rolę regulatorów długości polimeru aktyny.

4. Wśród modeli filamentu aktynowego coraz większe poparcie zyskuje nowy model, w którym asymetryczne, dwudomenowe monomery ułożone są dłuższą osią pod kątem do osi filamentu.

5. Monomery w filamencie mają swobodę kątowej rotacji rzędu około 10° , co ułatwia wytwarzanie połączeń z filamentami miozynowymi w procesach skurczu i, być może, z innymi białkami w różnych uporządkowanych strukturach komórkowych, pełniących funkcję cytoszkieletu i/lub odgrywających rolę w procesach ruchliwości.

6. Znajomość struktury filamentu aktynowego jest niezbędna do poznania mechanizmu oddziaływania aktyny z miozyną w procesie skurczu mięśnia.

LITERATURA

- [1] AEBI, U., FOWLER, W. E., BUHLE, E. L., SMITH, P. R., Electron microscopy and image processing applied to the study of protein structure and protein-protein interactions, *J. Ultrastruct. Res.*, **88**: 143 - 176, 1984.
- [2] AEBI, U., FOWLER, W. E., ISENBERG, G., POLLARD, T. D., SMITH, P. R., Crystalline actin sheets: their structure and polymorphism, *J. Cell Biol.*, **91**: 340 - 351, 1981.
- [3] AMOS, L. A., HUXLEY, H. E., HOLMES, K. C., GOODY, R. S., TAYLOR, K. A., Structural evidence that myosin heads may interact with two sites on F-actin, *Nature (London)*, **299**: 467 - 469, 1982.
- [4] ASTBURY, W. T., X-Ray and electron microscope studies, and their cytological significance, of the recently-discovered muscle proteins, tropomyosin and actin, *Exp. Cell Res., Suppl.*, **1**: 234, 1949.
- [5] BRETSCHER, A., WEBER, K., Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner, *Cell*, **20**: 839 - 847, 1980.
- [6] BROWN, S., YAMAMOTO, K., SPUDICH, J. A., A 40,000 dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca^{2+} dependent manner, *J. Cell Biol.*, **93**: 205 - 210, 1982.
- [7] CAPPUCINELLI, P., *Motility of Living Cells (Outline Studies in Biology)*, Chapman and Hall Ltd., 1980.
- [8] CHEN, T., APPLGATE, D., REISLER, E., Cross-linking of actin to myosin subfragment 1: course of reaction and stoichiometry of products, *Biochemistry*, **24**: 137 - 144, 1985.
- [9] COHEN, C., HANSON, J., AN X-ray diffraction study of F-actin, *Biochim. Biophys. Acta*, **21**: 177 - 178, 1956.
- [10] CRAIG, S. W., POWELL, L. D., Regulation of actin polymerization by villin,

- a 95,000-dalton cytoskeleton component of intestinal brush borders, *Cell*, **22**: 739 - 746, 1980.
- [11] DĄBROWSKA, R., Mechanizmy regulacji skurczu mięśni i ruchliwości komórkowej, *Post. Biol. Kom.*, **13**: 145 - 173, 1986.
- [12] DEPUE, R. H., Rice, R. V., F-actin is a right-handed helix, *J. Mol. Biol.*, **12**, 302 - 303, 1965.
- [13] DEROSIER, D. J., TILNEY, L. G., The form and function of actin. A product of its unique design, [w:] *Cell and Muscle Motility*, Vol. 5, red. J. W. Shay, Plenum Publishing Co. 1984, 139 - 169.
- [14] EGELMAN, E. H., DEROSIER, D. J., A model for F-actin derived from image analysis of isolated filaments, *J. Mol. Biol.*, **166**: 605 - 629, 1983.
- [15] EGELMAN, E. H., FRANCIS, N., DEROSIER, D. J., F-actin is a helix with a random variable twist, *Nature (London)*, **298**: 131 - 135, 1982.
- [16] EGELMAN, E. H., FRANCIS, N., DEROSIER, D. J., Helical disorder and the filament structure of F-actin are elucidated by the angle-layered aggregate, *J. Mol. Biol.*, **166**: 605 - 629, 1983.
- [17] EGELMAN, E. H., PADRÓN, R., X-ray diffraction evidence that actin is a 100 Å filament, *Nature (London)*, **307**: 56 - 58, 1984.
- [18] ELLIOT, G. F., LOWY, J., MILLMAN, B. M., Low-angle X-ray diffraction studies of living striated muscle during contraction, *J. Mol. Biol.*, **25**: 31 - 45, 1967.
- [19] ELZINGA, M., COLLINS, J. H., KUEHL, W. M., ADELSTEIN, R. S., Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2687 - 2691, 1973.
- [20] FOWLER, W. E., AEBI, U., A consistent picture of the actin filament related to the orientation of the actin molecule, *J. Cell Biol.*, **97**: 264 - 269, 1983.
- [21] GEIGER, B., Membrane-cytoskeleton interaction, *Biochim. Biophys. Acta*, **737**: 305 - 341, 1983.
- [22] GILLIS, J. M., O'BRIEN, E. J., The effect of calcium ions on the structure of reconstituted muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.*, **99**: 445 - 459, 1975.
- [23] GLENNEY, J. R., KAULFUS, P., WEBER, K., F-actin assembly modulated by villin. Ca^{2+} dependent nucleation and capping of the barbed end, *Cell*, **24**: 471 - 480, 1981.
- [24] GORDON, D. J., BOYER, J. L., KORN, E. D., Comparative biochemistry of non-muscle actins, *J. Biol. Chem.*, **252**: 8300 - 8309, 1977.
- [25] GREENE, L. E., Stoichiometry of actino S-1 cross-linked complex, *J. Biol. Chem.*, **259**: 7363 - 7366, 1984.
- [26] HANSON, J., Axial period of actin filaments, *Nature (London)*, **213**: 353 - 356, 1967.
- [27] HANSON J., LEDNEV, V., O'BRIEN, E. J., BENNETT, P. M., Structure of the actin-containing filaments in vertebrate skeletal muscle, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**: 311 - 318, 1972.
- [28] HANSON, J., LOWY, J., The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle, *J. Mol. Biol.*, **9**: 46 - 60, 1963.
- [29] HARRIS, D. A., SCHWARTZ, J. H., Characterization of brevin, a serum protein that shortens actin filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6798 - 6802, 1981.
- [30] HARRIS, H. E., BAMBURG, J. R., WEEDS, A. G., Actin filament disassembly in blood plasma, *FEBS Lett.*, **121**: 175 - 177, 1980.
- [31] HARRIS, H. E., WEEDS, A. G., Plasma gelsolin caps and severs actin filaments, *FEBS Lett.*, **177**: 184 - 188, 1984.
- [32] HASEGAWA, T., TAKAHASHI, S., HAYASHI, H., HATANO, S., Fragmin:

- a calcium ion sensitive regulatory factor of the formation of actin filaments, *Biochemistry*, **19**: 2677 - 2683, 1980.
- [33] HASELGROVE, J., X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**: 341 - 352, 1972.
- [34] HAYASHI, T., Ip, W., Polymerization polarity of actin, *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **3**: 163 - 169, 1976.
- [35] HEAPY, S., TREGGAR, R., Stoichiometry of covalent actin-subfragment 1 complexes formed on reaction with a zero-length crosslinking compound, *Biochemistry*, **23**: 2211 - 2214, 1984.
- [36] HEUSER, J. E., Procedure for freeze-drying molecules adsorbed to mica flakes, *J. Mol. Biol.*, **169**: 155 - 195, 1983.
- [37] HINSSEN, H., An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification, *Eur. J. Cell Biol.*, **23**: 225 - 233, 1981.
- [38] — An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca^{++} -dependence and other properties, *Eur. J. Cell Biol.*, **23**: 234 - 240, 1981.
- [39] HINSSEN, H., SMALL, J. V., SOBIESZEK, A., A Ca^{2+} -dependent actin modulator from vertebrate smooth muscle, *FEBS Lett.*, **166**: 90 - 95, 1981.
- [40] HUXLEY, H. E., X-Ray analysis and the problem of muscle, *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **141**: 59 - 62, 1953.
- [41] — Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle, *J. Mol. Biol.*, **7**: 281 - 308, 1963.
- [42] — The mechanism of muscular contraction, *Science*, **164**: 1356 - 1366, 1969.
- [43] — Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction, *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**: 361 - 376, 1972.
- [44] HUXLEY, H. E., BROWN, W., The low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor, *J. Mol. Biol.*, **30**: 383 - 434, 1967.
- [45] ISENBERG, G., AEBI, U., POLLARD, T., An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions, *Nature (London)*, **288**: 455 - 459, 1980.
- [46] ISENBERG, G., OHNHEISER, R., MARUTA, H., "Cap 90", a 90-kDa Ca^{2+} -dependent F-actin-capping protein from vertebrate brain, *FEBS Lett.*, **163**: 225 - 229, 1983.
- [47] JAKUBIEC-PUKA, A., FRÖSCH, D., RÜDEL, R., Ultrastructure of the contractile apparatus of muscle embedded in an aqueous medium, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, w druku.
- [48] KABSCH, W., MANNHERZ, H. G., SUCK, D., Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution, *EMBO J.*, **4**: 2113 - 2118, 1985.
- [49] KATAYAMA, E., WAKABAYASHI, T., Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. III. The multi-domain structure of actin-heavy meromyosin complex, *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**: 703 - 714, 1981.
- [50] KILLIMANN, M. W., ISENBERG, G. I., Actin filament capping protein from bovine brain, *EMBO J.*, **1**: 889 - 894, 1982.
- [51] KONDO, H., ISHIWATA, S., Uni-directional growth of F-actin, *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**: 159 - 171, 1976.
- [52] KORN, E. D., Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells, *Physiol. Rev.*, **62**: 672 - 737, 1982.

- [53] KORN, E. D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 588 - 599, 1978.
- [54] MARUYAMA, K., KIMURA, S., ISHII, T., KURODA, M., OHASHI, K., MURAMATSU, S., Beta-actinin, a regulatory protein of muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**: 215 - 232, 1977.
- [55] MOORE, P. B., HUXLEY, H. E., DEROSIER, D. J., Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **50**: 279 - 295, 1970.
- [56] MORNET, D., BERTRAND, R., PANTEL, P., AUDEMARD, E., KASSAB, R., Structure of the actin-myosin interface, *Nature (London)*, **292**: 301 - 306, 1981.
- [57] NAGASHIMA, H., ASAKURA, S., Dark-field light microscopic study of the flexibility of F-actin complexes, *J. Mol. Biol.*, **136**: 169 - 182, 1980.
- [58] O'BRIEN, E. J., BENNETT, P. M., HANSON, J., Optical diffraction studies of myofibrillar structure, *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, **261**: 201 - 208, 1971.
- [59] O'BRIEN, E. J., COUCH, J., JOHNSON, G. R. P., MORRIS, E. P., Structure of actin and the thin filament, [w:] *Actin: Its Structure and Function in Muscle and non-Muscle Cells*, red. C. dos Remedios, J. Barden, Academic Press, Sydney 1983, 3 - 15.
- [60] O'BRIEN, E. J., GILLIS, J. M., COUCH, J., Symmetry and molecular arrangement in paracrystals of reconstituted muscle thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **99**: 461 - 475, 1975.
- [61] O'BRIEN, E. J., MORRIS, E. P., SEYMOUR, J., COUCH, J., Structure and activity of the thin filament, [w:] *Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms*, red. S. Ehashi, K. Maruyama, M. Endo, Japan Scientific Societies Press, Tokyo; Springer Verlag, Berlin 1980, 147 - 164.
- [62] OLOMUCKI, A., HUC, C., LEFÉBURE, F., COUÉ, M., Isolation and characterization of human blood platelet gelsolin, *FEBS Lett.*, **174**: 80 - 85, 1984.
- [63] OOSAWA, F., The Flexibility of F-actin, *Biophys. Chem.*, **11**: 443 - 446, 1980.
- [64] — Macromolecular assembly of actin, [w:] *Muscle and Nonmuscle Motility*, red. A. Stracher, Vol. 1, Academic Press, New York 1983, 151 - 216.
- [65] PARRY, D. A. D., SQUIRE, J. M., Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles, *J. Mol. Biol.*, **75**: 33 - 55, 1973.
- [66] PINDER, J. C., OHANIAN, V., GRATZER, W. B., Spectrin and protein 4.1 as an actin filament capping complex, *FEBS Lett.*, **169**: 161 - 164, 1984.
- [67] PRÓCHNIEWICZ, E., YANAGIDA, T., Comparison of intermonomer interactions within polymers of chicken gizzard and rabbit skeletal muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**: 1215 - 1221, 1981.
- [68] dos REMEDIOS, C. G., DICKENS, M. J., Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions, *Nature (London)*, **276**: 731 - 733, 1978.
- [69] SAKABE, N., SAKABE, K., SASAKI, K., KONDO, H., EMA, T., KAMIYA, N., MATSUSHIMA, M., Crystallographic studies of the chicken gizzard G-actin DNase I complex at 5 Å resolution, *J. Biochem. (Tokyo)*, **93**: 299 - 302, 1983.
- [70] SELBY, C. C., BEAR, R. S., The structure of actin-rich filaments of muscles according to X-ray diffraction, *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **2**: 71 - 85, 1956.
- [71] SEYMOUR, J., O'BRIEN, E. J., The position of tropomyosin in muscle thin filaments, *Nature (London)*, **283**: 680 - 682, 1980.
- [72] SMITH, P. R., FOWLER, W. E., POLLARD, T. D., AEBI, K., Structure of the actin molecule determined from electron micrographs of crystalline actin

- sheets with a tentative alignment of the molecule in the actin filament, *J. Mol. Biol.*, **167**: 641 - 660, 1983.
- [73] SOUTHWICK, F. S., HARTWIG, J. H., Acumentin, a protein in macrophages which caps the "pointed" end of actin filaments, *Nature (London)*, **297**: 303 - 307, 1982.
- [74] SPUDICH, J. A., HUXLEY, H. E., FINCH, J. T., Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin, *J. Mol. Biol.*, **72**: 619 - 632, 1972.
- [75] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA, H., ZMORZYŃSKI, S., MOSSAKOWSKA, M., Bovine aorta actin. Development of an improved purification procedure and comparison of polymerization properties with actins from other types of muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **828**: 13 - 21, 1985.
- [76] SUCK, D., KABSCH, W., MANNHERZ, H. G., Three-dimensional structure of the complex of skeletal muscle actin and bovine pancreatic DNase I at 6-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 4319 - 4323, 1981.
- [77] SUTOH, K., Mapping of actin-binding sites on the heavy chain of myosin subfragment 1, *Biochemistry*, **22**: 1579 - 1585, 1983.
- [78] TAYLOR, K. A., AMOS, L. A., A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **147**: 297 - 324, 1981.
- [79] TAYLOR, K. A., AMOS, L. A., Structure of actin in reconstructed images of S-1 decorated filaments, [w:] *Actin: Its Structure and Function in Muscle and non-Muscle Cells*, red. C. dos Remedios, J. Barden, Academic Press, Sydney 1983, 25 - 26.
- [80] TILNEY, L. G., Interactions between actin filaments and membranes give spatial organization to cells, [w:] *Modern Cell Biology*, Vol. 2, red. J. R. McIntosh, Alan R. Liss, Inc, New York 1983, 163 - 199.
- [81] TILNEY, L. G., DEROSIER, D. J., MULROY, M. J., The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells, *J. Cell Biol.*, **86**: 244 - 259, 1980.
- [82] TILNEY, L. G., INOUÉ, S., The acrosomal reaction of Thyone sperm. II. The kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation, *J. Cell Biol.*, **93**: 820 - 827, 1982.
- [83] TOYOSHIMA, C., WAKABAYASHI, T., Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. I. Tilt angle of myosin subfragment-1 in the rigor complex, *J. Biochem. (Tokyo)*, **86**: 1887 - 1890, 1979.
- [84] — Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. IV. Reconstitution from minimal — and high-dose image of the actin-tropomyosin-myosin subfragment-1 complex, *J. Biochem. (Tokyo)*, **97**: 219 - 243, 1985.
- [85] — Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. V. Assignment of actin in the actin-tropomyosin-myosin subfragment-1 complex, *J. Biochem. (Tokyo)*, **97**: 245 - 263, 1985.
- [86] VIBERT, P., CRAIG, R., Three-dimensional reconstruction of thin filaments decorated with a Ca²⁺-regulated myosin, *J. Mol. Biol.*, **157**: 299 - 319, 1982.
- [87] WAKABAYASHI, T., HUXLEY, H. E., AMOS, L. A., KLUG, A., Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex, *J. Mol. Biol.*, **93**: 477 - 497, 1975.

- [88] WAKABAYASHI, K., TANAKA, H., AMEMIYA, Y., FUJISHIMA, A., KOBAYASHI, T., HAMANAKA, T., SUGI, H., MITSU, T., Time-resolved X-ray diffraction studies on the intensity changes of the 5.9. and 5.1 nm actin layer lines from frog skeletal muscle during an isometric tetanus using synchrotron radiation, *Biophys. J.*, **47**: 847-850, 1985.
- [89] WAKABAYASHI, T., TOYOSHIMA, C., Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. II. The multidomain structure of actin-myosin S1 complex, *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**: 683-701, 1981.
- [90] WANG, L.-L., BRYAN, L., Isolation of calcium dependent platelet proteins that interact with actin, *Cell*, **25**: 637-649, 1981.
- [91] WEEDS, A. G., Actin binding proteins — regulators of cell architecture and motility, *Nature (London)*, **296**: 811-816, 1982.
- [92] WEGNER, A., Head to tail polymerization, *J. Mol. Biol.*, **108**: 139-150, 1976.
- [93] WOODRUN, D. T., RICH, S., POLLARD, T. D., Evidence for biased unidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin by an improved method, *J. Cell Biol.*, **67**: 231-237, 1975.
- [94] YANAGIDA, T., NAKASE, M., NISHIYAMA, K., OOSAWA, F., Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin, *Nature (London)*, **307**: 58-60, 1984.
- [95] YIN, H. L., HARTWIG, J. H., MARUYAMA, K., STOSSEL, T. P., Ca^{2+} control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization, *J. Biol. Chem.*, **256**: 9693-9697, 1981.
- [96] YIN, H. L., STOSSEL, T. P., Purification and structural properties of gelsolin, a Ca^{2+} -activated regulatory protein of macrophages, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9490-9493, 1980.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-097 Warszawa.

Otrzymano: 15 grudnia 1985.

Przyjęto: 15 grudnia 1985.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
5708 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: (773) 936-3700
FAX: (773) 936-3700
WWW: www.uchicago.edu

MEMORANDUM FOR THE RECORD
SUBJECT: [Illegible]

[The following text is extremely faint and largely illegible. It appears to be a memorandum or report, possibly detailing a chemical synthesis or experimental procedure. Key words like "reaction", "product", and "analysis" are faintly visible.]

DATE: [Illegible]

BY: [Illegible]

APPROVED: [Illegible]

ROZWÓJ I ULTRASTRUKTURA ŻEŃSKIEGO GAMETOFITU ROŚLIN
OKRYTONASIENNYCH *DEVELOPMENT AND ULTRASTRUCTURE OF FEMALE GAMETOPHYTE
IN ANGIOSPERMS

Bohdan RODKIEWICZ i Józef BEDNARA

Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Streszczenie. Gametofity — męski i żeński rozwijają się pod epigenetyczną kontrolą sporofitu, który m. in. determinuje płęć gametofitu. W załączku najpierw rozwija się mejocyt oddzielający się od reszty komórek warstwą kalozy. Pod koniec I profazy kaloza zanika z jednego wierzchołka mejocytu — heteropolarizacja. Po mejozie bezkalozowy wierzchołek jest miejscem, gdzie rozwija się megaspóra funkcjonalna. W intermitotycznych okresach rozwoju gametofitu pojawia się i zanika ziarniste ER, a do ścian wbudowuje się osmofilny materiał. W synergidzie, ale nie w komórce jajowej, rozwija się ziarniste ER przekształcające się później w masę pęcherzyków, buduje się aparat włókienkowy, do bocznych ścian odkłada się materiał osmofilny, podczas gdy chalazalna ściana zanika — otwiera się droga dla komórki plemnikowej.

Summary. A meiocyte (fig. 1) after meiosis gives rise to a tetrad of megaspores (fig. 2). The three degenerating megaspores are covered by callose walls, while the functional megaspore wall is partly without callose (fig. 3). There is general coincidence between a lack of callose and the position of the functional megaspore in a tetrad.

Newly formed cells of egg apparatus are of very similar internal structure (figs. 4-6). They differentiate into two synergids and an egg cell. The developing synergids of *Stellaria media* set up a filiform apparatus (fig. 7) which seems to grow by addition of materials brought by large vesicles (fig. 8).

Long, rough ER cisternae are arranged along the developing synergids. These cisternae are later fragmented into vesicles (fig. 10). The ER development coincides with a deposition of osmiophilic material into the walls (fig. 14) of the micropylar and middle parts of the cells. At this time inside the walls appear numerous perpendicular fibrils (fig. 9). The walls become thicker but their chalazal parts are

* Referat wygłoszony podczas II Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, Warszawa, 18-20 IX 1985 r.

caused to stretch and thin down by growing cells. Eventually the chalazal walls are discontinued (fig. 15) and disappear. The microtubules are situated along the synergids (fig. 12).

An egg cell does not develop ER. A large vacuole in the middle seems to have its origin in a large number of vesicles apparently of dictyosomal origin (fig. 7).

GAMETOFITY I SPOROFITY W CYKLU ROZMNAŻANIA

Cykl płciowego rozmnażania rośliny należącej do grupy *Spermatophyta* (rośliny nasienne) kończy się wytworzeniem nasion. Aby nasienie powstało, potrzebne są trzy organizmy: dwa z nich są zróżnicowanymi płciowo haploidalnymi gametofitami, trzeci jest diploidalnym sporofitem [17, 20]. Zatrzymamy się tylko na gametofitach roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*). Jeden z gametofitów — żeński, nazywany megagametofitem lub woreczkiem zalążkowym, wytwarza komórkę jajową, drugi — męski gametofit (ziarno pyłku) wytwarza dwie gamety nazywane komórkami plemnikowymi. Oba gametofity mają mikroskopowe wymiary i są zbudowane z niewielkiej, zwykle ściśle określonej liczby komórek. Dojrzały gametofit żeński najczęściej jest siedmiokomórkowy, w tym jedna komórka jajowa; na dojrzały gametofit męski prawie wszystkich roślin okrytonasiennych składają się trzy komórki, w tym są dwie gamety.

Gametofity obu płci rozwijają się z komórek trzeciego organizmu zwanego sporofitem. Komórki, które dają początek gametofitom są położone w pręcikach i zalążkach zamkniętych w młodych pąkach kwiatowych. Gametofity rozwijają się z pomejotycznych zarodników: męski gametofit z mikrospory, a żeński z megaspory. Sporofity są zatem formalnie organizmami bezpłciowymi, ponieważ nie wytwarzają gamet, a tylko dwa rodzaje zarodników. Kiedy jednak mówimy o płciowych i bezpłciowych organizmach roślinnych, nie powinniśmy pojęcia płci zbyt nie antropomorfizować lub zoomorfizować. Wśród roślin są gatunki, których sporofity są zróżnicowane na dwie kategorie, jedne są roślinami męskimi i wydają kwiaty pręcikowe (męskie), inne są roślinami żeńskimi, mającymi kwiaty słupkowe (żeńskie). Rośliny te nazywamy żeńskimi i męskimi, mimo że nie wytwarzają one żadnych gamet, a tylko mikrospory lub megaspory. Jednak sporofity z megasporami różnią się od sporofitów z mikrosporami liczbą chromosomów i mają w zespołach chromosomowych chromosomy płciowe. Rośliny te różnią się także różnymi innymi cechami: wzrostem, długością życia, pokrojem [2, 3], co przypomina zróżnicowanie cech płciowych u zwierząt.

Ogromna większość gatunków roślin okrytonasiennych ma obupłciowe sporofity, tj. na jednej roślinie rosną pręciki i słupki, a w zespole chro-

mosomowym nie ma chromosomów płciowych. Toteż męskie gametofity rozwijające się w pręcikach nie różnią się chromosomami od żeńskich gametofitów rozwijających się w zalążkach. Żeńskie i męskie gametofity oraz sporofity mają takie same chromosomy i genomy, chociaż w sporoficie są one w podwojonej liczbie. Możliwości rozwojowe macierzystych komórek obu rodzajów gametofitów i sporofitu muszą więc być takie same. O kierunku rozwoju każdej z tych komórek powinny decydować warunki środowiska. Dlatego z mikrospory w normalnym pylniku *in situ* rozwija się gametofit męski (pyłek), ale jeśli odcięty pylnik hodować w specjalnych warunkach *in vitro*, mikrospory rozwiną się w haploidalne sporofity [32], a nie w męskie gametofity. Podobnie można by zmienić kierunek rozwoju megaspor, gdyby wiedzano, jakich warunków do tego potrzebuje zalążek. Dawne i nowsze doświadczenia pokazały, że z mejocytów w pylnikach mogą się w pewnych warunkach rozwijać twory bardzo podobne do żeńskiego gametofitu [35, 61]. To również dowodzi, jak labilny jest rozwój komórki, która w organizmie jest predestynowana do stania się gametofitem.

Struktura i płęć gametofitu kształtuje się więc zależnie od organu, w którym nastąpiła indukcja mejotyczna. Przedmejotyczne komórki macierzyste mikrospor i megaspor muszą mieć identyczne możliwości rozwojowe, przynajmniej u roślin obupłciowych. Dlatego też nie bez racji pręciki nazywane są organami męskimi [17], a słupki z zalążkami żeńskimi, bo determinują one tylko płęć gametofitów, chociaż nie mają bezpośredniego związku z gametami.

MEGASPOROGENEZA

Rozwój gametofitu żeńskiego zaczyna się od jednej komórki nazywanej megasporą funkcjonalną. Jest ona jedną z czterech megaspor (w typie monosporowego rozwoju), które powstają po mejotycznym podziale komórki macierzystej położonej w wierzchołkowej części zalążka [1, 2]. Tylko w tym miejscu tworzą się warunki do rozpoczęcia mejozy i ukształtowania się megaspor w procesie mejotycznego podziału, a następnie zróżnicowania się megaspor funkcjonalnej. W zalążkach niektórych gatunków roślin zasięg indukcji mejotycznej jest nieco większy, ale nie obejmuje więcej niż kilkanaście komórek.

Przy badaniu megasporogenezy nasuwa się od razu kilka problemów dotyczących: a) czynników, które indukują mejozę, zwykle w jednej z wielu komórek zalążka; b) mechanizmów mejotycznych przekształceń chromosomów; c) przemian plastydów i mitochondriów; d) ultrastruktury

ralnych i molekularnych przemian cytoplazmy właściwej diploidalnej komórce sporofitu, jaką jest komórka macierzysta, na cytoplazmę haploidalnej komórki gametofitu, którą jest megaspora; e) determinacji jednej megaspori funkcjonalnej z czwórki (tetrady) megaspor powstających w monosporowym typie rozwoju woreczka zalążkowego.

Nie wiemy zupełnie, jakie są induktory mejozy. Formułuje się jedynie bardzo ogólne przypuszczenia. Mechanizm przejścia komórki z podziałów mitotycznych do mejozy prawdopodobnie musi być niezwykle stabilny i niezawodny, bowiem mejotycznie dzielą się tylko ściśle określone komórki, kiedy jakieś czynniki pochodzące z całej rośliny ukonstytuują w jednym miejscu zalążka warunki odpowiednie do inicjacji mejozy [41]. Wszystkie dotychczasowe wysiłki doprowadzenia do mejozy i rozwoju pyłku w hodowlach *in vitro* odciętych, przedmejotycznych pylników były nieudane. Natomiast pylniki, w których mejoza się rozpoczęła, mogą po przeniesieniu *in vitro* dojrzewać i wytwarzać pyłek. Wystarczy, aby mejocyty w przenoszonych pylnikach były w stadium leptotenu.

Znane są dosyć dokładnie strukturalne i ultrastrukturalne procesy zachodzące w chromosomach podczas pierwszej profazy mejotycznej [65]. Warunkują one wymianę oraz późniejszą redukcję liczby chromosomów. Po redukcji i po zakończeniu drugiego podziału mejotycznego tworzy się tetrada zarodników (spor). Większość obserwacji mejozy dotyczy mikrosporogenezy, ale sądzi się, że mejoza przebiega zasadniczo tak samo wszę-

Fot. 1. Zalążek *Stellaria media* z mejocytem w fazie leptotenu (pierwsza profaza mejotyczna); półcienki preparat barwiony błękitem toluidyny. Pow. 600 ×

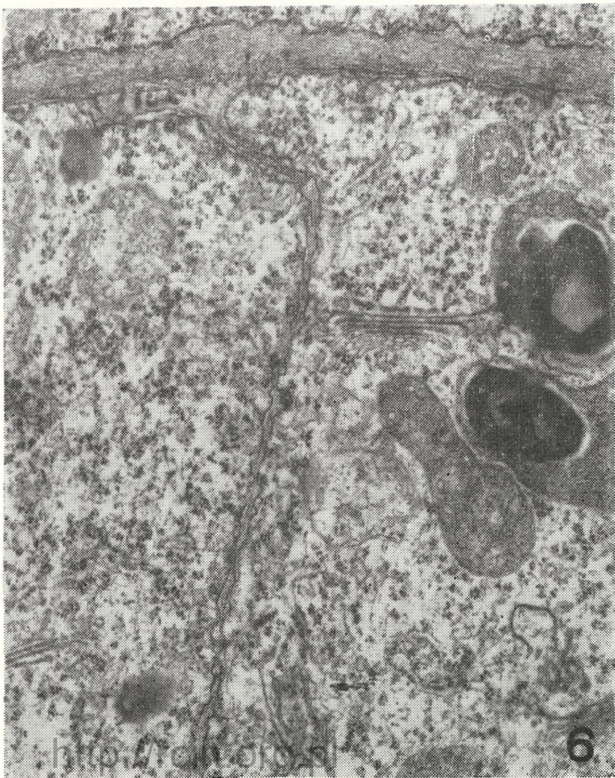
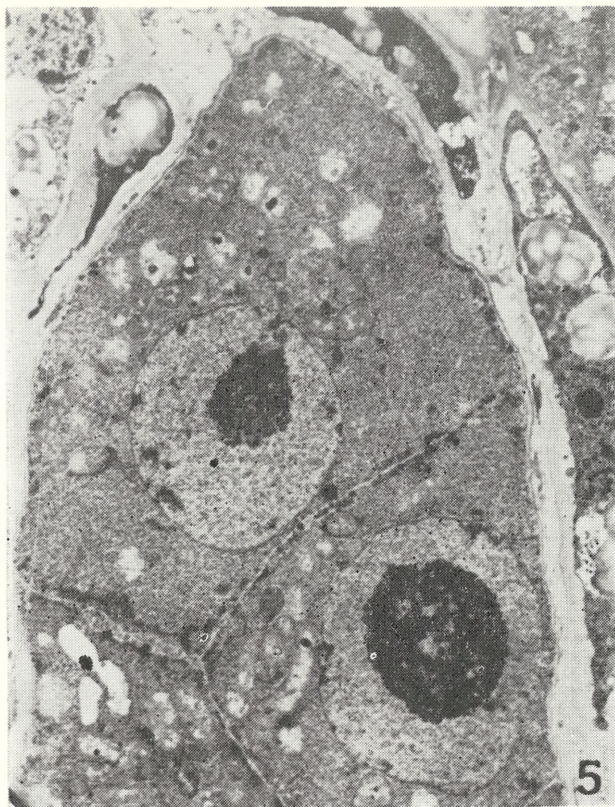
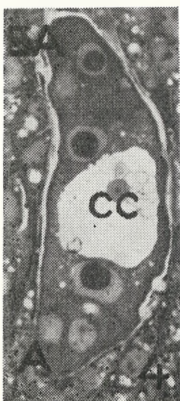
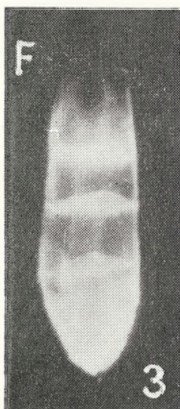
Fot. 2. Tetrada megaspor *Fuchsia hybrida hort.* U góry megaspora funkcjonalna z cienką ścianą na wierzchołku mikropylarnym. Preparat gnieciony, niebarwiony. Pow. 600 ×

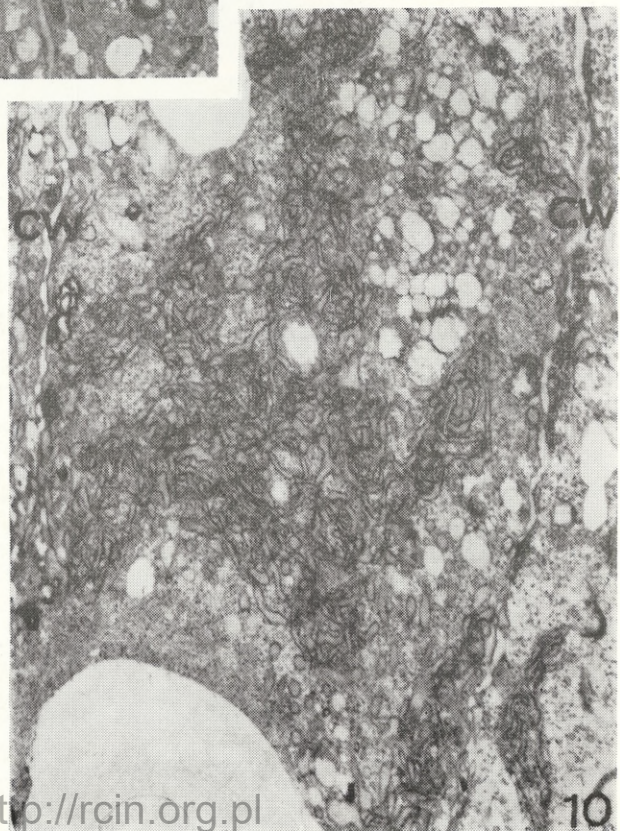
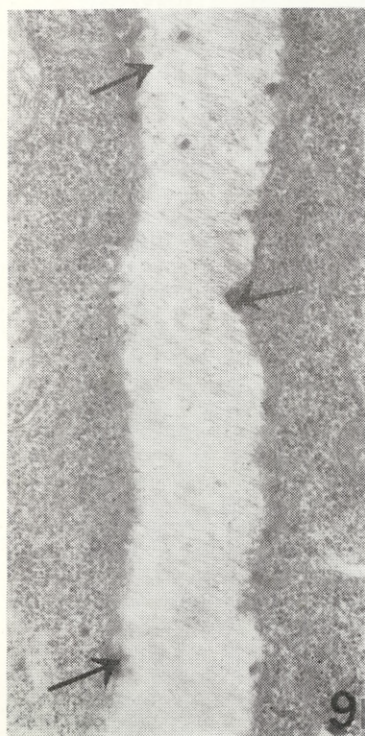
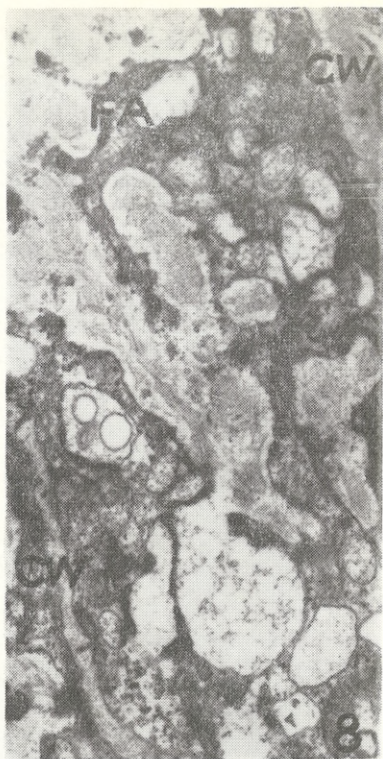
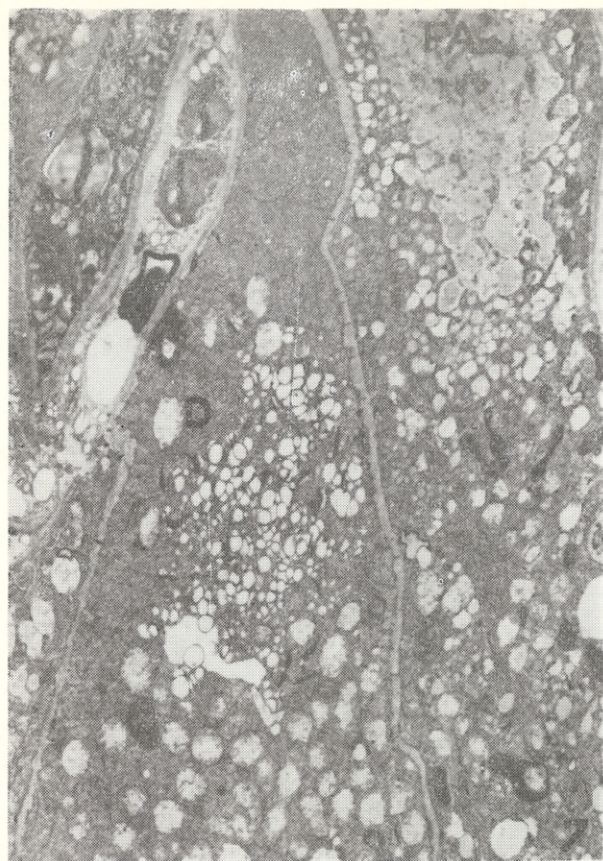
Fot. 3. Tetrada megaspor *Fuchsia hybrida hort.*, ściany komórkowe fluoryzują po reakcji na kalozę z błękitem aniliny. Fluorescencja całych ścian trzech degenerujących megaspor i tylko części ściany megaspori funkcjonalnej. Mikroskop fluorescencyjny. Pow. 600 ×

Fot. 4. Gametofit żeński (woreczek zalążkowy) *Stellaria media* we wczesnym stadium komórkowym. U góry widoczne dwie komórki (z trzech) aparatu jajowego, jądra komórkowe są jasne; środek zajmuje komórka centralna z dużą wakuolą i dwoma jądrami komórkowymi, w każdym ogromne jąderko. Dolną (chalazalną) część wypełniają trzy antypody, u niektórych roślin rozrastają się one do znacznych rozmiarów [8]. Półcienki preparat barwiony błękitem toluidyny. Pow. 600 × (wg [46])

Fot. 5. Młode komórki aparatu jajowego *Stellaria media* wkrótce po zbudowaniu ścian komórkowych. Pow. 8000 × (wg [46])

Fot. 6. Cytoplazma młodych synergid w woreczku zalążkowym *Epilobium*, w okresie rozbudowywania ścian komórkowych. Widać plastydy ze skrobią, mitochondria i diktyosomy. Pow. 20 000 × (wg [4])





dzie, a więc i w megasporogenezie. Megasporogeneza jednak prowadzi do utworzenia tetrady zarodników inaczej rozmieszczonych niż w tetradzie powstałej po mikrosporogenezie. Różnicę tę warunkuje kształt megasporocyta i mikrosporocyta. W kulistym mikrosporocycie wrzecziono drugiego podziału mejotycznego jest pod pewnym kątem do osi pierwszego podziału, co prowadzi zwykle do tetraedrycznego ułożenia się czterech mikrospor w tetradzie. Podłużny megasporocyt (w rozwoju typu monosporowego) dzieli się poprzecznymi ścianami na cztery megaspory ułożone liniowo wzdłuż osi mikropylarno-chalazalnej (fot. 2). Każda z tych megaspor jest inaczej położona względem komórek zalążka i być może znajduje się w innym miejscu pola morfogenetycznego. Megaspory, chociaż powinny mieć takie same geny, nie rozwijają się identycznie. W tetradzie uprzywilejowana, funkcjonalna staje się jedna z megaspor wierzchołkowych. Rozwija się ona w gametofit żeński, podczas gdy pozostałe degenerują i podlegają kompletnej hydrolizie.

POŁOŻENIE MEGASPORY FUNKCJONALNEJ

Jedna z komórek zalążka zaczyna mejozę (fot. 1) i we wczesnej profazie otacza się polisacharydową warstwą kalozową. W tym czasie wszystkie inne komórki utrzymują ściany celulozowo-pektynowe. Wkrótce jednak część warstwy kalozowej, obejmującej jeden z wierzchołków mejotycznej komórki, znika, ale reszta warstwy okrywającej boki i drugi wierzchołek mejocytu pozostaje do końca mejozy. Powstałe cztery megaspory są także oddzielone od siebie ścianami kalozowymi. Megaspory funkcjonalną staje się ta, która jest położona na wierzchołku, gdzie nie ma ciągłej warstwy kalozowej (fot. 3), a inne megaspory otoczone kalozą wkrótce degenerują.

Fot. 7. Część komórki jajowej (z lewej) i synergidy *Stellaria media* po stronie mikropylarnej. W komórce jajowej strefa homogennej cytoplazmy, diktyosomy D i pęcherzyki na obszarze, gdzie utworzy się wakuola, poniżej mitochondria i plastydy. W synergidzie aparat włókienkowy FA, niżej gęsta cytoplazma z dużą liczbą cystern i pęcherzyków ER, mitochondriów i plastydów. Pow. 8000 ×

Fot. 8. Pogranicze aparatu włókienkowego FA i cytoplazmy. Pęcherzyki z zawartością zdają się łączyć z wyrostkami aparatu włókienkowego, ściany synergidy CW. Pow. 20 000 ×

Fot. 9. Ściana między synergidami, wewnątrz delikatne fibryle ułożone prostopadle do powierzchni. Między ścianą i cytoplazmą oraz w ścianie grudki osmofilnego materiału (strzałki). Pow. 25 000 ×

Fot. 10. Środkowa część synergidy. Pasma cystern ER, które powstały po fragmentacji dłuższych cystern CW — ściany synergidy. Pow. 12 000 ×

Bezkalozowy wierzchołek megasporocytu i funkcjonalna megaspora ogromnej większości gatunków monosporowych znajdują się po chalazalnej stronie załączków. Jedynie w rodzinie *Onagraceae* mikropylarna strona tetrazy jest pospolitym miejscem różnicowania się megasporę funkcjonalnej i w tej części ściana mejocytu nie ma też kalozy. To zdaje się wskazywać, że chemiczne zróżnicowanie ściany profazowego mejocytu określa, która z megaspor w ciągu mejozy stanie się funkcjonalna.

Mejocyty pewnych gatunków *Oenothera* nie mają ściany kalozowej. Megasporę funkcjonalną różnicują się tam po mejozie na obu wierzchołkach tetrazy, a dwie środkowe megasporę degenerują wcześniej, ponieważ podczas podziału mejotycznego nie otrzymują plastydów. To wydaje się potwierdzać przypuszczenie, że różne właściwości chemiczne ściany na wierzchołkach mejocytu określają różny kierunek rozwoju zlokalizowanych tam megaspor, a jeżeli takiego zróżnicowania nie ma, obie megasporę mogą stać się funkcjonalne. Wszystkie te obserwacje nad rozmieszczeniem kalozy i jej związku z megasporogenezą dokonane przez nas i przez Brylass-Górską, Kuran i Snieżko były następnie potwierdzone i zreferowane [9, 27].

Zmieniona chemicznie ściana mejocytu nie jest jedynym czynnikiem określającym miejsce różnicowania się funkcjonalnej megasporę. Widać to z rezultatów megasporogenezy w załączkach międzygatunkowych mieszańców *Oenothera*. Krzyżowano gatunki, których mejocyty miały bardzo mało kalozę w ścianie i megasporę funkcjonalną rozwijającą się na obu wierzchołkach tetrazy, z gatunkiem mającym kalozę w ścianie mejocytu i funkcjonalną megasporę położoną na mikropylarnym wierzchołku tetrazy tak, jak u prawie wszystkich *Onagraceae*. Wśród mieszańców F_2 znalazły się rośliny z mejocytami bez kalozę w ścianie, a mimo to z funkcjonalną megasporą różnicującą się prawie zawsze na wierzchołku mikropylarnym tetrazy [55-58].

Muszą być zatem inne niż kalozę czynniki kierujące różnicowaniem się megasporę funkcjonalną w określonym miejscu załączka i tetrazy. Możemy o nich mówić tylko spekulatywnie. Przypisuje się znaczenie położeniu komórek względem tkanki przewodzącej, gradientom hormonów bez wątplenia tworzącym się w załączku, parcjalnemu ciśnieniu tleniu [53], a także napięciom i ciśnieniom powodowanym przez otaczającą tkankę [30]. Wszystkie te czynniki mogą być morfogenetyczne, ale w ustalonych gatunkach z gametofitem o monosporowym lub bisporowym typie rozwoju mniej lub bardziej wyraźne, chemiczne zróżnicowanie ściany mejocytu jest skorelowane z położeniem megasporę funkcjonalną. Wszędzie była widoczna zbieżność między brakiem kalozę na wierzchołku mejocytu i położeniem funkcjonalnej megasporę.

WARSTWA KALOZOWA

Terminem kaloza określa się materiał, którego chemizm i oznaczanie cytochemiczne są dyskusyjne [54, 45], ale który zjawia się w ściśle określonych miejscach podczas rozwoju rośliny oraz w warunkach doświadczalnych. Warstwa kalozowa była dokładniej badana w mikrosporogenezie niż w megasporogenezie. Kaloza zjawia się w ścianie mikrosporocytu na początku pierwszej profazy mejotycznej. Według opisów jednak warstwa kalozy zaczyna się odkładać zależnie od gatunku w nieco innym stadium. Początkiem syntezy warstwy kalozowej w mikrosporocytach *Cucurbita ficifolia* jest leptoten [16], w mikrosporocytach *Olea europea* — zygoten [36], a w pręcikach kwiatów pszenicy synteza kalozy rozpoczyna się w przedmejotycznych komórkach archesporialnych [33]. Na ogół jednak początek syntezy odnosi się do okresu wczesnej profazy mejotycznej. Trudno stwierdzić, czy te różnice są rzeczywiste, a nie wynikają z braku dokładności oceny stadium rozwojowego komórki lub ze stosowania różnych metod do wykrycia pierwszych, bardzo małych złogów kalozy.

Za pomocą mikroskopu elektronowego prześledzono rozwój ścian kalozowych w pylnikach pszenicy [33]. W miejscach przy ścianie komórki archesporialnej, gdzie zaczyna się odkładać kaloza, znajduje się gęsta cytoplazma z dużą liczbą pęcherzyków różnej wielkości i dużo osmofilnych cząstek. Prawdopodobnie jedne pęcherzyki niosą enzymy do rozcinaania błony komórkowej, a inne zawierają prekursorzy kalozy. W pierwszej fazie błona komórkowa jest rozciniwana, a jej płaty odrywają się od ściany komórkowej. Na te miejsca dostają się pęcherzyki z prekursorami kalozy, po czym następuje synteza i budowa warstwy kalozowej oraz zjawia się nowa błona komórkowa.

Można wnioskować, że przy budowie warstwy kalozowej zmienia się cała błona komórkowa lub jej część. Jeżeli tak jest, to można sobie wyobrazić, że zmienia się przy tym skład i rozmieszczenie receptorów. Receptory związków czynnych (hormony) były odkryte na powierzchni błony komórkowej rozmaitych komórek roślinnych [14] i powinny być na mejocytach. Postulowana zmiana układu lub kategorii receptorów musi naturalnie wpływać na kierunek różnicowania się komórki.

Twierdzi się, że ściana kalozowa jest dużo mniej przepuszczalna od ściany celulozowej, zwłaszcza dla większych cząsteczek. Dlatego w początkowym, krótkim okresie, kiedy mejocyt jest w całości otoczony warstwą kalozy, izoluje się on w jakimś stopniu od wszystkich pozostałych komórek załączka. Kiedy zaś kaloza zanika z jednego wierzchołka mejocytu, pogłębia się jego biegunowe zróżnicowanie i w miejscu, gdzie jest

najlepsza komunikacja z tkankami załączka, powstają warunki do założenia się megasporu funkcjonalnej. Miejsce to, prócz braku kalozowej warstwy, odznacza się jako jedyne w mejocycie licznymi plazmodesmami [5, 52, 48].

PRZEKSZTAŁCENIA W CYTOPLAZMIE MEJOCYTU

W ciągu mejozy zmienia się wygląd cytoplazmy, przy tym najbardziej widocznie przekształcają się cysterny endoplazmatycznego reticulum (ER), a mniej wyraźnie mitochondria i plastydy. Podczas profazy w mejocycie lilii pojawia się bardzo dużo długich cystern ziarnistego ER, które następnie tworzą koncentryczne układy zamykające pewną część cytoplazmy podstawowej razem z częścią mitochondriów i plastydów. Później otoczona cytoplazma i organelle w większości ulegają hydrolizie. To zjawisko przez długi czas było obserwowane przez Mikulską i Rodkiewicza, a później innych [lit. w 21, 26] tylko w tetrasporowym typie rozwoju gametofitu, do którego należy lilia. Nie można go było uogólnić aż do czasu, kiedy zasadniczo podobne zmiany ER stwierdzili Schulz i Jensen [53] w megasporogenezie *Capsella bursa pastoris* (z gametofitem monosporowego typu). ER w pachytenowym megasporocycie przekształca się w koncentryczne układy cystern i pojedyncze, koncentrycznie zamknięte cysterny. W koncentrycznych układach tylko zewnętrzna powierzchnia brzeżnej cysterny zachowuje rybosomy, a w pojedynczych, koncentrycznych cysternach rybosomy są na obu powierzchniach cysterny.

W czasie mejotycznej profazy plastydy zaokrąglają się, tracą wewnętrzną strukturę, ale zachowują rybosomy i często są połączone z cysternami ziarnistego ER [5, 48, 53]. Podobnie upraszcza się wewnętrzna struktura mitochondriów [48]. Z cystern ER połączonych z plastydami mogą być wyprowadzone enzymy hydrolityczne. Pojawiają się one na obszarze cytoplazmy, a zwłaszcza układów cystern ER [47], jak pokazano później kwaśna fosfataza jest zlokalizowana w cysternach ER oraz niektórych mitochondriach i plastydach [53]. Prawdopodobnie organelle te i cysterny ER wraz z zamkniętą przez nie cytoplazmą stają się autofagicznymi wakuolami.

Proces masowej autofagii prowadzi do zniszczenia wielkiej liczby rybosomów, części cytoplazmy i organelli. Przypuszcza się, że chodzi o zniszczenie materiałów, zwłaszcza rybosomów zbudowanych pod kontrolą diploidalnego genomu komórki sporofitu [11, 12]. Potem następuje szybka synteza nowego materiału komórki haploidalnej. W funkcjonalnej megasporze rozrasta się jąderko i materiał rybosomowy przechodzi do cytoplazmy, gdzie powstają nowe rybosomy tworzone pod kontrolą haploidalnego genomu [43].

GAMETOFIT WOLNOJĄDROWY

Gametofit żeński rozwijający się z funkcjonalnej megaspory jest początkowo wolnojądrową komórką, która w monosporowym rozwoju typu *Polygonum* liczy ostatecznie osiem jąder komórkowych powstałych po trzech cyklach bez następujących cytokinez. Dopiero ośmiojądrowa komórka dzieli się ścianami na sześć komórek jednojądrowych i jedną dwujądrową. O całym tym procesie mamy najmniej danych.

Na początku procesu megaspora funkcjonalna rośnie i zgniata sąsiednie komórki ośrodka, przy czym trzy degenerujące megaspory są także zgniatane. Zgniecione komórki i ich ściany komórkowe są hydrolizowane enzymatycznie i prawdopodobnie stają się wyjątkowym środowiskiem sprzyjającym rozwojowi młodego gametofitu. Niedawno pokazano, że oligosacharydy powstające z enzymatycznego trawienia hemicelulozy i pektyn, tj. składników ścian komórkowych, działają podobnie jak hormony [42].

W rozwijającej się megasporze funkcjonalnej *Capsella bursa pastoris* [51] cytoplazma wypełnia się gęsto rybosomami, ale po obu stronach jądra są duże wakuole z resztkami cytoplazmy i trawionymi plastydami i mitochondriami. Część plastydów i mitochondriów pozostaje jednak nienaruszona, a niektóre z nich, jak się zdaje, są w trakcie podziału. Na ścianie komórkowej po stronie chalazalnej, gdzie są plazmodesmy, pojawiają się wyrostki na kształt kosmków skierowanych do wnętrza komórki [51], podobnie jak na chalazalnej ścianie profazowego mejocytu i funkcjonalnej megaspory storczyka [6]. Przystosowują one tę stronę szybko rosnących komórek do chłonięcia pokarmu.

Po mitozie dwa jądra rozmieszczają się w przeciwległych wierzchołkach gametofitu. Środek jego zajmuje duża wakuola z resztkami trawionych organelli; są one jeszcze widoczne w stadium czterojądrowego gametofitu [48] i później (fot. 4). Wyrostki ściany znikają, ale plazmodesmy nadal przecinają ścianę chalazalnego wierzchołka. Według tego samego typu rozwija się gametofit *Stellaria media*.

W okresach między mitozami gametofit *Stellaria media* rozbudowuje w cytoplazmie długie cysterny szorstkiego ER, które prawdopodobnie pod koniec każdego okresu rozpadają się na drobne pęcherzyki, tak że cysterny ER prawie całkowicie znikają. Kiedy cysterny ER są liczne, niektóre z nich przylegają do błony komórkowej gametofitu. W tych cysternach bywają widoczne drobne, kuliste, osmofilne kuleczki. Takie same kuleczki leżą także przy błonie komórkowej, między błoną a ścianą komórkową, oraz są zagłębione w ścianie. Na podstawie rozmieszczenia osmofilnych kuleczek, można przypuszczać, że mogą one być przenoszone przez cysterny ER, przechodzą błonę komórkową, a następnie są wbu-

dowywane do ściany komórkowej, w której tracą swe właściwości osmo-filne, ściana komórkowa wolnojądrowego gametofitu rozbudowuje się, jak można sądzić, w okresach między mitozami [46].

PODZIAŁ GAMETOFITU NA KOMÓRKI

Po przejściu trzech cykli mitotycznych następuje w gametofitycznej komórce bardzo słabo poznany okres cytokinezy. Jest on krótki w porównaniu z czasem rozwoju gametofitu i dlatego trudny do znalezienia na preparatach przygotowywanych do mikroskopu elektronowego. Znajomość cytokinezy w gametoficie jest zatem ułamkowa.

Stadium tworzenia się ścian komórkowych w żeńskim gametoficie *Hordeum vulgare* znajdowano najpierw za pomocą mikroskopu świetlnego na skrawkach mikrotomowych. Skrawki te następnie zatapiano w żywicy i krajano na ultramikrotomie dla celów mikroskopii elektronowej [10].

W wierzchołku mikropylarnym z czterema jądrami komórkowymi ściany komórkowe zakładają się w cytoplazmie z czynnymi diktyosomami, dużą ilością ER i mikrotubul. Diktyosomy wytwarzają wtedy dwa rodzaje pęcherzyków — jedne z gęstą zawartością, inne raczej przezroczyste. Cyterny ER są albo ukształtowane koliście, albo często nieregularnie rozdęte i rozgałęzione. Przylegają one w wielu miejscach do rosnącej ściany. W pierwszej obserwowanej fazie ściana zaznacza się jako pasmo paciorkowatych tworów, które, jak się zdaje, zespala się w ścianę z dużymi otworami. Wygląda ona w przekroju jak wiele paciorkowatych odcinków, a powinna mieć kształt sieci z dużymi oczkami. Przy końcach tych odcinków, czyli w otworach ściany leżą pęki mikrotubul prostopadłych do płaszczyzny podziału. Tym układem mikrotubule przypominają fragmoplast zwykłej cytokinezy.

Do paciorkowatej ściany ściśle przylegają rozdęte cysterny ER. Nieco później ściana przestaje mieć wygląd paciorkowaty, jej powierzchnia wyrównuje się, otwory znikają i ściana grubieje. Przynajmniej część materiałów zużywanych w tym procesie powinna pochodzić z cystern ER [10].

Nie jest jasne, czy mikrotubule widoczne w otworach ściany pochodzą z wrzeciona cytokinetycznego, jak w bielmie pszenicy [8], czy powstały niezależnie od tego wrzeciona, zgodnie z opisem Bajera i Mol'e-Bajer [1], przyżyciowo oglądanej cytokinezy w izolowanych fragmentach bielma.

RÓŻNICOWANIE SIĘ APARATU JAJOWEGO

Młody aparat jajowy składa się zwykle z trzech komórek o bardzo podobnym merystematycznym wyglądzie, stłoczonych w mikropylarnym wierzchołku gametofitu (fot. 4 i 5). Komórki są wypełnione gęstą cytoplazmą z dużą liczbą organelli i ER oraz minimalną liczbą małych wakuoli. Od strony chalazalnej przylega do nich duża komórka centralna. Te cztery komórki później są bezpośrednio zaangażowane przy zapłodnieniu [23-26, 59, 60, 63, 64]. Przed spełnieniem swoich funkcji każda z tych komórek przechodzi inną drogę różnicowania. Wprawdzie synergidy różnicują się tak samo, ale w okresie zapłodnienia tylko jedna z nich może przyjąć łagiewkę i komórki plemnikowe, druga prawdopodobnie tej zdolności z jakichś przyczyn nie ma.

Jedynie bardzo rzadko aparat jajowy jest zredukowany, np. krańcową redukcją aparatu jajowego odznaczają się gatunki z rodzaju *Plum-samotną* komórkę jajową przybierającą jednak pewne cechy synergidy. jedynie komórkę jajową przybierającą jednak pewne cechy synergidy. Na wierzchołku mikropylarnym tej komórki rozwija się aparat włókienkowy i, podobnie jak w synergidzie, do tego aparatu wrasta łagiewka. Nie wchodzi ona tutaj do wnętrza komórki, ale rośnie wzdłuż ściany komórki jajowej i otwiera się przy jej chalazalnym wierzchołku. Tam, na granicy między komórką jajową i komórką centralną, wydostają się z łagiewki komórki plemnikowe [50].

Komórki aparatu jajowego, początkowo spłaszczone lub mniej więcej izodiametryczne, rosną w kierunku chalazalnym i przybierają kształt gruszkowaty. Jednocześnie zmienia się budowa ścian komórkowych i wygląd cytoplazmy. Zmiany te w synergidach są zupełnie inne niż w komórce jajowej. Toteż komórka jajowa dojrzałego gametofitu, rozwijającego się według typu *Polygonum*, różni się bardzo wyraźnie od synergid (fot. 15).

W gametoficie *Peperomia* (tetrasporowy rozwój typu *Peperomia*) żadnych oczywistych różnic w budowie komórek aparatu jajowego nie zauważono [3, 40]. Komórki te i niektóre inne komórki gametofitu są kuliste, osłonięte tylko błoną komórkową, ale bez ścian komórkowych znajdujących we wszystkich dotychczas opisanych komórkach aparatu jajowego. Komórka jajowa w gametoficie *Peperomia* odróżnia się od innych tylko położeniem przy mikropyle. Mimo braku różnic strukturalnych komórki te pełnią różne funkcje, bowiem jedynie komórka jajowa łączy się z gametą męską i zamienia się w zygote.

W ogromnej większości opisanych gatunków aparat jajowy różnicuje się w podobny sposób [25, 26]. Jego wydłużające się komórki mają gęstą

cytoplazmę i po jednej wakuoli powiększającej się do dużych rozmiarów, przy czym wakuola zajmuje chalazalną część synergidy i znajduje się poniżej jądra komórkowego; w komórce jajowej zaś wakuola rozwija się w środkowej części komórki, powyżej jądra komórkowego, które jest przesunięte do wierzchołka chalazalnego. Tak umiejscowione jądro będzie blisko obszaru, dokąd zdążają gamety męskie. Gamety te wprowadzone do synergidy przenoszą się w bliżej nie wyjaśniony sposób do przestrzeni między wierzchołkiem komórki jajowej i jądrem komórki centralnej. Potem jedna z gamet łączy się z komórką jajową, a druga z komórką centralną.

Gamety męskie, jak dotychczas sądzono, są zupełnie jednakowymi siostrzanymi komórkami. W rodzaju *Plumbago* jednak gamety te różnią się zawartością plastydów. Jedna z nich zawiera plastydy, druga jest ich pozbawiona. Pierwsza prawie zawsze łączy się z komórką centralną, a druga z komórką jajową [49, 50]. Jak dochodzi do zróżnicowania gamet, a później do wybiórczej syngamii, nie wiadomo.

KOMÓRKA JAJOWA

Jedna z trzech bardzo podobnych komórek aparatu jajowego różnicuje się w komórkę jajową. Przybiera ona zdecydowanie inną budowę od różnicujących się obok synergid. Jak wspomniano, przede wszystkim jądro komórkowe i wakuola są w niej inaczej położone niż w synergidach. Podczas rozwoju nie zauważono nigdy w komórce jajowej dużej ilości cystern ER, których obfitość jest typowa dla synergid [24, 26].

Przed pojawieniem się wakuoli w środkowym obszarze wydłużonej komórki jajowej gromadzą się diktyosomy i duża liczba pęcherzyków prawdopodobnie diktyosomalnego pochodzenia (fot. 7). Później tę strefę komórki zajmuje duża wakuola, która być może powstaje ze złączenia się tych pęcherzyków [44], natomiast wakuola synergidy rozwija się zupełnie inaczej [46].

Na ogół komórkę jajową opisuje się jako fizjologicznie nieczynną w dojrzałym gametoficie. Zdjęcie 15 pokazuje komórkę jajową nieco młodszego gametofitu. Jądro jego komórki jajowej ma bardzo duże jąderko, co dowodzi, że komórka jest aktywna fizjologicznie, podobnie jak komórka centralna, w której jądro i jąderko rozrastają się do olbrzymich rozmiarów. Prócz tego w komórce centralnej rozwinięty jest system cystern szorstkiego ER.

Ściana komórki jajowej rozwija się podobnie jak ściany synergid, wyjąwszy brak aparatu włókienkowego. Zresztą większa część tych ścian

jest wspólna i właściwie przypomina przegrody pierwotne, a nie typowe ściany komórkowe [44]. Wierzchołek chalazalny dojrzałej komórki jajowej jest pozbawiony ściany lub okrywa go ściana z dużymi otworami [26, 63]. Wskutek takich przystosowań gameta męska może łatwo dokonać w tym miejscu zapłodnienia.

ROZWÓJ SYNERGIDY

Młoda synergida wygląda na bardzo czynną komórkę. Ma ona duże jądro z dużym jąderkiem, gęstą cytoplazmę podstawową z polirybosomami, mitochondria, plastydy i czynne diktyosomy, ale dosyć mało cystern ER (fot. 5 i 6). W trakcie wydłużania się i wzrostu synergidy rozbudowuje się ściana komórkowa, a zwłaszcza jej część mikropylarna, gdzie powstaje aparat włókienkowy (fot. 7 i 8).

Aparat włókienkowy, który jest swego rodzaju ścianą transferową lub labiryntową, składa się z ogromnej liczby powyginanych, splątanych i częściowo zrosniętych wyrostków zbudowanych z materiałów polisacharydowych różnego rodzaju PAS (reakcja z kwasem nadjodowym i odczynnikiem Schiffa na nierozpuszczalne polisacharydy) dodatnich i ujemnych [7]. Przynajmniej część tego materiału przynoszą pęcherzyki diktyosomowe [62]. Do tak rozbudowanej powierzchni ściany przylega błona komórkowa. Dzięki dużej powierzchni błony mogą być tędy przenoszone materiały intensywniej niż w miejscach, gdzie ściana nie ma wyrostków. Dlatego przyjmuje się, że początkowo przez aparat włókienkowy pobierane są pokarmy [34], a później z dojrzałej synergidy wydzielane związki, na które chemotropowo reaguje łagiewka wrastająca tędy do synergidy.

Synergidy nielicznych gatunków roślin w miejsce aparatu włókienkowego rozwijają długie haustoria rozgałęzione w tkankach załążka. W niektórych miejscach na ścianach tych haustoriów tworzą się wyrostki, tak jak na ścianie transferowej [37-39]. Aparat włókienkowy i haustoria są różnymi, ale skutecznymi rozwiązaniami technicznymi do pobierania pokarmu. Kiedy gametofit jest dojrzały, haustorium służy jako droga dla łagiewki.

W synergidach, przeciwnie niż w komórce jajowej, rozwija się dużo cystern ziarnistego ER. Cysterny te układają się wzdłuż rosnącej synergidy, głównie między jądrem komórkowym a wierzchołkiem mikropylarnym. Po jakimś czasie cysterny rozpadają się na podłużne pęcherzyki nadal związane z rybosomami i ułożone w pasmach, a następnie w oddzielnych grupach (fot. 10 i 11). Niektóre z tych grup pęcherzyków

ściśle przylegają do ścian synergidy (fot. 14). Dojrzewająca synergida jest wypełniona jakby pianistą masą kulistych i podłużnych pęcherzyków oraz mniej lub bardziej zdeformowanymi organellami (fot. 13). W chalazalnym wierzchołku znajduje się wtedy duża wakuola, a ponad nią jądro komórkowe.

Wraz z synergidą rośnie i grubieje ściana komórkowa. Do ściany, prawdopodobnie przy udziale cystern ER (fot. 14), są odkładane jakieś materiały osmofilne. Grudki osmofilnego materiału ściśle przylegają do powierzchni ściany oraz są widoczne w jej wnętrzu (fot. 9), podobnie jak to opisaliśmy w jądrowym stadium gametofitu *Stellaria media* [46]. Osmofilne kuleczki w synergidach obserwowała także Fougere-Rifot [19]. Sądzi ona, że są to kropelki lipidowe przenikające przez plazmodesmy z komórki do komórki. W naszym materiale nie zauważyliśmy związku takich osmofilnych kuleczek z plazmodesmami ścian aparatu jajowego; w ścianie jądrowego gametofitu nawet nie ma plazmodesm, przynajmniej poza wierzchołkiem chalazalnym. Dlatego sądzimy, że materiał osmofilny jest wbudowywany do ściany komórkowej, a nie przemieszczany z komórki do komórki.

Początkowo ściany aparatu jajowego są przezroczyste dla elektronów, ale po jakimś czasie wzrostu zjawiają się w ścianie gęsto ułożone fibryle (fot. 9). Leżą one prostopadle do powierzchni ściany i w takim układzie nie powinny odbierać ścianie możliwości łatwego wydłużania się, a jednocześnie mogą zwiększać jej wytrzymałość.

Na wierzchołkach chalazalnych rosnących komórek aparatu jajowego ściany stają się coraz cieńsze, prawdopodobnie rozciągane przez powię-

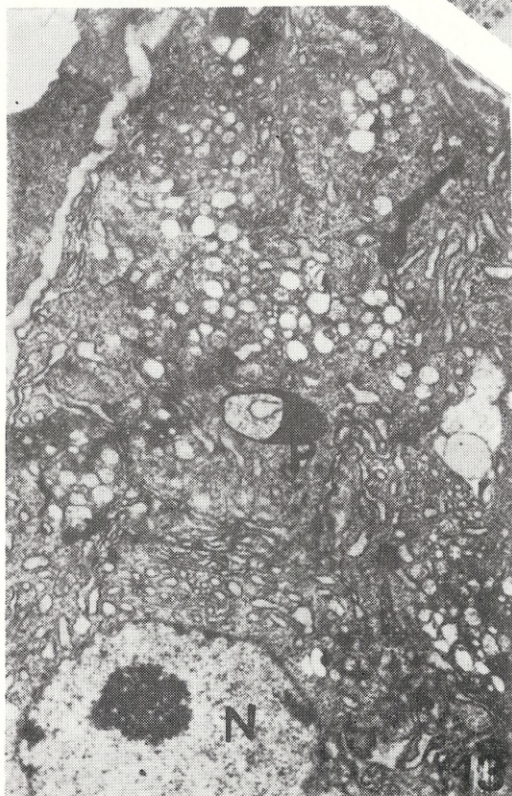
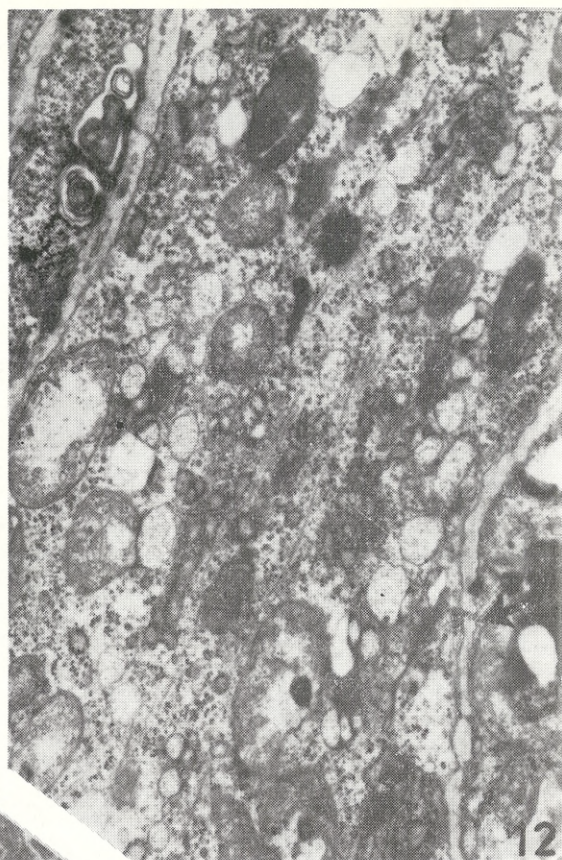
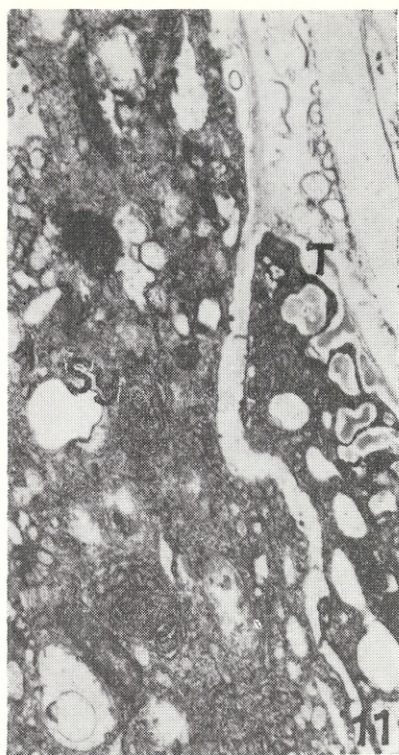
Fot. 11. Część synergidy Sy i mały fragment komórki centralnej (z prawej), ściana tej komórki T zaopatrzona w wyrostki — ściana transferowa. Pow. 6000 ×

Fot. 12. Synergida po fragmentacji cystern ER. Mitochondria, pęcherzyki szorstkiego ER i mikrotubule ułożone wzdłuż osi komórki. W ścianie są plazmodesmy (strzałka) i nieco wyżej omofilny materiał. Pow. 25 000 ×

Fot. 13. Synergida w okresie po fragmentacji ER wypełniona masą pęcherzyków, N — jądro, P — plastyd. Pow. 7000 × (wg [46])

Fot. 14. Synergida. Cysterny szorstkiego ER zgrupowane przy ścianie komórkowej. Do ściany ściśle przylegają grudki materiału osmofilnego. Pow. 20 000 ×

Fot. 15. Mikropylarna część gametofitu *Stellaria media*. EC — komórka jajowa, Sy — synergida, CC — komórka centralna. Wierzchołki komórki jajowej i synergidy od strony komórki centralnej okrywa nieciąga ściana komórkowa, która później całkowicie zniknie. FA — aparat włókienkowy, T — odcinki bocznych ścian komórki centralnej z wyrostkami transferowymi. We wszystkich komórkach ciemno zabarwione plastydy i jasne mitochondria. Pow. 6000 × (częściowo wg [46])





kszające się komórki. Jednocześnie w cytoplazmie wierzchołków komórek nie ma większej ilości cystern ER, zgromadzonych wtedy w środkowych i mikropylnych częściach synergid; na tym wierzchołku więc ściany nie mogą grubieć. W rezultacie coraz cieńsza ściana może być rozrywana na kawałki (fot. 15), a w końcu chalazalny wierzchołek każdej synergidy i komórki jajowej staje się zwykle nagi (jak u *Stellaria*) i może być łatwo sforsowany przez komórkę plemnikową [63].

FUNKCJE SYNERGID

Synergidy, jeżeli sądzić na podstawie struktury, pełnią w ciągu swego życia rozmaite funkcje. Po utworzeniu aparatu włókienkowego działają jako komórki chłonne; jednoczesny ogromny rozwój cystern szorstkiego ER świadczy, że są one także komórkami wydzielniczymi. Przynajmniej jakies wydzielinę synergid przyciągają rosnące łagiewki pyłkowe; jedna z synergid wybiera, która z łagiewek ma dokonać zapłodnienia i przyjmuje jej gamety męskie [15, 24, 52, 63].

Zanim dojdzie do zapłodnienia łagiewka (gametofit męski), musi przekroczyć wiele barier izolacyjnych, które bronią przed genetycznie niewłaściwym zapłodnieniem. Pierwszą barierą jest powierzchnia znamienia, które rozpoznaje, prawdopodobnie na drodze chemicznej, ziarna pyłku własnego gatunku, a w gatunkach z systemem niezgodności genetycznej odróżnia jeszcze pyłek zgodny od niezgodnego [13, 22, 28, 29]. Zasadniczo na znamieniu tylko pyłek zgodny może kiełkować w łagiewkę. Następną barierą niezgodności mieści się w szyjce słupka i tam dopiero łagiewki z pyłku niezgodnego genetycznie przestają rosnąć i degenerują. Najpierw więc właściwości genetyczne męskiego gametofitu są rozpoznawane przez komórki sporofitu uplasowane w odpowiednich częściach słupka. Niekiedy łagiewki niezgodne genetycznie są zatrzymywane przy wierzchołku aparatu jajowego, najprawdopodobniej przez synergidę. Są oczywiście przypadki przełamania barier izolacyjnych przez łagiewki niezgodne lub łagiewki obcego gatunku i wtedy dochodzi do nieprzewidzianych krzyżówek.

Łagiewka (gametofit męski), która zbliża się do gametofitu żeńskiego, ma przed sobą dwie synergidy z aparatami włókienkowymi na wierzchołkach. Wtedy odbywa się niezrozumiała operacja, ponieważ tylko jedna z synergid przyjmuje łagiewkę z gametami, a druga pozostaje niedostępna. Prawdopodobnie synergidy rozwijają się z niejednakową szybkością — jedna z nich zaczyna wcześniej degenerować i traci zdolność przyjęcia łagiewki [63].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAJER A. S., MOLÉ-BAJER J., Spindle dynamics and chromosome movements. Intern. Rev. Cytol. Suppl., 3: 34 - 97, 1972.
- [2] BAWA K. S., Modification of the gender of seed plants in varying conditions. Evol. Biol., 17: 255 - 339, 1984.
- [3] BANNIKOVA V. P., PLYUSHCH T. A., Embryo sac ultrastructure in *Peperomia blanda* H. B. et K. before and after fertilization, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went. Pudoc, Wageningen, 155, 1985.
- [4] BEDNARA J., Female gametophyte and pollen tube of *Epilobium palustre* L., Acta Soc. Bot. Pol., 46: 603 - 615, 1977.
- [5] — Plasmodesmata and ingrowths of chalazal wall in megasporogenesis in an orchid *Epipactis*, Bul. Soc. Bot. France, 125: Actualité Bot., 171 - 175, 1978.
- [6] BEDNARA J., KURAS M., RODKIEWICZ B., Ultrastructural changes during megasporogenesis in *Epipactis (Orchidaceae)*, Acta Soc. Bot. Pol., 50: 127 - 130, 1981.
- [7] BHANDARI N. N., SACHDEVA A., Some aspects of organization and histochemistry of the embryo sac of *Scilla sibirica* Sato. Protopl., 116: 170 - 178, 1983.
- [8] BOHDANOWICZ J., TURAŁA-SZYBOWSKA K., Ultrastructure of endopolyploid antipodals in *Aconitum vulparia* Rchb. I. Antipodals in the mature embryo sac. Protopl., 127: 163 - 170, 1985.
- [9] BOUMAN F., The ovule., [w] Embryology of Angiosperms, red. B. M. Johri. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 123 - 157, 1984.
- [10] CASS P., POTEYA D., Aspects of megagametogenesis in *Hordeum vulgare*, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went. Pudoc, Wageningen, 140 - 142, 1985.
- [11] DICKINSON H. G., HESLOP-HARRISON J., Ribosomes and organelles during meiosis in angiosperms., Phil. Trans. Roy. Soc. London, B., 277: 327 - 342, 1977.
- [12] DICKINSON H., POTTER U., Cytoplasmic changes accompanying the female meiosis in *Lilium longiflorum* Thumb., Jour. Cell Sci., 29: 147 - 169, 1978.
- [13] DICKINSON H., ROBERTS I. N., ELLEMAN C. J., HARROD G., ZUBEVI M. I., Early events on the Brassica stigma following compatible and incompatible intraspecific matings, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went. Pudoc, Wageningen, 105 - 107, 1985.
- [14] DODDS J. H., HALL M. A., Plant hormone receptors, Sci Progress Oxford, 66: 513 - 565, 1980.
- [15] DUMAS C., KNOX R. B., McCONCHIE C. A., RUSSELL S. D., Emerging physiological concepts in fertilization. What's New in Plant Physiol., 15: 17 - 20, 1984.
- [16] ESCHRICH W., Die Kalosynthese by Pollenmutterzellen von *Cucurbita ficifolia*, [w] Pollen physiology and fertilization, red. H. F. Linskens, North Holland Publ. Co. Amsterdam, 121 - 130, 1964.
- [17] EVENARI M., Seed physiology: from ovule to maturing seed. Bot. Rev., 50: 143 - 170, 1984.
- [18] FINERAN B. H., WILD D. J. C., JUNGERFELD M., Initial wall formation in the endosperm of wheat, *Triticum aestivum*: a reevaluation., Canad. Jour. Bot., 60: 1776 - 1795, 1982.

- [19] FOUGÈRE — RIFOT M., Intercellular and wall structures in mature embryo sacs of four species of angiosperms. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 131 - 138, 1981.
- [20] GRZESIUK S., KULKA K., Zasady formowania się nasion roślin okrytozalążkowych. *Wiad. Bot.*, **26**: 187 - 204, 1982.
- [21] HESLOP-HARRISON J., Sexuality of angiosperms., [w] *Plant Physiology, VIC Physiology of development from seed to sexuality*, red. F. C. Steward, Acad. Press, New York, London, 133 - 289, 1972.
- [22] — Self-incompatibility: phenomenology and physiology., *Proc. Roy. Soc. London B.*, **218**: 371 - 395, 1983.
- [23] HILL R. A., The ultrastructure of the synergids of *Gossypium hirsutum* (cotton): From anthesis through pollen tube discharge. PhD dissert. Univ. Calif., Berkeley, 1977 (wg 51).
- [24] JENSEN W. A., The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton., *Amer. Jour. Bot.*, **52**: 238 - 256, 1965.
- [25] — The embryo sac and fertilization in Angiosperms. Univ. of Hawaii, Honolulu, L. Lyon Arboretum Lecture, **3**: 1 - 31, 1972.
- [26] KAPIL R. N., BHATNAGAR A. K., Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. *Intern. Rev. Cytol.*, **70**: 291 - 341, 1981.
- [27] KAPIL R. N., TIWARI S. C., Plant embryological investigations and fluorescence microscopy: an assessment of integration. *Intern. Rev. Cytol.*, **53**: 291 - 331, 1978.
- [28] KNOX R. B., Pollen — pistil interaction, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, red. H. F. Linskens i J. Heslop-Harrison, New series v. **17**: 508 - 608, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
- [29] LARSEN K., Cell surface recognition glycoproteins and their possible role in angiosperm self-incompatibility, [w] *Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses*, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went, Pudoc, Wageningen, 112 - 114, 1985.
- [30] LINTILHAC P. M., Differentiation, organogenesis and tectonics of cell wall orientation II. Separation stress in a two-dimensional model. *Amer. Jour. Bot.*, **61**: 135 - 140, 1974.
- [31] LLOYD D. G., WEBB C. J., Secondary sex characters in seed plants. *Bot. Rev.*, **43**: 177 - 216, 1977.
- [32] MAHESHWARI S. C., RASHID A., TYAGI A. K., Haploids from pollen grains Retrospect and prospects. *Amer. Jour. Bot.*, **69**: 865 - 879, 1982.
- [33] McQUADE H. A., YOUNG-ROTTLER A. M., Observations on promeicytes of wheat. *Amer. Jour. Bot.*, **71**: 228 - 238, 1984.
- [34] MOGENSEN H. L., Translocation of uranine within the living ovules of selected species. *Amer. Jour. Bot.*, **68**: 183 - 194, 1981.
- [35] NEMEC B. Über den Pollen der petaloiden Antheren von *Hyacinthus orientalis*. *Bull. Intl. Acad. Sci. Boh.*, **5**: 17 - 23, 1898.
- [36] PACINI E., FRANCHI G. G., BELLANI L. M., Pollen grain development in the olive (*Olea europea* L.): ultrastructure and anomalies, [w] *Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses*, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went. Pudoc, Wageningen, 25 - 27, 1985.
- [37] PHILIPSON M. N., Apomixis in *Cortaderia jubata* (Gramineae). *N. Zel. Jour. Bot.*, **16**: 45 - 59, 1978.
- [38] — The haustorial synergids of *Cortaderia* (Gramineae) at maturity. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 151 - 160, 1981.

- [39] PHILIPSON M. N., CONNOR H. E., Haustorial synergids of Danthonioid grasses. *Bot. Gazet.* **145**: 78 - 82, 1984.
- [40] PLYUSHCH T. A., Ultrastruktura zarodkovo miszka *Peperomia blanda* L. (Piperaceae). *Ukr. Bot. Żur.*, **39** (4): 87 - 91, 1982.
- [41] RILEY R., FLAVELL R. B., A first view of the meiotic process. *Phil. Trans. Roy. Soc. London B.*, **277**: 191 - 196, 1977.
- [42] ROBERTS K., Oligosaccharide floral messages?, *Nature.* **314**: 581, 1985.
- [43] RODKIEWICZ B., Przebudowa cytoplazmy i polaryzacja w mejocytach podczas megasporogenezy u Angiospermae. *Post. Biol. Komórki*, **5**: 135 - 154, 1978.
- [44] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., KUDLICKA K., Egg apparatus walls and vacuoles in *Stellaria media*, [w] Fertilization and embryogenesis in ovulated plants. red. O. Erdelska, Veda, Bratislava, 211 - 214, 1983.
- [45] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., KURAS M., Przejawy biegunowości w komórkach mejotycznych i pomejotycznych, [w] Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych, red. T. J. Wodzicki. SGGW-AR, Warszawa, 65 - 87, 1984.
- [46] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., KUDLICKA K., KURAS M., Callose and osmiophilic material deposition into walls of developing megagametophyte in *Stellaria*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **51**: 353 - 359, 1982.
- [47] RODKIEWICZ B., KWIATKOWSKA M., Enzymy hydrolityczne w rozwijającym się woreczku zalążkowym lilii. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**: 235 - 242, 1965.
- [48] RUSSELL S. D., Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Canad. Jour. Bot.*, **57**: 1093 - 1110, 1979.
- [49] — Participation of male cytoplasm during gamete fusion in an angiosperm, *Plumbago zeylanica*. *Science*, **210**: 200 - 201, 1980.
- [50] RUSSELL S. D., CASS D. D., Ultrastructure of fertilization in *Plumbago zeylanica*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 185 - 189, 1981.
- [51] SCHULZ P., Ultrastructure and ultrachemical localization of acid phosphatase in the dyad, tetrad and developing megaspore of *Capsella bursa pastoris*, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses. red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went, Pudoc, Wageningen, 137 - 139, 1985.
- [52] SCHULZ P., JENSEN W. A., *Capsella* embryogenesis. The synergids before and after fertilization. *Amer. Jour. Bot.*, **55**: 541 - 532, 1968.
- [53] — Prefertilization ovule development in *Capsella*: ultrastructure and ultrachemical localization of acid phosphatase in the meiocyte. *Protopl.*, **107**: 27 - 45, 1981.
- [54] STONE B. A., EVANS N. A., BONIG I., CLARKE A. E., The application of sirofluor, a chemically defined fluorochrome from aniline blue for histochemical detection of callose. *Protopl.*, **122**: 191 - 195, 1984.
- [55] SNIEŻKO R., Megaspore competition in generation I and II of hybrids between *Oenothera hookeri* and *Oe. suaveolens*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **53**: 317 - 324, 1984.
- [56] SNIEŻKO R., HARTE C., Polarity and competition between megaspores in the ovule of *Oenothera* hybrids. *Plant Syst. Evolution*, **144**: 83 - 97, 1984.
- [57] — Callose patterns and polarization phenomena in the ovules in the F₂ hybrids between *Oenothera hookeri* and *Oe. suaveolens*. *Plant Syst. Evolution*, **147**: 79 - 90, 1984.
- [58] — Genetic basis of callose pattern, megaspore degeneration and polarity in the ovules of *Oenothera*, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went. Pudoc, Wageningen, 137, 1985.

- [59] TILTON V. R., Ovule development in *Ornithogallum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction IV. Egg apparatus structure and function. *New Phytol.*, **88**: 505 - 531, 1981.
- [60] van WENT J. L., THENNIS C. H., den NIJS A. P. M., Embryo sac ultra-structure before and after fertilization in *Cucumis sativus*, [w] Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse i J. L. van Went, Pudoc, Wageningen, 153 - 154, 1985.
- [61] VIJAYARAGHAVAN M. R., RATNAPARAKHI S., Pollen-embryo sacs in *Heuchera micrantha* Dougl. *Caryologia*, **30**: 105 - 119, 1977.
- [62] WILLEMSE M. T. M., FRANSEN-VERHEIJEN A. A. W., Cell organelle changes during megasporogenesis and megagametogenesis in *Gasteria verrucosa* (Mill) Haw. *Bull. Soc. Bot. France*, **125**: Actualité Bot., 187 - 191, 1978.
- [63] WILLEMSE M. T. M., van WENT J. L., The female gametophyte, [w] Embryology of angiosperms, red. B. M. Johri, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 159 - 196, 1984.
- [64] YOU R., JENSEN W. A., Ultrastructural observations of the mature megagametophyte and fertilization in wheat (*Triticum aestivum*). *Canad. Jour. Bot.*, **63**: 163 - 175, 1985.
- [65] ZICKLER D., Donneés récentes sur la prophase I de méiose (Revue). *Ann. Sci. Nat. Bot.* 13^e sér., **6**: 177 - 197, 1984.

Adres autorów: ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

Otrzymano: 23 grudnia 1985.

Przyjęto: 23 grudnia 1985.

KOMUNIKAT

Polskie Towarzystwo Toksykologiczne informuje, że
III Zjazd Naukowy Towarzystwa
odbędzie się w dniach 20 - 23 IX 1987 r. w Kozubniku koło
Bielska-Białej.

Wszystkich zainteresowanych zapraszamy do wzięcia
udziału. Wszelkich informacji na temat organizacji Zjazdu
udziela Oddział Śląski PTT.

Adres:

II Katedra Histologii i Embriologii
Śląska Akademia Medyczna
ul. Medyków 20
40-752 Katowice — Ligota
tel. 526-524

MECHANIZMY REGULACJI SKURCZU MIĘŚNI I RUCHLIWOŚCI KOMÓRKOWEJ *

REGULATORY MECHANISMS OF MUSCLE CONTRACTION AND CELL MOTILITY

Renata DĄBROWSKA

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

Streszczenie. Aktyna i miozyna są obecne we wszystkich typach mięśni, jak również w eukariotycznych komórkach niemięśniowych. Ich współdziałanie w obecności ATP jest podstawą skurczu mięśni i zjawisk ruchu zachodzących w komórkach niemięśniowych. Aktyna w komórkach niemięśniowych może brać również udział w różnych zjawiskach ruchu, których podstawą jest zmiana stanu jej organizacji. Celem przedstawionej pracy jest przegląd mechanizmów regulacji tych procesów.

Summary. Actin and myosin are present in all muscle as well as in nonmuscle eukaryotic cells. They can generate movement by their combined interaction with ATP. In addition, actin can be involved in a variety of motile events in nonmuscle cells based on rearrangements of its organization. The aim of this article is to review the mechanisms of regulation of these processes.

WSTĘP

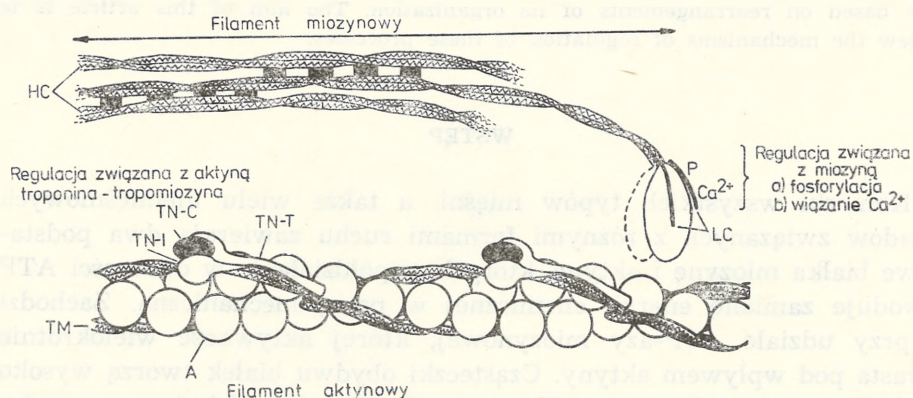
Komórki wszystkich typów mięśni, a także wielu niemięśniowych układów związanych z różnymi formami ruchu zawierają dwa podstawowe białka miozynę i aktynę, których współdziałanie w obecności ATP powoduje zamianę energii chemicznej w pracę mechaniczną. Zachodzi to przy udziale ATP-azy miozynowej, której aktywność wielokrotnie wzrasta pod wpływem aktyny. Cząsteczki obydwu białek tworzą wysoko zorganizowane struktury — filamenty. Podłożem molekularnym ruchu

* Referat wygłoszony podczas II Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki Warszawa, 18 - 20 IX 1985 r.

jest cyklicznie powtarzające się łączenie i dysocjacja filamentów aktynowych z globularnymi, enzymatycznie aktywnymi rejonami cząsteczek miozyny, wysuniętymi na zewnątrz filamentów miozynowych. Podczas tego procesu następują zmiany kąta nachylenia główek miozynowych, które prowadzą do przesuwania filamentów względem siebie [38, 67] (ryc. 6 w [136]).

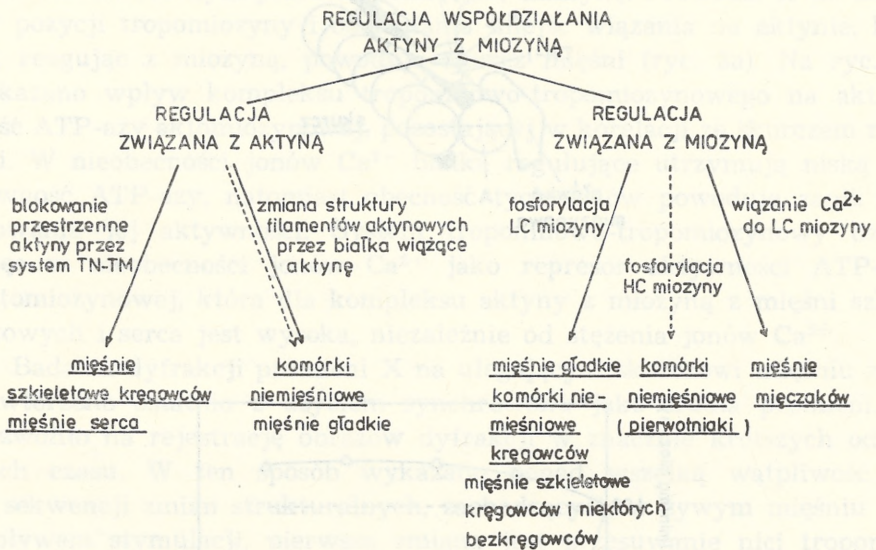
Procesem zapoczątkowującym współdziałanie aktyny z miozyną jest wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórki (lub w określonych jej rejonach) [18, 45]. Mechanizm, za pomocą którego jony Ca^{2+} regulują aktywność ruchową, jest różny dla różnych tkanek i pośredniczą w nim liczne białka regulujące. W zależności od miejsca działania tych białek wyróżnia się dwa zasadnicze typy mechanizmów regulacji, które są związane z aktyną albo miozyną [2, 37]. Kompleks białkowy troponina — tropomiozyna, związany z filamentami aktynowymi, spełnia rolę regulującą w skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych. W innych układach kurczliwych kompleks troponinowo-tropomiozynowy może być zastąpiony przez białka, które w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} wiążą się z filamentami aktynowymi i wpływają na ich współdziałanie z filamentami miozynowymi. Regulacja współdziałania aktyny z miozyną poprzez miozynę związana jest głównie z zależną od jonów Ca^{2+} modyfikacją lekkich regulatorowych łańcuchów miozyny, zachodzącą w wyniku fosforylacji lub bezpośredniego wiązania się z nimi jonów Ca^{2+} (ryc. 1) [2].

Główny mechanizm regulacji mięśni skurczu szkieletowych kręgowców i mięśni serca jest związany z aktyną, natomiast w mechanizmie re-



Ryc. 1. Schemat budowy filamentów aktynowych i miozynowych pokazujący miejsca regulacji ich współdziałania. A — aktyna, TM — tropomiozyna, TN-C, TN-I i TN-T — składniki troponiny, HC i LC, ciężkie i lekkie łańcuchy miozyny. Modyfikacja schematu wg Adelsteina i Eisenberga [2]

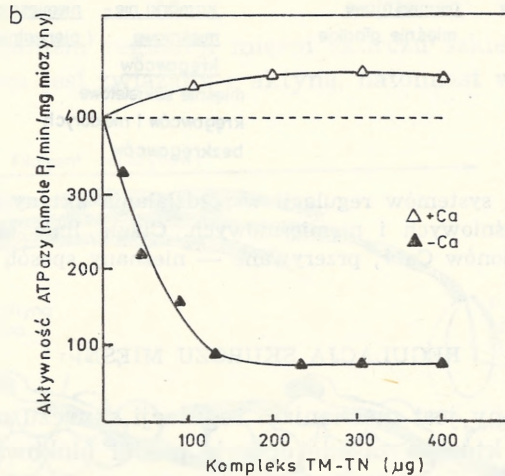
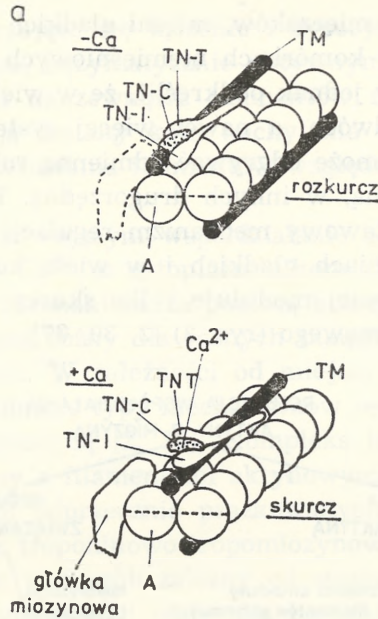
gulacji skurczu mięśni mięczaków, mięśni gładkich kręgowców i zjawisk ruchu zachodzących w komórkach niemięśniowych dominującą rolę odgrywa miozyna. Należy jednak podkreślić, że w wielu komórkach stwierdzono występowanie dwóch, a nawet więcej systemów regulacji, przy czym ten sam system może odgrywać odmienną rolę w różnych komórkach: w jednych główną, w innych drugorzędną. Fosforylacja np. miozyny, stanowiąca podstawowy mechanizm regulacji współdziałania aktywny z miozyną w mięśniach gładkich i w wielu komórkach niemięśniowych, najprawdopodobniej moduluje tylko skurcz mięśni szkieletowych i być może mięśnia sercowego (ryc. 2) [2, 30, 37].



Ryc. 2. Występowanie systemów regulacji współdziałania aktyny z miozyną w różnych komórkach mięśniowych i niemięśniowych. Ciągłe linie oznaczają regulację zależną od jonów Ca^{2+} , przerywane — nieznaną sposob regulacji

REGULACJA SKURCZU MIĘŚNI

Najlepiej poznany jest mechanizm regulacji skurczu mięśni szkieletowych kręgowców, którego zasadę opisuje model blokowania przestrzennego (steric blocking model), zaproponowany na początku lat siedemdziesiątych, na podstawie badań tych mięśni przy użyciu dyfrakcji promieni X [61, 66]. W mechanizmie tym bierze udział kompleks tropoinowo-tropomiozynowy, którego składniki usytuowane są na filamentach aktynowych: polimery tropomiozyny znajdują się w rowkach spirali aktynowej na całej długości filamentu, troponina natomiast łączy



Ryc. 3. a. Regulacja skurczu mięśni szkieletowych przez kompleks troponinowo-tropomiozyny według modelu blokowania przestrzennego (steric blocking model). Oznaczenia jak na ryc. 1. Modyfikacja schematu wg Hartshorne i Góreckiej [60].
 b. Wpływ kompleksu troponinowo-tropomiozyny na ATP-azę aktomiozyny (wg Dąbrowskiej, Dydyńskiej, Szpacenko i Drabikowskiego [39])

się z aktyną i tropomiozyną z okresowością 38 nm (ryc. 1). Troponina składa się z trzech podjednostek: troponiny C — białka będącego akceptorem jonów Ca^{2+} podczas skurczu, troponiny I — inhibitora współdziałania aktyny z miozyną (którego działanie jest potęgowane przez tropomiozynę) oraz troponiny T — składnika wiążącego się z tropomiozyną [37]. Według modelu blokowania przestrzennego, w nieobecności jonów Ca^{2+} polimery tropomiozynowe zasłaniają miejsca wiązania główek miozyny na filamentach aktynowych. Wiązanie jonów Ca^{2+} z troponiną C wywołuje zmiany strukturalne tego białka, które pociągają za sobą zmiany jego oddziaływania z innymi składnikami filamentu. Następuje wzrost siły wiązania troponiny C z troponiną I i dysocjacja wiązania z kompleksem utworzonym przez tropomiozynę i aktynę. Prowadzi to do zmiany pozycji tropomiozyny i odsłaniania miejsc wiązania na aktynie, które, reagując z miozyną, powodują skurcz mięśni (ryc. 3a). Na ryc. 3b pokazano wpływ kompleksu troponinowo-tropomiozynowego na aktywność ATP-azy aktomiozynowej, pozostającej w korelacji ze skurczem mięśni. W nieobecności jonów Ca^{2+} białka regulujące utrzymują niską aktywność ATP-azy, natomiast obecność tych jonów powoduje zanik hamowania jej aktywności. System troponinowo-tropomiozynowy działa więc w nieobecności jonów Ca^{2+} jako represor aktywności ATP-azy aktomiozynowej, która dla kompleksu aktyny z miozyną z mięśni szkieletowych i serca jest wysoka, niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} .

Badania dyfrakcji promieni X na ulegającym skurczowi mięśniu żaby powtórzono ostatnio z użyciem synchrotronu jako źródła promieni, co pozwoliło na rejestrację obrazów dyfrakcji w znacznie krótszych odstępach czasu. W ten sposób wykazano ponad wszelką wątpliwość, że w sekwencji zmian strukturalnych, zachodzących w żywym mięśniu pod wpływem stymulacji, pierwszą zmianą jest przesuwanie nici tropomiozynowych w sposób opisany dla modelu blokowania przestrzennego [68]. Dopiero później zachodzi przemieszczanie globularnych rejonów cząsteczek miozynowych w kierunku filamentu aktynowego. Z analiz kinetycznych wynika jednak, że w warunkach rozkurczu mięśni kompleks troponinowo-tropomiozynowy nie zapobiega łączeniu miozyny z aktyną, ale wpływa na stałą równowagi ich wiązania. Jego hamujący wpływ jest wynikiem oddziaływania na jeden z etapów złożonego mechanizmu hydrolizy ATP przez kompleks aktomiozynowy [21, 56]. Coraz więcej jednak eksperymentalnych dowodów przemawia za tym, że aktyna odgrywa aktywną rolę podczas skurczu mięśni [12, 155, 156], co sugeruje, że kompleks troponinowo-tropomiozynowy może również wpływać bezpośrednio na filamenty aktynowe, powodując zmiany konformacyjne monomerów aktyny.

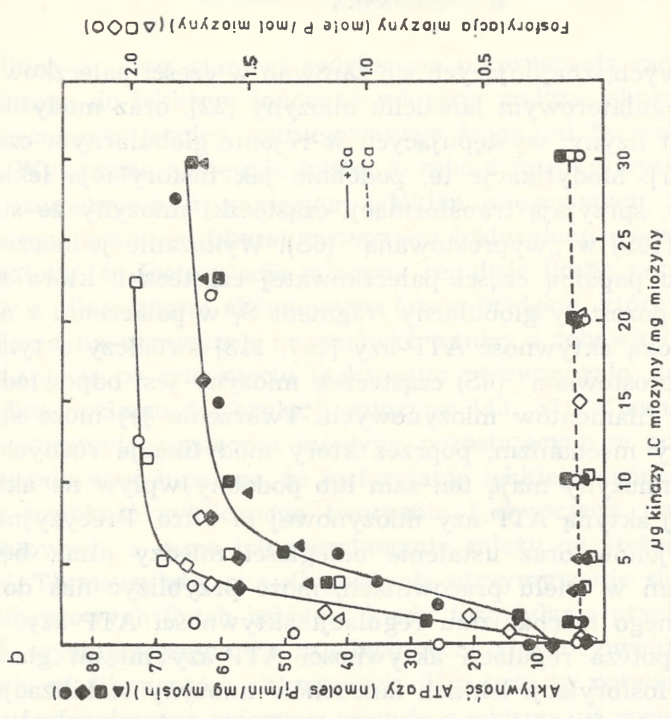
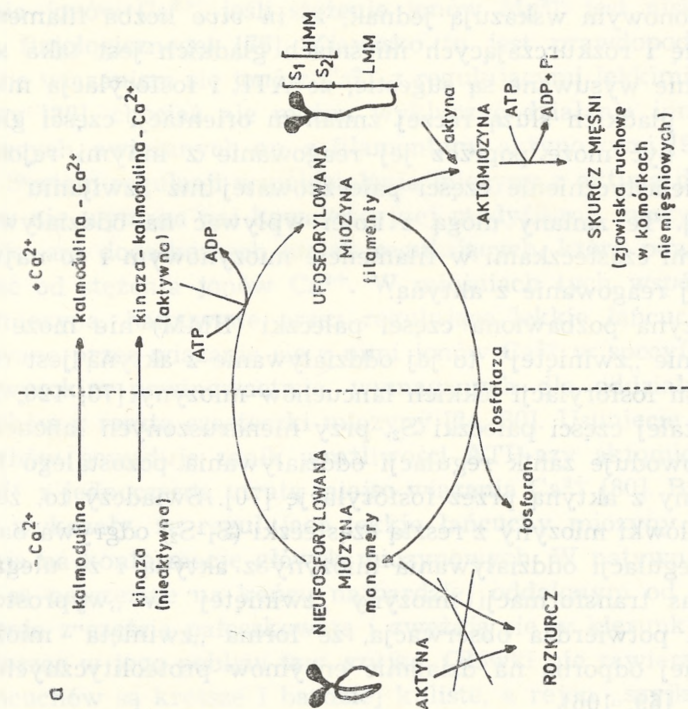
W mięśniach gładkich kręgowców brak jest troponiny, a czyste biał-

ka aktyna i miozyna nie reagują ze sobą niezależnie od obecności jonów Ca^{2+} . Badania nad zależnym od jonów Ca^{2+} aktywatorem współdziałania aktyny z miozyną z mięśni gładkich doprowadziły do powszechnie akceptowanego poglądu, że aktywacja następuje w wyniku fosforylacji regulujących lekkich łańcuchów miozyny, które znajdują się w rejonie połączenia globularnej części miozyny z resztą cząsteczki [121, 146]. W tym systemie regulacji jony Ca^{2+} aktywują kinazę lekkich łańcuchów miozyny poprzez wiązanie z jej podjednostką regulatorową — kalmoduliną. Aktywna kinaza fosforyluje lekkie łańcuchy miozyny i w ten sposób inicjuje skurcz mięśni. Rozkurcz następuje w wyniku defosforylacji miozyny przez specyficzny enzym — fosfatazę lekkich łańcuchów miozyny (ryc. 4a) [2, 30, 126, 150]. Aktywność kinazy, a tym samym skurcz mięśni gładkich może być regulowany nie tylko stężeniem jonów Ca^{2+} w komórce, ale również na drodze hormonalnej, która poprzez fosforylację kinazy, zależną od cAMP, prowadzi do jej unieczynnienia [2].

Cykl reakcji przedstawionych na ryc. 4A znajduje odbicie w obserwowanej *in vitro* korelacji aktywności ATP-azy aktomiozyny z mięśni gładkich ze stopniem fosforylacji miozyny (ryc. 4b). W nieobecności jonów Ca^{2+} , kiedy fosforylacja nie zachodzi, aktywność ATP-azy aktomiozynowej jest bardzo niska. Jest to zgodne z poglądem, że nieufosforylowany lekki łańcuch miozyny hamuje jej współdziałanie z aktyną [102, 118].

Fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny wpływa na strukturę całej cząsteczki tego białka. Badania przeprowadzane przy zastosowaniu metod fizykochemicznych wykazały, że cząsteczki nieufosforylowanej miozyny są mniej asymetryczne niż ufosforylowanej (ich współczynnik sedymentacji wynosi 10S) [137]. Z obserwacji w mikroskopie elektronowym wiadomo, że wynika to ze zwinięcia części pałeczkowatej miozyny, która łączy się z częścią globularną, tworząc pętlę (ryc. 4a) [105, 144]. Fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny sprzyja wyprostowaniu części pałeczkowatej cząsteczki (jej stała sedymentacji wynosi wówczas 6S) [126, 137]. Konieczna jest, dla pełnej transformacji formy „zwiniętej” cząsteczki miozyny w „wyprostowaną”, fosforylacja obydwu jej lekkich regulujących łańcuchów [71]. Obydwie formy miozyny różnią się znacznie aktywnością enzymatyczną [72]. „Wyprostowana” struktura jest niezbędna nie tylko dla jej oddziaływania z aktyną, ale również dla wytworzenia w roztworach o niskiej sile jonowej stabilnych filamentów, które, w odróżnieniu od filamentów tworzonych przez miozynę nieufosforylowaną, nie ulegają dysocjacji w obecności ATP [35, 144].

Ostatnie badania wskazują, że na aktywność ATP-azy miozynowej aktywowanej aktyną i stabilność filamentów miozynowych taki sam wpływ, jak fosforylacja miozyny, ma również chemiczna modyfikacja



Ryc. 4. a. Regulacja skurczu mięśni gładkich oraz zjawisk ruchu w komórkach mięśniowych przez fosforylację miozyny. Na schemacie cząsteczki miozyny zaznaczono jej fragmenty S₁, S₂, LMM i HMM otrzymane w wyniku działania enzymów proteolitycznych. Modyfikacja schematu wg Smitha, Cande, Craiga, Tootha, Scholey'a i Kendricka-Jonesa [126]. b. Wpływ fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny z mięśni gładkich na aktywność ATP-azy aktomiozynowej (wg Dąbrowskiej, Sherry i Hartsborne [42])

reszt sulfhydrylowych, znajdujących się zarówno w części pałeczkowatej, jak i w lekkim regulatorowym łańcuchu miozyny [22], oraz modyfikacje reaktywnych reszt lizyny, występujących w rejonie globularnym cząsteczki miozyny [131]. Modyfikacje te, podobnie jak fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny, sprzyjają transformacji cząsteczki miozyny ze struktury „zwiniętej” (10S) w „wyprostowaną” (6S). Wykazanie jednocześnie, że po odtrawieniu papainą części pałeczkowatej cząsteczki, która może ulegać zwinięciu, pozostały globularny fragment S_1 w połączeniu z aktywną wykazuje wysoką aktywność ATP-azy [117, 118] świadczy o tym, że konformacja „wyprostowana” (6S) cząsteczek miozyny jest odpowiedzialna za stabilizację filamentów miozynowych. Tworzenie jej może stanowić także wspólny mechanizm, poprzez który modyfikacje różnych rejonów cząsteczki miozyny mają ten sam lub podobny wpływ na aktywność aktywowanej aktyny ATP-azy miozynowej *in vitro*. Precyzyjna lokalizacja tych rejonów oraz ustalenie odległości między nimi, będące przedmiotem badań w wielu pracowniach, może przybliżyć nas do poznania molekularnego mechanizmu regulacji aktywności ATP-azy.

Jakkolwiek hipoteza regulacji aktywności ATP-azy mięśni gładkich przez zależną od fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny stabilizację filamentów miozynowych byłaby bardzo atrakcyjna, to obserwacje w mikroskopie elektronowym wskazują jednak, że *in vivo* liczba filamentów w kurczących się i rozkurczających mięśniach gładkich jest taka sama [130, 141]. Obecnie wysuwane są sugestie, że ATP i fosforylacja miozyny w mięśniach gładkich służą raczej zmianom orientacji części globularnej miozyny, być może poprzez jej reagowanie z innymi rejonami cząsteczki lub uelastycznienie części pałeczkowatej niż „zwijaniu” cząsteczki [70, 145]. Te zmiany mogą z kolei wpływać na oddziaływanie miozyny z innymi cząsteczkami w filamencie miozynowym i co najważniejsze — na jej reagowanie z aktyną.

Chociaż miozyna pozbawiona części pałeczki (HMM) nie może występować w formie „zwiniętej”, to jej oddziaływanie z aktyną jest regulowane poziomem fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny [73, 120, 122]. Usunięcie pozostałej części pałeczki S_2 , przy nienaruszonych łańcuchach regulujących, powoduje zanik regulacji oddziaływania pozostałego fragmentu S_1 miozyny z aktyną przez fosforylację [70]. Świadczy to, że rejon połączenia główki miozyny z resztą cząsteczki (S_1 - S_2) odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji oddziaływania miozyny z aktyną i że ulega on zmianom podczas transformacji miozyny „zwiniętej” w „wyprostowaną”. Pogląd ten potwierdza obserwacja, że forma „zwinięta” miozyny jest dużo bardziej odporna na działanie enzymów proteolitycznych niż „wyprostowana” [69, 106].

Dodatkowy dowód, że fosforylacja miozyny reguluje skurcz mięśni

gładkich *in vivo*, stanowi zwiększona inkorporacja radioaktywnego ortofosforanu do lekkiego łańcucha miozyny podczas skurczu mięśni żołądka i mięśniówki tętnicy, zainicjowanego środkami farmakologicznymi [8, 9, 88]. Wykazanie następnie ścisłej korelacji między wytworzonym w skurczu izometrycznym napięciem włókien mięśniowych, pozbawionych sarkolemy (skinned fibers), i stopniem fosforylacji miozyny [19, 63] wskazywałoby, że fosforylacja miozyny reguluje liczbę połączeń główek miozyny z filamentami aktynowymi (cross-bridges), które generują napięcie. Badania na skrawkach mięśniówki tętnicy i tchawicy wykazały jednak, że napięcie po osiągnięciu maksimum utrzymywało się długi czas, mimo spadku poziomu fosforylacji miozyny [43, 52]. Zjawisko to tłumaczono defosforylacją cząsteczek miozyny pozostających w połączeniu z aktyną. Powstała więc hipoteza, że fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny reguluje szybkość cyklicznego tworzenia i dysocjacji połączeń międzyfilamentowych, a samo ich powstawanie zależy od stężenia jonów Ca^{2+} [3, 125]. Tłumaczyłaby ona długotrwałe utrzymywanie się połączeń międzyfilamentowych (latch bridges), kiedy fosforylacja przebiega przy stężeniu Ca^{2+} wystarczającym dla zapobiegnięcia oddysocjowania główek miozynowych od filamentów aktynowych. Hipotezę tę potwierdzają obserwacje, że ufosforylowana miozyna reaguje z aktyną w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} , jeśli stężenie jonów Mg^{2+} jest niskie (bliskie stężenia fizjologicznego) [76]. Zjawisko to jest prawdopodobnie uwarunkowane wiązaniem się jonów Ca^{2+} z regulującymi lekkimi łańcuchami miozyny [20], chociaż nie można wykluczyć działania innych białek regulujących, związanych np. z filamentami aktynowymi [93].

System regulacji współdziałania miozyny z aktyną dla mięśni mięczaków nie wymaga ani kowalencyjnej modyfikacji miozyny przez fosforylację, ani dodatkowych białek regulujących, które powodują jego zależność od stężenia jonów Ca^{2+} . W mięśniach tych współdziałanie aktyny z miozyną, hamowane przez regulujące lekkie łańcuchy, jest neutralizowane przez wiązanie się z nimi jonów Ca^{2+} w specyficznych miejscach o wysokim powinowactwie, wymaganych dla oddziaływania tych łańcuchów z resztą cząsteczki miozyny [24, 80]. Usunięcie regulujących łańcuchów powoduje zanik wrażliwości ATP-azy aktomiozynowej na jony Ca^{2+} z jednoczesną utratą miejsc wiązania Ca^{2+} [80]. Badania strukturalne wykazały, że regulujące lekkie łańcuchy miozyny mięczaków wpływają na konformację główek miozynowych. W natywnej miozynie główki są najszersze na końcu najbardziej oddalonym od miejsca ich połączenia z częścią pałeczkowatą i zwężają się w kierunku tego połączenia, tworząc w jego pobliżu tzw. szyjkę. Główki nie zawierające regulujących łańcuchów są krótsze i bardziej kuliste, a rejon „szyjki” jest niewidoczny [18]. Obserwacje te dokonane w mikroskopie elektronowym oraz ba-

dania immunologiczne wykazały, że regulujące lekkie łańcuchy miozyny mięczaków mają kształt wydłużony (około 10 nm długości) i podobnie jak lekkie łańcuchy miozyny z mięśni gładkich i szkieletowych, znajdują się w rejonie połączenia główek z resztą cząsteczki miozyny (S_1 - S_2) [132, 148]. Rejon ten ma prawdopodobnie istotne znaczenie dla zależnej od jonów Ca^{2+} regulacji reagowania miozyny z aktyną w mięśniach mięczaków, gdyż jego zablokowanie przez specyficzne przeciwciała powoduje zanik wrażliwości ATP-azy aktomiozynowej na jony Ca^{2+} (wg [149]). Potwierdzają to także badania wskazujące, że reagowanie samej główki miozynowej S_1 z aktyną (po odtrawieniu pozostałej części cząsteczki miozyny) nie zależy od stężenia jonów Ca^{2+} [132], podobnie jak reagowanie główki miozyny z mięśni gładkich z aktyną nie zależy od fosforylacji miozyny [70]. Jak wykazuje trójwymiarowa rekonstrukcja filamentów aktynowych, dekorowanych subfragmentami miozyny (główkami), miejsce wiązania aktyny znajduje się na końcu główki miozyny, oddalonym od jej połączenia z „szyjką”, a więc jest zbyt odległe, aby regulujące lekkie łańcuchy mogły je przestrzennie blokować [146]. Mechanizm regulacji ma bardziej złożoną naturę. Ostatnie badania wykazują, że bierze w nim udział również druga para lekkich łańcuchów, zwanych łańcuchami głównymi, które także znajdują się w rejonie połączenia główki z częścią pałeczkowatą miozyny i w warunkach aktywacji skurczu przemieszczają się w stosunku do łańcuchów regulatorowych [57, 149]. Wiele biochemicznych badań wskazuje ponadto, że w mechanizmie regulacji mięśni mięczaków odgrywają rolę kooperatywne oddziaływania między dwiema główkami w cząsteczce miozyny [23, 24]. Tak więc można przypuszczać, że zmiany w oddziaływaniu między lekkimi łańcuchami regulującymi i głównymi oraz łańcuchami ciężkimi w pobliżu połączenia główki z resztą cząsteczki miozyny (S_1 - S_2) mogą w sposób kooperatywny wpływać na strukturę obydwu rejonów „szyjki” i w ten sposób modyfikować właściwości domen wiązania aktyny i nukleotydu w obydwu główkach.

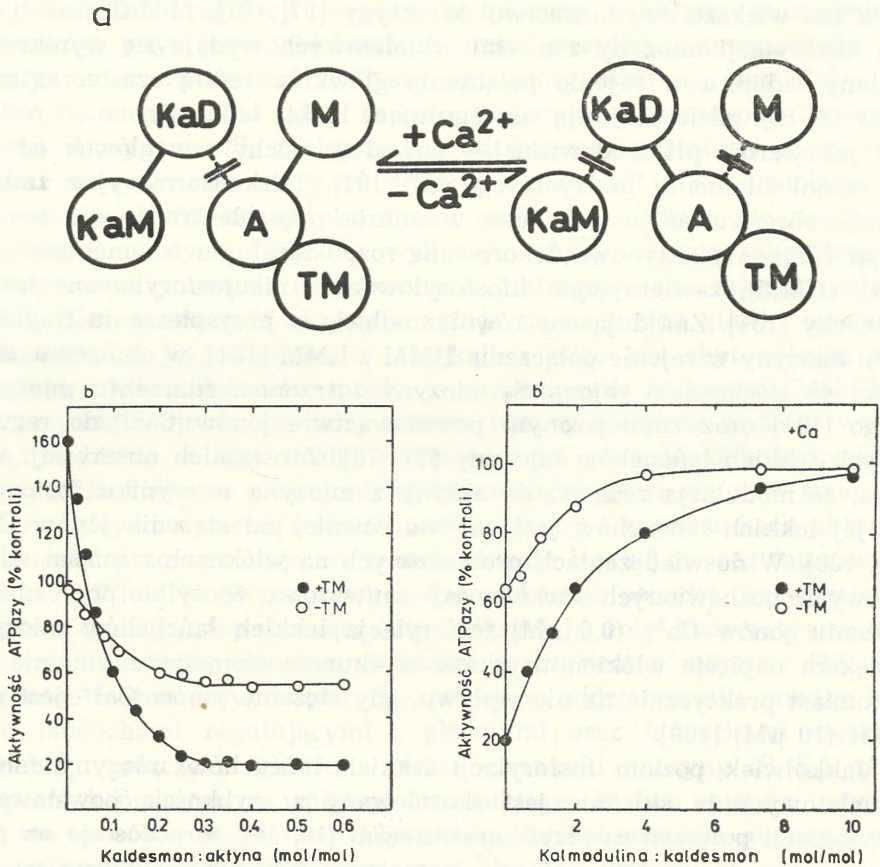
Oprócz opisanych już tu podstawowych systemów regulacji skurczu, zarówno mięśnie szkieletowe, jak i mięśnie gładkie mają komplementarne systemy regulacji. Ich działanie tłumaczy często wiele faktów doświadczalnych, których nie można wyjaśnić na podstawie istnienia wyłącznie jednego systemu regulacji. I tak np. mięśnie szkieletowe mają wszystkie enzymy potrzebne do regulacji skurczu poprzez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny. Stwierdzono jednak, że fosforylacja miozyny z mięśni szkieletowych, w odróżnieniu od fosforylacji miozyny z mięśni gładkich, wpływa w znacznie mniejszym stopniu na strukturę cząsteczki miozyny. W roztworach o niskiej sile jonowej monomery miozyny z mięśni szkieletowych mają stałą sedymentacji 6S, a filamenty

nie ulegają dysocjacji pod wpływem ATP [58, 78]. Badania *in vitro* wskazują, że nie powoduje ona także zasadniczych zmian w oddziaływaniu miozyny z mięśni szkieletowych z aktyną. Aktywność ATP-azy aktomiozynowej, zawierającej zarówno ufosforylowaną, jak i nieufosforylowaną miozynę, jest wysoka, chociaż wykazano, że ufosforylowana miozyna ma większe powinowactwo do aktyny [97, 107]. Modułująca funkcja fosforylacji miozyny z mięśni szkieletowych wydaje się wynikać ze zmiany ładunku w rejonie połączenia główki z resztą cząsteczki miozyny (S_1 - S_2), gdzie znajdują się regulujące lekkie łańcuchy, co — podobnie jak wzrost pH środowiska — powoduje odchylenie główek od powierzchni filamentu miozynowego [27, 101]. Te konformacyjne zmiany można obserwować bezpośrednio w mikroskopie elektronowym, porównując filamenty aktynowe dekorowane rozpuszczalnym fragmentem miozyny (HMM), zawierającym ufosforylowane i nieufosforylowane lekkie łańcuchy [134]. Znajdują one również odbicie w przyspieszeniu fragmentacji miozyny w rejonie połączenia HMM z LMM [101], w obniżeniu zdolności do sieciowania rejonu S_2 miozyny z trzonem filamentu miozynowego [101] oraz zmniejszonym powinowactwie jonów Ca^{2+} do regulujących lekkich łańcuchów miozyny [77, 78]. Z ostatnich obserwacji wynika, że modulacja reagowania aktyny z miozyną w wyniku fosforylacji jej lekkich łańcuchów jest zależna również od stężenia jonów Ca^{2+} [79, 138]. W doświadczeniach prowadzonych na włóknach z mięśni szkieletowych pozbawionych sarkolemy zauważono, że tylko przy niskim stężeniu jonów Ca^{2+} (0,6 μM) fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny zwiększa napięcie włókien uzyskane w skurczu izometrycznym, nie ma natomiast praktycznie na nie wpływu, gdy stężenie jonów Ca^{2+} jest wysokie (10 μM) [109].

Jakkolwiek poziom fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny mięśni szkieletowych *in situ* nie jest skorelowany z szybkością powstawania i dysocjacji połączeń międzyfilamentowych [10, 16], to pozostaje on proporcjonalny do wzrostu napięcia izometrycznego, generowanego po uprzednim rozwoju skurczu tępcowego, co pozwala sądzić, że fosforylacja miozyny powoduje wzmocnienie pojedynczych skurczów (post-tetanic potentiation) [82, 91]. Udowodniono, że proces ten ma znaczenie fizjologiczne w pracy szybkich mięśni ssaków [65, 99].

Uzupełniającym systemem regulacji współdziałania aktyny z miozyną w mięśniu gładkim może być system związany z nowo odkrytym białkiem, zwanym kaldesmonem, które wiąże się zarówno z aktyną, jak i kalmoduliną [127, 128]. Proponowany mechanizm działania tego systemu jest następujący. W nieobecności jonów Ca^{2+} kaldesmon tworzy kompleks z aktyną, zapobiegając jej współdziałaniu z miozyną, natomiast w obecności jonów Ca^{2+} kaldesmon łączy się z kalmoduliną i oddysocjo-

wuje od aktyny, która może wówczas łączyć się z miozyna (ryc. 5a). Wpływ kaldesmonu na ATP-azę aktomiozynową (ryc. 5b) [40] przypomina działanie układu troponina-tropomiozyna, co sugeruje, że może on mieć znaczenie podczas rozkurczu mięśni gładkich.



Ryc. 5. a. Schemat ilustrujący wpływ kaldesmonu na oddziaływanie aktyny z miozyna. A — aktyna, M — miozyna, TM — tropomiozyna, KaM — kaldesmon, KaD — kalmodulina. Według Sobue, Morimoto, Inui, Kanda i Kakiuchi [127]. b. Wpływ kaldesmonu wyizolowanego z mięśni gładkich na aktywność ATP-azy aktomiozyny z mięśni szkieletowych. b'. Neutralizacja działania kaldesmonu na ATP-azę aktynomiozynową przez kalmodulinę (wg Dąbrowskiej, Gocha, Gałążkiewicz i Osińskiej [40])

REGULACJA RUCHLIWOŚCI KOMÓRKOWEJ

Aktyna i miozyna, białka odpowiedzialne za skurcz komórek mięśniowych, występują we wszystkich komórkach eukariotycznych, gdzie prawdopodobnie biorą udział w wielu zjawiskach ruchu, związanych z loko-

mocją komórek, transportem wewnątrzkomórkowym, sekrecją, endocytozą, cytokinezą, utrzymywaniem i modulacją kształtu komórek, przyczepianiem ich do podłoża i in. [83, 110]. Współdziałanie aktyny z miozyna w komórkach mięśniowych może służyć jedynie jako model oddziaływania tych białek podczas niektórych zjawisk ruchu komórkowego. Zasadnicze różnice między systemami mięśniowymi i niemięśniowymi w generowaniu ruchu określają różne wymagania stawiane białkom wspólnym dla obydwu systemów. Organizacja filamentów aktynowych i miozynowych w komórkach mięśniowych jest regularna i stabilna, natomiast struktury filamentowe w komórkach niemięśniowych są bardzo dynamiczne i pojawiają się w zależności od stanu fizjologicznego komórki w różnych jej rejonach. Tak więc proces regulacji zjawisk ruchowych w komórkach niemięśniowych jest bardziej złożony i dotyczy nie tylko regulacji współdziałania filamentów miozynowych z aktynowymi, ale też ich tworzenia oraz wzajemnego ułożenia i orientacji w przestrzeni wewnątrzkomórkowej.

Przypuszcza się, że oddziaływanie miozyny z aktyną dla wywołania danego ruchu odbywa się przy wykorzystaniu tego samego mechanizmu, który działa w komórkach mięśniowych, tj. przesuwania się filamentów aktynowych i miozynowych względem siebie, związanego z hydrolizą ATP [67]. Mechanizm taki może działać, jeśli filamety aktynowe przymocowane są jednym końcem do innych struktur komórkowych, takich jak błona komórkowa, organelle komórkowe, mikrotubule czy filamety pośrednie, i wykazują odpowiednią strukturalną polarność [136]. Jeśli między dwoma przeciwnie zorientowanymi wiązkami filamentów aktynowych znajdują się dwupolarne filamety miozynowe, to następuje wzajemne ich przesuwanie, w wyniku którego wolne końce filamentów aktynowych zbliżają się do siebie, przemieszczając struktury komórkowe, do których są przymocowane [67, 114]. Taki właśnie mechanizm generowania zjawisk ruchu proponuje się dla oddziaływania aktyny z miozyna niemięśniową kręgowców i bezkręgowców, która ma strukturę zbliżoną do miozyny występującej w komórkach mięśniowych.

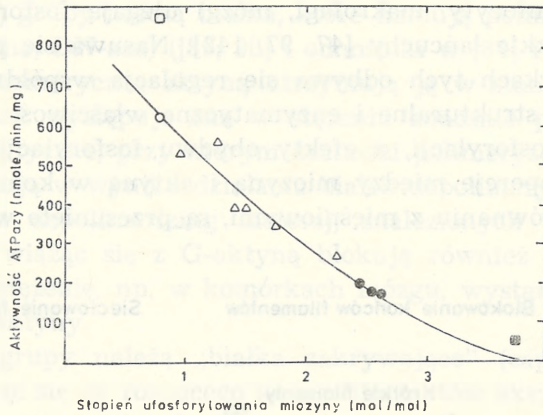
U *Acanthamoeba* [6], *Dictyostelium* [31] i prawdopodobnie w mikroorganizmach jelitowych [33], oprócz normalnej miozyny dwugłówkowej występuje miozyna jednogłówkowa, która składa się tylko z jednego łańcucha ciężkiego i dwóch łańcuchów lekkich i nie wykazuje zdolności do tworzenia filamentów. Hipoteza funkcjonowania miozyny jednogłówkowej zakłada, że jej cząsteczki są przymocowane za pomocą części pałeczkowatej do organelli komórkowych. Dzięki oddziaływaniu wystających na zewnątrz główek miozyny z aktyną, organelle te mogą się przemieszczać wzdłuż filamentów aktynowych [4, 123]. Taki mechanizm z udziałem monomerycznej miozyny (również dwugłówkowej) w generowaniu zjawisk

ruchu może być wykorzystany w transporcie wewnątrzkomórkowym [13, 75].

Z badań prowadzonych *in vitro* wynika, że współdziałanie aktyny z miozyną izolowaną z wielu komórek mięśniowych jest regulowane poprzez fosforylację lekkich łańcuchów regulujących lub ciężkich łańcuchów miozyny [30, 87]. W miozynie komórek mięśniowych kręgowców (płytki krwi, grasica, tarczyca, mózg, rdzeń nadnerczy, makrofagi, fibroblasty, erytrocyty, limfocyty, komórki rakowe nadnerczy — feochromocyty) ulegają fosforylacji lekkie łańcuchy podobnie jak w miozynie z mięśni gładkich (ryc. 4a) [1, 11, 46, 47, 49, 95, 116, 129, 143, 157]. Proces fosforylacji zależy od stężenia jonów Ca^{2+} i obecności kalmoduliny. Z wielu komórek mięśniowych udało się już wydzielić specyficzną, zależną od kalmoduliny kinazę lekkich łańcuchów miozyny [41, 59, 157]. Fosforylacji miozyny z tych komórek towarzyszy wielokrotny wzrost aktywności ATP-azy miozynowej aktywowanej aktyną. W odróżnieniu od fosforylacji miozyny z mięśni gładkich, która jest procesem kooperatywnym [108, 119], fosforylacja miozyny z grasicy przebiega z jednakową szybkością dla obydwu główek [147]. W konsekwencji, aby uzyskać stymulację ATP-azy miozynowej przez aktynę, w mięśniu gładkim potrzebna jest pełna fosforylacja miozyny, a dla grasicy, przy niskim poziomie fosforylacji miozyny, można uzyskać stosunkowo wysoką aktywność ATP-azy aktomiozynowej. Oznacza to, że niski poziom fosforylacji miozyny może wystarczyć dla stymulacji aktywności ruchowej komórki.

Zaobserwowano, że *in vitro* fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny z komórek mięśniowych kręgowców (grasica, płytki krwi, tarczyca) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych wpływa na konformację cząsteczek miozynowych i przesuwą równowagę monomer \rightleftharpoons filament w kierunku tworzenia filamentów [95, 116, 139]. Ufosforylowana miozyna występuje w postaci stabilnych filamentów, natomiast filamenty miozyny nieufosforylowanej są nietrwałe i, podobnie jak filamenty miozyny nieufosforylowanej z mięśni gładkich, ulegają dysocjacji pod wpływem ATP. W ten sposób monomeryczna miozyna mogłaby łatwiej przemieszczać się w obrębie komórki, a w określonym czasie pod wpływem fosforylacji mogłaby tworzyć filamenty i reagować z aktyną, generując zjawiska ruchu. Jednak dotychczas, mimo zlokalizowania miozyny w wielu komórkach mięśniowych metodami immunocytochemicznymi, nie udało się określić jej molekularnej organizacji *in vivo*, zarówno podczas spoczynku, jak i aktywności ruchowej komórki [44]. Wiąże się to prawdopodobnie z niskim stężeniem miozyny w komórkach mięśniowych, mniejszymi rozmiarami filamentów lub tym, że tylko niewielka populacja cząsteczek miozyny znajduje się w komórce w postaci filamentów [62].

Przypuszcza się, że opisane już tu mechanizmy, poprzez które działanie jonów Ca^{2+} aktywuje zjawiska ruchu w komórkach niemięśniowych, mogą być wykorzystane w komórkach grasicy podczas endocytozy tyreoglobulin w wyniku stymulacji tyreotropiną [95], w komórkach rdzenia nadnerczy mogłyby służyć sekrecji katecholamin [129], a w komórkach nerwowych — uwalnianiu neurotransmiterów [11]. Wiadomo, że *in vivo* fosforylacja miozyny w płytkach krwi stabilizuje połączenie miozyny ze strukturami cytoskieletu [50] i pozostaje w korelacji z sekrecją serotoniny [104], a także ze zmianą kształtu płytek [36].



Ryc. 6. Wpływ fosforylacji ciężkich łańcuchów dwugłówkowej miozyny z *Acanthamoeba castellani* na aktywność ATP-azy aktomiozynowej (wg Collinsa i Korna [28])

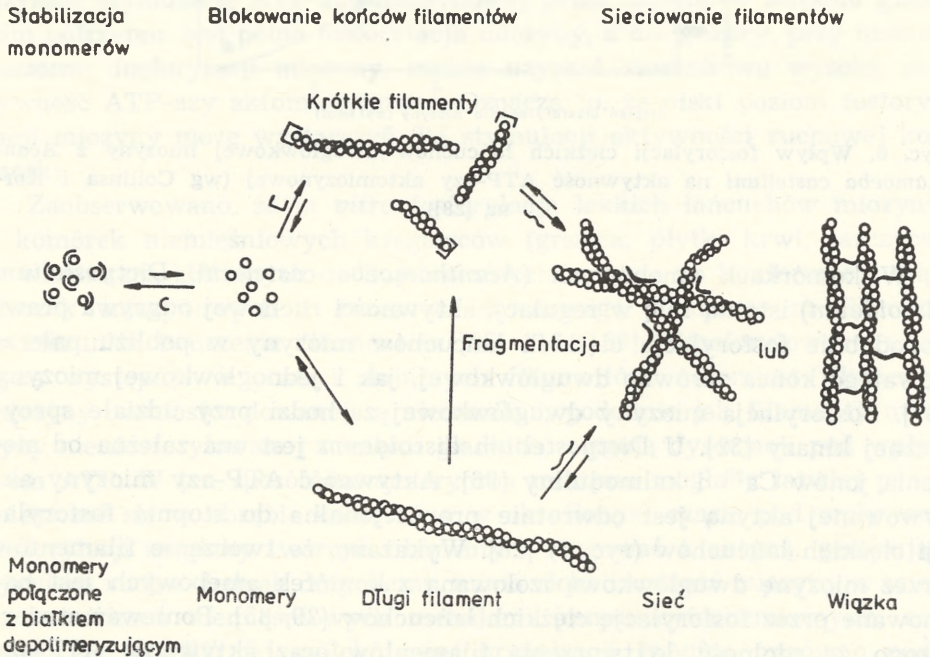
W komórkach amebowych (*Acanthamoeba castellani*, *Dictyostelium discoideum*) istotną rolę w regulacji aktywności ruchowej odgrywa prawdopodobnie fosforylacja ciężkich łańcuchów miozyny w pobliżu pałeczkowatego końca zarówno dwugłówkowej, jak i jednogłówkowej miozyny [87]. Fosforylacja miozyny dwugłówkowej zachodzi przy udziale specyficznej kinazy [32]. U *Dictyostelium discoideum* jest ona zależna od stężenia jonów Ca^{2+} i kalmoduliny [96]. Aktywność ATP-azy miozyny aktywowanej aktywną jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia fosforylacji ciężkich łańcuchów (ryc. 6) [28]. Wykazano, że tworzenie filamentów przez miozynę dwugłówkową izolowaną z komórek amebowych jest hamowane przez fosforylację ciężkich łańcuchów [29, 85]. Ponieważ stwierdzono, że zdolność do tworzenia filamentów oraz aktywność ATP-azy miozynowej aktywowanej aktywną zależy od obecności końcowego fragmentu pałeczki miozyny, w obrębie którego zachodzi fosforylacja [86], wysunięto więc hipotezę, że fosforylacja ciężkiego łańcucha miozyny dwugłówkowej komórek amebowych reguluje współdziałanie tego białka z aktyną [87]. Dokonuje się to przez oddziaływania międzycząsteczkowe

wewnątrz filamentów, które determinują ich konformację i w konsekwencji reaktywność główek miozynowych.

Fosforylacja ciężkiego łańcucha miozyny jednogłównkowej zachodzi w niewielkiej odległości od miejsca katalitycznego cząsteczki i powoduje wzrost aktywności ATP-azy miozynowej aktywowanej aktyną [5]. Przyпуска się, że za lokomocję komórek amebowych odpowiedzialne jest współdziałanie aktyny z dwugłównkową miozyną [85, 159], natomiast transport wewnątrzkomórkowy może zależeć od interakcji aktyny z miozyną jednogłównkową.

Ostatnie badania wykazują, że w miozynie niektórych komórek mięśniowych (limfocyty, makrofagi, mózg) ulegają fosforylacji zarówno ciężkie, jak i lekkie łańcuchy [47, 97, 142]. Nasuwa się pytanie, w jaki sposób w komórkach tych odbywa się regulacja współdziałania aktyny z miozyną, jeśli strukturalne i enzymatyczne właściwości miozyny zależą od miejsca fosforylacji, a efekty obydwu fosforylacji są przeciwne.

Ilościowe proporcje między miozyną i aktyną w komórkach mięśniowych, w porównaniu z mięśniowymi, są przesunięte wyraźnie na ko-



Ryc. 7. Regulacja stanu organizacji aktyny w komórkach mięśniowych przez białka: a) wiążące się z monomerami aktyny i hamujące tworzenie filamentów aktynowych, b) skracające filanty aktynowe i c) łączące filanty aktynowe w wiązki lub sieci (wg Craig i Pollarda [34])

rzyć aktywne. Ten „nadmiar” aktywny tworzy cytoszkielet, a także bierze udział w generowaniu zjawisk ruchu na drodze transformacji $G \rightleftharpoons F$ -aktywna i tworzeniu wysoko zorganizowanych struktur F-aktywny. Procesy te podlegają regulacji przez występujące w komórce liczne białka wiążące się z aktywną. Białka wpływające na stan organizacji aktywny zostały podzielone na trzy zasadnicze grupy (ryc. 7) [34, 84, 115, 153]:

- 1) depolimeryzujące F-aktywną i stabilizujące G-aktywną,
- 2) ograniczające długość filamentów aktywnych i wpływające na szybkość polimeryzacji aktywny,
- 3) sieciujące filamente aktywny.

Do pierwszej grupy należą białka, które hamują polimeryzację G-aktywny (np. profilina, DN-aza) ([89, 90] i odnośniki w [84] i [153]). Tworząc kompleks z monomeryczną aktywną utrzymują ją w stanie zdepolimeryzowanym, chociaż występuje ona w stężeniu znacznie przekraczającym tzw. stężenie krytyczne, przy którym zachodzi polimeryzacja. Monomery aktywny powstają w wyniku działania białek depolimeryzujących F-aktywną (ADF-actin depolymerizing factors), znalezionych w osoczu krwi i mózgu, które wiążąc się z G-aktywną blokują również jej polimeryzację [7, 26]. Ich stężenie, np. w komórkach mózgu, wystarcza, aby zablokować 20-30% aktywny.

Do drugiej grupy należą „białka zakrywające” (capping proteins), które przyłączając się do rosnącego końca filamentów aktywnych blokują przyłączanie monomerów do filamentów (podobnie jak to ma miejsce w przypadku cytochalazyny) (odnośniki w [136]). Lista tych białek podana jest w pracy [136]. Niektóre z białek tej grupy mogą również przecinać utworzone filamente, a następnie blokować wzrastające końce fragmentów. W ten sposób dochodzi do skracania filamentów aktywnych. Białka te, w odróżnieniu od białek depolimeryzujących F-aktywną (ADF), wpływają też często na tworzenie zarodków polimeryzacji, przez co przyspieszają proces polimeryzacji aktywny [14, 74, 81]. Mogą one, dzięki zdolności inicjacji polimeryzacji aktywny, decydować o szybkim powstawaniu w danym rejonie komórki filamentów aktywnych, potrzebnych dla wywołania określonego zjawiska ruchu. Podczas np. podziału komórkowego pojawiają się wiązki filamentów aktywnych, które początkowo otaczają wrzeciono podziałowe, a później tworzą pierścień wokół bruzdy podziałowej, którego zadanie polega na oddzielaniu nowo powstałych komórek [113, 124]. Gwałtowne tworzenie filamentów *in vivo* obserwuje się także w czasie procesów akrosomalnych, zachodzących podczas zapłodnienia w plemnikach strzykwy (Thyone) [140].

Do trzeciej grupy należą białka, które powodują łączenie filamentów aktywnych w równoległe wiązki lub trójwymiarowe izotropowe sieci. Sieci filamentów aktywnych występują głównie w pobliżu błony komór-

kowej, tworząc lamellopodia i filopodia [103]. Wiązki filamentów występują najczęściej w głębi cytoplazmy i są przymocowane do błony komórkowej. Strukturami złożonymi z wiązek filamentów aktynowych są m.in. włókna naprężeniowe (stress fibers) i mikrokosmki komórek nabłonka jelitowego [17, 100]. Do grupy tej należą również białka, które przymocowują aktynę do błony komórkowej i innych fibrylarnych struktur cytoszkieletu, jak mikrotubule i filamety pośrednie. Ich przykładami są winkulina [51] czy spektryna, która sieciuje krótkie filamety aktywne, znajduje się w błonie komórkowej erytrocytów, i decyduje o ich kształcie [55]. Homologi spektryny występują w innych komórkach mięśniowych oraz komórkach mięśni gładkich pod nazwą fodryny i służą m.in. utrzymywaniu strukturalnej integralności błon [53, 154]. Białkiem sieciującym jest również filamina obecna we wszystkich komórkach mięśniowych i mięśniowych, występująca zarówno na obrzeżach komórek mięśniowych, jak i we włóknach naprężeniowych. Przypuszcza się, że oprócz wypełniania funkcji strukturalnej, może ona brać udział w wysuwaniu pseudopodiów [151, 152]. Jej homologi (ABP — actin binding proteins) wyizolowane z makrofagów i płytek krwi decydują o odpowiedniej konsystencji cytoplazmy w komórce, co warunkuje zdolność jej przepływu [111, 135].

Dla wywołania określonego zjawiska ruchu opisane już tu białka wpływają na struktury tworzone przez aktynę w sposób kompleksowy. Podczas np. reakcji akrosomalnej działają białka, które uwalniają aktynę z jej kompleksu z białkiem stabilizującym, inne powodują polimeryzację G-aktyny, a jeszcze inne sieciują wytworzone filamety aktywne [140].

Niektóre z białek regulujących wpływają na stan organizacji aktyny w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} , które wiążą się bezpośrednio z białkami regulującymi lub poprzez kalmodulinę obecną we wszystkich komórkach mięśniowych. Przykładem pierwszego typu białek jest żelozolina, która, po związaniu jonów Ca^{2+} , powoduje przecinanie filamentów aktynowych tworzących sieci i w konsekwencji rozpuszczanie żelu [158]. Przykładem drugiego typu białek jest spektryna (fodryna), której podjednostka wiąże się z kalmoduliną i w ten sposób powoduje wrażliwość działania tego białka na jony Ca^{2+} [15, 54].

Wiele białek, które wpływają na stan organizacji aktyny w komórce, wpływa również na jej współdziałanie z miozyną. Wysokocząsteczkowe białka sieciujące aktynę (ABP) indukujące powstawanie żelu powodują, że stężenie miozyny potrzebne do wywołania danego zjawiska ruchu (w obecności ATP, kinazy lekkich łańcuchów miozyny i kalmoduliny) jest znacznie mniejsze niż podczas oddziaływania samej aktyny z miozyną [133].

Przykłady te wskazują na trudności w ustaleniu, czy o danej formie ruchu komórkowego decyduje zmiana stanu organizacji aktyny, czy jej współdziałanie z miozyną, czy obydwie te procesy razem. Sytuacja jest jeszcze bardziej złożona, gdy w generacji ruchu, obok wymienionych systemów, bierze również udział układ tubulinowo-dyneinowy [98] lub tubulinowo-kinezynowy [64].

Trzeba jednak podkreślić, że badania ostatnich lat przyniosły wiele interesujących informacji dotyczących białek regulujących stan organizacji aktyny i jej współdziałanie z miozyną w wielu komórkach mięśniowych. Przeprowadzono charakterystykę strukturalną i funkcjonalną wielu z tych białek. Coraz więcej wiadomo też na temat ich lokalizacji w różnych stanach fizjologicznych i różnych fazach cyklu komórkowego. Te biochemiczne i immunologiczne badania zbliżają nas do poznania mechanizmów regulujących zjawiska ruchu w komórkach mięśniowych. Dla pełnego zrozumienia tych mechanizmów konieczne są jednak wiadomości dotyczące funkcjonowania poszczególnych białek w żywej komórce.

WNIOSKI

Zjawiska ruchu, w których biorą udział aktyna i miozyna, można podzielić na dwie grupy: pierwsze zależą od współdziałania obu tych białek w obecności ATP i są wspólne dla mięśni i komórek mięśniowych, drugie, których podstawą są zmiany stanu organizacji aktyny, występują tylko w komórkach mięśniowych.

Mechanizmy regulacji współdziałania aktyny z miozyną w komórkach mięśniowych i mięśniowych działają prawdopodobnie poprzez wpływ białek regulujących (kompleksu troponinowo tropomiozynowego) lub modyfikacji miozyny na poszczególne etapy hydrolizy ATP, a nie na zasadzie blokowania przestrzennego [2, 25, 112].

Mechanizmy regulacji, polegające na modyfikacji enzymatycznej (fosforylacja) miozyny i/lub wiązaniu ligandu (jonów Ca^{2+}) z jej lekkimi regulującymi łańcuchami, charakteryzują się tym, że:

- 1) Zmieniają konformację główek miozyny poprzez wpływ na rejon połączenia główki z resztą cząsteczki.

- 2) Efektywność ich zależy od subtelnych różnic w budowie poszczególnych elementów cząsteczki miozyny — jej regulujących lekkich łańcuchów lub innych rejonów główki oraz części pałeczkowatej. Na różnice struktury lekkich łańcuchów pochodzących z różnych typów miozyny wskazuje m.in. różna zdolność do rekonstytucji systemu regulującego mięczaków przez wprowadzenie łańcuchów regulujących z innych typów

miozyny w miejsce usuniętych łańcuchów rodzimych [80]. Na odmienną budowę części pałeczkowatej różnych typów miozyny wskazuje różna ich fragmentacja przez enzymy proteolityczne [94] i zdolność tylko niektórych typów miozyny do specyficznego „zwijania” części pałeczkowatej [145]. Różnice w aktywności ATP-azy aktomiozynowej po związaniu kowalencyjnym aktywy z główkami (S_1) miozyny z mięśni gładkich i szkieletowych świadczą o różnej budowie tych główek w rejonie miejsca wiązania z aktyną [92].

3) Transmisja zmian konformacyjnych zachodzących w jednym rejonie cząsteczki miozyny (miejscu działania efektora) do odległego rejonu, np. miejsca katalitycznego, miejsca wiązania aktywy lub części pałeczkowatej, może przebiegać wzdłuż struktury α -heliksu, odznaczającej się dużą sztywnością (jeśli nie jest ona zaburzona). Na przykład zmiany konformacyjne spowodowane fosforylacją ciężkiego łańcucha miozyny mogą być przenoszone przez strukturę α -heliksu ciężkiego łańcucha do części globularnej. Transmisja zmian konformacyjnych może zachodzić także w przeciwnym kierunku — zmiany w rejonie główki mogą decydować o „zwijaniu” części pałeczkowatej miozyny, stabilności filamentów itd.

Mechanizmy regulujące zmiany stanu organizacji aktywy w komórkach niemięśniowych zależą od białek wiążących się z aktyną. Białka te wpływają na równowagę reakcji monomer \rightleftharpoons filament oraz na powstawanie bardziej złożonych struktur filamentów aktynowych, jak sieci czy wiązki.

LITERATURA

- [1] ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., Phosphorylation of platelet myosin increases actin activated myosin ATPase activity. *Nature*, **256**: 597-598, 1975.
- [2] ADELSTEIN R. S., EISENBERG E., Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 921-956, 1980.
- [3] AKSOY M. O., MRAS S., KAMM K. E., MURPHY R. A., Ca^{2+} , cAMP and changes in myosin phosphorylation during contraction of smooth muscle, *Am. J. Physiol.*, **245**: C255-C270, 1983.
- [4] ALBANESI J. P., FUJISAKI H., HAMMER J. A. III, KORN D., JONES R., SHEETZ M. P., Monomeric *Acanthamoeba* myosin I support movement *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **260**: 8649-8652, 1985.
- [5] ALBANESI J. P., FUJISAKI H., KORN E., Localization of the active site and phosphorylation site of *Acanthamoeba* myosin IB, *J. Biol. Chem.*, **25**: 14184-14189, 1984.
- [6] ALBANESI J. P., HAMMER J. A. III, KORN E. D., The interaction of F-actin with phosphorylated and unphosphorylated myosin IA and IB from *Acanthamoeba castellanii*, *J. Biol. Chem.*, **258**: 10176-10181, 1983.
- [7] BAMBURG J. R., HARRIS H. E., WEEDS A. G., Partial purification and

- characterization of an actin depolymerizing factor from brain, *FEBS Lett.*, **121**: 178 - 182, 1980.
- [8] BARRON J. T., BĀRĀNY M., BĀRĀNY K., Phosphorylation of the 20 000 dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction, *J. Biol. Chem.*, **254**: 4954 - 4956, 1979.
- [9] BARRON J. T., BĀRĀNY M., BĀRĀNY K., STORTI R. V., Reversible phosphorylation and dephosphorylation of the 20 000 dalton light chain of myosin during the contraction-relaxation-contraction cycle of arterial smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 6238 - 6244, 1980.
- [10] BARSOTTI R. J., BUTLER T. M., Chemical energy usage and myosin light chain phosphorylation in mammalian skeletal muscle, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **5**: 45 - 64, 1984.
- [11] BARYŁKO B., SOBIESZEK A., Phosphorylation and actin activation of brain myosin, *EMBO J.*, **2**: 369 - 374, 1983.
- [12] BOROVIKOV Y. S., GUSEV N. B., Effect of troponin-tropomyosin complex and Ca^{2+} on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment 1, *Eur. J. Biochem.*, **136**: 363 - 369, 1983.
- [13] BRADY S. T., LASEK R. J., ALLEN R. D., YIN H. L., STOSSEL T. P., Gelsolin inhibition of fast axonal transport indicates a requirement for actin microfilaments, *Nature*, **310**: 56 - 58, 1984.
- [14] BRYAN J., KURTH M. C., Actin-gelsolin interactions. Evidence for two actin-binding sites, *J. Biol. Chem.*, **259**: 7480 - 7487, 1984.
- [15] BURNS N. R., GRATZER W. B., Interaction of calmodulin with red cell and its membrane skeleton and with spectrin, *Biochemistry*, **24**: 3070 - 3074, 1985.
- [16] BUTLER T. M., SEGMAN M. J., MOOERS S. V., BARSOTTI R. J., Myosin light chain phosphorylation does not modulate cross-bridge cycling rate in mouse skeletal muscle, *Science*, **220**: 1167 - 1169, 1983.
- [17] BYERS H. R., WHITE G. E., FUIJWARA K., Organization and function of stress fibers in cells *in vitro* and *in situ*, w *Cell and Muscle Motility*, red. J. W. Shay, vol. 5, Plenum Publishing Corporation, 1984, 83 - 137.
- [18] BYGRAVE F. L., Calcium movements in cells, *Trans. in Biol. Sci.*, **3**: 175 - 178, 1978.
- [19] CASSIDY P. S., KERRICK W. G. L., HOAR P. E., MALENCIK D. A., Exogenous calmodulin increases Ca^{2+} sensitivity of isometric tension activation and myosin phosphorylation in skinned smooth muscle, *Pflügers Arch.*, **392**: 115 - 120, 1981.
- [20] CHACKO S., ROSENFELD A., Regulation of actin-activated ATP hydrolysis by arterial myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**: 292 - 296, 1982.
- [21] CHALOVICH J. M., EISENBERG E., Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin, *J. Biol. Chem.*, **257**: 2432 - 2437, 1982.
- [22] CHANDRA T. S., NATH N., SUZUKI H., SEIDEL J., Modification of thiols of gizzard myosin alters ATPase activity, stability of myosin filaments, and the 6-10S conformational transition, *J. Biol. Chem.*, **260**: 201 - 207, 1985.
- [23] CHANTLER P. D., Regulatory light chains and scallop myosin. From of light chain removal or reuptake is dependent on the presence of divalent cations, *J. Mol. Biol.*, **181**: 557 - 560, 1985.
- [24] CHANTLER P. D., SZENT-GYÖRGYI A. G., Regulatory light-chains and scallop myosin: full dissociation, reversibility and cooperative effects, *J. Mol. Biol.*, **138**: 473 - 492, 1980.

- [25] CHALOVICH J. M., CHANTLER P. D., SZENT-GYÖRGYI A. G., EISENBERG E., Regulation of moluscan actomyosin ATPase activity, *J. Biol. Mol.*, **259**: 2617 - 2621, 1984.
- [26] CHAPONNIER C., PATEBEX P., GABBIANI G., Human plasma actin-depolymerizing factor. Purification, biological activity and localization in leukocytes and platelets, *Eur. J. Biochem.*, **146**: 267 - 276, 1985.
- [27] CHIAO Y. C., HARRINGTON W. F., Crossbridge movement in glycerinated rabbit psoas muscle fibers. *Biochemistry*, **18**: 959 - 963, 1979.
- [28] COLLINS J. H., KORN E. D., Actin activation of Ca^{2+} sensitive Mg^{2+} -ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains, *J. Biol. Chem.*, **255**: 8011 - 8016, 1980.
- [29] COLLINS J. M., KUŹNICKI J., BOWERS B., KORN E. D., Comparison of the actin binding and filament formation properties of phosphorylated and dephosphorylated *Acanthamoeba* myosin II, *Biochemistry*, **21**: 6910 - 6915, 1982.
- [30] COOKE R., STULL J., Myosin phosphorylation. A biochemical mechanism for regulating contractility, w *Cell and Muscle Motility*, red. R. M. Dowben, J. W. Shay, vol. I, Plenum Press, New York, 1983, 99 - 133.
- [31] CÔTÉ B. P., ALBANESI J. P., UENO T., HAMMER J. A. III, KORN E., Purification from *Dictyostelium discoideum* of a low-molecular weight myosin that resembles myosin I from *Acanthamoeba castellanii*, *J. Biol. Chem.*, **260**: 4543 - 4546, 1985.
- [33] CÔTÉ G. P., COLLINS J. H., KORN E. D., Identification of three phosphorylation sites on each heavy chain of *Acanthamoeba* myosin II, *J. Biol. Chem.*, **256**: 2586 - 2595, 1981.
- [33] COLLINS J. H., BORYSENKO C. W., The 110 000 — Dalton actin — and calmodulin — binding protein from intestinal brush border is a myosin like ATPase, *J. Biol. Chem.*, **259**: 14128 - 14135, 1984.
- [34] CRAIG S. W., POLLARD T. D., Actin binding proteins. *Trans. Biol Sci.*, **82**: 88 - 92, 1982.
- [35] CRAIG R. C., SMITH R., KENDRICK-JONES J., Light chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin molecules, *Nature*, **302**: 436 - 439, 1983.
- [36] DANIEL J. L., MOLISH I. R., RIGMAIDEN M., GWENDOLYN S., Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response, *J. Biol. Chem.*, **259**: 9826 - 9831, 1984.
- [37] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Postępy Biochemii*, **22**: 467 - 481, 1976.
- [38] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu, *Postępy Biochemii*, **19**: 344 - 359, 1973.
- [39] DĄBROWSKA R., DYDYŃSKA M., SZPACENKO A., DRABIKOWSKI W., Comparative studies on the composition and properties of troponin from fast, slow, and cardiac muscles, *Int. J. Biochem.*, **4**: 189 - 194, 1973.
- [40] DĄBROWSKA R., GOCH A., GAŁAZKIEWICZ B., OSIŃSKA H., Influence of caldesmon on ATPase activity of skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments, *Biochem. Biophys. Acta*, **842**: 70 - 75, 1985.
- [41] DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., A Ca^{2+} - and modulator-dependent myosin light chain kinase from non-muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 1352 - 1359, 1978.
- [42] DĄBROWSKA R., SHERRY J. M. F., HARTSHORNE D. J., Phosphorylation of myosin: possible regulatory mechanism in smooth muscle, [w] *Motility in*

- Cell Function, Proc. I John M. Marshall Symp. in Cell Biol. red. F. A. Pepe, J. W. Sanger, V. T. Nachmias, Academic Press, New York, 1979, 147 - 160.
- [43] DILLON P. F., AKSOY M., DRISKA S. P., MURPHY R. A., Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle, *Science*, **211**: 495 - 497, 1981.
- [44] DRENCKHAHN D., GRÖSCHEL-STEWART U., Localization of myosin actin and tropomyosin in rat intestinal epithelium immunohistochemical studies at light and electron microscope levels, *J. Cell Biol.*, **86**: 475 - 482, 1980.
- [45] EBASHI S., Excitation — contraction coupling, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 293 - 313, 1976.
- [46] ENGLERT D. F., PERLMAN R. L., Myosin and myosin phosphorylation in pheochromocytoma (PC 12) cells, *Biochim. Biophys. Acta.* **802**: 77 - 82, 1984.
- [47] FACHEIMER M., CEBRA J. J., Phosphorylation of lymphocyte myosin catalyzed *in vitro* and in intact cells, *J. Cell Biol.* **93**: 261 - 268, 1982.
- [48] FLICKER P. F., WALLIMANN T., VIBERT P., Electron microscopy of scallop myosin. Location of regulatory light chains, *J. Mol. Biol.*, **169**: 723 - 741, 1983.
- [49] FOWLER V. M., DAVIS J. Q., BENNET V., Human erythrocyte myosin: identification and purification, *J. Cell. Biol.* **100**: 47 - 55, 1985.
- [50] FOX J. F. B., PHILIPS R. D., Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4120 - 4126, 1982.
- [51] GEIGER B., TOKUYASU K. T., DUTTON A. H., SINGER S. J., Vinculin an intracellular protein localized at special sites where microfilament bundles terminate at cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **77**: 4127 - 4131, 1980.
- [52] GERTHOFFER W. T., MURPHY R. A., Myosin phosphorylation and regulation of cross-bridge cycle in tracheal smooth muscle, *Am. J. Physiol.*, **244**: C182 - C187, 1983.
- [53] GLENNEY J. R., GLENNEY P., Fodrin is the general spectrin-like protein. found in most cells whereas spectrin and the TW protein have a restricted distribution, *Cell*, **34**: 503 - 512, 1983.
- [54] GLENNEY J. R., GLENNEY P., WEBER K., Erythroid spectrin, brain fodrin and intestinal brush border proteins (TW-260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell-type-specific subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**: 4002 - 4005, 1982.
- [55] GOODMAN S. R., SHIFFER K., The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes; *Am. J. Physiol.*, **244**: C121 - C141, 1983.
- [56] GREENE L. E., EISENBERG E., Cooperative binding of myosin subfragment 1 to the actin-troponin-tropomyosin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**: 2616 - 2620, 1980.
- [57] HARDWICKE P. M. D., SZENT-GYÖRGYI A. G., Proximity of regulatory light chains in scallop myosin, *J. Mol. Biol.*, **183**: 203 - 211, 1985.
- [58] HARRINGTON W. F., HIMMELFARB S., Effect of adenosine di- and triphosphate on the stability of synthetic myosin filaments, *Biochemistry*, **4**: 2945 - 2952, 1972.
- [59] HATHAWAY D. R., ADELSTEIN R. S., Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**: 1653 - 1657, 1979.
- [60] HARTSHORNE D. J., GÓRECKA A., Biochemistry of the contractile proteins of smooth muscle, w *Handbook of Physiology*, sec. 2. The cardiovascular sys-

- tem, Vascular smooth muscle, red. R. M. Berne, A. P. Somlyo H. V. Sparks, vol. II, Bethesda, 1980, 93 - 120.
- [61] HASELGROVE J. C., X ray evidence for a conformational change in the actin containing filaments of vertebrate striated muscle, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **37**: 341 - 352, 1972.
- [62] HERMAN I., POLLARD T. D., Electron microscopic localization of cytoplasmic myosin with ferritin labeled antibodies, J. Cell Biol., **88**: 346 - 351, 1981.
- [63] HOAR P. E., KERRICK W. G. L., CASSIDY P. S., Relation between calcium-activated phosphorylation and contraction, Science, **204**: 503 - 506, 1979.
- [64] HOLLENBECK P. J., A third front for cell motility, Nature, **317**, 17 - 18, 1985.
- [65] HOUSTON M. E., GREEN J., STULL J., Myosin light chain phosphorylation and isometric twitch potentiation in intact human muscle, Pflüg. Archiv., **403**: 348 - 352, 1985.
- [66] HUXLEY H. E., Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contractions, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **37**: 361 - 376, 1972.
- [67] — Muscular contraction and cell motility, Nature, **243**: 445 - 449, 1973.
- [68] — The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications, J. Exp. Biol., **115**: 17 - 30, 1985.
- [69] IKEBE M., HARTSHORNE D. J., Conformation — dependent proteolysis of smooth-muscle myosin, J. Biol. Chem., **259**: 11639 - 11642, 1984.
- [70] — Proteolysis of smooth muscle myosin by *Staphylococcus aureus* protease. Preparation of heavy meromyosin and subfragment 1 with intact 20 000 dalton light chains. Biochemistry, **24**: 2380 - 2387, 1985.
- [71] IKEBE M., HINKINS S., HARTSHORNE D. J., Correlation on intrinsic fluorescence and conformation of smooth muscle myosin, J. Biol. Chem., **258**: 14770 - 14773, 1981.
- [72] — Correlation of enzymatic properties and conformation of smooth muscle myosin, Biochemistry, **22**: 4580 - 4587, 1983.
- [73] IKEBE M., OGIHARA S., TONOMURA Y., Nonlinear dependence of actin -- activated Mg^{2+} -ATPase activity on the extent of phosphorylation of gizzard myosin and H-meromyosin, J. Biochem. (Tokyo), **91**: 1809 - 1312, 1982.
- [74] JANMEY P. A., CHAPONNIER C., LIND S. E., ZANER K. S., STOSSEL T. P., YIN H. L., Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and blocking, Biochemistry, **24**: 3614 - 3723, 1985.
- [75] KACHAR B., Direct visualization of organelle movement along actin filaments dissociated from Characean Algae, Science, **227**: 1355 - 1357, 1985.
- [76] KAMIŃSKI E. A., CHACKO S., Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the actin-activated ATP hydrolysis by phosphorylated heavy meromyosin from arterial smooth muscle, J. Biol. Chem., **259**: 9104 - 9108, 1984.
- [77] KARDAMI E., ALEXIS M., de la PAZ P., GRATZER W., Phosphorylation and the binding of calcium and magnesium to skeletal myosin, Eur. J. Biochem., **110**: 153 - 160, 1980.
- [78] KARDAMI E., GRATZER W. B., Conformational effects of cation binding to myosin and their relation to phosphorylation, Biochemistry, **21**: 1186 - 1191, 1982.
- [79] KAŁOL I., BOROVNIKOV Y. S., LEVITSKI D. I., Design of molecular mechanism of actin-myosin interaction in skeletal muscle by phosphorylation of myosin, J. Muscle Res. Cell Motility **7**: 66, 1986.

- [80] KENDRICK-JONES J., SZENTKIRALYI E. M., SZENT-GYÖRGYI A. G., Regulatory light chains in myosins, *J. Mol. Biol.*, **104**: 747-775, 1976.
- [81] KILIMANN M. W., ISENBERG G., Actin filament capping protein from bovine brain, *EMBO J.*, **1**: 889-894, 1982.
- [82] KLUG G. A., BOTTERMAN B. R., STULL J. T., The effect of low frequency stimulation on myosin light phosphorylation in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4688-4690, 1982.
- [83] KORN E. D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 588-599, 1978.
- [84] KORN E. D., Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells, *Physiol. Rev.*, **62**: 672-737, 1982.
- [85] KUCZMARSKI E. R., SPUDICH J. A., Regulation of myosin self assembly: phosphorylation of *Dictyostelium* heavy chain inhibits formation of thick filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7292-7296, 1980.
- [86] KUŹNICKI J., CÔTÉ G. P., BOWERS B., KORN E., Filament formation and actin-activated ATPase activity are abolished by proteolytic removal of small peptide from the tip of the tail of the heavy chain of *Acanthamoeba* myosin II, *J. Biol. Chem.*, **260**: 1967-1972, 1985.
- [87] KUŹNICKI J., Fosforylacja miozyny *in vivo* i *in vitro* I. Miozyna komórek mięśniowych, *Postępy Biochem.* (w druku).
- [88] de LANEROLLE P., STULL J. T., Myosin phosphorylation during contraction and relaxation of tracheal smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9993-10000, 1980.
- [89] LINBERG U., HOGLUND A. S., KARLSSON R., On the ultrastructural organization of the microfilament system and the possible role of profilactin, *Biochimie*, **63**: 307-323, 1981.
- [90] MANNHERZ H. G., GOODY R. S., KONRAD M., NOWAK E., The interaction of bovine pancreatic deoxyribonuclease I and skeletal muscle actin, *Eur. J. Biochem.*, **104**: 367-379, 1980.
- [91] MANNING D. R., STULL J. T., Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle, *Am. J. Physiol.*, **242**: C234-C241, 1982.
- [92] MARIANNE-PEPIN T., MORNET D., BERTRAND R., LABBE J. P., KASSAB R., Interaction of the heavy chain of gizzard myosin heads with skeletal F-actin, *Biochemistry*, **24**: 3024-3029, 1985.
- [93] MARSTON S. B., SMITH C. W., Purification and properties of Ca^{2+} regulated thin filaments and F-actin from sheep aorta smooth muscle, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **5**: 559-575, 1984.
- [94] MATSUMURA S., KUMON A., CHIBA T., Proteolytic substructure of brain myosin, *J. Biol. Chem.*, **260**: 1959-1966, 1985.
- [95] MARTIN F., GABRION J., CAVADORE J. C., Thyroid myosin filament assembly disassembly is controlled by myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation, *FEBS Lett.*, **131**: 235-238, 1981.
- [96] MARUTA H., BALTES W., DIETER P., MARME D., SERISCH G., Myosin heavy chain kinase inactivated by Ca^{2+} /calmodulin from aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*, *EMBO J.*, **2**: 535-542, 1983.
- [97] MICHNICKA M., KASMAN K., KAKOL I., The binding of actin to phosphorylated and dephosphorylated myosin, *Biochim. Biophys. Acta*, **704**: 470-475, 1982.
- [98] MOHRI H., The function of tubulin in motile systems, *Biochem. Biophys. Acta*, **456**: 85-127, 1976.

- [99] MOORE R. L., STULL J., Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscle *in situ*, *Am. J. Physiol.* **247**: C462 - C471, 1984.
- [100] MOOSEKER M. S., Actin binding proteins in the brush border, *Cell*, **35**: 11 - 13, 1983.
- [101] MRAKOVIC-ZENIC A., REISLER E., Light chain phosphorylation and cross bridge conformation in myosin from vertebrate skeletal muscle, *Biochemistry*, **22**: 525 - 530, 1983.
- [102] MRWA U., RÜEGG J. C., Myosin-linked calcium regulation in vascular smooth muscle, *FEBS Lett.*, **60**: 81 - 84, 1975.
- [103] NACHMIAS V. T., w Microfilaments, red. J. J. Head, Carolina Biology Readers, North Carolina, 1984, 1 - 16.
- [104] NISHIKAWA M., TANAKA T., HIDAKA H., Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion, *Nature*, **287**: 863 - 865, 1980.
- [105] ONISHI H., WAKABAYASHI T., Electron microscopic studies of myosin molecules of chicken gizzard muscle. The formation of the intramolecular loop in the myosin tail. *J. Biochem. (Tokyo)*, **92**: 871 - 879, 1982.
- [106] ONISHI H., WATANABE S., Correlation between the papain digestibility and the conformation of 10S-myosin from chicken gizzard, *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**: 899 - 902, 1984.
- [107] PEMRICK S. M., The phosphorylated L₂ light chain of skeletal myosin is a modifier of the actomyosin ATPase, *J. Biol. Chem.*, **255**: 8836 - 8841, 1980.
- [108] PERSECHINI A., HARTSHORNE D. J., Phosphorylation of smooth muscle myosin: evidence for cooperativity between the myosin heads, *Science*, **213**: 1383 - 1385, 1981.
- [109] PERSECHINI A., STULL J. T., COOK R., The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers, *J. Biol. Chem.*, **260**: 7951 - 7954, 1985.
- [110] POLLARD T. D., WEIHING R. R., Actin and myosin and cell movement, *Crit. Rev. Biochem.*, **2**: 1 - 65, 1974.
- [111] ROSENBERG S., STRACHER A., LUCAS R. C., Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets, *J. Cell Biol.*, **91**: 201 - 211, 1981.
- [112] ROSENFELD S. S., TAYLOR W., Reactions of 1-N⁶-ethenoadenosine nucleotides with myosin subfragment 1 and acto-subfragment 1 of skeletal and smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **259**: 11920 - 11929, 1984.
- [113] SANGER J. W., Changing patterns of actin localization during cell division, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**: 1913 - 1916, 1983.
- [114] SANGER J. M., SANGER J. W., Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells, *J. Cell Biol.*, **86**: 568 - 575, 1980.
- [115] SCHLIWA M., Proteins associated with cytoplasmic actin, *Cell*, **25**: 587 - 590, 1981.
- [116] SCHOLEY J. M., TAYLOR K. A., KENDRICK-JONES J., The role of myosin light chains in regulatory actin-myosin interaction, *Biochimie*, **63**: 255 - 271, 1981.
- [117] SEIDEL J. C., Chymotryptic heavy meromyosin from gizzard myosin: A proteolytic fragment with the regulatory properties of the intact myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 107 - 113, 1978.
- [118] SEIDEL J. C., Fragmentation of gizzard myosin by chymotrypsin and papain, the effect on ATPase activity and the interaction with actin, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4355 - 4361, 1980.

- [119] SELLERS J. R., CHOCK P. B., ADELSTEIN D. S., The apparently negatively cooperative phosphorylation of smooth muscle myosin at low ionic strength is related to its filamentous state, *J. Biol. Chem.*, **258**: 14181 - 14188, 1983.
- [120] SELLERS J. R., PATO M. D., ADELSTEIN R. S., Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin heavy meromyosin and platelet myosin, *J. Biol. Chem.*, **256**: 13137 - 13142, 1981.
- [121] SELLERS J. R., HARVEY E. V., Localization of a light-chain binding on smooth muscle myosin revealed by light-chain overlay of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoretic gels, *J. Biol. Chem.*, **259**: 14203 - 14207, 1984.
- [122] SELLERS J. R., EISENBERG E., ADELSTEIN R. S., The binding of smooth muscle heavy meromyosin to actin in the presence of ATP, *J. Biol. Chem.*, **267**: 13880 - 13883, 1982.
- [123] SHEETZ M. P., SPUDICH J. A., Movement of myosin-coated structures on actin cables, *Cell Motility*, **3**: 485 - 489, 1983.
- [124] SHIMIZU T., Organization of actin filaments during polar body formation in eggs of *Tubifex (Annelida Oligochaeta)*, *Eur. J. Cell Biol.*, **30**: 74 - 82, 1983.
- [125] SIEGMAN M. J., BUTLER T. M., MOOERS S. V., Energetics and regulation of cross bridge states in mammalian smooth muscle, *Experientia*, **41**: 1020 - 1025, 1985.
- [126] SMITH R. C., CANDE W. Z., CRAIG R., TOOTH P. J., SCHOLEY J. M., KENDRICK-JONES J., Regulation of myosin filament assembly by light-chain phosphorylation, *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, **B 302**: 73 - 82, 1983.
- [127] SOBUE K., MORIMOTO K., INUI M., KANDA K., KAKIUCHI S., Control of actin-myosin interaction of gizzard smooth muscle by calmodulin- and caldesmon-linked flip-flop mechanism, *Biomed. Res.*, **3**: 188 - 196, 1982.
- [128] SOBUE K., MURAMOTO Y., FUJITA M., KAKIUCHI S., Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 5652 - 5655, 1981.
- [129] SOBUE K., TANAKA T., KANDA K., TAKAHASHI K., ITO K., KAKIUCHI S., A dual regulation of the actin-myosin interaction in adrenal medullary actomyosin by actin-linked and myosin-linked systems, *Biomed. Res.*, **6**: 93 - 102, 1985.
- [130] SOMLYO A. V., BUTLER T. M., BOND M., SOMLYO A. P., Myosin filaments have non-phosphorylated light chains in relaxed smooth muscle, *Nature*, **294**: 567 - 569, 1981.
- [131] SRIVASTAVA S., IKEBE M., HARTSHORNE D. J., Trinitrophenylation of smooth muscle myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**: 743 - 755, 1985.
- [132] STAFFORD W. F., SZENT-GYÖRGYI A. G., Physical characterization of myosin light chains, *Biochemistry*, **17**: 607 - 614, 1978.
- [133] STENDAHL O. L., STÖSSEL T. P., Acting-binding protein amplifies actomyosin contraction, and gelsolin confers calcium control on the direction of contraction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 675 - 681, 1980.
- [134] STĘPKOWSKI D., OSIŃSKA H., SZCZEŚNA D., WROTEK M., KĄKOL I., Decoration of actin filaments with skeletal muscle heavy meromyosin containing either phosphorylated or dephosphorylated regulatory light chains, *Biochem. Biophys. Acta*, **830**: 337 - 340, 1985.
- [135] STÖSSEL T. P., HARTWIG J. H., Interactions between actin, myosin and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5706 - 5712, 1975.

- [136] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., Struktura filamentu aktynowego i jej implikacje biologiczne, *Post. Biol. Kom.*, **13**: 97 - 123, 1986.
- [137] SUZUKI H., KAMATA T., ONISHI H., WATANABE S., Adenosine-triphosphate-induced reversible change in the conformation of chicken gizzard myosin and heavy meromyosin, *J. Biochem. (Tokyo)*, **91**: 1699 - 1705, 1982.
- [138] SZCZĘSNA D., BOROVIKOV Y. S., The conformational changes of F-actin induced by the binding of two forms of heavy meromyosin to actin, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **7**: 66, 1986.
- [139] TAKEUCHI K., ISHIMURA K., Properties of porcine platelet myosin. II. Shape change of the molecule, *J. Biochem. (Tokyo)*, **97**: 1695 - 1708, 1985.
- [140] TILNEY L. G., HATANO S., ISHIKAWA H., MOOSEKER M. S., The polymerization of actin: Its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm, *J. Cell Biol.*, **59**: 109 - 126, 1973.
- [141] TSUKITA S., TSUKITA S., USUKURA J., ISHIKAWA K., Myosin filaments in smooth muscle cells of the guinea pig taeniocoli — a freeze-substitution study, *Eur. J. Cell Biol.*, **28**: 195 - 201, 1982.
- [142] TROTTER J. A., Living macrophages phosphorylate the 20 000 dalton light chains and heavy chains of myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**: 1071 - 1077, 1982.
- [143] TROTTER J. A., ADELSTEIN R. S., Regulation of actin-activated ATPase activity by phosphorylation of the 20 000 dalton light chain, *J. Biol. Chem.*, **254**: 8781 - 8785, 1979.
- [144] TRYBUS K. M., HUIATT T. W., LOWEY S., A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**: 6151 - 6155, 1982.
- [145] TRYBUS K. M., LOWEY S., Conformational states of smooth muscle myosin, *J. Biol. Chem.*, **259**: 8564 - 8571, 1984.
- [146] VIBERT P., CRAIG R., Three-dimensional reconstruction of thin filaments decorated with a Ca^{2+} -regulated myosin, *J. Mol. Biol.*, **157**: 299 - 319, 1982.
- [147] WAGNER P. D., VU N-D., GEORGE J. N., Random phosphorylation of the two heads of thymus myosin and the independent stimulation of their actin activated ATPases, *J. Biol. Chem.*, **260**: 8084 - 8089, 1985.
- [148] WALLIMAN T., SZENT-GYÖRGYI A. G., An immunological approach to myosin light-chain function in thick filament linked regulation. 1. Characterization specificity and cross-reactivity of anti-scallop myosin heavy- and light-chain antibodies by competitive, solid-phase radioimmunoassay, *Biochemistry*, **20**: 1176 - 1197, 1981.
- [149] WALLIMAN T., SZENT-GYÖRGYI A. G., An immunological approach to myosin light chain function in thick filament linked regulation. 2. Effects of anti-scallop myosin light chain antibodies. Possible regulatory role for the essential light chain, *Biochemistry*, **20**: 1188 - 1197, 1981.
- [150] WALSH M. P., HARTSHORNE D. J., Actomyosin of smooth muscle, *Calcium and Cell Function*, vol. **III**: 223 - 269, 1962.
- [151] WANG K., Filamin a new high-molecular protein found in smooth muscle and non muscle cells. Purification and properties of chicken gizzard filamin, *Biochemistry*, **16**: 1857 - 1864, 1977.
- [152] WANG K., SINGER S. J., Interaction of filamin with F-actin in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 2021 - 2025, 1977.
- [153] WEEDS A., Actin binding proteins-regulators of cell architecture and motility, *Nature*, **296**: 811 - 816, 1982.

- [154] WILLARD M., LEVINE J., Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells, *J. Cell Biol.*, **90**: 631-643, 1981.
- [155] YANAGIDA T., NAKASE M., NISHIYAMA K., OOSAWA F., Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin, *Nature*, **307**: 58-60, 1984.
- [156] YANAGIDA T., TANIGUCHI M., OOSAWA F., Conformational changes of F-actin in the thin filaments of muscle induced *in vitro* and *in vivo* by calcium ions, *J. Mol. Biol.*, **90**: 509-522, 1974.
- [157] YERNA M-J., DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., GOLDMAN R. D., Calcium-sensitive regulation of actin-myosin interaction in baby hamster kidney (BHK-21) cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**: 184-188, 1979.
- [158] YIN H. L., STOSSEL T. P., Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin a calcium-dependent regulatory protein, *Nature*, **281**: 583-586, 1979.
- [159] YUMURA S., MORI H., FUKUI Y., Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence, *J. Cell Biol.*, **99**: 894-899, 1984.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Otrzymano: 23 grudnia 1985.

Przyjęto: 23 grudnia 1985.

The following information is provided for your information. It is intended to be a general guide only and should not be used as a substitute for professional advice. The information is based on the best available information at the time of publication and is subject to change without notice. The information is provided as a service to our clients and is not intended to constitute an offer of any financial product or service. The information is not intended to be used as a basis for investment decisions. The information is provided for your information only and should not be used as a substitute for professional advice. The information is based on the best available information at the time of publication and is subject to change without notice. The information is provided as a service to our clients and is not intended to constitute an offer of any financial product or service. The information is not intended to be used as a basis for investment decisions.

ORGANIZACJA PRZESTRZENNA MECHANIZMÓW NAPĘDOWYCH
I STERUJĄCYCH W RUCHU AMEBOWYM *SPATIAL DISTRIBUTION OF THE MOTOR AND STEERING MECHANISMS
IN AMOEBOID MOVEMENT

ANDRZEJ GRĘBECKI

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

Streszczenie. Klasyczne teorie ruchu ameb opierały się albo na założeniu, że endoplazma jest tłoczona do przodu przez skurcz ektoplazmy ograniczony tylko do tylnej części komórki, albo że ma ona taką konsystencję, która umożliwia jej ciągnięcie przez skurcz zachodzący w strefie czołowej. Przedstawiono eksperymentalną konfrontację obu tych sprzecznych teorii z teorią ogólnej kurczliwości kortykalnej. Według tej nowej koncepcji, kurczliwa jest cała peryferyjna warstwa mikrofilamentów. Skurcz zachodzący wzdłuż całego obwodu komórki podnosi wewnętrzne ciśnienie hydrostatyczne. Ciśnienie to zaś spada tylko w strefie czołowej wskutek zerwania kontaktu korteksu z błoną, a to powoduje przepływ endoplazmy. Stopień relaksacji czoła (lub powrót jego kurczliwości) jest pod kontrolą bodźców zewnętrznych. W ten sposób strefa czołowa steruje ruchem, choć właściwa siła napędowa jest wytwarzana poza nią.

Summary. The classical theories of amoeboid movement were based either on the presumption that the fluid endoplasm is squeezed forwards by the ectoplasmic contraction restricted to the cell tail, or that its consistency makes possible its pulling by a contraction localized in the frontal zone. These controversial theories were both confronted with the theory of generalized cortical contraction. According to this new concept the whole cortical microfilamentous layer is contractile. The contraction along the whole cell periphery results in an increase of the intracellular hydrostatic pressure. The pressure drops down only in the fronts, where the membrane-cortex contact is broken; that promotes the flow of the endoplasm. The relaxation of the front, or the recovery of its contractility, are under the control of external stimuli. In that way the frontal zone may steer the locomotion, though the proper motive force is generated behind it.

* Referat wygłoszony podczas II Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, Warszawa 18-22 1985 r.

WPROWADZENIE

Ogólnie wiadomo, jak rozpowszechniony jest ruch amebowy w świecie żywym, u komórek wolno żyjących i tkankowych, embrionalnych i dorosłych, normalnych i nowotworowych, in situ i w stanie hodowli. Za najważniejszą cechę ruchów amebowych, wyróżniającą je od innych, trzeba uważać nietrwałość samego narządu ruchu, zarówno na poziomie organizacji komórkowej, jak i budowy cząsteczkowej. Filamentowe struktury kurczliwo-szkieletalne dezintegrują się po wykonaniu skurczu i są następnie przenoszone do przedniej części pełzającej komórki, gdzie jest odtwarzana ich zorganizowana funkcjonalna postać.

Od ponad stu lat wielkie ameby słodkowodne, *Amoeba proteus* i *Chaos chaos*, a ostatnio także drobna glebowa *Acanthamoeba castellanii* szczególnie przydatna w badaniach biochemicznych, służą jako modelowy obiekt badań ruchów amebowych. Przypomnijmy, że u ameb cytoplazma jest zróżnicowana na stosunkowo mniej ruchliwy peryferyjny cylinder żelifikowanej ektoplazmy oraz wewnątrz wypełnione endoplazmą, będącą w stanie solu i intensywnie płynącą do przodu. Cylinder ektoplazmatyczny ulega ciągłej solifikacji w swej zamkniętej tylnej części; materiał w nim zawarty jest przenoszony w postaci strumienia endoplazmy do jego otwartego przedniego końca, gdzie ulega ponownej żelifikacji, rozkładając się słojami na obwodzie i dobudowując tym samym nowe odcinki cylindra ektoplazmatycznego. Już na kilkadziesiąt lat przed wykryciem białek kurczliwych u ameb prawie powszechnie ustalili się poglądy, najwszechstronnie uzasadniony przez Masta [51], że kurczliwość ektoplazmy jest przyczyną przepływu endoplazmy i ruchu komórki jako całości.

Wiemy obecnie, że kilkanaście procent suchej masy ameby stanowi aktyna identyczna z aktyną mięśniową. Można ją z ameb ekstrahować, badać metodami biochemicznymi in vitro, cytochemicznymi in situ, analizować układy jej filamentów w mikroskopie elektronowym, a także ich dynamikę in vivo technikami fluorescencyjnymi i immunofluorescencyjnymi [61, 66]. F-aktyna tworzy wiązki filamentów w ektoplazmie, a przede wszystkim trójwymiarową sieć mikrofilamentów w jej najbardziej zewnętrznym słoju przyległym do błony komórkowej, nazwaną korteksem kurczliwym [42, 48, 49]. W endoplazmie znajduje się natomiast aktynę monomeryczną lub nisko oligomeryczną, niewidoczną w mikroskopie elektronowym. Wykryto dotąd u ameb trzy rodzaje miozyny, wszystkie nieco różne od miozyny z mięśni prążkowanych i gładkich [43, 44]. Reagują one z F-aktyną, pozostając same w stanie oligomerycznym; identyfikacja amebowej miozyny in situ za pomocą mikroskopii elektronowej jest więc co najmniej zawodna. Względna zawartość miozyny

w stosunku do aktywności jest u ameb ponad 20 razy niższa, niż w mięśniach prądkowanych [44]. Znaczna część F-aktywności jest zaangażowana w interakcje z innymi białkami ją wiążącymi, szczególnie takimi, które spinają jej trójwymiarową sieć w korteksie, nadając cylindrowi ektoplazmatycznemu konsystencję półsztywnego żelu [54, 66].

Cylinder ektoplazmatyczny jest więc zarazem i aparatem kurczliwym i cytoszkieletem ameby (terminu cytoszkielet używam w jego historycznie i etymologicznie właściwym znaczeniu niekurczliwej struktury oporowej). Uważa się obecnie, że są w nim przemieszane mikrodomeny cytoszkieletalne, gdzie przeważa stabilizujące działanie białek spinających aktynę, z mikrodomenami kurczliwymi, w których interakcja aktywności z miozyna przebiega swobodniej. W takiej sytuacji stopniowo przebiegający skurcz musi być sprzężony z równie stopniowym rozrywaniem struktury oporowej żelu i jego powolną solifikacją [34, 66, 67]. Pełne wykorzystanie mocy tak zbudowanego aparatu kurczliwego musi więc prowadzić do jego zupełnej dezintegracji.

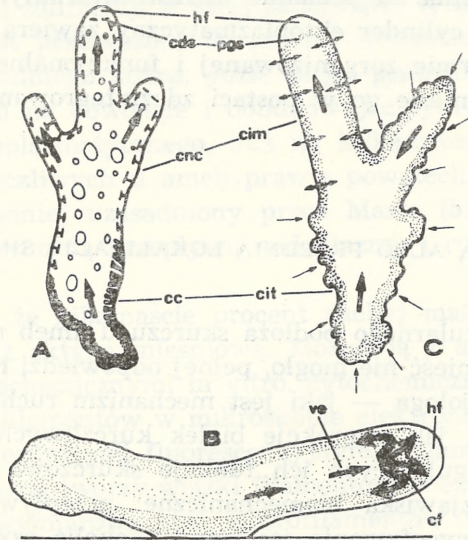
Wrócić musimy w ten sposób do definicji ruchu amebowego — nietrwałości samego narządu ruchu, który rozpada się w miarę wykonywania swej funkcji. Badania na poziomie ultrastrukturalnym i molekularnym wskazują więc, że cylinder ektoplazmatyczny zawiera aparat kurczliwo-szkieletalny w formie zorganizowanej i funkcjonalnej, endoplazma zaś płynąca środkiem niesie go w postaci zdeintegrowanej i niezdolnej do działania.

SPÓR O TYLNA ALBO PRZEDNIĄ LOKALIZACJĘ SIŁY NAPĘDOWEJ

Poznanie molekularnego podłoża skurczu u ameb nie przyniosło jednak, bo samo przynieść nie mogło, pełnej odpowiedzi na pytanie najważniejsze dla cytofizjologa — jaki jest mechanizm ruchu na poziomie ponadcząsteczkowym, jak interakcje białek kurczliwych oraz towarzyszących im białek regulujących ich funkcje skurczowe i cytoszkieletalne, wywołują znane zjawiska biomechaniczne: przepływ endoplazmy wewnątrz komórki, wycofywanie jej tylnych okolic czy powstawanie nowych nibynózek w okolicach przednich. Chodzi więc o to, jaka jest topografia funkcji wypełnianych przez aparat kurczliwo-szkieletalny i ich wzajemne stosunki przestrzenne w makroskali organizacji komórki jako całości.

Badania w tym zakresie już od ćwierćwiecza toczą się w atmosferze ostrego sporu między dwiema skrajnie sprzecznymi koncepcjami — teoriami skurczów tylnego i przedniego.

Według teorii skurczu tylnego endoplazma płynie do przodu wskutek gradientu ciśnienia wewnątrz cylindra tworzonego przez ektoplazmę. Różnica ciśnienia hydrostatycznego bierze się stąd, że kurczy się tylko tylna zamknięta część cylindra (ryc. 1A). Endoplazma, jak pasta wyciskana z tuby, płynie do przodu, gdzie cylinder jest otwarty i narastają nowe słoje jego ścianek kosztem żelifikacji napływającego solu. Protoplastą tego poglądu był Mast [51], choć oczywiście nie znał molekularnego podłoża skurczu, o którym mówił. Na przełomie lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych Goldacre [10-12] dopasował teorię Masta do ówczesnego stanu wiedzy o mechanizmie skurczu i szczególnie mocno wyeksponował tezę, że kurczy się tylko tylna część cylindra ektoplazmatycznego ameby. Wielu bardziej współczesnych autorów [42, 57, 69] podtrzymało ten pogląd popierając go nowymi argumentami eksperymentalnymi oraz uzupełniając rozważaniami o ewentualnych biegunowych różnicach rozmieszczenia miozyny, stężenia ATP, stężenia jonów wapnia itd. Rozważania te jednak pozostały w sferze niepotwierdzonych hipotez. Badania biochemiczne i strukturalne potwierdziły jasno wszyst-



Ryc. 1. Schematy proponowane przez autorów i zwolenników teorii skurczu tylnego (A), skurczu przedniego (B) i ogólnego skurczu korykalnego (C); hf — czołowy czeppek hialinowy, cds-pgs — korteks oderwany od błony w strefie czołowej, cnc — korteks uważany za niekurczliwy, cc — korteks uważany za kurczliwy, cim — korteks w skurczu izometrycznym, cit — korteks w skurczu izotonicznym, cf — hipotetyczny skurcz strefy czołowej, ve — endoplazma lepkosprężysta; wg różnych źródeł za [25]

kie założenia teorii skurczu tylnego, jeśli chodzi o różnice w rozmieszczeniu i postaci struktur kurczliwo-szkieletalnych między peryferyjną (ektoplazmatyczną) a osiową (endoplazmatyczną) warstwą ameby, a nie potwierdziły żadnych sugestii o analogicznych zróżnicowaniach między tylnymi a przednimi okolicami jej ciała. Wśród fizjologów także zdarzały się wypowiedzi kwestionujące zasadność lokalizacji siły napędowej ruchu amebowego wyłącznie w tyle komórki (np. Marsland [50], Seravin [59], Korohoda [46]).

Spór, który zachwiał monopolem klasycznej teorii skurczu tylnego, zaczął się jednak nieco wcześniej, wraz z ogłoszeniem przez Allena [1, 2] całkowicie przeciwstawnej koncepcji — teorii skurczu przedniego. Według niej, skurcz zachodzi nie w tyle, ale wyłącznie w przodzie ameby, a zarazem nie w peryferyjnym słoju ektoplazmy, ale w osiowym rdzeniu endoplazmatycznym (ryc. 1B). Mamy tu więc do czynienia z całkowitym odwróceniem stosunków przestrzennych, któremu musi zatem towarzyszyć odwrócenie kierunku i charakteru hipotetycznej siły napędowej. Nie może już być mowy o tłoczeniu endoplazmy przez ciśnienie hydrostatyczne, trzeba zaś, by była ona ciągnięta do przodu dzięki powstającym w niej naprężeniom mechanicznym. Allen zakłada na podstawie pewnych dowodów pośrednich (których nie zdołano potwierdzić badaniami ultrastrukturalnymi), że w płynącej endoplazmie istnieje ciągłość filamentów F-aktyny, dzięki czemu cała ta lepkosprężysta masa mogłaby być obkurczana i podciągana ku ośrodkom skurczowym zlokalizowanym w czole każdej posuwającej się nibynóżki, w miejscu przekształcania się endoplazmy w ektoplazmę. Konsekwencjami teorii skurczu przedniego, logicznie przyjmowanymi przez jej zwolenników, jest więc:

- (1) zaprzeczenie aktywności skurczowej ektoplazmy, która miałaby być biernie ciągnięta do przodu;
- (2) zaprzeczenie wszelkiej roli ciśnieniowego mechanizmu przepływu endoplazmy;
- (3) lokalizacja kontroli i sterowania ruchem w czole pełzającej komórki, tam gdzie jest to „behawioralnie uzasadnione”, jak wyraża się Allen [3].

Ta ostatnia teza jest niewątpliwie ogromnie atrakcyjna, zwłaszcza że teorie skurczu tylnego przez 60 lat swego istnienia nigdy nie wyjaśniły, dlaczego front od razu i jako pierwszy reaguje na nowe sytuacje napotkane na drodze migracji, jeżeli maszyna ma być umieszczona z tyłu. Ale dzisiejsza wiedza o rozmieszczeniu struktur kurczliwo-szkieletalnych w komórce ameby znacznie lepiej przystaje do teorii klasycznej bezpośrednio potwierdzając, co prawda nie ich szczególną koncentrację w tyle, lecz przynajmniej ich specyficzną lokalizację w warstwie peryferyjnej.

TEORIA OGÓLNEJ KURCZLIWOŚCI KORTYKALNEJ

Gdy przed 10 laty zajęliśmy się tym zagadnieniem w naszym zespole, doszliśmy dość szybko do przekonania, że poprawna teoria ruchu amebowego musi przede wszystkim godzić dwa elementy: powstawanie siły napędowej wzdłuż peryferii komórki, gdzie aparat kurczliwo-szkieletalny jest w rzeczywistości wykrywany w postaci mikrofilamentowego korteksu, a kontrolę ruchu tam, gdzie jest ona biologicznie najpotrzebniejsza, czyli w przodzie pełzającej komórki. Oznacza to, że funkcje napędowe i sterujące są zapewne przestrzennie rozdzielone między cylinder peryferyjny i strefę czołową. Jest to podstawowa myśl teorii ogólnego skurczu kortykalnego, którą wysunęliśmy i rozwijamy od paru lat [22, 24-26], a której główne założenia można w skrócie przedstawić następująco.

Cały kortykalny mikrofilamentowy cylinder, taki jakim go ukazuje mikroskopia elektronowa, jest kurczliwy i istotnie się kurczy w trakcie lokomocji (ryc. 1C). Jego skurcz ma charakter izotoniczny, wykonuje pracę i jest bezpośrednio widoczny w tylnych okolicach komórki, które nie przylegają trwale do podłoża i dość łatwo ewakuują do przodu nadmiar endoplazmy. Natomiast silniejsza adhezja i nadmiar endoplazmy napływającej z tyłu powodują, że w rejonach środkowych i przednich skurcz cylindra zachodzi w reżimie izometrycznym, nie poddaje się więc bezpośredniej obserwacji. Niemniej wywiera on siłę, która wzmagając naprężenie ścianek przedniej części cylindra przyczynia się do zachowania jego kształtu i objętości, a tym samym do wzrostu ciśnienia hydrostatycznego w całym jego wnętrzu. Jeśli cały cylinder jest pod wysokim ciśnieniem wewnętrznym, to miejscowy spadek ciśnienia w jakimkolwiek punkcie powierzchni wystarczy, by w tym kierunku popłynął strumień endoplazmy i utworzył się tam front lokomocji. Uważamy więc strefy czołowe za jedyne zrelaksowane okolice cechujące się obniżonym ciśnieniem. Ich relaksacja lub ponowny skurcz są właśnie pod kontrolą bodźców zewnętrznych. Oznacza to, że przyjmując hydrodynamiczną koncepcję przepływu endoplazmy jego kontrolę, lokalizujemy nie w maksymalnym, lecz w minimalnym biegunie gradientu ciśnienia. Zmiany ciśnienia w strefie czołowej wpływają na przepływ w całej amebie zgodnie z podstawowymi prawami hydrodynamiki. W ten sposób fronty mogą sterować prędkością i kierunkiem ruchu, chociaż właściwa siła napędowa powstaje gdzie indziej, wzdłuż całej peryferii komórki poza samymi frontami.

Rozważmy kilka pytań, które wydają się najistotniejsze dla skonfrontowania zasadności tej koncepcji z teoriami skurczu tylnego i przedniego.

CZY ZACHOWANIE SIĘ ŚRODKOWYCH I TYLNYCH PERYFERII KOMÓRKI
JEST WYNIKIEM ICH WŁASNEJ AKTYWNOŚCI SKURCZOWEJ?

W trakcie migracji ameby tylne okolice jej ciała przesuwały się jako całość do przodu, a zarazem zmniejsza się ich objętość. Planimetryczna analiza kolejnych klatek filmowych pozwoliła nam wyliczyć, że przeciętnie redukcji wymiarów podlegają tylne $2/3$ komórki [18]. Później zinterpretowaliśmy to właśnie jako przejaw miejscowego skurczu izotonicznego [22]. Lecz w międzyczasie zarzucono nam, że nie jest to aktywny skurcz, lecz tylko bierne „skracanie się” struktur ciągniętych przez siły powstające w strefie czołowej [4].

Testem rozstrzygającym między tymi interpretacjami było sprawdzenie, czy zablokowanie strefy czołowej zlokalizowanym bodźcem ujemnym lub jej zupełne zniszczenie znosi zjawiska ruchowe w środkowych i tylnych częściach komórki [17, 19, 23].

Najpierw użyliśmy bodźca świetlnego, który wywiera na amebę działanie skurczowe. Komórkę pełznącą wewnątrz prostokątnej strefy zacienionej (2500 luksów) kierowano do jej narożnika. Tam każdy nowy front musiał wkraczać na obszar silniej oświetlony (10 000 luksów) i niezmienne zatrzymywał się na jego granicy. Mimo to, pozostałe okolice komórki posuwały się nadal w dawnym kierunku, co prowadziło do rozděcia przedniej części ameby i wreszcie do jej uwięzienia na wiele minut w narożniku cienia. Doświadczenie mocno sugeruje, że to nie aktywność hamowanych światłem czoł ciągnęła komórkę, ale nieskrępowany skurcz pozostałych odcinków jej cylindra ektoplazmatycznego wtłoczył ją w ślepy zaułek.

Czy w doświadczeniu tym rzeczywiście wszystkie kolejne czoła były skutecznie blokowane? Wątpliwość ta znika, gdy strefę czołową zniszczyć mikrooperacyjnie w sposób uniemożliwiający zablźnienie rany, gdy na miejscu dawnego frontu pozostaje po prostu niezasklepiony otwór (ryc. 2). Nawet wówczas nietknięte środkowe i tylne okolice ciała ameby nadal obkurczają się i wyciskają endoplazmę przez ranę na zewnątrz, do środowiska. Nowa endoplazma wciąż powstaje we wnętrzu i jest stopniowo ewakuowana z komórki aż do całkowitego wyczerpania materiału i ostatecznego rozpadu ameby. Taka „samobójcza” reakcja całkowicie wyklucza lokalizowanie siły napędowej w czole ameby, skoro pozostałe okolice ciała są nadal zdolne przesuwać się, zmniejszać swą objętość i wytwarzać strumień endoplazmy w nieobecności jakiegokolwiek strefy czołowej.

CZY AKTYWNOŚĆ SKURCZOWA CYLINDRA EKTOPLAZMATYCZNEGO JEST OGRANICZONA DO JEGO TYLNEGO KONCA?

Już dość dawno opisywano u ameb wyginanie się przednich przyrastających nibynózek [21, 55]. Ruchy takie mogą świadczyć o kurczliwości przedniej części cylindra. Wyginanie się młodych nibynózek ku podłożu jest stałym składnikiem lokomocji, bo umożliwia powstawanie nowych miejsc przyczepu do podłoża [5]. Stwierdziliśmy, że zjawisko to przebiega tak samo w pozycji odwróconej, jest więc ruchem czynnym, a nie grawitacyjnym [53].

Modele ameb ekstrahowane glicerolem kurczą się po dodaniu ATP na całą swą długość, a nie tylko w tylnym odcinku [58].

Liczne próby oceny w mikroskopie elektronowym przestrzennego rozmieszczenia struktur kurczliwych, dokonane głównie przez Stockema i wsp. [62, 69], a także przez nas [20] i przez niektórych innych autorów [6, 33, 56] zgodnie wykazywały obecność trójwymiarowej sieci filamentów spolimeryzowanej aktyny w całym zewnętrznym słoju ektoplazmy (ryc. 3). Stockem i wsp. [9, 35, 63, 64] oraz Taylor i wsp. [68] wykazali obecność struktur kurczliwo-szkieletalnych wzdłuż całej peryferii ameby metodami immunocytochemicznymi na materiale utrwalonym oraz drogą iniekcji znakowanej aktyny do żywych migrujących komórek. Autorzy ci stwierdzając szczególnie silny rozwój warstwy filamentowej nie na którymkolwiek z biegunów, lecz wzdłuż całych bocznych ścian ciała ameby, poparli naszą teorię ogólnej kurczliwości kortykalnej.

Warstwa mikrofilamentów otacza całą komórkę w postaci korteksu ogólnie przylegającego do błony, choć miejscami — zwłaszcza w strefach czołowych — korteks odstaje od błony [20, 62, 69]. W takich miejscach między korteksem a błoną pojawia się hialoplazma, początkowo pozbawiona elementów strukturalnych (ryc. 1 hf).

Bezpośrednich danych o kurczliwości różnych odcinków cylindra ektoplazmatycznego mogą oczywiście dostarczyć tylko eksperymenty fizjologiczne *in vivo*. Prowadziliśmy je najpierw przy użyciu zlokalizowanych bodźców świetlnych, by sprawdzić skurczowe działanie światła i relaksujące działanie cienia na różne okolice migrującej komórki [24]. W amebach zaadaptowanych do cienia naświetlano: sam tylny koniec ciała, zwany uroidem, tylny odcinek rury ektoplazmatycznej, jej odcinek środkowy, albo jej odcinek przedni poza właściwą strefą czołową. Równolegle inne ameby preadaptowano do światła, po czym zaciemnianie te same cztery odcinki (ryc. 4). Na podstawie protokołów filmowych mierzono szybkości wycofywania tyłu i wysuwania przodu przed włączeniem bodźca, w trakcie jego działania oraz po jego wyłączeniu. Okazało się, że naświetlenie którejkolwiek części cylindra ektoplazmatycznego zawsze przyspiesza

ruch, a zacienienie którejkolwiek zawsze go zwalnia. Efekty skurczowego działania światła lub relaksującego działania cienia sumują się, tzn. są o wiele wyraźniejsze przy wystawieniu całego cylindra na działanie bodźca, niż przy stymulacji ograniczonej do jednego odcinka. Wynik potwierdza więc ogólną kurczliwość korteksu ameby, a nie jakikolwiek skurcz biegunowy.

Do tego samego wniosku prowadzą zupełnie inne doświadczenia wykonywane na amebach pozbawionych przyczepu do podłoża [27, 28]. Komórki takie nie mogą migrować, a w ich wnętrzu przepływ endoplazmy do przodu jest skompensowany ciągłym wycofywaniem całego cylindra ektoplazmatycznego ku tyłowi. Zbadaliśmy wzdlużne profile prędkości tego wstecznego ruchu peryferyjnej warstwy żelu. Prędkość zawsze znacznie przyrasta od tyłu ku przodowi i to w sposób wyraźnie liniowy. A więc cały cylinder obkurcza się w stronę swego zamkniętego tylnego końca, a w miarę wzrostu odległości przyrasta liniowo prędkość, bo każdy odcinek kurcząc się sam pociąga za sobą wszystkie następne. Tego właśnie należało się spodziewać, jeśli własności kurczliwe i cytoszkieletalne cylindra ektoplazmatycznego są wzdluż niego dość równomiernie przeplecione. Gdyby którykolwiek odcinek nie był kurczliwy, lecz pełnił wyłącznie funkcje cytoszkieletalne (zgodnie z biegunowymi teoriami lokalizacji siły napędowej), musiałyby być wycofywany jako jednolity blok i zaznaczyłyby się jako płaski poziomy odcinek na profilu prędkości. Profili takich nigdy nie otrzymywaliśmy.

CZY RUCH ZALEŻY OD CIŚNIENIA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO?

Ciągły skurcz całego cylindra kortykalnego może istotnie wytwarzać i podtrzymywać wysokie ciśnienie hydrostatyczne w jego wnętrzu. Już w latach dwudziestych wykonywano pierwsze mikrooperacje wykazując, że w pierwszym momencie po nakłuciu ameby wypływ cytoplazmy ma charakter erupcyjny [7]. Wyciągnięto stąd wniosek, że ciśnienie wewnątrzkomórkowe jest wyższe od zewnętrznego, a jego gradient wywołuje przepływ endoplazmy. Wniosek ten jest podtrzymywany przez ogromną większość badaczy do czasów dzisiejszych.

Gdy perforowaliśmy tylne okolice pełną ameby wspomnianą już tu techniką uniemożliwiającą zablźnienie rany [17], ciągły wyciek endoplazmy stopniowo odwracał kierunek przepływu w komórce, aż w końcu ogarniał nawet dawne strefy czołowe (ryc. 5). Świadczy to o tym, że różnica między ciśnieniem hydrostatycznym we wnętrzu komórki a ciśnieniem atmosferycznym w miejscu uszkodzenia wystarcza, by uruchomić strumień endoplazmatyczny. Ciśnienie ujemne, rzędu kilku cm

słupa wody, przyłożone mikropipetką do wnętrza endoplazmy, jest też dostateczne, by zmieniać kierunek jej przepływu i odwracać w sposób trwały ogólną polaryzację ruchową ameby [16]. Tego samego rzędu różnice ciśnień na zewnątrz dwóch różnych okolic komórki pozwalają kontrolować przepływ endoplazmy w jej wnętrzu metodą podwójnej kamery ciśnieniowej Kamiyi [38].

Przypomnijmy, że jeśli ciśnienie wewnątrz cylindra ektoplazmatycznego jest wyższe niż na zewnątrz, to jego lokalny spadek gdziekolwiek wzdłuż peryferii powinien zainicjować nowy kierunek przepływu i powstanie tam nowego frontu lokomocji.

CZY MOŻNA SPODZIEWAĆ SIĘ MIEJSCOWEGO SPADKU CIŚNIENIA W STREFIE CZOŁOWEJ?

Miejscowego spadku ciśnienia można się oczywiście spodziewać wszędzie tam, gdzie ciągłość kurczliwej warstwy kortykalnej zostanie przerwana. Sytuacja taka zdarza się w naturze i jest powodem powstawania form ameb zwanych monotaktycznymi (ryc. 6). Ameba taka utrzymuje stale tylko jeden kierunek ruchu i jest nawet bardzo mało wrażliwa na bodźce [30] dlatego, że ma specyficzny czepek frontalny wakuolarny w swej naturze [49] i w swym pochodzeniu [14]. Pęcherzyk ten jest otoczony własną błoną, którą uwidoczniliśmy (ryc. 7) mikrochirurgicznie [15] i w mikroskopie elektronowym. Między błoną pęcherzyka frontального a błoną zewnętrzną nie ma warstwy filamentowej, stanowi więc on prawdziwą lukę w korteksie kurczliwym [36]. Gdy pęcherzyk taki powstanie dzięki fuzji wakuol i zostanie dopchnięty do peryferii komórki, przerywa ją i przybiera charakterystyczną postać czepka w ciągu 1-2 s. Natychmiast wszystkie dotychczasowe strumienie endoplazmatyczne odwracają swój bieg w jego kierunku i ameba politaktyczna zmienia się w monotaktyczną (ryc. 6).

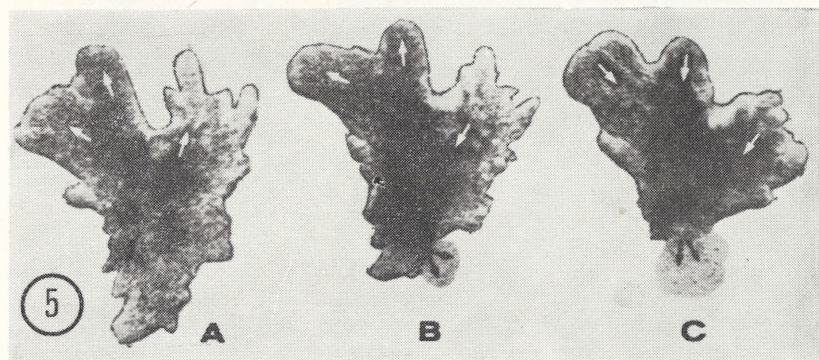
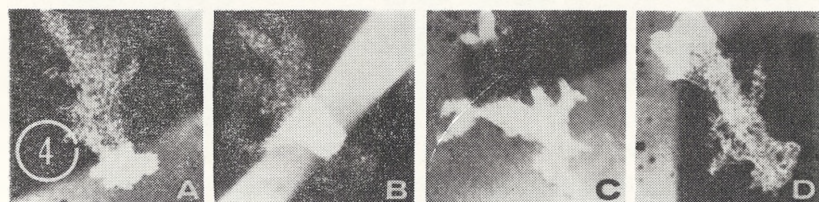
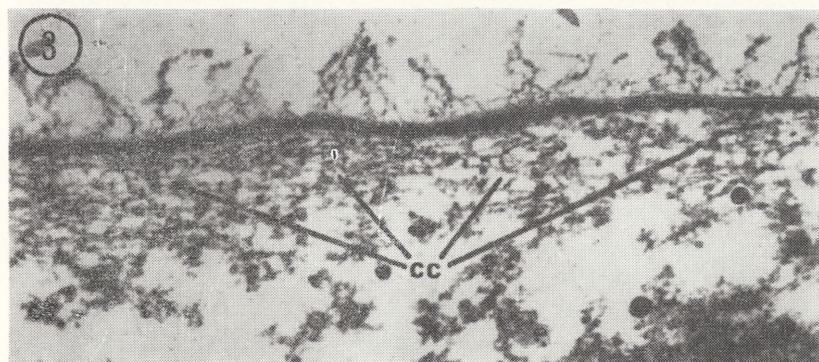
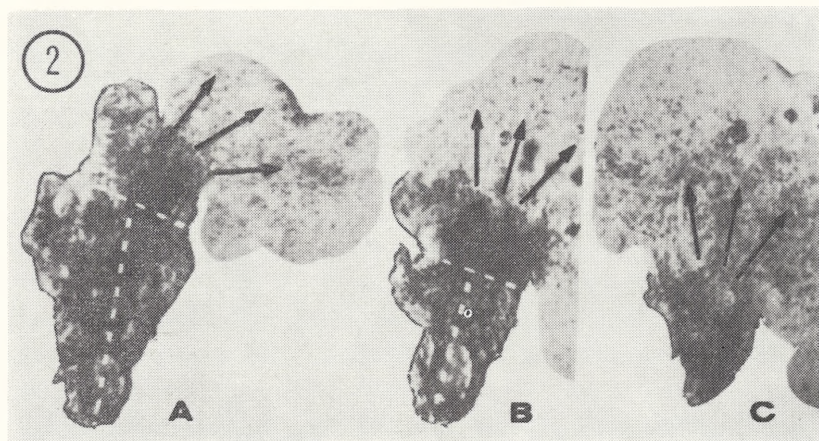
To naturalne zjawisko można symulować wstrzykując mikrokrople

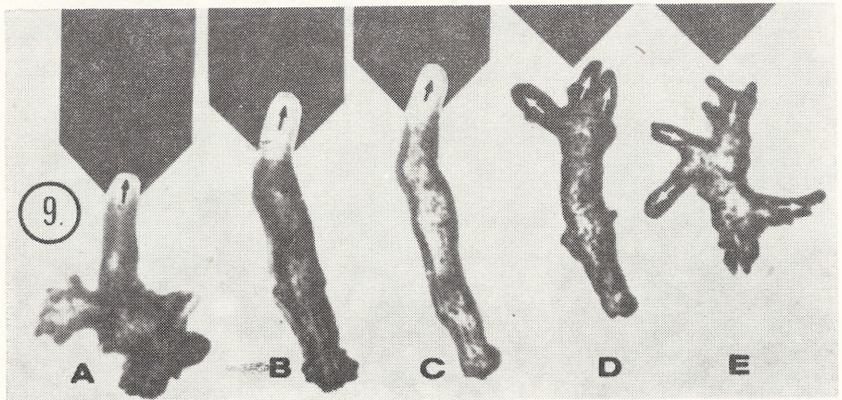
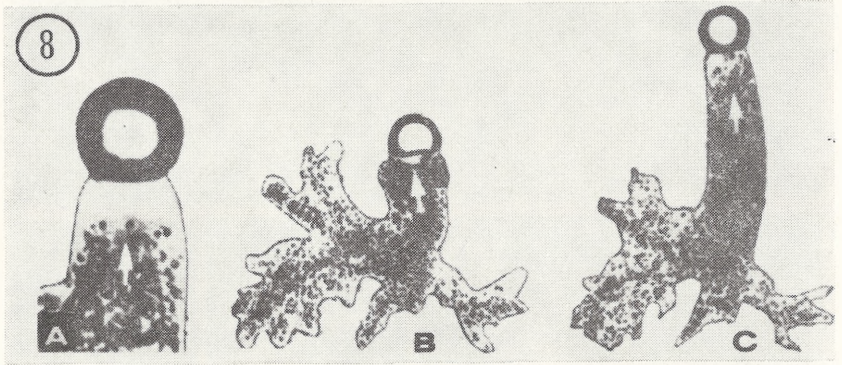
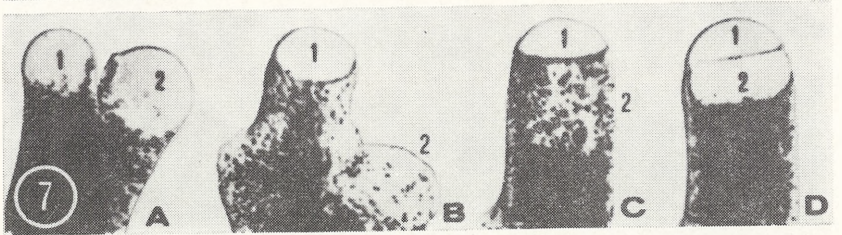
Ryc. 2. Po zniszczeniu strefy czołowej (A) pozostałe okolice komórki nadal obkurczają się i wytwarzają strumień endoplazmy (A-B), aż do wyczerpania materiału i dezintegracji (C); wg [17]

Ryc. 3. Obraz korteksu kurczliwego w mikroskopie elektronowym; cc — podbłonowa warstwa mikrofilamentów; skrawek z bocznej ścianki w przedniej części ameby; wg [20]

Ryc. 4. Przykłady pobudzania światłem lub cieniem określonych okolic pełzającej ameby: naświetlenie samego uroidu (A), tylnej części cylindra ektoplazmatycznego (B), zacinienie jego przedniej części (C) i naświetlenie strefy czołowej (D); wg [24]

Ryc. 5. W amebie politaktycznej (A) po perforacji dokonanej w tyle komórki (B) następuje odwrócenie przepływu endoplazmy (C); wg [17]





oleju parafinowego pod wewnętrzną stronę błony komórkowej [11, 13]. Kropelka taka natychmiast tworzy sztuczny czepek frontalny, skupia wszystkie przepływy endoplazmy i przekształca amebę w sztuczną formę monotaktyczną (ryc. 8). Fakt przerywania przez nią korytkalnej warstwy filamentów potwierdziliśmy w mikroskopii elektronowej [36]. Sztuczne fronty otrzymywali też badacze z NRD [8, 69] za pomocą lokalnych podbłonkowych iniekcji czynników depolimeryzujących aktyne, bądź hamujących jej repolimeryzację. Wszystkie te rezultaty prowadzą do wspólnego wniosku — każda miejscowa dezintegracja kurczliwej warstwy korowej tworzy obszar obniżonego ciśnienia hydrostatycznego, który reorganizuje przepływy endoplazmy i staje się nowym frontem lokomocji.

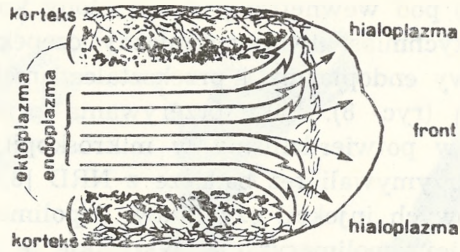
W jakiej jednak mierze wniosek ten stosuje się do normalnych ameb politaktycznych, których czepki frontalne są zbudowane z hialoplazmy [49]? Parę lat temu stwierdzono jednocześnie w naszym zespole i w NRD [20, 62, 69], że w tych normalnych strefach czołowych filamentowy korteks jest oderwany od błony i przebiega głębiej u podstawy czepka, na granicy hialoplazmy i granuloplazmy (ryc. 10). Wiadomo zaś już było, że taki oderwany korteks działa jak sito, przepuszczając hialoplazmę, a zatrzymując większe elementy strukturalne [65]. Stwierdzono też metodami fluorescencyjnymi, że spolimeryzowana aktyna wbudowuje się w tę warstwę i nie przenika na teren samego hialinowego frontu [9, 68]. Przenika tam jednak G-aktyna. Świadczy to o tym, że: 1. Hialinowe czepki czołowe są wynikiem filtracji endoplazmy przez filamentowy korteks lokalnie oderwany od błony. 2. W sąsiedztwie takiej struktury, umożliwiającej wypływ ciekłej frakcji endoplazmy, musi istotnie wystąpić postulowany spadek ciśnienia. 3. Czynna strefa frontalna nie może aktualnie się kurczyć, będąc pozbawiona F-aktyny, lecz potencjalnie — w zależności od sytuacji zewnętrznej lub wewnętrznej — może kurczliwość odzyskiwać, skoro jest na jej terenie G-aktyna.

Ryc. 6. Po utworzeniu przez amebę politaktyczną pęcherzykowego czepka czołowego (A) inne czola wycofują się (B) i powstaje forma monotaktyczna (C); wg [14]

Ryc. 7. Po wzdłużnym przecięciu czepka czołowego ameby monotaktycznej (A) jedna połówka (1) zachowuje funkcje frontu, a druga (2) jest resorbowana (B), po czym wraca ze strumieniem endoplazmy do przodu (C) i na kilka sekund tworzy czepek „piętrowy” z wyraźnie widoczną błoną (D); wg [15]

Ryc. 8. Mikrokropła oleju parafinowego wstrzyknięta bezpośrednio pod błonę tworzy sztuczny front (A), który zaczyna dominować w amebie politaktycznej (B) i przekształca ją w sztuczną formę monotaktyczną (C); wg [13]

Ryc. 9. Konsekwentne zacielenie jednego z czoł ameby politaktycznej (A) nadaje mu rolę wiodącą i przekształca komórkę w ortotaktyczną (B-C); usunięcie bodźca przywraca konkurencję czoł i politaktyczną postać (D-E); wg [23]



Ryc. 10. Schemat funkcjonowania frontu ameby politaktycznej; miejscowe oderwanie korteksu od błony powoduje powstanie czepka hialinowego; korteks w czole działa jak sito zatrzymujące elementy strukturalne, a przepuszczające płynną hialoplazmę; wg [29]

JAK STREFA CZOŁOWA REAGUJE NA BODŹCE SKURCZOWE I ROZKURCZOWE?

To co dziś wiemy o budowie i funkcjonowaniu strefy czołowej oraz sama teoria ogólnej kurczliwości kortykalnej skłaniają do przypuszczenia, że ruch postępowy strefy czołowej powinien być stymulowany przez bodźce rozkurczowe, natomiast bodźce skurczowe powinny go blokować, pozbawiając tę okolicę cech frontu. Zauważmy, że według teorii skurczu przedniego spodziewalibyśmy się wręcz odwrotnej zależności — aktywacji frontu bodźcami skurczowymi, a hamowania jego ruchu przez czynniki relaksujące.

Pierwszą wskazówkę w tej sprawie przyniosły eksperymenty Korohody [47], który lokalnie przykładając anestetyki mikropipetką do ograniczonych pól na powierzchni ameby prowokował wytwarzanie w tych miejscach nowych frontów.

W naszym zespole dokładnie zbadaliśmy ilościowo skutki przykładania do funkcjonującego czoła migrującej komórki skurczowych i rozkurczowych bodźców świetlnych [24]. Metody i sytuacje doświadczalne były już tu opisane (ryc. 4). Po prostu tym razem porównywano skutki miejscowego naświetlania lub zacieniania określonych odcinków cylindra ektoplazmatycznego ze skutkami przykładania tych samych bodźców wyłącznie do właściwej strefy czołowej. Skutki te są zawsze fizjologicznie przeciwstawne. Naświetlenie frontu hamuje jego ruch postępowy, podczas gdy naświetlenie cylindra ektoplazmatycznego przyspiesza go. Front zacieniony zaś wysuwa się szybciej, a zacienienie cylindra zwalnia go. Ogólnie, czynnik skurczowy hamuje migrację komórki, działając na jej strefę czołową, natomiast aktywuje ją, działając gdziekolwiek indziej. Czynnik rozkurczowy pobudza migrację po przyłożeniu do czoła, a zwalnia ją po przyłożeniu do jakiegokolwiek części cylindra kortykalnego.

Uogólnienie to zostało ostatnio potwierdzone przez Stockema i wsp. [61] przy użyciu serii kilkudziesięciu skurczowych i rozkurczowych bodźców chemicznych przykładanych mikropipetką do czołowych, środkowych i tylnych okolic ciała migrujących ameb.

Przy dłuższym oddziaływaniu miejscowo stosowane bodźce świetlne wywołują efektowne skutki behawioralne. Każdą wysuwaną nibynóżkę można zatrzymać światłem, co kiedyś wykazał już Mast [52]. Ale skrawkiem cienia można indukować powstanie nowego frontu z boku komórki, przywrócić aktywność dowolnej już wycofywanej nibynóżce, zagwarantować jakiemukolwiek frontowi trwałość jego czołowej pozycji, przekształcając tym samym rozgałęzioną amebę politaktyczną w formę ortotaktyczną, migrującą jednokierunkowo (ryc. 9). Przemianym przykładaniem światła i cienia do szczytu jakiejś nibynóżki wywołujemy w niej serię wielokrotnych zmian kierunku przepływu endoplazmy [23].

Zjawiska te dałyby się wytłumaczyć na podstawie teorii skurczu przedniego tylko wówczas, gdyby założyć, że światło hamuje aktywność skurczową, a cień ją wzmacnia lub przynajmniej chroni. Ale byłoby to sprzeczne z całą wiedzą o działaniu różnych natężeń światła na amebę, nagromadzoną od ponad 50 lat. Skutki miejscowego naświetlania i zacieniania przystają natomiast idealnie do zasadniczego postulatu naszej koncepcji, według którego front jest jedyną, nie kurczącą się okolicą migrującej ameby, a ten jego stan może być wzmacniany, osłabiany lub odwracany przez bodźce zewnętrzne.

CZY I JAK STREFA CZOŁOWA KONTROLUJE I KOORDYNUJE RUCH?

Nie wiemy jeszcze dokładnie, co dzieje się na poziomie strukturalnym w strefie czołowej, pobudzanej cieniem lub hamowanej światłem. Być może dowiemy się czegoś więcej, gdy uda się połączyć przyżyciowe badania aktywnej znakowanej fluorescencyjnie z metodami stymulacji ameby zlokalizowanymi bodźcami świetlnymi. Wiemy jednak na pewno, że napływ endoplazmy do czoła hamowanego światłem zostaje znacznie ograniczony, a do czoła pobudzanego cieniem silnie wzmożony. Tłumaczy to m.in. dlaczego zmiana warunków świetlnych w strefie czołowej wpływa na szybkość wycofywania tylnego krańca komórki. Hamowanie wiodącej nibynóżki przez światło utrudnia bowiem ewakuację endoplazmy z okolic tylnych, dopóki nie zostaną utworzone nowe fronty. Gdy zaś front jest aktywowany cieniem, wpływ endoplazmy zostaje ułatwiony i tył może wycofywać się szybciej.

Na tej samej zasadzie opierają się stosunki między różnymi nibynóżkami tej samej ameby. Analiza filmowych zapisów spontanicznego ruchu

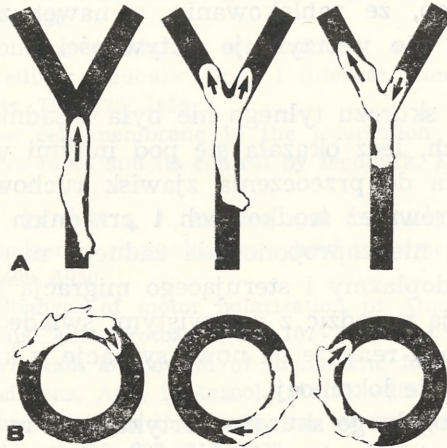
ameb, nie pobudzanych żadnym kierunkowym bodźcem, wskazuje na ich wzajemną współzależność. Zatrzymaniu lub cofnięciu nibynóżki, która pełniła dotąd funkcję wiodącą, zawsze towarzyszy w czasie rozwój jakiejś innej nibynóżki bocznej [40]. Analogiczna analiza filmowa ruchu ameb miejscowo pobudzanych bodźcami świetlnymi [32] pozwoliła nam wykryć, które zjawisko jest pierwotne, a które wtórne. Czy nowy front powstaje w następstwie zatrzymania się i kurczenia poprzedniej nibynóżki, zgodnie z przewidywaniami teorii skurczu tylnego? Czy też powstanie nowego frontu jest przyczyną, a nie skutkiem wycofania dawnego czoła, co w tym przypadku zgodnie przewidywałyby zarówno nasza teoria, jak i teoria skurczu przedniego? Stwierdziliśmy, że powstanie nowego frontu zawsze wyprzedza w czasie wycofanie się starego. Najpierw powstaje w jakimś miejscu nowa strefa czołowa (lokalne odklejenie korteksu od błony), potem strumień endoplazmy odwraca kierunek w jej bezpośrednim sąsiedztwie, a dopiero na końcu zmienia swój bieg w dawnej nibynóżce wiodącej. Podobne lub o tym samym świadczące obserwacje wcześniej przytaczał Allen [2], Seravin [60] oraz Kalisz i Korohoda [37], mało były one jednak brane pod uwagę jako wyraźnie sprzeczne z panującą wówczas teorią skurczu tylnego.

Za inicjatora zmian kierunku ruchu komórki musimy więc uważać nową strefę czołową, nie dlatego, żeby we froncie mieściła się autonomiczna maszyna napędzająca całą komórkę, ale dlatego, że front reagując na bodźce skurczem albo relaksacją tym samym albo przymyka, albo szerzej otwiera drogę odpływu endoplazmy z pozostałych, kurczących się, okolic ciała ameby. W ten sposób front pełni swe funkcje kontrolno-sterujące w ruchu amebowym.

Oczywiście, zwiększenie liczby czynnych frontów powinno przynieść podobny skutek, jak relaksacja pojedynczego czoła — również ułatwić odpływ endoplazmy, a w konsekwencji przyspieszyć wycofywanie tyłu. Potwierdziliśmy to posługując się amebami zmuszonymi do wędrówki wzdłuż widełkowato rozgałęzionych smug cienia [41]. Gdy początkowo pojedynczy front ameby mija rozgałęzienie i dzieli się na dwa potomne (ryc. 11A), tył zaczyna posuwać się szybciej. Ale nie aż dwa razy szybciej niż poprzednio. Wobec tego każdy z nowych frontów potomnych posuwa się nieco wolniej, niż przedtem posuwał się jeden front pierwotny. Po prostu ustala się nowa równowaga między tłoczeniem endoplazmy przez cały kurczący się korteks komórki, a jej odpływem przez strefy czołowe; równowaga spełniająca podstawowe prawo hydrodynamiki, głoszące, że objętości cieczy wpływającej do rozgałęzienia i wpływającej z niego muszą być równe.

Sądźmy więc, że koordynacja ruchu w rozgałęzionej amebie politycznej jest po prostu zgodna z zasadami hydrodynamiki. Podobnie

jak w każdym rozgałęzionym układzie hydraulicznym, zmiana warunków przepływu w jednym odgałęzieniu musi wpłynąć na przepływ w innych odgałęzieniach oraz na pracę całości układu. Przepływ cieczy w takim układzie można kontrolować albo regulując pracę pomp, albo regulując zawory odpływów. Uważamy, że ruch ameby jest kontrolowany tym drugim sposobem — przez odpływy, dla których strefy frontalne nibynóżek są właśnie jakby zaworami regulowanymi przez bodźce zewnętrzne.



Ryc. 11. Otrzymywanie form bipodalnych jako najprostszego modelu ameby politaktycznej metodą wędrówki wzdłuż widelkowato rozgałęzionego pasma cienia (A); ciągle korekty kierunku wysuwania czoła u ameby wędrującej po pierścieniu cienia (B); wg [39] i [41]

W ten sposób strefy czołowe kontrolują szybkość migracji całej komórki, a zarazem i jej kierunki, gdy nowe fronty tworzą się i rozwijają pod innym kątem, niż poprzednie. Sterowanie ruchem może także odbywać się w sposób płynny, bez zastępowania starego frontu nowym, a to wówczas, gdy front ten jest nieprzerwanie poddany działaniu asymetrycznie skierowanego bodźca. Tak np. czoło rosnącej nibynóżki wygina się ku otworowi mikropipetki zawierającej czynnik chemotaktycznie dodatni, a amebę ortotaktyczną można prowadzić po łuku, zacięniając nieprzerwanie jedną stronę jej strefy czołowej [31]. Czoło ameby zmuszonej do wędrówki wzdłuż smugi cienia w kształcie pętli lub koła [39] wciąż koryguje kierunek swej dalszej ekspansji (ryc. 11B), a w rezultacie stopniowo dopasowuje kształt całej migrującej komórki do krzywizny zaprogramowanej drogi.

Najrozsowniejsze doświadczenia potwierdzają więc zgodnie tezę, że funkcje kontrolno-sterujące w ruchu amebowym pełnią strefy czołowe, które reagują ujemnie na bodźce skurczowe, a dodatnio na relaksujące.

PODSUMOWANIE

Trzeba dojść ostatecznie do wniosku, że teoria skurczu przedniego jest nie do utrzymania, ponieważ: nie liczy się z peryferyjnym rozmieszczeniem aparatu kurczliwo-szkieletalnego wzdłuż całej długości komórki; pomija rolę gradientów ciśnienia hydrostatycznego w powstawaniu strumieni endoplazmy i w kontroli ich przepływu; front ameby reaguje ujemnie na bodźce skurczowe i dodatnio na rozkurczowe, a nie odwrotnie; wreszcie dlatego, że zablokowanie, a nawet zupełne zniszczenie wszystkich frontów nie wstrzymuje aktywności ruchowej pozostałych okolic komórki.

Klasyczna teoria skurczu tylnego nie była zasadniczo błędna w wielu swych postulatach, lecz okazała się pod innymi względami niezadowalająca. Prowadziła do przeoczenia zjawisk ruchowych, które świadczą o kurczliwości również środkowych i przednich odcinków cylindra ektoplazmatycznego; nie zaproponowała żadnego mechanizmu kontrolującego przepływ endoplazmy i sterującego migracją komórki, a co najważniejsze, trudno ją pogodzić z oczywistymi świadectwami behawioralnymi, że front od razu reaguje na nowe sytuacje, z którymi jako pierwszy styka się w trakcie lokomocji.

Zadaniem teorii ogólnego skurczu korytkalnego było wypełnić te luki i pogodzić sprzeczności dzięki założeniu, że skurcz całej filamentowej warstwy peryferyjnej podnosi ciśnienie hydrostatyczne we wnętrzu komórki. Ruch jest w związku z tym wywoływany, regulowany, kierowany i koordynowany przez miejscowe spadki ciśnienia w czołach rosnących nibynózek, które z kolei same są pod kontrolą bodźców zewnętrznych. Najróżniejsze obserwacje, które dotychczas pozornie wydawały się sprzeczne i służyły za kontrargumenty w klasycznym sporze, wszystkie znajdują w takim schemacie swoje miejsca i wspólne objaśnienie.

LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., A new theory of amoeboid movement and endoplasmic streaming, *Exp. Cell Res. (Suppl.)*, 8: 17 - 31, 1961.
- [2] — Amoeboid movement [w:] *The Cell*, red. J. Brachet, A. E. Mirsky, Vol. 2, Academic Press, New York and London, 135 - 216, 1961.
- [3] — Differences of a fundamental nature among several types of amoeboid movement, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 22: 151 - 168, 1968.
- [4] ALLEN R. D., ALLEN N. S., Cytoplasmic streaming in amoeboid movement, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 7: 469 - 495, 1978.
- [5] BELL L. G. E., JEON K. W., Locomotion of *Amoeba proteus*, *Nature*, 198: 675 - 676, 1963.
- [6] COMLY L. T., Microfilaments in *Chaos carolinensis*: Membrane association,

- distribution and heavy meromyosin binding in the glycerinated cell, *J. Cell. Biol.*, **58**: 230 - 237, 1973.
- [7] EDWARDS J. G., The effect of chemicals on locomotion in *Amoeba*, *J. Exp. Zool.*, **38**: 1 - 43, 1923.
- [8] GAWLITTA W., HINSSEN H., STOCKEM W., The influence of an actin-modulating protein (AM-protein) from *Physarum polycephalum* on the cell motility of *Amoeba proteus*, *Eur. J. Cell Biol.*, **23**: 43 - 52, 1980.
- [9] 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.*, **206**: 181 - 191, 1980.
- [10] GOLDACRE R. J., The regulation of movement and polar organization in *Amoeba* by intracellular feedback, *Proc. I Internat. Congr. Cybernetics, Gauthiers-Villars, Paris*, 715 - 725, 1956.
- [11] — 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.)*, **8**: 1 - 16, 1961.
- [12] GOLDACRE R. J., LORCH I. J., Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work, *Nature*, **166**: 487 - 499, 1950.
- [13] GRĘBECKA L., Changes of motor polarization in *Amoeba proteus* as induced by oil injections, *Acta Protozool.*, **16**: 107 - 120, 1977.
- [14] — Frontal cap formation and origin of monotactic forms of *Amoeba proteus* under culture conditions, *Acta Protozool.*, **17**: 191 - 202, 1978.
- [15] — Micrurgical experiments on the frontal cap of monotactic forms of *Amoeba proteus*. *Acta Protozool.*, **17**: 203 - 212, 1978.
- [16] — Reversal of motor polarity of *Amoeba proteus* by suction, *Protoplasma*, **102**: 361 - 375, 1980.
- [17] — Motor effects of perforating peripheral cell layers of *Amoeba proteus*, *Protoplasma*, **106**: 343 - 349, 1981.
- [18] GRĘBECKA L., GRĘBECKI A., Morphometric study of moving *Amoeba proteus*, *Acta Protozool.*, **14**: 337 - 361, 1975.
- [19] — Testing motor functions of the frontal zone in the locomotion of *Amoeba proteus*, *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**: 587 - 594, 1981.
- [20] GRĘBECKA L., HREBENDA B., Topography of cortical layer in *Amoeba proteus* as related to the dynamic morphology of moving cell, *Acta Protozool.*, **18**: 493 - 502, 1979.
- [21] GRĘBECKI A., Non-axial cell frame movements and the locomotion of *Amoeba proteus*, *Acta Protozool.*, **16**: 53 - 85, 1977.
- [22] — Organization of motor functions in amoebae and in slime moulds plasmodia, *Acta Protozool.*, **18**: 43 - 58, 1979.
- [23] — Behaviour of *Amoeba proteus* exposed to light-shade difference, *Protistologica*, **16**: 103 - 113, 1980.
- [24] — Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications. *Eur. J. Cell Biol.*, **24**: 163 - 175, 1981.
- [25] — Études expérimentales sur la localisation des fonctions motrices chez les amibes, *Année Biol.*, **21**: 273 - 306, 1982.
- [26] — Supramolecular aspects of amoeboid movement, *Progress in Protozoology, Proc. VI Internat. Congr. Protozool.*, part 1, PWN, Warszawa, 117 - 130, 1982.
- [27] — Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. I. Be-

- haviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon. *Protoplasma*, **123**: 116 - 134, 1984.
- [28] — Relative motion in *Amoeba proteus* in respect to the adhesion sites. II. Ectoplasmic and surface movements in polytactic and heterotactic amoebae, *Protoplasma*, **127**: 31 - 45, 1985.
- [29] Mechanizmy ruchów amebowych, [w] Komórka jej budowa i ruch, red. L. Kuźnicki, Ossolineum, Wrocław, w druku.
- [30] GRĘBECKI A., GRĘBECKA L., Morphodynamic types of *Amoeba proteus*: a terminological proposal, *Protistologica*, **14**: 349 - 358, 1978.
- [31] GRĘBECKI A., GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., Testing steering functions of the frontal zone in the locomotion of *Amoeba proteus*, *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**: 595 - 600, 1981.
- [32] GRĘBECKI A., KŁOPOCKA W., Functional interdependence of pseudopodia in *Amoeba proteus* stimulated by light-shade difference, *J. Cell Sci.*, **50**: 245 - 258, 1981.
- [33] HAUSER M., Demonstration of membrane-associated and oriented microfilaments in *Amoeba proteus* by means of a Schiff base/glutaraldehyde fixative. *Cytobiologie*, **18**: 95 - 106, 1978.
- [34] HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., The contractile basis of ameboid movement. VI The solution-contraction coupling hypothesis, *J. Cell Biol.*, **83**: 633 - 648, 1979.
- [35] HOFFMANN H. U., STOCKEM W., GRUBER B., Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. II. Influence of different agents on the spatial organization of microinjected fluorescein-labeled actin, *Protoplasma*, **119**: 79 - 92, 1984.
- [36] HREBENDA B., GRĘBECKA L., Ultrastructure of the frontal cap of monotactic forms of *Amoeba proteus*, *Cytobiologie*, **17**: 62 - 72, 1978.
- [37] KALISZ-NOWAK 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.*, **15**: 345 - 358, 1976.
- [38] KAMIYA N., The motive force of endoplasmic streaming in the amoeba, [w] *Primitive Motile Systems in Cell Biology*, red. R. D. Allen, N. Kamiya, Academic Press, New York and London, 257 - 274, 1964.
- [39] KŁOPOCKA W., Intracellular factors influencing the direction of new pseudopodia produced by *Amoeba proteus*, *Protistologica*, **18**: 389 - 396, 1982.
- [40] KŁOPOCKA W., GRĘBECKI A., Motor interdependence of pseudopodia in freely moving *Amoeba proteus*, *Acta Protozool.*, **19**: 129 - 142, 1980.
- [41] — Locomotion of *Amoeba proteus* after standardizing its body shape, *Protoplasma*, **112**: 37 - 45, 1982.
- [42] KOMNICK H., STOCKEM W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and ameboid movement, *Internat. Rev. Cytol.*, **34**: 169 - 249, 1973.
- [43] KORN E. D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 588 - 599, 1978.
- [44] — Regulation of the form and function of actin and myosin of non-muscle cells, *Acta Protozool.*, **18**: 75 - 90, 1979.
- [45] — Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility in *Acanthamoeba castellanii*, *Soc. Gen. Microbiol. Symp.*, **30**: 253 - 272, 1980.
- [46] KOROHODA W., Locomotion of *Amoeba proteus* in conditions imitating its natural environment, *Folia Biol.*, **18**: 145 - 152, 1970.

- [47] — Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of *Amoeba proteus* and its bearing on the theories of amoeboid movement, *Cytobiologie*, **14**: 338 - 349, 1977.
- [48] KOROHOĐA W., STOCKEM W., On the nature of hyaline zones in the cytoplasm of *Amoeba proteus*, *Microsc. Acta*, **77**: 129 - 141, 1975.
- [49] — Two types of hyaline caps, constricting rings and the significance of contact for the locomotion of *Amoeba proteus*, *Acta Protozool.*, **15**: 179 - 185, 1976.
- [50] MARSLAND D., Chairman's Introduction, [w] *Primitive Motile Systems in Cell Biology*, red. R. D. Allen, N. Kamiya, Academic Press, New York and London, 331 - 332, 1964.
- [51] MAST S. O., Structure, movement, locomotion and stimulation in *Amoeba*, *J. Morphol.*, **41**: 347 - 425, 1926.
- [52] — Localized stimulation, transmission of impulses, and the nature of response in *Amoeba*. *Physiol. Zool.*, **5**: 1 - 15, 1932.
- [53] NOWAKOWSKA G., GREBECKI A., Attachment of *Amoeba proteus* to the substrate during upside-down crawling, *Acta Protozool.*, **17**: 353 - 358, 1978.
- [54] POLLARD T. D., Actin-binding protein evolution, *Nature*, **312**: 404, 1984.
- [55] RINALDI R. A., Velocity profile pictographs of amoeboid movement, *Cytologia*, **28**: 417 - 427, 1963.
- [56] RINALDI R. A., HREBENDA B., Oriented thick and thin filaments in *Amoeba proteus*, *J. Cell Biol.*, **66**: 193 - 198, 1975.
- [57] RINALDI R. A., JAHN T. D., On the mechanism of ameoboid movement, *J. Protozool.*, **10**: 344 - 357, 1963.
- [58] RINALDI R. A., OPAS M., HREBENDA B., Contractility of glycerinated *Amoeba proteus* and Chaos chaos, *J. Protozool.*, **22**: 286 - 292, 1975.
- [59] SERAVIN L. N., Krititcheskiy obzor sovremjennykh predstavleniy ob ameobidnom dvizhenii, *Tsitologiya*, **6**: 653 - 667, 1964.
- [60] — Ameoboidnoje dvizhenie. I. Prekrashtchenie i vozobnovlenie ameobidnogo dvizhenia pri njekotorykh eksperimentalnykh vozdiejstvjach, *Zool., Zhurn.*, **45**: 344 - 351, 1966.
- [61] STOCKEM W., HOFFMANN H. U., Microfilament organization and function in *Amoeba proteus*, *Acta Protozool.*, **25**, w druku.
- [62] STOCKEM W., HOFFMANN H. U., GAWLITTA W., Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*, *Cell Tiss. Res.*, **221**: 505 - 519, 1982.
- [63] STOCKEM W., HOFFMANN H. U., GRUBER B., Dynamics of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. I. Redistribution of microinjected fluorescein-labeled actin during locomotion, immobilization and phagocytosis, *Cell Tiss. Res.*, **232**: 79 - 96, 1983.
- [64] STOCKEM W., NAIB-MAJANI W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., OSBORN M., WEBER K., Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIX. Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in *Amoeba proteus*, *Eur. J. Biol.*, **29**: 171 - 178, 1983.
- [65] STOCKEM W., WEBER K., WEHLAND J., The influence of microinjected phalloidin on locomotion, protoplasmic streaming and cytoplasmic organization in *Amoeba proteus* and *Physarum polycephalum*, *Cytobiologie*, **13**: 114 - 131, 1978.
- [66] TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, *Internat. Rev. Cytol.*, **56**: 57 - 144, 1979.
- [67] TAYLOR D. L., FECHHEIMER M., Cytoplasmic structure and contractility:

- the solation-contraction coupling hypothesis, *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*, **299**: 185 - 197, 1982.
- [68] TAYLOR D. L., WANG Y. L., HEIPLE J., The contractile basis of ameboid movement. VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amebas, *J. Cell Biol.*, **86**: 590 - 598, 1980.
- [69] WEHLAND J., WEBER K., GAWLITTA W., STOCKEM W., Effect of the actin-binding protein DNAase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of *Amoeba proteus*. An attempt to explain amoeboid movement. *Cell Tiss. Res.*, **199**: 353 - 372, 1979.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-097 Warszawa.

Otrzymano: 23 grudnia 1985.

Przyjęto: 23 grudnia 1985.

HYDRODYNAMICZNE METODY BADANIA ADHEZYJNYCH ODDZIAŁYWAŃ KOMÓRKOWYCH*

Jan DOROSZEWSKI

Zakład Biofizyki i Biomatematyki Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
w Warszawie

Streszczenie. Praca przedstawia zasady metod badania adhezyjnych oddziaływań komórkowych, które są oparte na wykorzystaniu zjawisk hydrodynamicznych związanych z ruchem komórek względem: środowiska, podłoża i innych komórek. Omówione są podstawy fizyczne tych zjawisk. Metody, których dotyczy praca, są przydatne w badaniu następujących problemów: charakterystyka adhezji do podłoża komórek poruszających się z prądem cieczy i w nieruchomym środowisku (m. in. w trakcie lokomocji), siła i energia adhezji komórek do różnych powierzchni oraz charakterystyka adhezji międzykomórkowej. Opisane są przykłady wyników badań nad adhezją i lokomocją komórek białaczki L 1210 i L 5222 i innych komórek uzyskane za pomocą przedstawionych metod.

Oznaczenia

- a — promień cząstki (komórki)
- E — energia
- F — siła
- h — odległość środka cząstki (komórki) od ściany kanału
- S — gradient prędkości cieczy
- T — moment obrotowy
- u — prędkość translacyjna cząstki (komórki)
- μ — lepkość cieczy
- δ — odległość powierzchni cząstki (komórki) od ściany kanału
- ω — prędkość kątowna

* Referat wygłoszony podczas II Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, Warszawa 18–22 IX 1985 r.

WSTĘP

W niniejszej pracy opisane są podstawy metod badania adhezji komórek do powierzchni, adhezji międzykomórkowej i lokomocji komórek, które są oparte na wykorzystaniu sił związanych z ruchem komórek względem środowiska, powierzchni lub innych komórek. Zakres zastosowań tych metod ilustrowany jest przykładami wyników doświadczeń. Praca niniejsza stanowi podsumowanie metodologicznych badań prowadzonych w naszym Zakładzie, co jest usprawiedliwieniem faktu, że nie są w niej prezentowane inne badania w zbliżonych dziedzinach [20, 21].

Pod pojęciem metod hydrodynamicznych rozumiem metody badań wykonywanych poza ustrojem, w których istotnym elementem są zjawiska hydrodynamiczne [14]. W pierwszej części pracy omówione są badania, w których komórki znajdują się w nieruchomym środowisku i poruszają się prostopadle lub równoległe do ściany kanału. Druga część pracy zawiera opis badań, w których komórki znajdują się w strumieniu cieczy, przy czym wyróżnione są trzy rodzaje sytuacji: przepływ komórek przy ścianie kanału, przepływ środowiska obok nieruchomych komórek i przepływ zawiesiny komórek.

W badaniach nad adhezją komórek do powierzchni i do innych komórek wykonywanych poza ustrojem stosuje się różnego rodzaju naczynia zawierające środowisko z komórkami. Są to szklane kamery o płaskich ścianach i prostokątnym poprzecznym przekroju, rurki szklane i przewody ze sztucznych tworzyw o okrągłym przekroju poprzecznym itd. Wszelkie takie naczynia można określić mianem kanałów niezależnie od tego, czy zawarta w nich ciecz porusza się, czy jest nieruchoma (w niniejszej pracy nie omawiam metod, w których jako naczynie stosuje się probówki lub większe pojemniki). Rozmiary wewnętrzne kanałów są rozmaite; w tej pracy omawiam tylko takie, których najmniejszy wymiar jest co najmniej kilka razy większy od średnicy badanych komórek. Jeśli więc komórka znajduje się blisko jednej ze ścian, to można nie brać pod uwagę wpływu innych ścian. Istnieje też wiele takich możliwych pozycji komórki, przy których nie występuje uchwytyny wpływ jakiegokolwiek ściany. Naprzeciw siebie położone ściany kanałów są równoległe, przy czym mają one płaskie powierzchnie, jak w kamerach szklanych lub promień ich krzywizny jest bardzo duży (zaniedbywalny) w stosunku do promienia komórki (rurki i przewody). Przy analizie zjawisk hydrodynamicznych przyjmuję założenie, że powierzchnia kontaktu ściany ze środowiskiem jest gładka i nie odkształca się. Nie biorę tu pod uwagę budowy chemicznej ściany, ani ładunku elektrycznego powierzchni, zaniebuję też ruchy termiczne komórek. Przy stężeniach komórek stosowanych w opisywanych w tej pracy badaniach środowisko, z reologicznego punktu widzenia, może być traktowane jako ciecz o właściwościach niutonowskich. Analiza oddziaływania komórek ze ścianami kanału i z innymi komórkami dotyczy w tej pracy zasadniczo pojedynczych komórek lub zjawisk będących bezpośrednim wynikiem wzajemnego kontaktu tych komórek. Zakładam więc,

zgodnie z metodyką większości badań biologicznych w tej dziedzinie, że zawiesina komórek jest znacznie rozcieńczona, tj. że średnie odległości między komórkami w zawieszynie są rzędu co najmniej kilku średnic komórki.

W opisywanych tu badaniach ruch cieczy (środowiska) i komórek jest stosunkowo powolny, tj. liczba Reynoldsa jest zawsze mniejsza od jedności.

Metody przedstawione w tej pracy oparte są na zastosowaniu dwojakiego rodzaju kanałów, z których jednym są kamery szklane, umożliwiające obserwację pod mikroskopem zawartych w nich komórek, drugim zaś przewody ze sztucznego tworzywa. Kamery mają następujące rozmiary wewnętrzne: wysokość 0,12–0,24 mm, szerokość 5–10 mm i długość około 30 mm [30]. Kamera może być szczelnie zamknięta lub włączona w obwód zapewniający precyzyjnie stabilizowany przepływ cieczy (środowiska z komórkami). Stosowany w dalszym tekście termin „kamera” oznacza zawsze właśnie tego rodzaju kanał. Przewód polietylenowy ma wewnętrzną średnicę 0,66 mm i długość 1–5,5 mm [16].

Niniejsza praca nie obejmuje badań nad adhezją i przepływem komórek w sztucznych złożach, np. [11, 28], których opis wymaga odmiennego ujęcia, m. in. z punktu widzenia zagadnień hydrodynamicznych i analizy modelowej.

I. KOMÓRKI W NIERUCHOMYM ŚRODOWISKU

1. OPADANIE KOMÓREK W CIECZY

Na komórkę o objętości v i gęstości d_k znajdującą się w środowisku (cieczy) o gęstości d_s działa siła grawitacyjna F ,

$$F = v(d_k - d_s) g,$$

gdzie g jest przyspieszeniem ziemskim.

Dla komórek jądraztych (tkankowych) siła ta jest rzędu 10^{-13} N. Ze względu na znaczną niejednorodność wielkości komórek, różnica między maksymalną a minimalną wartością tej siły może wynosić cały rząd wielkości lub więcej. W jednej np. populacji komórek L 1210 [30] średnia wartość promienia komórki wynosiła 5,16 μm , przy średnim odchyleniu równym 0,59 μm , największy zaś i najmniejszy promień komórek wynosił 6,9 i 3,5 μm . Przyjmując gęstość komórki jądrazstej równą 1,07 g/cm³, łatwo obliczyć, że siła grawitacyjna, działająca w typowym środowisku na komórkę o najmniejszym zaobserwowanym w tej populacji promieniu, wynosi $1,24 \cdot 10^{-13}$ N, dla największej zaś komórki $9,4 \cdot 10^{-13}$ N.

Ocena tej siły dla komórek, których kształt znacznie różni się od kulistego, jest oczywiście trudniejsza i mniej dokładna.

Siła, z jaką komórka spoczywająca na dolnej powierzchni kanału działa na tę powierzchnię, równa się sile F . Jeśli pominiemy hydrodynamiczny wpływ ściany

kanalu, to otrzymamy siłę działającą na komórkę, która związana jest (np. przez więzy adhezyjne) z powierzchnią górnej ściany kanału. Tego rodzaju sytuacja jest typowa dla najprostszej, szeroko stosowanej metody badania adhezji komórek do powierzchni, polegającej na odwróceniu kamery o 180° po zaadherowaniu opadłych na dno komórek.

Bliskie sąsiedztwo ściany wpływa na zmianę siły oporu środowiska, gdy komórka opada na dolną powierzchnię kanału lub odrywa się od jego górnej ściany. Trudno wprawdzie w pełni ocenić praktyczne znaczenie tego zjawiska, warto jednak krótko je przedstawić. Gdy kulista cząstka zbliża się do dolnej powierzchni kanału, siła oporu środowiska rośnie zgodnie ze zmodyfikowanym wzorem Stokesa [2],

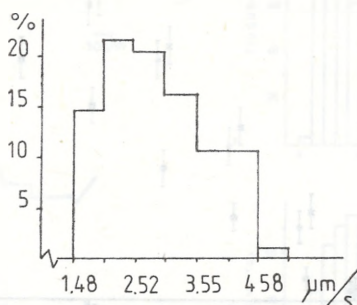
$$F = 6\pi\mu a u A, \quad (1)$$

gdzie μ — lepkość środowiska, a — promień cząstki, u — prędkość cząstki, a A — współczynnik będący funkcją stosunku promienia cząstki do odległości środka cząstki od ściany.

Wartości liczbowe tego współczynnika dla cząstek sztywnych oraz odkształcalnych są podane w [1, 29]. Gdy cząstka zbliża się do ściany, wartość współczynnika A rośnie (teoretycznie do nieskończoności). Przyczyną tego zjawiska jest przemieszczanie się cząsteczek cieczy znajdujących się między cząstką a powierzchnią w kierunkach bocznych (niejako „wyciskanie” ich przez cząstkę). Teoretycznie więc do pełnego kontaktu (w skończonym czasie) między cząstką a powierzchnią może dojść jedynie dzięki dodatkowemu działaniu sił innych niż siła grawitacyjna (siły: związane z ruchami termicznymi, elektrostatyczne oraz van der Waalsa). Jeśli chodzi o kontakt komórki ze ścianą kanału, to w związku z nieregularnością kształtu tej powierzchni, wzór (1) oraz teoria, na której jest on oparty, mają jedynie przybliżony charakter. Gdy komórka oddala się od powierzchni (jak przy „odpadaniu” od górnej powierzchni kanału), występuje analogiczne zjawisko. Przestrzeń zawarta między ścianą a powierzchnią komórki staje się coraz szersza i otaczająca ciecz wypełnia ją w miarę oddalania się komórki. Siła oporu środowiska jest więc początkowo bardzo duża, prędkość zaś cząstki bardzo mała (teoretycznie początkowo równa zero). Podobnie więc jak przy zbliżaniu się cząstki do ściany, jej oderwanie się wymaga teoretycznie działania innych sił, jeśli jako stan początkowy przyjąć pełny kontakt cząstki z powierzchnią. W miarę zwiększania się odległości między komórką a ścianą siła oporu środowiska maleje do wartości równej sile Stokesa w nieograniczonym środowisku.

Jeśli chodzi o oddziaływanie ze ścianą i ruch w środowisku cząstek o tak nieregularnym kształcie jak żywa komórka, to doświadczalne wykazanie opisanych tu zjawisk lub weryfikacja ich teoretycznego opisu jest trudna. Stwierdzona jednak doświadczalnie [30] średnia prędkość komórek L 1210 opadających w kamerze o wysokości $120 \mu\text{m}$ wykazuje z dość dobrym przybliżeniem zgodność z wartością, którą można przewidywać teoretycznie (ryc. 1). Jeśli pominąć niewielką asymetrię

rozkładu prędkości komórek (zapewne zależną od wpływu komórek o największej średnicy), to można przyjąć, że średnia prędkość opadania komórki wynosi 2,92 $\mu\text{m/s}$, teoretycznie zaś obliczona prędkość wynosi 3,1 $\mu\text{m/s}$.



Ryc. 1. Rozkład prędkości komórek L 1210 ($\mu\text{m/s}$) swobodnie opadających w środowisku Parkera, wg [30]

2. RUCH KOMÓREK WZDŁUŻ ŚCIANY KANAŁU W NIERUCHOMYM ŚRODOWISKU

Przemieszczanie się komórek względem bezpośrednio sąsiadującej z nią powierzchni kanału w nieruchomym (w stosunku do kanału) środowisku występuje, gdy powierzchnia jest nachylona, tj. gdy kąt, jaki powierzchnia ta tworzy z kierunkiem poziomym, jest zawarty między 0 a 90° oraz przy aktywnej migracji (lokomocji) komórek.

Na komórkę znajdującą się na nachylonej powierzchni działa komponenta siły grawitacyjnej równoległa do tej powierzchni (siła F_r), która jest równa

$$F_r = F \sin \gamma,$$

gdzie F jest siłą grawitacyjną, γ zaś kątem, pod jakim powierzchnia jest nachylona względem poziomu.

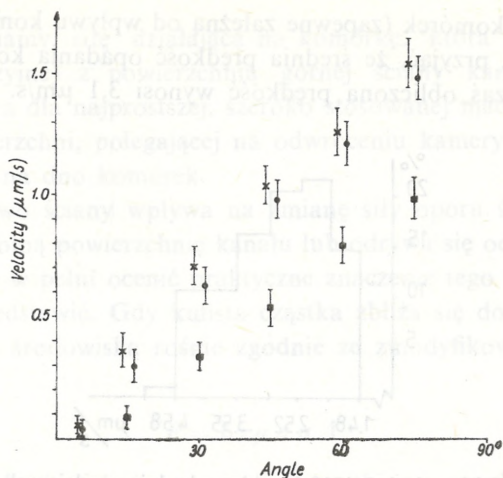
Prędkość translacyjna u i kątowa ω komórki [4, 22] przemieszczającej się w bliskiej odległości od ściany kanału (przesuwającej się po powierzchni) może być opisana równaniami

$$u = \frac{F}{3\pi\mu a \ln \delta}, \quad (2)$$

$$\omega = \frac{F}{12\pi\mu a^2 \ln \delta}, \quad (3)$$

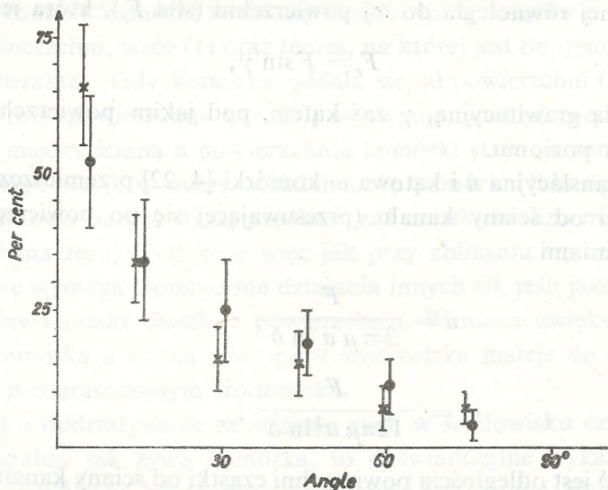
gdzie $F = F_r$, δ jest odległością powierzchni cząstki od ściany kanału (ryc. 7).

Doświadczalnie wyznaczona prędkość translacyjna ruchu komórek jądrazstych na nachylonej powierzchni (ryc. 2) wykazuje zgodność z wartością obliczoną na podstawie równania (2) i pozwala oszacować odległość δ na 12 nm [15]. Wobec

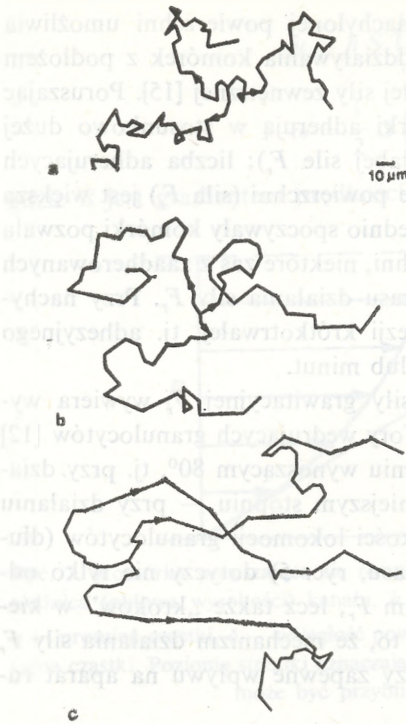


Ryc. 2. Prędkość komórek L 1210 (x), L 5222 (.) i erytrocytów (■) (oś rzędnych, $\mu\text{m/s}$) przemieszczających się na nachylonej powierzchni przy różnych jej kątach nachylenia (oś odciętych), wg [15]

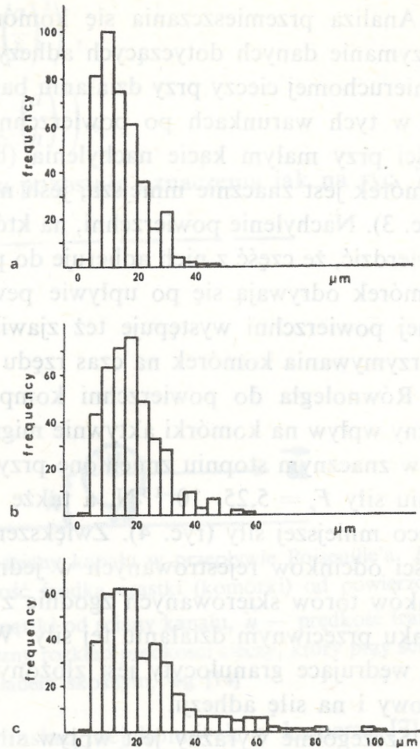
nieregularności powierzchni komórki interpretacja tego oszacowania nie jest jasna. Prędkość translacyjna erytrocytów jest znacznie mniejsza, co z pewnością wiąże się z ich odmiennym kształtem. Ruch obrotowy komórek, opisany wzorem (3), nie znajduje jednak potwierdzenia: najbardziej staranna obserwacja nie pozwala na jego stwierdzenie, mimo że komórki płynące w prądzie cieczy wykazują ruch obrotowy zgodny z teorią.



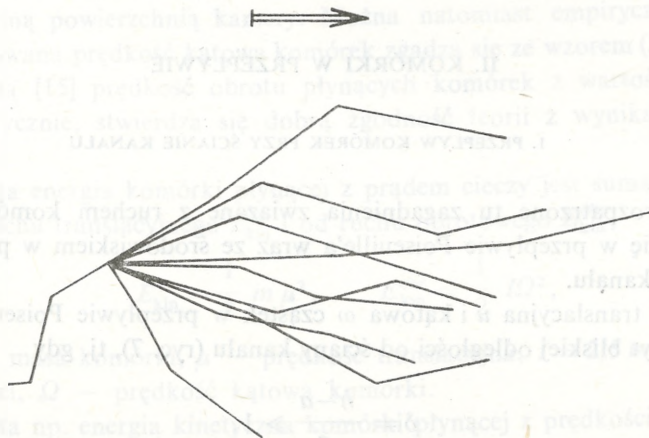
Ryc. 3. Adhezja komórek L 1210 do nachylonej powierzchni, na której komórki te przemieszczają się (oś rzędnych, procent komórek wchodzących w pole widzenia mikroskopu) w funkcji kąta nachylenia powierzchni (oś odciętych), wg [15]



Ryc. 4. Tory granuloocytów wędrujących na powierzchni poziomej (a) i nachylonej pod kątem 40° (b) i 80° (c). Kierunek nachylenia powierzchni od strony lewej ku prawej, wg [12]



Ryc. 5. Rozkład prędkości granuloocytów (długości jednoninutowych odcinków trajektorii) wędrujących na powierzchni poziomej (a) i nachylonej pod kątem 40° (b) i 80° (c), wg [12]



Ryc. 6. Tory komórek białaczki L 5222 wędrujących po powierzchni nachylonej pod kątem 2°. Kierunek nachylenia powierzchni od strony lewej ku prawej, wg [9]

Analiza przemieszczania się komórek na nachylonej powierzchni umożliwia otrzymanie danych dotyczących adhezyjnego oddziaływania komórek z podłożem w nieruchomej cieczy przy działaniu bardzo małej siły zewnętrznej [15]. Poruszając się w tych warunkach po powierzchni, komórki adherują w stosunkowo dużej ilości przy małym kącie nachylenia (bardzo słabej sile F_r); liczba adherujących komórek jest znacznie mniejsza, jeśli nachylenie powierzchni (siła F_r) jest większa (ryc. 3). Nachylenie powierzchni, na której uprzednio spoczywały komórki pozwala stwierdzić, że część z nich adheruje do powierzchni, niektóre zaś z zaadherowanych komórek odrywają się po upływie pewnego czasu działania siły F_r . Przy nachylonej powierzchni występuje też zjawisko adhezji krótkotrwałej, tj. adhezyjnego zatrzymywania komórek na czas rzędu sekund lub minut.

Równoległa do powierzchni komponenta siły grawitacyjnej F_r wywiera wyraźny wpływ na komórki aktywnie migrujące. Tory wędrujących granulocytów [12] są w znacznym stopniu zmienione przy nachyleniu wynoszącym 80° , tj. przy działaniu siły $F_r = 5,25 \cdot 10^{-13}$ N, a także — w mniejszym stopniu — przy działaniu nieco mniejszej siły (ryc. 4). Zwiększenie prędkości lokomocji granulocytów (długości odcinków rejestrowanych w jednostce czasu, ryc. 5) dotyczy nie tylko odcinków torów skierowanych zgodnie z wektorem F_r , lecz także „kroków” w kierunku przeciwnym działaniu tej siły. Wskazuje to, że mechanizm działania siły F_r na wędrujące granulocyty jest złożony i dotyczy zapewne wpływu na aparat ruchowy i na siłę adhezji.

Szczególnie wyraźny jest wpływ siły F_r na wędrujące komórki doświadczalnej białaczki L 5222 [9], których tory (ryc. 6) ulegają wyraźnej zmianie nawet przy minimalnym nachyleniu powierzchni, tj. pod kątem 2° ($F_r = 1,25 \cdot 10^{-14}$ N). Przy nachyleniu powierzchni większym niż 3° ($F_r = 1,9 \cdot 10^{-14}$ N) komórki L 5222 odrywają się od powierzchni i nie są zdolne do lokomocji.

II. KOMÓRKI W PRZEPIŹYWIE

1. PRZEPIŹYW KOMÓREK PRZY ŚCIANIE KANAŁU

Zostaną rozpatrzone tu zagadnienia związane z ruchem komórek przemieszczających się w przepływie Poiseuille'a wraz ze środowiskiem w pobliżu dolnej powierzchni kanału.

Prędkości translacyjna u i kątowna ω cząstek w przepływie Poiseuille'a, płynących w niezbyt bliskiej odległości od ściany kanału (ryc. 7), tj. gdy

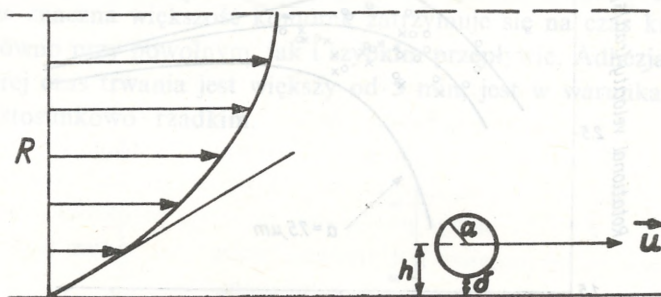
$$\delta = \frac{h-a}{a} \gg 1,$$

można opisać następującymi równaniami [22]:

$$u = h S \left(1 - \frac{5}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^3 \right), \quad (4)$$

$$\omega = \frac{1}{2} S \left(1 - \frac{5}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^3 \right), \quad (5)$$

gdzie S jest gradientem prędkości cieczy, a pozostałe oznaczenia jak na ryc. 7.



Ryc. 7. Komórka poruszająca się równoległe do ściany kanału w przepływie Poiseuille'a. R – średnica (połowa wysokości) kanału, h – odległość środka cząstki (komórki) od powierzchni, a – promień cząstki, δ – odległość powierzchni cząstki od ściany kanału, \vec{u} – prędkość translacyjna cząstki. Poziome strzałki oznaczają paraboliczny rozkład prędkości cieczy, który przy ścianie może być przybliżony rozkładem skośnym, wg [14]

Doświadczalne oznaczenie prędkości translacyjnej komórek w kamerze [7] nie daje podstaw do weryfikacji wzoru (4) z powodu dużego rozrzutu wyników: błąd względny pomiarów prędkości komórek sięga kilkudziesięciu procent. Rozrzut ten jest z pewnością spowodowany faktem, że odległość płynących komórek nie jest stała ze względu na nieregularność ich kształtu. Średnia prędkość komórek oznaczona dla różnych przepływów odpowiada prędkości cieczy w zakresie 5–8 μm nad dolną powierzchnią kamery. Można natomiast empirycznie sprawdzić czy obserwowana prędkość kątowna komórek zgadza się ze wzorem (5). Porównując obserwowaną [15] prędkość obrotu płynących komórek z wartościami obliczonymi teoretycznie, stwierdza się dobrą zgodność teorii z wynikami pomiarów (ryc. 8).

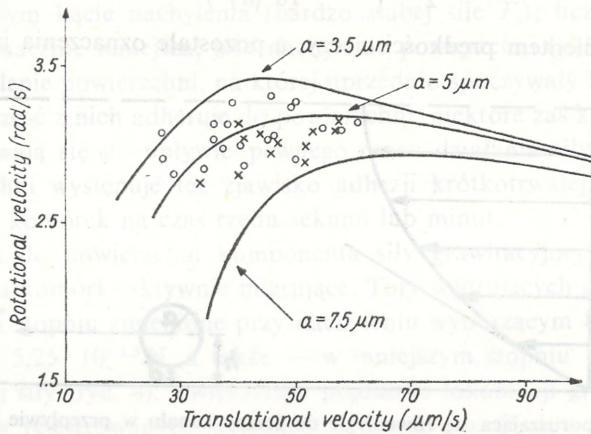
Całkowita energia komórki płynącej z prądem cieczy jest sumą jej energii zależnej od ruchu translacyjnego $E_{\text{kin}}^{\text{tr}}$ i od ruchu obrotowego $E_{\text{kin}}^{\text{obr}}$,

$$E_{\text{kin}}^{\text{tr}} = \frac{1}{2} m \mu^2, \quad E_{\text{kin}}^{\text{obr}} = \frac{1}{2} I \Omega^2,$$

gdzie m – masa komórki, μ – prędkość translacyjna, $I = 2/5 m a^2$ – moment bezwładności, Ω – prędkość kątowna komórki.

Całkowita np. energia kinetyczna komórki płynącej z prędkością 14 $\mu\text{m/s}$ (jest to prędkość komórki płynącej w sąsiedztwie powierzchni kanału w przepływie o wydatku 0,07 $\mu\text{l/s}$) wynosi $5,5 \cdot 10^{-21} \text{J}$.

Obserwacja i pomiar prędkości komórek przemieszczających się w przepływie w bliskości ściany kamery pozwalają na badanie różnych zjawisk związanych z oddziaływaniem komórek z powierzchnią.



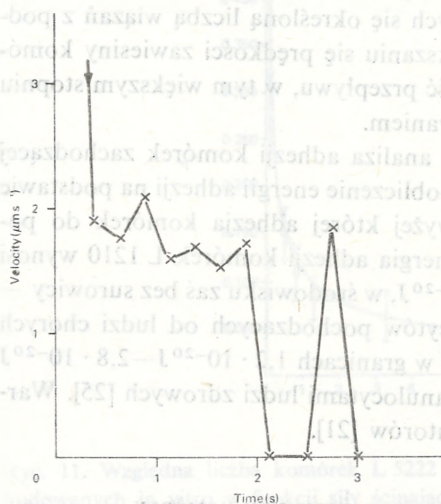
Ryc. 8. Prędkość kątowna komórek L 1210 (o) i L 5222 (x) płynących w prądzie cieczy jako funkcja prędkości translacyjnej (gradient prędkości cieczy $8,0 \text{ s}^{-1}$). Krzywe przedstawiają teoretycznie przewidywane prędkości kątowe komórek dla różnych promieni a ($3,5$, 5 i $7,5 \mu\text{m}$). Obserwowane prędkości kątowe mieszczą się w granicach określonych przez rozrzut wielkości komórek, wg [15]

Wśród komórek płynących w warstwie przyściennej niektóre kamery poruszają się bardzo powoli, z prędkością wielokrotnie mniejszą niż mogłoby to wynikać z efektów czysto hydrodynamicznych na pograniczu cieczy i ściany. Zjawisko to występuje zarówno w przypadku komórek jądrowych jak i erytrocytów. Ryc. 9 przedstawia wykres prędkości komórki L 1210, która w ciągu około 2 s płynie w przybliżeniu 6 razy wolniej od cieczy w jej otoczeniu, zostaje zatrzymana i następnie uwalnia się i znów osiada [7]. Podobne zjawisko obserwowane było wielokrotnie często w znacznie dłuższym czasie [10, 13]. Obserwując erytrocyty przepływające bezpośrednio nad dolną ścianą kamery [8] stwierdza się, że przy powolnym przepływie (gradient prędkości cieczy równy $4,64 \text{ s}^{-1}$) około 15% tych komórek nie wykazuje charakterystycznej rotacji i porusza się ruchem „ślizgającym”, tj. zachowując swą płaską powierzchnię w pozycji równoległej do podłoża. Przy większej prędkości cieczy liczba komórek „ślizgających się” maleje, nawet jednak przy stosunkowo bardzo szybkim przepływie około 1% erytrocytów przemieszcza się w ten sposób. Prędkość tych komórek wynosi około 1/2 prędkości środowiska w ich bezpośrednim sąsiedztwie.

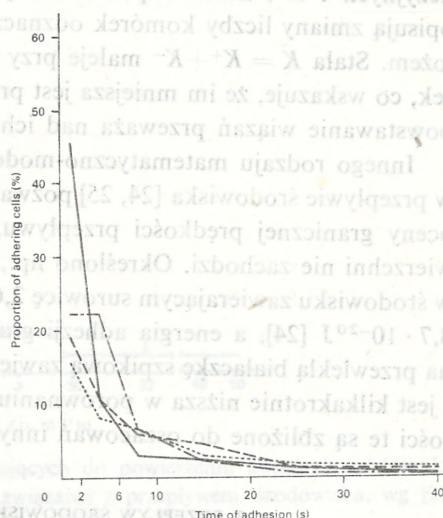
Zjawiska te wskazują, że adhezyjne oddziaływania między komórkami a podłożem mogą występować w trakcie ruchu komórki lub znacznie poprzedzać pełną adhezję.

Częstość adhezji komórek maleje w miarę wzrostu prędkości przepływu zawiesiny [10, 24, 25].

Płynące w środowisku komórki są często zatrzymywane na powierzchni na krótki czas, a następnie są dalej unoszone przez prąd cieczy; jest to zjawisko adhezji krótkotrwałej. W badaniach dotyczących komórek L 1210 i L 5222 stwierdzono [7], że znaczna większość komórek zatrzymuje się na czas krótszy niż 2 s (ryc. 10) zarówno przy powolnym, jak i szybkim przepływie. Adhezja długotrwała, tj. taka, której czas trwania jest większy od 5 min, jest w warunkach przepływu zjawiskiem stosunkowo rzadkim.



Ryc. 9. Bardzo powolny ruch komórek L 1210 w sąsiedztwie ściany kanału poprzedzający jej zatrzymanie. Prędkość cieczy na poziomie komórki wynosi $13 \mu\text{m s}^{-1}$, wg [7]



Ryc. 10. Rozkład czasów adhezji krótkotrwałej komórek białaczki w przepływie o różnej prędkości (gradientie). Komórki L 5222: —, —, —, $2,56 \text{ s}^{-1}$, $25,7 \text{ s}^{-1}$; komórki L 1210: —, —, —, $2,56 \text{ s}^{-1}$, — — — $25,7 \text{ s}^{-1}$, wg [7]

Mechanizm adhezji krótkotrwałej jest, jak się zdaje, następujący. Zatrzymanie komórki na podłożu jest wynikiem oddziaływania między pewnymi „aktywnymi” ośrodkami położonymi na powierzchni komórki, które mogą odpowiadać np. różnego rodzaju wypustkom błony komórkowej. Gdy komórka przepływa w okolicy ściany kanału, jej trajektoria ulega zaburzeniom. Komórka zbliża się do podłoża, którego dotyka pewien punkt jej powierzchni. Jeśli punkt ten odpowiada jednemu z „centrów aktywnych”, to powstaje pierwsze wiązanie między komórką a podłożem. Na komórkę jednak działa jednocześnie siła wywołana przez przepływ cieczy, czego wynikiem może być zerwanie tego wiązania. Jednakże w tym samym czasie inny ośrodek aktywny może zetknąć się z podłożem i może powstać następne wiązanie. Siła przepływu może zerwać również to wiązanie, może jednak także dojść do utworzenia się kolejnego wiązania, które z kolei może być zerwane lub

przetrwąć wraz z tworzącymi się nowymi wiązaniami. W taki sposób komórka może bądź zostać zatrzymana na podłożu, bądź od niego oderwana, które zaś z tych zdarzeń nastąpi zależy od przewagi jednego z dwóch procesów: powstawania więzów adhezyjnych lub ich przerywania. Od wzajemnego stosunku siły odrywającej i zatrzymującej komórkę zależy prawdopodobieństwo zajścia i czas trwania adhezji.

Ten hipotetyczny mechanizm adhezji komórek w przepływie został przyjęty jako podstawa matematycznego modelu [3], w którym wyróżnia się dwie stałe fenomenologiczne: K^+ odpowiadającą częstości powstawania nowych wiązań adhezyjnych i K^- , która odpowiada częstości zrywania wiązań. Równania modelu opisują zmiany liczby komórek odznaczających się określoną liczbą wiązań z podłożem. Stała $K = K^+ + K^-$ maleje przy zwiększaniu się prędkości zawiesiny komórek, co wskazuje, że im mniejsza jest prędkość przepływu, w tym większym stopniu powstawanie wiązań przeważa nad ich zrywaniem.

Innego rodzaju matematyczno-modelowa analiza adhezji komórek zachodzącej w przepływie środowiska [24, 25] pozwala na obliczenie energii adhezji na podstawie oceny granicznej prędkości przepływu, powyżej której adhezja komórek do powierzchni nie zachodzi. Określono np., że energia adhezji komórek L 1210 wynosi w środowisku zawierającym surowicę $2,6 \cdot 10^{-20}$ J, w środowisku zaś bez surowicy — $8,7 \cdot 10^{-20}$ J [24], a energia adhezji granulocytów pochodzących od ludzi chorych na przewlekłą białaczkę szpikową zawiera się w granicach $1,2 \cdot 10^{-20}$ J — $2,8 \cdot 10^{-20}$ J i jest kilkakrotnie niższa w porównaniu z granulocytami ludzi zdrowych [25]. Wartości te są zbliżone do oszacowań innych autorów [21].

2. PRZEPLYW ŚRODOWISKA OBOK NIERUCHOMYCH KOMÓREK

Na komórkę nieruchomą, przylegającą do powierzchni kanału ($\delta \rightarrow 0$), działa siła ścinająca przepływu, która wynosi [22]

$$F = 6\pi \mu a h S F^*,$$

moment zaś obrotowy

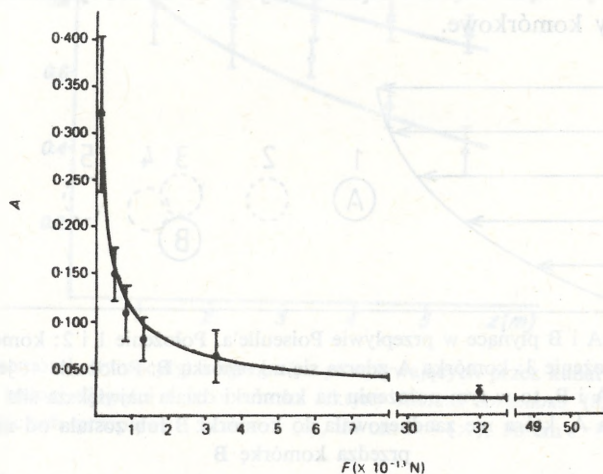
$$T = 4\pi \mu a^3 S T^*,$$

gdzie S jest przyściennym gradientem prędkości cieczy, F^* i T^* zaś są współczynnikami, których wielkość zależy od stosunku h/a ; zostały one podane w formie tabelarycznej w pracy [22]. Przyjmując np. $h/a = 1,04$, przy przepływie przez kamerę cieczy z wydatkiem równym $0,07 \mu\text{l/s}$,

$$F = 3,5 \cdot 10^{-12} \text{ N}, \quad T = 7,6 \cdot 10^{-18} \text{ Nm}.$$

Wykorzystanie działania siły ścinającej, występującej przy przepływie cieczy na komórki, które uległy adhezji do podłoża w nieruchomym środowisku, pozwala na ocenę siły adhezji tych komórek. Wykazano [26, 27], że siła adhezji komórek

L 1210 i L 5222 do różnych powierzchni (szkło, kolagen, komórki śródbłónka) zawarta jest w bardzo szerokich granicach (ryc. 11), od wartości mniejszych od 10^{-14} N do większych od 10^{-9} N. Analiza rozkładu tych sił skłania do przypuszczenia, że adhezja jest zjawiskiem bezprogowym, tj. że każdy kontakt komórki z podłożem może prowadzić do powstania więzów adhezyjnych o różnej jednak sile: od znikomo małej do stosunkowo bardzo dużej. Siły adhezji podawane przez innych autorów wynoszą na ogół 10^{-10} N lub 10^{-11} N [21]; dokładne porównanie jest zresztą trudne z powodu różnic metodycznych.



Ryc. 11. Względna liczba komórek L 5222 adhezujących do powierzchni komórek śródbłónka hodowanych in vitro w funkcji siły ścinającej F związanej z przepływem środowiska, wg [27]

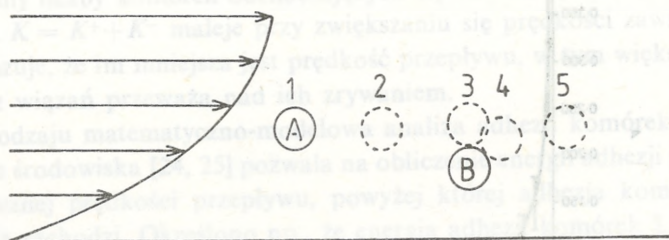
3. PRZEPLYW ZAWIESINY KOMÓREK

Na komórki przemieszczające się z przepływem środowiska działają siły hydrodynamiczne, które powodują zarówno występowanie wzajemnych zderzeń komórek, co może prowadzić do powstawania agregatów komórkowych, jak i mogą rozrywać połączenia między komórkami tworzącymi agregaty. Tego rodzaju zjawiska w przepływie Couette'a (o skośnym rozkładzie prędkości) w urządzeniu typu wiskozymetru zostały wykorzystane przez Curtisa i wsp. [5, 6] w badaniach dotyczących agregacji komórek. Duszyk i wsp. [16] opracowali teorię oddziaływań międzykomórkowych w przepływie Poiseuille'a (w przewodzie o przekroju okrągłym) oraz opartą na niej metodę badania adhezji międzykomórkowej w zawiesinie.

Komórki, które w przepływie Poiseuille'a znajdują się bliżej środka kanału mają większą prędkość niż komórki położone bardziej ekscentrycznie (ryc. 12). Jeśli trajektoria komórki płynącej szybciej jest zbliżona do trajektorii komórki poruszającej się wolniej, czyli (w przybliżeniu) gdy odległość między trajektoriami tych komórek nie jest większa od średnicy komórki, to dochodzi do zderzenia

tych komórek. W wyniku zderzenia bądź dochodzi do adhezyjnego połączenia między komórkami, bądź też komórki rozdzielają się i oddalają. Jeśli komórki ulegną połączeniu, to zaczyna działać na nie siła hydrodynamiczna, która dąży do ich rozerwania.

Wykorzystanie tych zjawisk do badania adhezji międzykomórkowej opiera się na śledzeniu zmian stężenia zawiesiny komórek przepływającej z określoną prędkością przez kanał. Zmiany te odzwierciedlają powstawanie lub rozpad agregatów komórkowych. Możliwe są dwie sytuacje: siła adhezji komórek ulegających połączeniu może być bądź większa bądź mniejsza od hydrodynamicznej siły rozrywającej agregaty komórkowe.



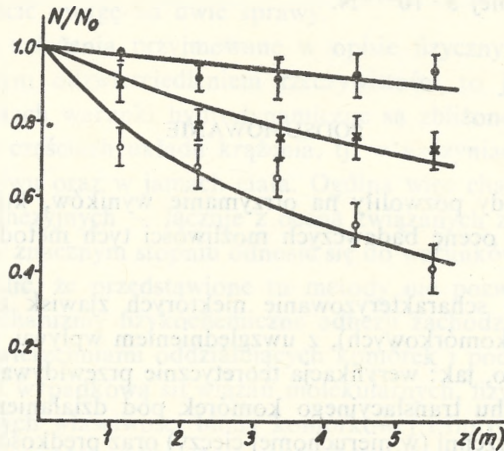
Ryc. 12. Komórki A i B płynące w przepływie Poiseulle'a. Położenie 1 i 2: komórka A zbliża się do komórki B. Położenie 3: komórka A zderza się z komórką B. Położenie 4: jeśli doszło do połączenia komórek A i B, to w tym położeniu na komórki działa największa siła rozrywająca. Położenie 5: komórka A, która nie zaadherowała do komórki B lub została od niej oderwana wyprzedza komórkę B

Miarą adhezywności międzykomórkowej jest współczynnik efektywności wychwytu komórek, który można określić, jeśli wpływające do kanału komórki tworzą zawiesinę monodispersyjną i siła adhezji w powstających agregatach jest większa od hydrodynamicznej siły rozrywającej. Wyznaczenie współczynnika wychwytu jest oparte na wynikach pomiarów liczby cząstek (tj. łącznej liczby pojedynczych komórek i agregatów komórkowych) w zawieszynie, która przepłynęła przez kanał przy znanej liczbie komórek wchodzących do kanału. W najbardziej ogólnym ujęciu czynniki odgrywające główną rolę w badaniu adhezji międzykomórkowej za pomocą opisywanej metody związane są zależnością

$$\frac{N}{N_0} = \int_0^1 f(a, z, k, x) dx,$$

gdzie N — liczba cząstek w zawieszynie po przejściu przez kanał, N_0 — liczba cząstek (komórek) wchodzących do kanału, a — współczynnik efektywności wychwytu komórek, który równa się stosunkowi strumienia cząstek przechodzących przez pole wychwytu (tj. pole, wewnątrz którego położone są trajektorie komórek ulegających agregacji) do strumienia cząstek przechodzących przez geometryczny przekrój wychwytu (tj. koło o promieniu równym średnicy komórek), z — długość

kanalu (od początku do miejsca pomiaru stężenia cząstek), k — parametr zależny od charakterystyki zawiesiny komórek (tj. od wielkości komórek, ich stężenia i lepkości środowiska) oraz od promienia kanału. Wszystkie czynniki poza współczynnikiem efektywności wychwytu α są znane lub mogą być zmierzone doświadczalnie, istnieje więc możliwość wyznaczenia tego współczynnika.



Ryc. 13. Stężenie komórek (tymocyty) i agregatów przepływających przez kanał o średnicy przekroju 0,66 mm, o różnej długości z w obecności lektyny *Ricinus communis* (0,125 $\mu\text{g/ml}$) przy różnych prędkościach przepływu: 5 cm s^{-1} (o), 18 cm s^{-1} (\times), 30 cm s^{-1} (o), wg [18]

Jeśli do kanału wpływa zawiesina, w której występują agregaty wielokomórkowe, to siłę rozrywającą więzy międzykomórkowe można określić korzystając z równania [23]

$$F = 19,2 \mu S a^2 \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi,$$

gdzie μ — lepkość cieczy, S — gradient prędkości cieczy, a — promień komórki, Θ i Φ — kąty określające wzajemną konfigurację komórek w agregacie.

Metoda oparta na oddziaływaniu komórek w przepływie Poiseuille'a została wykorzystana do zbadania agregacji tymocytów szczura [18]. Komórki te w środowisku typowym, zawierającym surowicę, nie wykazują agregacji w przepływie, wiążą się natomiast w obecności lektyn (ryc. 13). W badaniach, dotyczących lektyny z *Ricinus communis* (RCA) i konkanawaliny A (Con A), określono współczynnik wychwytu dla tych komórek oraz zbadano wiele zjawisk związanych z ich agregacją, jak maksymalna odległość powierzchni komórek, przy której możliwa jest agregacja, współczynnik dyfuzji receptorów lektyn w błonie komórkowej oraz siła adhezji międzykomórkowej wywoływanej przez lektyny [17, 19]. Maksymalna odległość umożliwiająca adhezję między tymocytami wynosi 5,5 nm dla RCA, a dla Con A około 2 nm, co (biorąc pod uwagę przypuszczalną wielkość cząsteczek lektyny, wynoszącą 6,8 nm dla RCA i 4 nm dla Con A) sugeruje, że miejsca receptorowe dla cząsteczek tych lektyn położone są w głębi błony komórkowej. Współ-

czynnik dyfuzji miejsc receptorowych na powierzchni tymocytów wynosi, według oceny dla RCA, $D = 5,6 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$. Współczynnik ten jest wyraźnie mniejszy, jeśli agregacja zachodzi w niższej temperaturze, tj. w 4°C w porównaniu z 37°C , oraz w komórkach utrwalonych w porównaniu z komórkami nieuszkodzonymi. Siła adhezji międzykomórkowej w agregatach powstałych pod wpływem lektyn jest równa co najmniej $3 \cdot 10^{-10} \text{ N}$.

PODSUMOWANIE

Opisane tu metody pozwoliły na otrzymanie wyników, których zrekapitulowanie może ułatwić ocenę badawczych możliwości tych metod i zakresu ich zastosowań.

1. Sprawdzenie i scharakteryzowanie niektórych zjawisk z dziedziny hydrodynamiki zawieszin (komórkowych), z uwzględnieniem wpływu powierzchni organiczającej środowisko, jak: weryfikacja teoretycznie przewidywanej prędkości opadania komórek, ruchu translacyjnego komórek pod działaniem siły zewnętrznej na nachylonej powierzchni (w nieruchomej cieczy) oraz prędkości kątowej komórek płynących w strumieniu cieczy, brak potwierdzenia teoretycznie przewidywanego ruchu obrotowego komórek na nachylonej powierzchni.

2. Określenie zależności częstości adhezji komórek białaczki L 1210 i L 5222 płynących w strumieniu cieczy od prędkości przepływu oraz tychże komórek poruszających się biernie w nieruchomym środowisku — od wielkości działającej siły (prędkości). Stwierdzenie występowania adhezyjnych oddziaływań z powierzchnią komórek białaczki i erytrocytów płynących w strumieniu cieczy. Wykazanie występowania i scharakteryzowanie zjawiska adhezji krótkotrwałej komórek białaczki w przepływie i przy biernym ruchu komórek w nieruchomym środowisku.

3. Stwierdzenie, że siła adhezji komórek L 1210 i L 5222 do powierzchni jest zawarta w bardzo szerokim zakresie kilku rzędów wielkości: od wartości znacznie mniejszych od 10^{-14} N do wartości większych od 10^{-9} N . Wykazanie istotnych różnic w adhezji tych komórek do rozmaitych powierzchni, jak szkło, kolagen i warstwa komórek śródbłonna.

4. Eksperymentalne wyznaczenie energii adhezji do powierzchni komórek białaczki L 1210 oraz granulocytów normalnych i białaczkowych.

5. Estymacja siły adhezji związanej z aktywną wędrówką (lokomocją) granulocytów i komórek białaczki L 5222 oraz ocena wpływu działania siły zewnętrznej na charakterystykę i mechanizm lokomocji tych komórek.

6. Określenie charakterystyki adhezji międzykomórkowej tymocytów w obecności lektyn: wyznaczenie współczynnika wychwytu komórek, minimalnej siły adhezji, maksymalnej odległości między adherującymi komórkami oraz współczynnika dyfuzji receptorów lektyn w błonie komórkowej.

Wymienione zjawiska badane były *extra vivum*, w sztucznych warunkach daleko odbiegających od warunków naturalnych zarówno z punktu widzenia środowiska, jak i powierzchni, stężenia komórek itd. Problem biologicznej, wewnątrzustrojowej relewancji (w braku lepszego terminu) wyników eksperymentów wykonywanych poza ustrojem jest więc również dla tych badań podstawowy. W związku z tym trzeba zwrócić uwagę na dwie sprawy.

1^o. Wprawdzie założenia przyjmowane w opisie fizycznym są często jedynie bardzo przybliżonym odzwierciedleniem rzeczywistości, to jednak w opisanych w tej pracy badaniach warunki hydrodynamiczne są zbliżone do tych, jakie występują w różnych częściach układu krążenia, tj. w naczyniach o różnej średnicy i prędkości przepływu oraz w jamach ciała. Ogólna więc charakterystyka komórkowych zjawisk adhezyjnych — łącznie z oceną związanych z tymi zjawiskami sił i energii — może w znacznym stopniu odnosić się do warunków ustrojowych. Trzeba jednak podkreślić, że przedstawione tu metody nie pozwalają na wniknięcie w szczegółowe mechanizmy fizykochemiczne adhezji zachodzące w warstwie granicznej między powierzchniami oddziałujących komórek i podłoża. Rozpatrywana np. siła adhezji jest wypadkową sił wiązań molekularnych, fizycznych sił dalekiego zasięgu, reologicznych właściwości błony komórkowej i innych czynników.

2^o. Ze względu na charakter badanych zjawisk można przypuszczać, choć nie można być tego całkowicie pewnym, że podstawowe cechy oddziaływań adhezyjnych są podobne niezależnie (w pewnym stopniu) od warunków, w jakich zachodzą. Pogląd ten jest oparty na ogólnie przyjętych zasadach badań biologicznych oraz na podobieństwie wielu wyników otrzymywanych w różnych warunkach i środowiskach oraz dla różnych komórek itd. Należy pamiętać, że podstawowym obiektem części opisanych tu badań były komórki białaczkowe, których właściwości adhezyjne mogą w istotnych szczegółach różnić się od właściwości innych komórek nowotworowych i komórek prawidłowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BART E., Chem. Eng. Sci., 23: 193, 1968.
- [2] BRENNER H., Chem. Eng. Sci., 16: 242, 1961.
- [3] CHERNAVSKII D. S., DOROSZEWSKI J., GOŁĄB-MEYER Z., RUIJGROK Th. W., Mathematical Description of the Adhesion of Cells Flowing in the Near-Wall Region, Post. Cybern., (4) 2: 39–47, 1981.
- [4] COX R. G., Int. J. Multiphase Flow, 1; 343, 1974.
- [5] CURTIS A. S. G., The measurement of cell adhesiveness by an absolute method, J. Embryol. Exp. Morph., 22; 305–325, 1969.
- [6] CURTIS A. S. G., HOKING L., Collision efficiency of equal spherical particles in a shear flow, Trans. Faraday Soc., 66: 1381–1390, 1370.

- [7] DOROSZEWSKI J., Short-term and incomplete cell-substrate adhesion. W: Cell adhesion and motility, pod red. A. S. G. Curtis i J. D. Pitts, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1980, 171–197.
- [8] DOROSZEWSKI J., DUSZYK M., Charakterystyka ruchu erytrocytów w pobliżu ściany kanału, *Acta Haematol. Pol.*, **10**: 243–249, 1979.
- [9] DOROSZEWSKI J., DUSZYK M., JAKUBAS-PRZEWŁOCKA J., Contact of migrating L 5222 leukemia cells with the substrate as studied under the action of gravitational force, *Neoplasma*, **28**: 67–77, 1981.
- [10] DOROSZEWSKI J., GOŁĄB-MEYER Z., GURYN W., Adhesion of cells in flowing suspensions: effects of shearing force and cell kinetic energy, *Microvascular Res.*, **18**: 421–433, 1979.
- [11] DOROSZEWSKI J., JAKUBAS J., SZLENK W., Mathematical model of dynamic adhesion of lymphocytes on a glass-bead column, *Bull. Math. Biol.* **38**: 659–669, 1976.
- [12] DOROSZEWSKI J., LEWANDOWSKA K., WIERZBICKI W., Locomotion of granulocytes on an inclined plane, *Acta Physiol. Pol.*, **2**: 1986 (w druku).
- [13] DOROSZEWSKI J., SKIERSKI J., PRZĄDKA L., Interaction of neoplastic cells with glass surface under flow conditions, *Exp. Cell Res.*, **104**: 335–343, 1977.
- [14] DUSZYK M., DOROSZEWSKI J., Hydrodynamics of interaction of particles (including cells) with surfaces, *Progr. Surface Sci.*, **15**: 369–399, 1984.
- [15] DUSZYK M., DOROSZEWSKI J., Surface interactions of leukemia and red cells passively moving in a quiescent fluid, *Biorheol.*, **19**: 269–279, 1982.
- [16] DUSZYK M., DOROSZEWSKI J., Poiseuille flow method for measuring cell-to-cell adhesion, *Cell Biophys.* (w druku).
- [17] DUSZYK M., HAN M., Determination of lectin-receptors mobility by means of cell aggregation assay, *Symp. Intertec 7*, Bruksela 1985.
- [18] DUSZYK M., KAWALEC M., DOROSZEWSKI J., Specific cell-to-cell adhesion under flow conditions, *Cell Biophys.* (w druku).
- [19] DUSZYK M., KAWALEC M., DOROSZEWSKI J., Quantitative study of lectin-mediated cell aggregation, *Lectins*, **4**: 307–312, 1985.
- [20] GARROD D. R., NICOL A., Cell behaviour and molecular mechanisms of cell-cell adhesion, *Biol. Rev.*, **56**: 199–242, 1981.
- [21] GINGELL D., VINCE S., Long-range forces and adhesion: an analysis of cell-substratum studies, [w:] *Cell adhesion and motility*, pod red. A. S. G. Curtis i J. D. Pitts, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1980, 1–37.
- [22] GOLDMAN A. J., COX R. G., BRENNER H., Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall, *Chem. Eng. Sci.*, **22**: 637–660, 1967.
- [23] GOLDSMITH H. L., LICHTARGE D., TESSIER-LAVIGNE M., SPAIN S., Some model experiments in hemodynamics: VI. Two-body collisions between blood cells, *Biorheology*, **18**: 531–555, 1981.
- [24] JAKUBAS-PRZEWŁOCKA J., Effect of the flow velocity of cell suspension on the adhesion of lymphocytes and L 1210 cells to a glass surface, *Bull. Ac. Pol. Sci. (série biol.)*, **28**: 17–23, 1980.
- [25] —, Adhezywność granulocytów w przewlekłej białaczce szpikowej, Praca doktorska, Akademia Medyczna w Warszawie, 1984.
- [26] KOWALCZYŃSKA H. M., NOWAK M., Effect of cell-substrate interaction time and shearing force on adhesion of L 1210 cells to collagen and glass, *J. Cell Sci.*, **66**: 321–333, 1984.
- [27] KOWALCZYŃSKA H. M., NOWAK M., DOWJAT W. K., DOROSZEWSKI J., Adhesion and locomotion of L 5222 cells on endothelium, collagen and glass, *J. Cell Sci.*, **55**: 317–325, 1982.
- [28] LEWANDOWSKA K., SKIERSKI J., DOROSZEWSKI J., Influence of serum protein and

- medium composition on the dynamic adhesiveness of lymphocytes and erythrocytes, Arch. Immunol. Ther. Exp., **24**: 749–757, 1976.
- [29] WACHOLDAR E., WEIKS D., Slow motion of a fluid sphere in the vicinity of another sphere or a plane boundary, Chem. Eng. Sci., **27**: 1817–1828, 1972.
- [30] ZACHARA J., DOROSZEWSKI J., Analysis of cell suspension flow in the parallel-plate channel, Post. Fiz. Med., **13**: 115–125, 1978.

Uprzejmie dziękuję Redakcjom i Wydawnictwom Acta Physiol. Polonica, Biorheology, Cambridge Univ.Press, Neoplasma i Progass in Surface Science za zgodę na reprodukcję rycin.

Adres autora: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

Otrzymano: 15 stycznia 1986.

Przyjęto: 14 stycznia 1986.

- [1] ...
- [2] ...
- [3] ...
- [4] ...
- [5] ...
- [6] ...
- [7] ...
- [8] ...
- [9] ...
- [10] ...
- [11] ...
- [12] ...
- [13] ...
- [14] ...
- [15] ...
- [16] ...
- [17] ...
- [18] ...
- [19] ...
- [20] ...
- [21] ...
- [22] ...
- [23] ...
- [24] ...
- [25] ...
- [26] ...
- [27] ...
- [28] ...
- [29] ...
- [30] ...
- [31] ...
- [32] ...
- [33] ...
- [34] ...
- [35] ...
- [36] ...
- [37] ...
- [38] ...
- [39] ...
- [40] ...
- [41] ...
- [42] ...
- [43] ...
- [44] ...
- [45] ...
- [46] ...
- [47] ...
- [48] ...
- [49] ...
- [50] ...
- [51] ...
- [52] ...
- [53] ...
- [54] ...
- [55] ...
- [56] ...
- [57] ...
- [58] ...
- [59] ...
- [60] ...
- [61] ...
- [62] ...
- [63] ...
- [64] ...
- [65] ...
- [66] ...
- [67] ...
- [68] ...
- [69] ...
- [70] ...
- [71] ...
- [72] ...
- [73] ...
- [74] ...
- [75] ...
- [76] ...
- [77] ...
- [78] ...
- [79] ...
- [80] ...
- [81] ...
- [82] ...
- [83] ...
- [84] ...
- [85] ...
- [86] ...
- [87] ...
- [88] ...
- [89] ...
- [90] ...
- [91] ...
- [92] ...
- [93] ...
- [94] ...
- [95] ...
- [96] ...
- [97] ...
- [98] ...
- [99] ...
- [100] ...

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE I ICH NIEKTÓRE ZASTOSOWANIA

MONOCLONAL ANTIBODIES

Dariusz GÓRECKI

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna
w Warszawie

Streszczenie. Przeciwciała produkowane przez klon komórkowy noszą miano przeciwciał monoklonalnych (PM). Są one identyczne pod względem sekwencji aminokwasów oraz swoistości antygenowej. W 1975 r. Köhler i Milstein opisali metodę pozwalającą namnażać i długotrwale hodować komórki produkujące przeciwciała. Polega ona na fuzji i hybrydyzacji immunizowanych limfocytów B z komórkami szpiczaka, które zapewniają powstałej hybrydzie nieograniczony wzrost. Hybrydy selekcjonuje się pod względem produkowanych przeciwciał. Wybrane komórki są następnie namnażane, dając klon produkujący immunoglobuliny o żądanej swoistości. Alternatywną metodą otrzymywania PM jest transformowanie wirusem Epsteina-Barra limfocytów wytwarzających immunoglobuliny. PM znajdują coraz szersze zastosowanie w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Omówiono metody produkcji PM oraz wybrane zastosowania w onkologii, transplantologii, diagnostyce chorób zakaźnych i biologii błon komórkowych.

Summary. The antibodies produced by a clone of cells are called monoclonal antibodies (Mab). Mab are identical as far as amino acid sequence and antigen-binding specificity is concerned. In 1975, Köhler and Milstein described a method for the immortalization of a single antibody producing cell. This method consists in fusion of immunized B-cells with myeloma cells to yield cell hybrids, that can propagate indefinitely and continue to secrete the same immunoglobulins. The hybrids are screened for secreted antibody, and subcloned. The alternative method used to obtain monoclonal antibodies is based on the transformation of immunoglobulin-secreting lymphocytes with Epstein-Barr-virus. Monoclonal antibodies have proved to be a versatile tool in many areas of biology and medicine. In this article their production and some of their applications in oncology, transplantation, diagnosis of infectious disease and cell membrane biology are presented.

WSTĘP

Tradycyjna metoda otrzymywania przeciwciał polega na uczulaniu zwierzęcia odpowiednim antygenem i pobieraniu surowicy, z której można izolować immunoglobuliny. Otrzymany w ten sposób materiał jest jednak bardzo niejednorodny. Jest to spowodowane tym, że odpowiedź immunologiczna ustroju przeciwko danemu antygenowi jest bardzo złożona. Uzyskane przeciwciała różnią się przynależnością do klas, swoistością i powinowactwem. Różnorodność determinant antygenowych, obecnych w określonej cząsteczce antygeny, powoduje powstanie przeciwciał różniących się swoistością. Epitopy wykazują odmienną immunogenność, tzn. odpowiedź przeciwko jednym jest znacznie silniejsza niż przeciwko innym. Immunizacja np. myszy ludzkimi komórkami nowotworowymi w celu uzyskania przeciwciał przeciwko antygenom nowotworowym daje w głównej mierze immunoglobuliny przeciwko antygenom układu MHC [39, 172]. Tylko niewielka część odpowiedzi obejmuje antygeny nowotworowe. Ponadto nawet przeciwciała wiążące tę samą determinantę antygenową mogą różnić się stopniem powinowactwa. Stąd, wśród immunoglobulin otrzymanych z surowicy zwierzęcia immunizowanego określonym antygenem, tylko niewielka ich część (1-3%) jest swoista w stosunku do tego antygeny. Wyodrębnienie z takiej mieszaniny przeciwciała o ściśle określonych parametrach jest bardzo trudne. Ponadto próbka przeciwciał otrzymanych w sposób klasyczny jest po zużyciu nie do odtworzenia. Zastosowanie w identycznych warunkach tego samego antygeny do immunizacji podobnych zwierząt daje w efekcie mieszaninę przeciwciał różniących się swoimi parametrami od immunoglobulin z poprzedniej próbki.

Gdyby udało się wyizolować komórkę produkującą dane, ściśle określone przeciwciała i zmusić ją do proliferacji w hodowli, mogłaby ona lub klon z niej powstały stać się źródłem dużej liczby identycznych przeciwciał skierowanych przeciwko pojedynczej determinancie antygenowej, a więc przeciwciał monoklonalnych. Niestety, ani limfocyty, ani komórki plazmatyczne, główny producent przeciwciał, nie mogą być utrzymywane przez dłuższy czas w hodowli.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

W 1975 r. dwaj badacze Cesar Milstein i Georges Köhler przedstawili metodę wytwarzania przeciwciał monoklonalnych przez sztucznie otrzymane hybrydy: limfocyta B i komórki szpiczaka [86]. Limfocyt decyduje o swoistości produkowanego przeciwciała, a komórka szpiczaka —

nowotworowa, zapewnia nieograniczony wzrost hybrydy w hodowli *in vitro*, czy też w układzie *in vivo*. Za swe odkrycie Köhler i Milstein zostali uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny w 1984 r.

Eksperymenty z hybrydyzacją komórek przeprowadzano już na początku lat sześćdziesiątych. Technika ta była wykorzystywana m.in. do badań nad mapowaniem, ekspresją i różnicowaniem genów [182]. Przeprowadzone na początku lat siedemdziesiątych eksperymenty z hybrydyzacją komórek różnych typów szpiczaka wykazały, że hybryda produkuje cząsteczki immunoglobulin właściwe obydwu komórkom poddanym fuzji. Stwierdzono jednocześnie, że hybrydy takie mogą być namnażane i długo-otrwanie hodowane w pożywkach *in vitro* [182]. Szpiczak mnogi (siatkowiak plazmocytowy) jest nowotworem wywodzącym się z szeregu rozwojowego limfocytów B. Komórki szpiczaka produkują homogenne białko o charakterze immunoglobuliny lub fragmentu jej cząsteczki. Charakteryzują się one ponadto nieograniczonym wzrostem, właściwym komórkom nowotworowym.

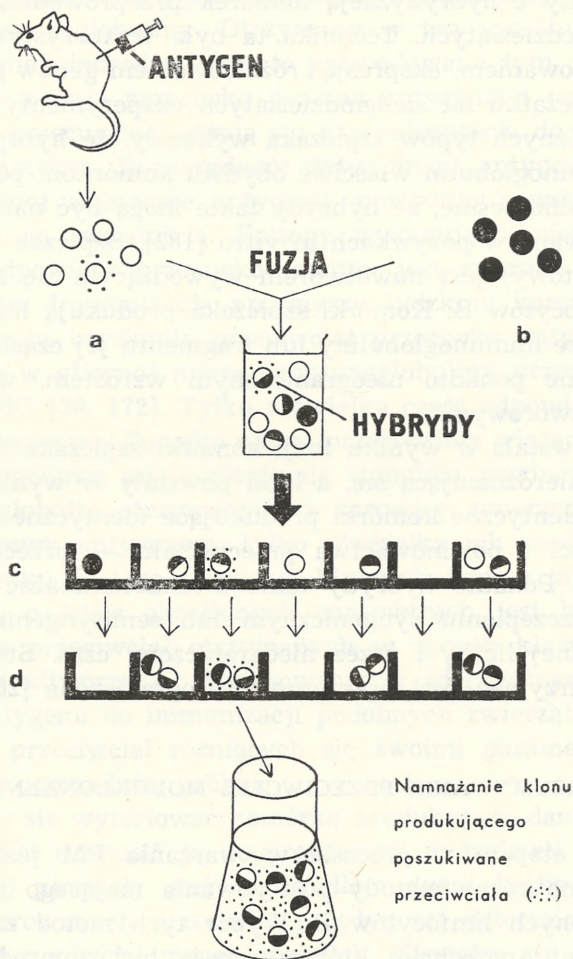
Hybryda powstała w wyniku fuzji komórki szpiczaka z limfocytym B jest komórką nieróżnicującą się, a klon powstały w wyniku jej podziałów stanowią identyczne komórki produkujące identyczne pod względem klasy, swoistości i powinowactwa przeciwciało — przeciwciało monoklonalne (PM). Ponadto hybrydy takie można namnażać *in vitro* i *in vivo* (po przeszczepieniu syngenicznym lub semisyngenicznym osobnikom) do dowolnej liczby i przez nieograniczony czas. Stąd i ilość PM, które można otrzymać, jest praktycznie nieograniczona [200, 202].

OTRZYMYWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Pierwszym etapem w procesie wytwarzania PM jest immunizacja (ryc. 1). Opisano różne metody postępowania mającego na celu otrzymanie pobudzonych limfocytów B. Wybór tych metod zależy m.in. od postaci antygeny, przeciwko któremu mają być wyprodukowane PM. Istotne jest, że antygen użyty do immunizacji nie musi być oczyszczony. Jest to jedna z zalet tej techniki, gdyż często otrzymanie antygeny w czystej postaci jest trudne. Należy dodać, że możliwa jest także produkcja PM przeciwko zupełnie niescharakteryzowanemu antygenowi.

Najczęściej stosowana procedura immunizacji całymi komórkami polega na dootrzewnowym wstrzyknięciu myszom $1-2 \cdot 10^7$ komórek. Następnie stosuje się jedną lub więcej iniekcji przypominających w odstępach 1-6-tygodniowych. Stosowane są również bardziej skomplikowane techniki, np. podawanie antygeny wielokrotnie i różnymi drogami — dootrzewnowo, podskórnym i dożylnym [115]. Ponieważ przeciwciała reagu-

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE



Ryc. 1. Schemat otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Pobudzone antygenem komórki ze śledziony immunizowanego zwierzęcia (a) poddaje się fuzji z komórkami szpiczaka (b), które wykazują defekt enzymatyczny. Otrzymuje się mieszaninę hybryd komórek śledzionowych z komórkami szpiczaka, połączonych ze sobą limfocytów, lub komórek szpiczaka i komórek, które nie uległy fuzji. Odpowiednie rozcieńczenie pozwala na otrzymanie przeciętnie jednej komórki w studzience (c). Hodowla w środowisku selektywnym eliminuje hybrydy powstałe z dwóch komórek szpiczaka lub dwóch limfocytów oraz komórki, które nie uległy fuzji (d). W płynie z nad hodowli hybryd limfocyta i komórki szpiczaka poszukuje się i analizuje przeciwciała. Wyselekcjonowane hybrydy produkujące poszukiwane PM namnażają się *in vitro* lub po przeszczepieniu syngenicznemu lub semisyngenicznemu zwierzęciu

jące z określonymi determinantami na powierzchni żywych komórek nie zawsze rozpoznają te same determinanty w utrwalonych tkankach [120], stosuje się czasami do immunizacji komórki utrwalone zamiast żywych [196]. Jest to istotne, gdy PM mają służyć do badań histologicznych.

Jak już wspomniano, w złożonych mieszaninach antygenów pewne epitopy są bardziej immunogenne od innych i w głównej mierze odpowiedź przeciwko nim jest skierowana [114]. Próbuje się maskować główne immunogeny, by ułatwić powstawanie odpowiedzi przeciwko pozostałym, np. przez ich zablokowanie przeciwciałami [83].

Poza opisaną immunizacją zwierząt *in vivo*, możliwa jest także immunizacja komórek immunologicznie kompetentnych *in vitro*, przez inkubację splenocytów z antygenem w hodowli, w obecności czynników wzrostu produkowanych przez tymocyty [70]. Immunizacja *in vitro* jest szczególnie cenna w stosunku do słabych antygenów oraz antygenów, które *in vivo* wywołują tolerancję immunologiczną, lub przeciwko którym odpowiedź podlega supresji. Istotne jest, że do immunizacji *in vitro* wystarczające są minimalne, nawet pikomolowe ilości antygeny [102]. Inną korzyścią jest skrócenie czasu immunizacji do około 5 dni. Większość (około 80%) PM uzyskanych w ten sposób stanowią immunoglobuliny klasy IgM [128].

Pobudzone antygenem komórki ze śledziony immunizowanego zwierzęcia (lub z hodowli *in vitro*) poddaje się fuzji z komórkami szpiczaka. Jednakże nawet po hiperimmunizacji, tylko niewielka część splenocytów jest rzeczywiście pobudzona i wytwarza przeciwciała (około 50%), z których tylko 25% stanowią immunoglobuliny o poszukiwanej swoistości [86]. Chociaż komórki aktywowane łatwiej podlegają fuzji niż pozostałe splenocyty [60], to jednak w większości doświadczeń wykazano, że tylko około 0-2% hybryd produkuje przeciwciała o żądanej swoistości [115, 145]. Dlatego stosowane są metody zwiększające liczbę hybryd o poszukiwanych właściwościach. Próbowano m.in. pokrywać komórki szpiczaka antygenem, by ułatwić ich fuzję z uczulonymi na dany antygen limfocytami [5]. Przeszczepienie komórek uczulonego zwierzęcia syngenicznemu, subletalnie napromieniowanemu biorcy, który następnie otrzymuje iniekcję przypominającą także zwiększa ilość pozytywnych hybryd [53]. Inną metodą jest inkubacja komórek immunizowanego zwierzęcia z antygenem *in vitro*, a następnie poddanie ich fuzji [53].

Aby doprowadzić do fuzji, mieszaninę komórek szpiczaka i limfocytów B traktuje się czynnikami sprzyjającymi fuzji. Należą do nich np. wirusy Sendai z grupy myksowirusów. Zastosowanie tego wirusa daje głównie hybrydy produkujące immunoglobuliny klasy IgM [47], być może wydzielające IgG limfocyty mają mniejszą liczbę receptorów dla tego wirusa. Do przyspieszenia fuzji stosuje się również związki che-

miczne, takie jak lizolecytyna i glikol polietylenowy [57, 58]. Zwłaszcza ta ostatnia substancja jest szeroko wykorzystywana, chociaż jej zdolność do wywoływania fuzji waha się w zależności od ciężaru cząsteczkowego, stężenia, temperatury i czasu trwania inkubacji oraz obecności innych substancji w środowisku. Istotny bywa nawet producent [47].

Przeciętnie do hybrydyzacji stosuje się komórki w proporcji limfocyt: szpiczak 5-10 : 1, np. 10^8 komórek śledzionowych do $1-2 \cdot 10^7$ komórek szpiczaka [124]. Proces fuzji, pomimo korzystnej preferencji opisanej już tu, przebiega praktycznie w sposób losowy, stąd możliwe jest połączenie zarówno limfocyta z komórką szpiczaka, jak i dwóch lub więcej limfocytów lub komórek szpiczaka ze sobą. Ponadto część komórek w ogóle nie ulega fuzji. Do hybrydyzacji najlepiej używać komórek szpiczaka, które wykazują defekt enzymatyczny, umożliwiający wyeliminowanie komórek, które nie uległy hybrydyzacji w medium selektywnym. Defekt ten, w najczęściej stosowanych liniach szpiczaka, dotyczy enzymów: HPRT — transferazy hipoksantynofosforybozyłowej lub TK — kinazy tymidynowej. Komórki takie nie są zdolne do wbudowywania egzogennej hipoksantyny lub tymidyny. Zablockowanie endogennej syntezy prekursorów DNA aminopteryną doprowadza do śmierci komórek, nawet w obecności hipoksantyny i tymidyny w środowisku hodowlanym. Po hybrydyzacji komórki rozcieńcza się w taki sposób, by po przeniesieniu na płytkę otrzymać przeciętnie jedną zdolną do wzrostu komórkę w studzience. Kolejny etap stanowi hodowla tych komórek w środowisku selektywnym HAT (zawierającym hipoksantynę, aminopterynę i tymidynę) przez 10 - 14 dni. Komórki szpiczaka, które nie uległy hybrydyzacji oraz hybrydy z samych komórek szpiczaka giną. Przeżywają tylko hybrydy komórek szpiczaka i limfocyta, gdyż ten ostatni ma sprawny układ enzymatyczny, obejmujący enzymy HPRT i TK. Limfocyty, które nie uległy fuzji, giną spontanicznie, gdyż nie są zdolne do życia w warunkach in vitro, jeśli nie doda się do środowiska czynnika pobudzającego ich wzrost, tzn. interleukiny 2 [100].

14-30 dni po fuzji w płynie znad hodowli poszukuje się i analizuje przeciwciała. Z tego względu do hybrydyzacji najlepiej nadają się komórki szpiczaka nie tylko szybko wzrastające, zdolne do fuzji i z defektem umożliwiającym ich eliminację, ale także nie produkujące własnych immunoglobulin lub wytwarzające najwyżej pojedyncze łańcuchy polipeptydowe.

Jednym z poważnych problemów jest fakt, iż hybrydy produkujące PM są niestabilne, tzn. mogą one „gubić” chromosomy z genami kodującymi określone przeciwciało i przerastać hodowlę pożądaných hybryd, powodując jej zniszczenie. Opisano metodę eliminacji hybryd, które utraciły zdolność do produkcji przeciwciał. Mechanizm tej selekcji opiera się

na translokacji genu dla fosforybozylotransferazy adeninowej na chromosom zawierający gen dla ciężkiego łańcucha immunoglobuliny w limfocytach użytych do fuzji. Hybrydy powstałe z takich limfocytów wraz z utratą genu kodującego przeciwciało tracą zdolność do wzrostu w środowisku selektywnym, stąd taki klon jest stabilny pod względem produkcji przeciwciał [167].

Badania przeciwciał produkowanych przez hybrydy przeprowadza się najczęściej w płynie z nad hodowli, rzadziej bada się immunoglobuliny powierzchniowe [129]. Analiza przeciwciał jest etapem decydującym i trudnym. Pierwszy problem stanowi konieczność wykonania wielu oznaczeń [59, 115]. Kolejny, to wzrost hodowli. W próbach pobranych zbyt wcześnie ilość przeciwciał może być zbyt mała, natomiast przerośnięcie hodowli kończy się jej śmiercią. Metody stosowane w tego rodzaju oznaczeniach muszą być szybkie, proste i do zastosowania dla wielu prób, wykazujące jednocześnie przydatność przeciwciała w zamierzonych doświadczeniach. Najczęściej stosowanymi są: do oznaczeń przeciwciał przeciwko antygenowi scharakteryzowanemu i oczyszczonemu — test radioimmunologiczny (ang. radioimmunoassay) i enzymoimmunologiczny (enzyme-linked immunoassay) [123, 125]. Do oznaczeń przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi niescharakteryzowanemu, np. antygeny komórek nowotworowych, stosuje się test wiązania z całą komórką (ang. wholecell binding assay) i metody immunohistologiczne [120, 146, 165, 195].

Efektem często żmudnego etapu analizy nadsączów jest wyselekcjonowanie hybryd produkujących poszukiwane przeciwciała. Potrzebne ilości PM otrzymuje się przez namnożenie klonu w hodowli komórkowej w środowisku płynnym, półpłynnym (agar, agaroz, metyloceluloza) [60, 122] lub przez wszczepienie syngenicznym myszom, co powoduje wzrost hybryd w postaci guza. Produkcja w hodowli pozwala otrzymać przeciwciała monoklonalne nie zanieczyszczone innymi immunoglobulinami, zwłaszcza jeśli używa się środowiska bez dodatku surowicy [26, 46, 117]. Stosując ten sposób można uzyskać od 0,6 do 43-43,5 mg immunoglobuliny/dzień z 500 ml hodowli z około 10^6 komórek/ml. Znacznie większe ilości przeciwciał uzyskuje się z guzów powstałych po wstrzyknięciu hybryd syngenicznym zwierzętom. Iniekcja podskórna powoduje powstanie litego guza, a przeciwciała są uwalniane do surowicy. Wprowadzenie dootrzewnowe daje guz wysiękowy produkujący dużą ilość przeciwciał wydzielanych do otrzewnej. Ilość immunoglobulin uzyskiwanych w ten sposób waha się w granicach 1-10 mg/ml, jednakże na tę ilość składają się także inne białka obecne w surowicy zwierzęcia, w tym również jego własne przeciwciała. W pewnych warunkach płyn wysiękowy może być wykorzystywany bez oczyszczania zawartych w nim

przeciwciał. Jednak do łączenia ze znacznikami lub toksynami bądź stosowania u ludzi, konieczne jest oczyszczenie tak otrzymanych PM.

LUZKIE PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Większość otrzymanych dotychczas PM stanowią przeciwciała mysie. Zastosowanie ksenogenicznych immunoglobulin, zwłaszcza w klinice, jest z wielu względów niekorzystne. Obcogatunkowe białka indukują odpowiedź immunologiczną [138, 149]. Powoduje ona zarówno szybką inaktywację przeciwciał, co utrudnia wywarcie spodziewanego efektu [138, 149, 150], jak i może być niebezpieczna dla człowieka. Jednocześnie można się spodziewać, że odpowiedź immunologiczna organizmu ludzkiego przeciwko pewnym antygenom będzie szersza, np. wspomniana już immunizacja komórkami nowotworowymi, w czasie której mysz wytwarza głównie przeciwciała anty MHC. PM ludzkie powinny łatwiej rozpoznawać pewne dyskretne różnice antygenowe. Niestety, ich produkcja natrafia na trudności. Hybrydy ludzkich limfocytów z komórkami mysiego szpiczaka są bardzo niestabilne. W trakcie kolejnych podziałów „gubią” one ludzkie chromosomy i tym samym przestają produkować kodowane przez nie przeciwciała [113]. Główną przeszkodą utrudniającą otrzymywanie hybryd ludzkich limfocytów z komórkami szpiczaka, pochodzącymi od człowieka, jest brak odpowiednich linii komórek ludzkiego szpiczaka.

Jak wiadomo, do fuzji nadają się najlepiej linie, które charakteryzują się takimi cechami jak: nieprodukowanie własnych immunoglobulin, defekty enzymatyczne, umożliwiające eliminację komórek, które nie uległy hybrydyzacji, i wreszcie stabilny wzrost. Pierwsze doniesienia o otrzymaniu ludzkich hybryd produkujących PM pochodzą z 1980 r. [125]. Od tej pory badacze donosili o uzyskaniu ludzkich komórek szpiczaka nadających się do hybrydyzacji [32], jednak żadna z obecnie znanych linii nie wykazuje zdecydowanie lepszych własności, niż pozostałe linie. Nie udało się np. otrzymać takiej, która nie produkowałaby immunoglobulin.

Pewne problemy nastęrcza także uzyskanie odpowiednio immunizowanych ludzkich limfocytów. Poszukiwano ich m.in. w krwi obwodowej [41], węzłach chłonnych regionalnych, tzn. drenujących okolice guza [59, 155]. Wykorzystywano limfocyty naciekające nowotwór [156] oraz komórki z migdałków [24] i śledziony [125]. Immunizacja ludzkich limfocytów *in vitro* nie jest efektywna, jeśli dotyczy komórek, które nigdy nie stykały się z antygenem [90]. Natomiast dobre efekty uzyskiwano stosując niespecyficzną stymulację komórek od uczulonych osobników [153] lub powtórną immunizację *in vitro* limfocytów od uczulonych dawców [90, 126].

ALTERNATYWNA METODA WYTWARZANIA PRZECIWCIAŁ
MONOKLONALNYCH

Metoda produkcji PM przez hybrydy limfocyty i komórki szpiczaka nie jest jedyną obecnie stosowaną, zwłaszcza jeśli chodzi o ludzkie PM. Obserwacje, iż supernatant z hodowli komórkowej, zawierający cząstki wirusa Epsteina-Barra (EB), może transformować ludzkie limfocyty [108], zasugerowały możliwość stworzenia nowej metody wytwarzania PM [104, 161]. Stosowane są dwie techniki. Jedna polega na wyselekcjonowaniu limfocytów odpowiadających na określony antygen poprzez badanie ich immunoglobulin powierzchniowych. Wybrane komórki transformowane są wirusem EB [160, 161]. Można w ten sposób wybrać klasę produkowanych przeciwciał. Nie jest jednak wyjaśnione, jakie są relacje między ilością immunoglobulin powierzchniowych, a ilością immunoglobulin wydzielanych. Dlatego inną metodą jest transformacja wszystkich limfocytów B otrzymanych po immunizacji, a następnie klonowanie i analiza przeciwciał w supernatantach [141]. W chwili obecnej transformacja limfocytów B w celu otrzymania PM nie jest stosowana szeroko, gdyż produkcja immunoglobulin nie jest zbyt stabilna, a ilość otrzymywana tą metodą jest niewielka.

Jedną z prób ulepszenia tej metody było zastosowanie kombinacji: transformacji wirusem EB i następującej po niej hybrydyzacji z komórkami ludzkiego szpiczaka. Otrzymana hybryda produkowała 6-8 razy więcej przeciwciał niż użyty do hybrydyzacji, transformowany limfocyt B i była bardziej stabilna [91].

IMMUNODIAGNOSTYKA I IMMUNOTERAPIA CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

ZASTOSOWANIA DIAGNOSTYCZNE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Problemem, z którym wciąż boryka się onkologia, jest wykrywanie w początkowym stadium pierwotnych ognisk oraz wczesne wykrywanie bardzo małych przerzutów różnych nowotworów. Dotychczas opracowane metody mogą, i to nie zawsze w stopniu zadowalającym, służyć do poszukiwania przerzutów lub ognisk pierwotnych, które spowodowały już jakieś objawy kliniczne. Oczywiście idealną z punktu widzenia pacjenta i lekarza sytuacją byłoby opracowanie takich metod, które pozwalałyby wykrywać ogniska pierwotne tak małe, że nie wywołujące jeszcze żadnych objawów klinicznych. Wiadomo, że pewne grupy ludzi są szczególnie narażone na częstsze występowanie niektórych nowotworów trudno wykrywalnych we wczesnym stadium, np. raki płuc u palaczy tyto-

niu. Te grupy podwyższonego ryzyka, w przypadku opracowania odpowiednich metod diagnostycznych, mogłyby podlegać badaniu w pierwszym rzędzie.

ANTYGENY NOWOTWOROWE

U wielu osobników z rozwijającym się nowotworem stwierdza się reaktywność immunologiczną przeciwko autogenicznym komórkom nowotworowym. Reaktywność ta świadczy m.in. o istnieniu antygenów nowotworowych, które są rozpoznawane przez układ odpornościowy chorego. Ze względu na swoje podstawowe znaczenie dla immunodiagnostyki i immunoterapii nowotworów, antygeny te wymagają szerszego omówienia. Okazuje się, że wśród antygenów nowotworowych tylko niewielką część stanowią antygeny występujące wyłącznie na komórkach nowotworowych, a nieobecne na komórkach prawidłowych — swoiste antygeny nowotworowe (TSA, z ang. tumor specific antigens).

Udowodnienie, że dany antygen jest specyficzny dla komórek nowotworowych jest trudne. Wymaga zarówno wykazania jego immunogenności, jak również bezwzględnego niewystępowania na komórkach normalnych. Wielokrotnie pierwsze doniesienia o wykryciu specyficznego antygenu nowotworowego, po przeprowadzeniu wielu dalszych prób, były korygowane, gdyż okazywało się, że antygen występuje także, choć w mniejszym stopniu, na pewnych komórkach normalnych. Takie były m.in. koleje antygeny Ca, wykrytego za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Pierwotnie został on opisany jako występujący na większości komórek nowotworowych, bez względu na pochodzenie histologiczne nowotworów, tj. antygen ogólnonowotworowy. Pierwsze doniesienia mówiły, że nie występuje on na komórkach normalnych [2, 106, 198]. Jednakże dalsze badania w innych laboratoriach wykazały, że nie jest on rzeczywiście tak swoisty jak przypuszczano [18, 92, 127, 157]. Dlatego obecnie większość antygenów określa się, ostrożniej, mianem antygenów związanych z nowotworem lub też towarzyszących nowotworom TAA (z ang. tumor associated antigens). W tej dziedzinie zastosowanie PM może wykraczać poza rozpoznawanie już opisanych antygenów. Jak podano, można produkować PM przeciwko zupełnie nieznanym markerom. Można w ten sposób poszukiwać nowych antygenów, bardziej swoistych dla tkanek nowotworowych niż już poznane. Jednocześnie PM, rozpoznając pojedyncze epitopy, mogą służyć do identyfikowania poszczególnych determinant TAA i wyszukiwania najbardziej specyficznych dla guza.

Opisano wiele przeciwciał monoklonalnych reagujących z antygenami komórek różnego typu nowotworów, a jednocześnie mających bardzo

małe powinowactwo do odpowiednich komórek normalnych lub nie wykazujących w ogóle takiego powinowactwa. Stwierdzono m.in. TAA na komórkach takich nowotworów jak: raki jelita grubego [88, 89, 101], sutka [17, 52, 141], płuc [33, 115], gruczołu krokowego [185, 188], czerniak złośliwy [23, 39, 95, 164], nerwiak zarodkowy [77, 83], gwiazdziak [19], glejak [156], rak wątroby [174], trzustki [107], macicy [59], jajnika [7], guz Wilmsa [59], mięsakomięśniak gładkokomórkowy [37] i kostniakomięsak [42].

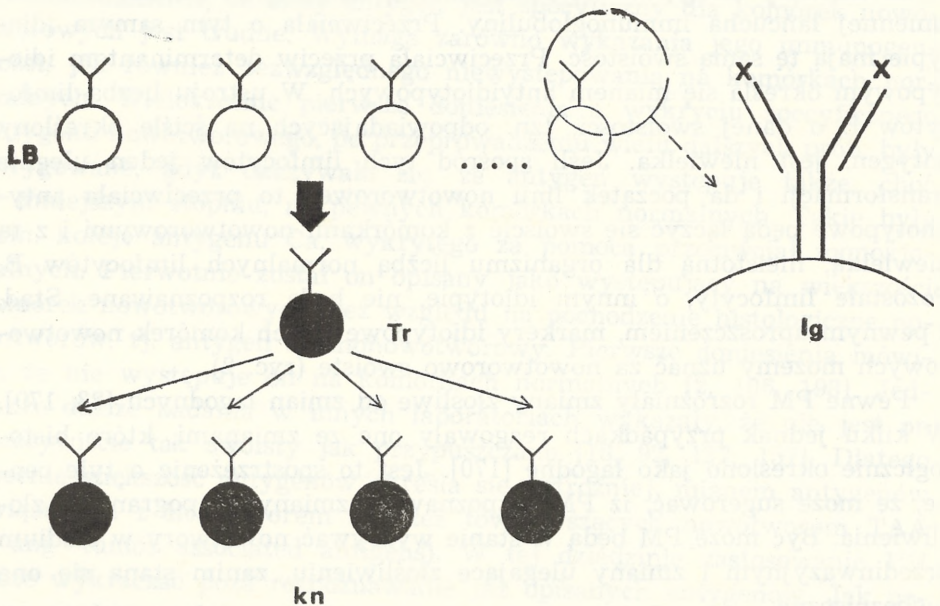
Wykryto również i opisano TAA komórek nowotworów krwi, m.in. białaczek [4, 98, 137, 203] i chłoniaków [118, 192, 203]. Komórki nowotworów wywodzących się z limfocytów B z pewnego względu wzbudzają szczególne zainteresowanie. Wywodzą się one najczęściej z jednego klonu komórkowego, tzn. jedna komórka transformując daje początek całej linii nowotworowej. Wszystkie komórki są identyczne, a także ich immunoglobuliny powierzchniowe charakteryzują się swoistym i takim samym dla wszystkich komórek danego nowotworu markerem idiotypowym. Markery idiotypowe to determinanty antygenowe obecne w części zmiennej łańcucha immunoglobuliny. Przeciwciała o tym samym idiotypie mają tę samą swoistość. Przeciwciała przeciw determinantom idiotypowym określa się mianem antyidiotypowych. W ustroju liczba limfocytów B o danej swoistości, tzn. odpowiadających na ściśle określony antygen, jest niewielka. Jeśli spośród tych limfocytów jeden ulegnie transformacji i da początek linii nowotworowej, to przeciwciała antyidiotypowe będą łączyć się swoicie z komórkami nowotworowymi i z tą niewielką, nieistotną dla organizmu liczbą normalnych limfocytów B. Pozostałe limfocyty, o innym idiotypie, nie będą rozpoznawane. Stąd, z pewnym uproszczeniem, markery idiotypowe takich komórek nowotworowych możemy uznać za nowotworowo swoiste (ryc. 2).

Pewne PM rozróżniały zmiany złośliwe od zmian łagodnych [23, 170]. W kilku jednak przypadkach reagowały one ze zmianami, które histologicznie określono jako łagodne [170]. Jest to spostrzeżenie o tyle cenne, że może sugerować, iż PM rozpoznawały zmiany na pograniczu złośliwienia. Być może PM będą w stanie wykrywać nowotwory w stadium przedinwazyjnym i zmiany ulegające złośliwieniu, zanim staną się one niebezpieczne.

Pewne TAA wykrywane są w surowicy pacjentów. Mogą one służyć do wczesnej diagnozy np. w grupach podwyższonego ryzyka, jak również dla celów rokowniczych i do monitorowania postępów choroby oraz wyników postępowania leczniczego. Do najbardziej znanych i wykorzystywanych antygenów tego rodzaju należy: α -fetoproteina (AFP), charakterystyczna dla nowotworów wątroby, która znalazła zastosowanie w badaniach w kierunku hepatoma u pacjentów z marskością wątroby [96].

Innym markerem serologicznym jest antygen rakowo-zarodkowy CEA (z ang. carcinoembryonic antigen), którego stężenie koreluje ze stopniem rozwoju i masą guza i z tego względu służy on do monitorowania skuteczności leczenia raków jelita grubego [61]. Podobne zastosowanie może mieć antygen o charakterze glikolipidu, pojawiający się w surowicy pacjentów z rakami jelita grubego, żołądka i trzustki [73, 88, 148]. Doniesienia opisujące oddzielanie się pewnych antygenów nowotworowych od powierzchni komórki i przechodzenie do medium hodowlanego [163] sugerują, że i inne TAA mogą być w ten sposób uwalniane do krwiobiegu i mogłyby być wykorzystywane jako markery serologiczne procesu chorobowego.

W pewnych sytuacjach w diagnostyce nowotworów mogą znaleźć zastosowanie markery swoiste dla prawidłowych tkanek lub pojedynczych



Ryc. 2. Markery idiotypowe immunoglobulin powierzchniowych obecnych na komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B jako antygeny nowotworowe. Z klonu limfocytów B (LB), którego immunoglobuliny powierzchniowe (Ig) mają ten sam marker idiotypowy (X), jedna z komórek może ulec transformacji nowotworowej (Tr). W efekcie powstaje klon komórek nowotworowych (kn), którego immunoglobuliny powierzchniowe charakteryzują się tym samym wyjściowym idiotypem. Przeciwciała monoklonalne antyidiotypowe rozpoznają komórki nowotworowe i niewielką, nieistotną dla organizmu liczbę normalnych limfocytów B o tym samym idiotypie

linii komórkowych, również występujące na komórkach nowotworowych. Mogą być one wykorzystywane w różny sposób, np. do poszukiwania przerzutów nowotworowych w innych tkankach krwi lub szpiku [36, 77]. wysięku surowicznym [43] itd., gdzie wczesna diagnoza jest często warunkiem sukcesu terapeutycznego. Antygeny grupowe krwi oraz antygeny głównego układu zgodności tkankowej MHC (z ang. major histocompatibility complex) mogą służyć do oceny stopnia złośliwości nowotworu. Stwierdzono, iż w pewnych guzach jelita grubego ekspresja tych antygenów zmniejsza się [14, 48] lub zwiększa [142, 172] w miarę wzrostu stopnia złośliwości.

Fakt, iż większość antygenów nowotworowych stanowią TAA, a nie TSA, utrudnia wykorzystywanie odpowiednich PM. Jednakże w porównaniu z konwencjonalnymi surowicami PM wniosły ogromny postęp i praktycznie wypierają je z użycia. Oprócz opisanego już wykrywania antygenów nowotworowych obecnych w surowicy, PM znajdują zastosowanie w dwóch innych dziedzinach diagnostycznych: immunohistopatologii i lokalizacji nowotworów przy użyciu badań scyntygraficznych.

RADIOLOKALIZACJA NOWOTWORÓW

Pochodzenie guza nie zawsze jest łatwe do ustalenia wyłącznie na podstawie obrazu histologicznego. W takich przypadkach bardzo pomocne są metody immunohistochemiczne [205]. Polegają one na użyciu specyficznych przeciwciał połączonych z odpowiednimi znacznikami (fluorochromy, ferrytyna, izotopy) lub częściej swoistego przeciwciała, a następnie antyimmunoglobuliny połączonej ze znacznikiem (metoda pośrednia). Uwidaczniają się odpowiednie komórki czy tkanki nowotworowe. W badaniach tych można wykorzystywać PM przeciwko odpowiednim TAA, rozróżniając komórki nowotworowe od normalnych. Stosuje się również PM reagujące z markerami normalnych komórek bądź tkanek. Przeciwciała takie mogą służyć do rozpoznawania tkanek lub linii komórkowych, z których wywodzą się różne morfologicznie podobne guzy [130], do analizowania stopnia zróżnicowania nowotworu [63] oraz do wykrywania przerzutów nowotworowych w miejscach odległych [51]. Jak już wspomniano, PM przeciwko antygenom w stanie natywnym mogą nie wykazywać powinowactwa do tych samych antygenów w utrwalonych skrawkach histologicznych [54, 66, 121].

RADIOLOKALIZACJA NOWOTWORÓW

PM mogą być wykorzystywane w diagnostyce nowotworów do lokalizacji zmian w ustroju pacjenta. Przeciwciało połączone ze znacznikiem promieniotwórczym, po wprowadzeniu do krwiobiegu, łączy się specyficznie z antygenem na powierzchni komórki nowotworowej. Emitowa-

ne promieniowanie wykrywane jest za pomocą odpowiednich detektorów, umożliwiając lokalizację i określając przybliżone rozmiary zmiany. Wydaje się, iż w tego rodzaju badaniach wykorzystać można przeciwciała przeciwko antygenom występującym w większej liczbie na komórkach nowotworowych niż na pozostałych, tzn. brak zupełnej swoistości nie jest przeszkodą. Jednakże użycie PM o większej swoistości daje lepsze rezultaty. Uwidocznienie nowotworu zależy od szybkości usuwania znakowanego PM z krwiobiegu i tkanek prawidłowych oraz szybkości łączenia przeciwciała z antygenem, tempa endocytozy, czy ogólniej czasu przebywania na powierzchni komórki znakowanego PM. Istotny jest również rodzaj samego guza, jego anatomia i unaczynienie. Wiele danych o radiolokalizacji nowotworów dostarczyły badania na zwierzętach [75, 97].

Radiolokalizacja za pomocą znakowanych PM przeciwko TAA jest stosunkowo szybka. Najlepsze obrazy uzyskuje się kilka minut do 24 godz. po wstrzyknięciu. Związane z antygenem immunoglobuliny są w większości przypadków internalizowane przez komórkę nowotworową. Klasa użytego PM nie wpływa na znakowanie i jakość obrazu, ma natomiast wpływ na okres półtrwania we krwi $t_{1/2}$. Użycie znakowanych PM daje kilkakrotnie lepsze wyniki niż zastosowanie konwencjonalnych surowic. Zwiększa się wyznakowanie docelowej tkanki przy jednoczesnym zmniejszeniu tła naczyniowego [72, 116].

Jeszcze doskonalszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie samego fragmentu $F(ab)_2$ przeciwciała. Obraz otrzymywany jest szybciej, a równocześnie zmniejsza się tło i ekspozycja pacjenta na promieniowanie, gdyż fragment ten jest szybko wydalany z ustroju [183].

Z zastosowaniami klinicznymi związany jest problem immunogenności ksenogenicznych przeciwciał. Nie obserwowano objawów toksycznych, jednak powstające w ustroju przeciwciała przeciwko mysim PM [45] dramatycznie skracają $t_{1/2}$ użytego znacznika, zmniejszając jego wychwytywanie przez tkanki nowotworowe [95]. Radiolokalizację stosowano m.in. do wykrywania przerzutów raka jelita grubego [158], czerniaka złośliwego [95], raków jajnika i żołądka [44] oraz sutka [44, 158].

Zmiany, które mogą być wykrywane przy użyciu znakowanych PM nie są jeszcze uchwytne przy zastosowaniu ultrasonografii i badań radiologicznych [44], m.in. wykrywano w 88% przerzuty czerniaka większe niż 1,5 cm [95].

ZASTOSOWANIA TERAPEUTYCZNE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Terapia nowotworów za pomocą PM jest metodą nową, której przydatność nie została jeszcze jednoznacznie określona. Pewne kwestie można już jednak uznać za rozwiązane.

Terapeutyczny efekt PM opiera się na trzech podstawowych mechanizmach: cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał — ADCC (z ang. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), aktywacji dopełniacza i opsonizacji komórek nowotworowych. Połączenie przeciwciała z antygenem na powierzchni błony komórkowej może inicjować ciąg reakcji prowadzących do lizy komórki. Może do tego dojść na drodze przyłączenia komórek aktywnych w procesie ADCC do fragmentu Fc PM [71]. Inną ewentualnością jest aktywacja układu dopełniacza, prowadząca do powstania kompleksu atakującego błonę i lizy komórki [154]. Trzeci mechanizm — opsonizacja — przyspiesza i nasila usuwanie pokrytych przeciwciałami komórek nowotworowych przez układ makrofagów [132]. Obok wykorzystywania naturalnych właściwości PM, dla skutecznego niszczenia komórek nowotworowych dokonywane są próby łączenia przeciwciał z lekami i toksynami — wolnymi lub zamkniętymi w liposomach, oraz substancjami modulującymi odpowiedź immunologiczną, np. interferonem [3].

TERAPEUTYCZNE ZASTOSOWANIE PM POZA USTROJEM

Jedną z form terapii białaczek są przeszczepy szpiku autogenicznego lub allogenicznego. Chory otrzymuje supraletalną dawkę chemio- lub radioterapii, która niszczy komórki nowotworowe, ale jednocześnie powoduje uszkodzenie szpiku, śmiertelne dla pacjenta, gdyby nie otrzymał przeszczepu. W przypadku przeszczepu autogenicznego jest to własny szpik chorego, pobrany w fazie remisji choroby i przechowywany do czasu przeszczepu. Źródłem szpiku allogenicznego są dobrani pod względem antygenów układu HLA dawcy, najczęściej rodzinni. Szpik pacjenta pobrany w fazie remisji białaczki zawiera najczęściej pewną liczbę komórek nowotworowych.

W szpiku pacjentów z pewnymi guzami litymi, u których również próbowano stosować tę metodę terapii, również mogą znajdować się komórki nowotworowe z przerzutów [36]. Po przeszczepieniu szpiku, komórki takie stają się źródłem wznowy procesu chorobowego. Małe przerzuty nowotworu są w szpiku trudne do wykrycia, natomiast komórki białczkowe w ogóle nie są wykrywalne na podstawie standardowych kryteriów morfologicznych [34, 74]. PM umożliwiają nie tylko wykrywanie, ale przede wszystkim eliminację ze szpiku komórek nowotworowych przed przetoczeniem. Proces niszczenia komórek nowotworowych *in vitro* przez PM wymaga dodania ksenogenicznego dopełniacza (najczęściej króliczego). Ludzki dopełniacz nie jest wystarczająco aktywny [8]. Opisano stosowanie tego rodzaju metody w przypadku: białaczek [8, 139], nowotworów wywodzących się z limfocytów T [79], chłoniaków

nie-Hodgkinowskich [9] oraz raków sutka i pęcherza moczowego [16]. Bardzo istotne jest, aby w trakcie niszczenia komórek nowotworowych nie uległy uszkodzeniu komórki macierzyste szpiku. Istnieje jeszcze zbyt mało danych o skuteczności takiej terapii i jej efektach odległych, by wyciągać ostateczne wnioski. Opisywane 20-miesięczne i dłuższe okresy przeżycia bez objawów wznowy [9, 139] pozwalają przypuszczać, że metoda ta znajdzie zastosowanie.

Tylko część PM zdolnych do rozpoznawania komórek nowotworowych ma właściwości aktywowania dopełniacza. Z tego powodu poszukuje się innych możliwości usuwania takich komórek ze szpiku. PM sprzęga się z toksynami, by otrzymać immunotoksyny [201]. Inną ciekawą metodą jest łączenie PM z substancjami o właściwościach magnetycznych. Umożliwia to usuwanie komórek nowotworowych metodami fizycznymi, redukując jednocześnie problem ewentualnej toksyczności w stosunku do komórek macierzystych szpiku. Zastosowano tę metodę z dobrym skutkiem klinicznym w przypadku białaczki [131]. Obserwowano szybkie podjęcie funkcji przeszczepionego szpiku. Wykorzystując tę samą procedurę z zastosowaniem sześciu specyficznych PM przeciwko neuroblastoma, usunięto 97-99% komórek nowotworowych, bez uszkodzenia komórek szpiku [81]. Uzyskano 100% podjęcie funkcji przez przeszczep.

Aczkolwiek pierwsze wyniki usuwania komórek nowotworowych ze szpiku metodami fizycznymi są obiecujące, jednak brak jeszcze obiektywnych danych o odległych wynikach takiej terapii. Nie można również dokonywać porównań z innymi metodami.

Terapeutyczny efekt allogenicznego przeszczepu szpiku, znajdującego zastosowanie najczęściej u pacjentów z białaczką, jest zmniejszany przez chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi — GVHD (z ang. graft versus host disease). Mimo starannego doboru dawców pod względem antygenów transplantacyjnych, proces ten występuje w ponad 50% przypadków. Ostra choroba GVH, objawiająca się przeważnie plamisto-grudkową wysypką, zapaleniem wątroby i silną biegunką oraz opóźnieniem podejmowania funkcji przez szpik, w około 25% przypadków kończy się śmiercią pacjenta [133]. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za reakcję GVH, zapoczątkowującą GVHD, są immunokompetentne limfocyty T, zawarte w przeszczepionym szpiku, które rozpoznają obcość antygenową gospodarza i inicjują skierowaną przeciwko niemu odpowiedź immunologiczną. Zastosowanie przeciwciał, w tym zwłaszcza PM, rozpoznających limfocyty T, powinno zapobiegać reakcji GVH [69]. Próbowano m.in. wykorzystywać globulinę antytymocytarną *in vivo* do eliminacji krążących limfocytów T [140]. Jednak metodą z wyboru jest traktowanie szpiku przed przeszczepieniem PM anty-T *in vitro*. Możliwa jest

wtedy kontrola efektywności działania i dobór optymalnych warunków. Równocześnie unika się problemów związanych z zastosowaniem PM *in vivo*, co zostanie tu opisane. Jedną z możliwości jest opsonizacja limfocytów T przeciwciałami monoklonalnymi *in vitro*. Następnie przeszczepia się cały szpik, włącznie z opsonizowanymi komórkami, które są powoli usuwane przez układ makrofagów [132].

Metodą znacznie bardziej efektywną jest niszczenie limfocytów T *in vitro* przy użyciu PM i dopełniacza (ksenogenicznego — najczęściej króliczego). W jednym przypadku stwierdzono, iż podejmowanie funkcji przez przeszczep było wolniejsze niż przy zastosowaniu innych form zapobiegania GVHD [133]. Doniesienie to przeczy obserwacjom sugerującym, że usunięcie limfocytów T przy użyciu PM i dopełniacza nie tylko nie zmniejsza, ale podwyższa liczbę komórek wytwarzających kolonie (ang. stem cells forming colonies) *in vitro* [152]. Interesujące wyniki otrzymano stosując szczurze PM do niszczenia limfocytów T w szpiku. Przeciwciało to, o symbolu CAMPATH-1, powodowało w ponad 99% lizę komórek w obecności ludzkiego, a nie ksenogenicznego dopełniacza. Przeszczepy tak przygotowanego szpiku otrzymało 11 pacjentów z różnymi śmiertelnymi schorzeniami hematologicznymi (białaczki limfatyczne i szpikowe w kolejnych remisjach, anemia aplastyczna, osteopetroza, talasemia). U żadnego z pacjentów nie stwierdzono objawów GVHD. Podjęcie funkcji przez przeszczep było w tym przypadku szybkie. 6 spośród 11 pacjentów było zdrowych od 110 do 360 dni po przeszczepie [184].

Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że niszczenie limfocytów T w szpiku, przed przeszczepieniem przy użyciu PM i dopełniacza, jest metodą skuteczną (około 99% wartości wyjściowych). Takie przygotowanie allogenicznego szpiku w znacznym stopniu lub nawet całkowicie zapobiega wystąpieniu reakcji GVH. Allogeniczny przeszczep szpiku ma szansę stać się jedną ze skuteczniejszych metod terapii białaczek. Jest to również, w obecnej chwili, jedyna metoda leczenia nienowotworowych, śmiertelnych schorzeń hematologicznych. Jednakże wymagają zbadania kwestie odległych wyników takiej terapii, zwłaszcza możliwości późnych powikłań lub niedoborów immunologicznych.

ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH *IN VIVO*

Bierna immunoterapia nowotworów, oparta na podawaniu PM, może obniżać liczbę komórek nowotworowych w wyniku opisanych już uprzednio mechanizmów: ADCC, aktywacji dopełniacza i opsonizacji. Jednak wzajemne relacje tych reakcji nie są znane. Efektywność działania PM *in*

vitro przewyższa efektywność tych samych przeciwciał *in vivo*. Pewne PM o sprawdzonych *in vitro* własnościach wiązania dopełniacza i wywoływania lizy nie działało *in vivo*, mimo iż wykazano, że łączyło się z komórkami docelowymi [171]. Wiadomo np., że PM klasy IgG są bardziej efektywne niż immunoglobuliny klasy IgM, a wśród IgG najbardziej aktywna jest podklasa IgG2_a [71, 85]. Szczególnie niepokojące jest spostrzeżenie, że PM hamujące rozwój jednej białaczki stymulowało wzrost innej [85]. Jednakże wyniki badań doświadczalnych, przeprowadzonych na zwierzętach, wykazujące efekty lecznicze [11, 82, 181], są zachęcające. Do prób przedklinicznych można zaliczyć terapię nowotworów człowieka przeszczepianych myszom nagim [71, 154]. Seroterapię stosowano u pacjentów z białaczkami, chłoniakami, nowotworami przewodu pokarmowego oraz u pacjenta z glejakiem. PM powodowały m.in. przejściowe obniżenie liczby komórek chłoniaka, przy jednoczesnym pojawianiu się krążących komórek martwych [119], co świadczy o skuteczności lizy *in vivo*.

Stosowano PM o symbolu J5 skierowane przeciwko wspólnemu antygenowi ostrych białaczek limfoblastycznych — cALLA (z ang. common acute lymphoblastic leukemia antigen). Wielokrotne iniekcje tego przeciwciała pacjentom z ostrą białaczką limfoblastyczną z komórek nie-T wywoływały szybki, lecz chwilowy spadek blastów krążących we krwi (nawet powyżej 90%). Nie wyeliminowano natomiast komórek białaczkowych ze szpiku. Usuwanie komórek nowotworowych związane było najprawdopodobniej z opsonizacją i wychwytywaniem przez układ makrofagów, gdyż mimo że obserwowano pokrywanie blastów PM i składnikiem C3 dopełniacza *in vivo*, to jednak ludzki dopełniacz nie powodował lizy tak opłaszczonych komórek *in vitro*.

Blasty przed rozpoczęciem terapii były rozpoznawane przez przeciwciało J5, na czym oparto zasadę leczenia. Zauważono jednak, że po podaniu przeciwciała większość komórek nowotworowych nie była już rozpoznawana przez J5 [136, 138]. To zjawisko modulacji antygenowej jest niestety znacznie częstsze i ogromnie utrudnia próby terapii.

Pierwsze doniesienie o uwieńczonym sukcesem zastosowaniu PM w seroterapii nowotworów dotyczyło pacjenta ze słabo zróżnicowanym chłoniakiem z komórek B. Zastosowano przeciwciało antyidiotypowe klasy IgG2b, reagujące z markerem idiotypowym immunoglobulin powierzchniowych obecnych na komórkach chłoniaka. Po podaniu 8 dawek terapię zakończono, nowotwór podlegał dalszej regresji. W 13 miesiącu od zakończenia leczenia pacjent pozostawał w remisji. PM wykrywalne były do 3 tygodni od ostatniej iniekcji. Nie stwierdzono reakcji organizmu na mysie PM. Ponieważ we wcześniej przeprowadzonych testach *in vitro* antyidiotypowe PM nie aktywowały dopełniacza, nie stwierdzono też zmian jego poziomu po iniekcji przeciwciał *in vivo*, a więc ten mecha-

nizm nie mógł być przyczyną regresji nowotworu. Autorzy sugerowali, iż PM hamowały proliferację komórek chłoniaka poprzez mechanizm regulacyjny [112]. Inna dyskutowana możliwość zakładała usunięcie komórek macierzystych dla transformacji nowotworowej, które mogły stanowić tylko mały procent wszystkich komórek chłoniaka [49]. Jednakże członiaki B-komórkowe wywodzą się z komórek pre-B, które nie mają immunoglobulin powierzchniowych [111].

Dokonywano również prób seroterapii przeciwciałami monoklonalnymi w stosunku do guzów litych. Zastosowano m.in. PM przeciwko komórkom nowotworów przewodu pokarmowego, które, jak uprzednio wykazano, hamowały rozwój guzów u myszy nagich, pośredniczyły w ADCC in vitro i swoiście reagowały z komórkami nowotworowymi w perfundowanych okrężnicach. Terapii poddano 4 [150], a następnie 20 pacjentów [149]. Przeciwciała podawano w jednorazowej dawce (z dwoma wyjątkami), ale bardzo zróżnicowanej pod względem ilości PM (od 15 do 1000 mg). Interesujące jest, że u pacjentów, którzy otrzymali od 366 do 1000 mg PM, nie powstały przeciwciała anti-PM, podczas gdy dawki poniżej 200 mg wyzwały produkcję tych przeciwciał. Trzech spośród tej heterogenicznej grupy pacjentów nie wykazywało objawów choroby od 10 do 22 miesięcy od immunoterapii [149]. Przedstawiony wynik jest interesujący i stwarza pewne nadzieje. Jednakże, jak przyznają sami autorzy, obiektywną interpretację utrudnia heterogeniczność grupy pacjentów oraz fakt, że byli oni poddawani różnorodnej chemioterapii przed zastosowaniem PM.

Ciekawą propozycją stałych infuzji PM do organizmu chorego było użycie komory zawierającej hybrydy produkujące przeciwciała. Linia ta produkowała ludzkie PM przeciwko komórkom glejaka. Komorę wszczepiono w powłoki brzuszne pacjenta z tym nowotworem. PM uwalniane były do krwiobiegu. W ciągu ponad 3 miesięcy obserwacji nie stwierdzono toksyczności, infekcji ani odczynu zapalnego wokół wszczepionej komory. Niestety, nie uzyskano również efektu leczniczego [187].

Reasumując, należy stwierdzić, że w przypadku większości doniesień dotyczących immunoterapii biernej przy użyciu PM, brakuje obiektywnych kontroli, które by w pełni uwiarygodniały opisywane efekty.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA SKUTECZNOŚĆ DIAGNOSTYKI I TERAPII PRZY UŻYCIU PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Czynniki wpływające na efektywność diagnostycznego i terapeutycznego zastosowania PM można podzielić na 3 zasadnicze grupy: właściwości samych przeciwciał monoklonalnych, czynniki związane z docelowymi komórkami nowotworowymi i czynniki ze strony pacjenta.

Czynniki związane z budową i właściwościami PM zostały już czę-

ściowo omówione w poprzednich rozdziałach: związki między klasą i podklasą immunoglobuliny a jej zdolnością do aktywowania dopełniacza, uczestniczenia w reakcji ADCC, czy opsonizacji komórek docelowych są znane i muszą być uwzględniane. Bardzo ważny wymóg, to swoistość przeciwciała w stosunku do komórek docelowych. W przypadku nowotworów warunek ten nie może być do końca spełniony, gdyż przeważającą większość antygenów nowotworowych stanowią TAA, a nie TSA. Nie stanowi to jednak absolutnej przeszkody, jak wykazały badania z wykorzystaniem PM przeciwko np. antygenom związanym z różnicowaniem się komórek [109, 110]. Można przyjąć, że PM przeciwko TAA mogą być użyte, jeśli stężenie TAA na komórkach nowotworowych jest wyższe niż na komórkach normalnych, gdy normalne komórki z tym antygenem nie mają decydującego dla życia znaczenia i ich zniszczenie nie spowoduje ujemnych dla organizmu skutków, lub gdy komórki nowotworowe całkowicie zdominowały normalną populację.

Ostateczny efekt wywierany przez przeciwciało zależy również od stopnia powinowactwa, długotrwałości przebywania na powierzchni komórki oraz szybkości endocytozy. Endocytoza kompleksu antygen—przeciwciało może mieć korzystny wpływ w przypadku zastosowania połączeń PM z lekami lub toksynami, które działają wewnątrzkomórkowo [201]. Zasadniczo jednak jej wpływ jest negatywny, gdyż powodować może znikanie znakowanych PM, uniemożliwiając lokalizację, a w terapii hamując efekt cytolityczny [139]. Odgrywa ona również rolę w ułatwieniu immunologicznym.

Wydaje się, że zastosowanie mieszaniny PM może zwiększać efektywność, zarówno diagnostyki, jak i terapii. Jednym z powodów, dla których używa się mieszanin PM, jest obecność różnych grup markerów na powierzchni różnych komórek. Stosując odpowiednie kombinacje PM można te różnice wychwycić, podczas gdy użycie jednego przeciwciała jest nieefektywne [50, 77]. Inny powód stosowania „koktajlu” PM to różnice w ekspresji antygenów komórek nowotworowych [1, 193] oraz możliwość krzyżowych reakcji pojedynczego PM z antygenami na komórkach nie będących docelowymi, co utrudni lub zafałszuje interpretację. Dwa PM przeciwko różnym epitopom tego samego antygeny mogą wywierać inny efekt niż obydwa przeciwciała użyte oddzielnie [40, 78, 188]. Z tych względów mieszaniny PM znajdują coraz częstsze zastosowanie w immunohistopatologii [77, 80], radiolokalizacji [21, 103] oraz terapii [81].

Poważny problem, związany z zastosowaniem PM *in vivo*, stanowi immunogenność immunoglobulin. Do tej pory zdecydowana większość wyprodukowanych PM to przeciwciała mysie. Odpowiedź immunologiczna na ksenogeniczne białko może stanowić potencjalne niebezpieczeństwo

dla organizmu. Opisywane reakcje na mysie PM wahały się w szerokim zakresie z reakcją anafilaktyczną [38] i chorobą posurowiczą, z odkładaniem kompleksów immunologicznych w nerkach włącznie [110, 119]. Jednak najczęstsza odpowiedź nie jest tak bardzo nasilona.

U części pacjentów ze sprawnym układem immunologicznym nie stwierdzono odpowiedzi przeciwko PM, co jest prawdopodobnie wyrazem zmiennej osobniczo wrażliwości. Poza szkodliwością dla pacjenta istnieje jeszcze drugi problem związany z immunogennością ksenogenicznych PM. Powstające w ustroju przeciwciała anti-PM mogą łączyć się z nimi już w surowicy i uniemożliwiać lub ograniczać efekt diagnostyczny i terapeutyczny. Zjawisko to nie musi współistnieć z wystąpieniem objawów chorobowych, będących wyrazem immunizacji. O jego znaczeniu dla efektywności terapii przy użyciu PM mogą świadczyć obserwacje ponownego wystąpienia nowotworu u pacjentów z remisją, równoczesne z pojawieniem się przeciwciał anti-PM [109, 110], oraz sukces terapeutyczny, gdy nie zaobserwowano powstania takich przeciwciał [112].

Najlepszym, ale w tej chwili jeszcze trudno osiągalnym rozwiązaniem problemu immunogenności jest zastosowanie ludzkich PM. Jednakże nie można wykluczyć, że odpowiedź anti-idiotypowa przeciwko ludzkim PM może być równie szkodliwa. Inna możliwość to podanie mysich PM w jednej dużej dawce. Sposób ten wydaje się dość skutecznie zapobiegać immunizacji [149]. Nie zawsze jednak do wywarcia efektu leczniczego wystarczy jednorazowa iniekcja.

Duże znaczenie dla efektywności terapii mają właściwości samego nowotworu: jego wielkość, budowa, lokalizacja zmian i stopień ich rozprzestrzenienia w organizmie. Ze względu na dużą dostępność, najbardziej podatne na seroterapię są nowotwory hematologiczne oraz małe guzy pierwotne i małe przerzuty. Z lokalizacją nowotworu wiąże się wybór optymalnej metody podawania PM. Oprócz stosowanej najczęściej aplikacji dożylniej, w pewnych przypadkach korzystniejsze wydaje się podanie PM podskórnym. Po takim wprowadzeniu większość cząsteczek przeciwciała przedostaje się do naczyń limfatycznych, a nimi do odpowiednich węzłów chłonnych. Można w ten sposób lepiej niż przy iniekcji dożylniej kierować przeciwciała do przerzutów w węzłach. Ta droga ma wiele zalet — pozwala zmniejszyć ilość używanych PM. Poprzez skierowanie ich bezpośrednio do odpowiedniej przestrzeni organizmu można uniknąć łączenia PM z antygenami występującymi na prawidłowych komórkach (jak to ma miejsce w przypadku TAA) lub wolnymi antygenami w surowicy. Zapobiega się tym samym odkładaniu kompleksów immunologicznych w nerkach. Zastosowanie tej metody w radiolocalizacji pozwala wykrywać znacznie mniejsze przerzuty poprzez obniżenie tła całego ciała. Zbadanie stanu węzłów chłonnych jest bardzo

ważne dla stwierdzenia stopnia rozwoju wielu nowotworów, np. choroby Hodgkina, czerniaka złośliwego oraz raków płuc, sutka, jelita grubego, macicy i gruczołu krokowego [189, 190].

Jedną z najważniejszych właściwości komórek nowotworowych, która wpływa na skuteczność terapii jest modulacja antygenowa. Jak już powiedziano, połączenie przeciwciała z antygenem na powierzchni komórki guza powoduje znikanie tego antygeny. Może to następować na drodze endocytozy [150, 193] lub uwalniania antygeny do krwiobiegu [110, 119]. Nowotwór przestaje być rozpoznawany przez PM, które były dla niego swoiste. W przypadku przechodzenia antygeny do krwiobiegu dołączają się inne niekorzystne zjawiska, jak blokowanie PM w surowicy oraz odkładanie kompleksów immunologicznych w nerkach.

Na efektywność leczenia przy użyciu PM wpływ mają także czynniki ze strony pacjenta. Wydolność układu immunologicznego jest konieczna dla efektywnej reakcji ADCC, czy usuwania opsonizowanych PM komórek nowotworowych. Sprawny układ odpornościowy silnie reaguje jednak na ksenogeniczne PM. Stąd w zaawansowanych chłoniakach czy białaczkach, wobec osłabienia odporności, PM można stosować znacznie bezpieczniej.

Potencjalne zagrożenie dla pacjentów poddawanych terapii PM mogą stanowić wirusy, którymi bywają zarażone hybrydy mysie [6, 191] lub ludzkie limfocyty celowo transformowane [90]. Jak dotąd nie ma dowodów, że wykryte wirusy mogą być patogenne dla człowieka, natomiast jeśli chodzi o wirus E-B używany do transformacji, 80-90% ludzi dorosłych w krajach rozwiniętych jest nim już zakażonych [31]. Ponadto typowa procedura oczyszczania przeciwciał powinna inaktywować lub usuwać wirusy.

NIEKTÓRE ZASTOSOWANIA PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH W TRANSPLANTOLOGII

Przykładem nowych możliwości stwarzanych przez przeciwciała monoklonalne w podejściu do starych problemów są przeszczepy nerek. Pierwszej transplantacji zakończonej pełnym powodzeniem dokonano w 1953 r. między dwoma bliźniętami monozygotycznymi. Niestety, układ ten jest bardzo ograniczony i najczęściej mamy do czynienia z przeszczepami ze zwłok lub od dawców rodzinnych. W obydwu przypadkach różnice w antygenach zgodności tkankowej mogą być przyczyną reakcji biocy prowadzącej do odrzucenia przeszczepu. Z tego względu dokonuje się immunologicznego doboru dawcy i biocy przeszczepu, poszukując pary osobników posiadających możliwie największą liczbę identycznych antygenów zgodności tkankowej układu HLA (human leukocyte antigens) — głównego układu zgodności tkankowej człowieka. Antygeny

HLA, A, B, C i DR oznacza się serologicznie. Do chwili opracowania techniki produkcji PM oznaczenia te przeprowadzano stosując surowice pochodzące od kobiet po wielokrotnych porodach lub immunizowanych ochotników. Użycie PM pozwala znacznie zwiększyć czułość i swoistość takich testów [15].

Innym przykładem wykorzystania PM w transplantologii jest analiza komórek naciekających przeszczep w procesie odrzucania. Swoiste PM przeciwko poszczególnym subpopulacjom komórek limfatycznych pozwalają na znacznie precyzyjniejszą ocenę niż standartowe badania histologiczne [67].

Produkcja na skalę przemysłową PM przeciwko poszczególnym subpopulacjom limfocytów T (przeciwciała serii OKT firmy Ortho Pharmaceuticals czy serii Leu firmy Becton-Dickinson) stworzyła możliwość porównywalnej oceny tych subpopulacji u pacjentów z przeszczepami [204]. Zastosowanie tych przeciwciał oraz PM rozpoznających inne komórki limfatyczne pozwala monitorować zmiany odsetkowe limfocytów we krwi, które zachodzą po przeszczepieniu i w różnych fazach odrzucania przeszczepu [20, 84, 105]. Znajomość zmian całkowitej ilości limfocytów T oraz stosunku limfocyt T pomocniczy do supresorowy-cytotoksyczny może pozwolić na przewidywanie procesu prowadzącego do odrzucenia przeszczepu. Umożliwia również ocenę wpływu leczenia immunosupresyjnego, który, jak się wydaje, może znajdować odzwierciedlenie w zmianach odsetka limfocytów T. Intensywna immunosupresja niesie niebezpieczeństwo ciężkich infekcji lub aktywacji wirusów latentnych, np. herpes simplex czy cytomegalowirus. Dlatego dąży się obecnie do indywidualizacji dawek cytotatyków, zapobiegających odrzucaniu przeszczepu, a jednocześnie zmniejszających niebezpieczeństwo infekcji. Analiza subpopulacji limfocytów T pozwala, w pewnym stopniu, przewidywać możliwość wystąpienia zakażenia, co zostanie tu opisane.

W procesie odrzucania przeszczepu allogenicznego uczestniczą limfocyty T. Obecnie stosowane środki immunosupresyjne działają niewybiórczo, depresyjnie na cały układ immunologiczny oraz wykazują wiele efektów niepożądanych. Cytotoksyczne przeciwciała reagujące z limfocytami T powinny swoicie zmniejszać liczbę lub całkowicie eliminować te komórki. To teoretyczne założenie leżało u podstaw zastosowania w klinice globuliny antytymocytarnej (ATG). Jest to surowica otrzymywana poprzez hiperimmunizację zwierząt, najczęściej koni. Wyniki uzyskane przy jej zastosowaniu są kontrowersyjne [124, 166]. ATG wykazuje natomiast wiele istotnych klinicznie efektów niepożądanych, jak dreszcze i gorączka, wysypki, trombocytopenia. PM przeciwko limfocytom T powinny wywierać ten sam efekt na limfocyty przy mniejszych niż w przypadku ATG działaniach ubocznych.

W badaniach przedklinicznych na małpach wykazano, że PM typu OKT4 i Leu-2a powodowały istotne zmniejszenie procentu limfocytów reagujących z tymi przeciwciałami. Zastosowanie PM przed przeszczepem powodowało przedłużenie przeżycia do 47 dni (kontrola 8–11 dni), gdy użyto OKT4, i do 34–36 dni w przypadku Leu-2a [27]. W eksperymencie klinicznym zastosowano przeciwciała OKT3 u 16 pacjentów, u których stwierdzono ostry proces odrzucania przeszczepu. OKT3 reagują ze wszystkimi limfocytami T, podczas gdy OKT4 rozpoznają limfocyty T pomocnicze, a OKT8 — supresorowe cytotoksyczne [204]. Już po 15 min po zastosowaniu OKT3 liczba krążących limfocytów T spadała do poziomu praktycznie niewykrywalnego, a u wszystkich pacjentów stwierdzono zahamowanie rozpoczętego już procesu odrzucania w ciągu 2–7 dni od rozpoczęcia terapii. Po kilku dniach stwierdzono wzrastającą liczbę komórek reagujących z innymi markerami limfocytów T, a nierozpoznanawanych przez OKT3. Jednocześnie u części pacjentów, u których zahamowano odrzucanie przeszczepu, proces ten wystąpił ponownie w 1 do 4 tygodni od zaprzestania terapii przy użyciu OKT3. U wszystkich zwierząt i u 11 pacjentów stwierdzono powstawanie przeciwciał przeciwko PM, a ponadto u części chorych stwierdzono przeciwciała antyidiotypowe [27]. Być może zjawisko modulacji antygenowej oraz odpowiedzi biorcy na PM użyte w terapii spowodowały późniejsze przypadki odrzucania przeszczepów. Wydają się to potwierdzać wyniki badań przeprowadzonych przez innych autorów [22].

Część autorów prezentuje pogląd, że istotnym elementem terapii przy użyciu ATG czy OKT3 jest usunięcie aktywnych klonów limfocytów, a nie całej ich populacji. Zastosowanie PM przeciwko blastom powstającym w trakcie odpowiedzi na allogeniczny przeszczep powinno zapobiec odrzucaniu lub zahamować rozwijający się proces. Jednocześnie takie postępowanie powinno pozostawać bez większego wpływu na pozostałe funkcje układu immunologicznego biorcy. Wstępne badania wykazały przedłużenie przeżycia przeszczepów skóry u małp po zastosowaniu PM przeciwko komórkom limfoblastycznym [168]. W badaniach klinicznych zastosowano to samo przeciwciało o symbolu CBL1 w terapii 11 pacjentów z przeszczepami nerek od dawców rodzinnych i 8, którym przeszczepiono narząd pochodzący ze zwłok. U wszystkich tych chorych wystąpił wcześniej proces odrzucania przeszczepu. U 15 z nich odrzucania przeszczepu nie udało się zahamować stosując sterydoterapię. Jest to istotne, gdyż inni badacze nie stosowali tego kryterium i być może pozytywny rezultat udałoby się uzyskać podając glikokortykoidy zamiast OKT3. Zastosowanie CBL1 nie wpływało na liczbę limfocytów krwi obwodowej, a mimo to zahamowało reakcję odrzucania u 17 z 19 pacjentów. Długotrwałe przedłużenie przeżycia przeszczepu uzyskano u 8 z 11

pacjentów, którzy otrzymali nerkę od żywych dawców, oraz u 6 z 8, którym przeszczepiono nerkę ze zwłok. Dla porównania u wszystkich chorych traktowanych OKT3 wystąpiło późne odrzucenie [27]. U 14 z 19 pacjentów traktowanych CBL1 stwierdzono produkcję przeciwciał przeciwko mysim PM, nie pociągnęło to jednak za sobą żadnych objawów ubocznych [168].

Reasumując, PM przeciwko komórkom zaangażowanym w procesie odrzucania przeszczepu są próbą nowego podejścia w transplantologii, które ma polegać na niszczeniu komórek zaangażowanych w daną reakcję. Jeszcze dalej idące propozycje dotyczą sprzęgania antygenów układu MHC z toksynami. Takie kompleksy mogą niszczyć wyłącznie komórki rozpoznające dany, ściśle określony antygen [201].

ZASTOSOWANIE PM W DIAGNOSTYCE CHORÓB ZAKAŻNYCH

Diagnostyka laboratoryjna chorób zakaźnych opiera się na czterech podstawowych metodach. Są to: a) badania mikroskopowe, które mogą uwidocznić czynnik zakaźny; b) hodowle mikroorganizmów na podłożach selektywnych; c) immunologiczna identyfikacja w tkankach lub płynach ustrojowych antygenów danego czynnika patogennego; d) oznaczanie miar swoistych przeciwciał wytwarzanych przez organizm chorego w odpowiedzi na wtargnięcie mikroorganizmów.

Żadna z tych metod nie daje, w oderwaniu od pozostałych, całkowitej pewności diagnostycznej. Najczęściej, w stosunku do poszczególnych chorób, zachodzi konieczność zastosowania kombinacji tych badań. Analiza mikroskopowa pozwala dość pewnie diagnozować infekcje wielokomórkowych pasożytów, ma jednak ograniczoną wartość jeśli chodzi np. o zakażenia wirusowe. Metody hodowlane są czułe i swoiste, jednakże wiele mikroorganizmów wykazuje słaby wzrost w hodowli, a sama technika jest pracochłonna, obciążająca dla laboratorium, i co często jest bardzo ważne, wymaga długiego czasu inkubacji. Bezpośrednia identyfikacja czynnika zakaźnego za pomocą przeciwciał jest metodą szybką i pewną pod warunkiem posiadania immunoglobulin o dużej swoistości i powinowactwie. Jak zaznaczono, przeciwciała pochodzące z surowicy nie zawsze mogą sprostać tym wymogom. Dodatkowo, wskutek podobieństw w antygenach powierzchniowych patogennych i niepatogennych szczepów mikroorganizmów, surowice mogą wykazywać reakcje krzyżowe.

Nowe możliwości w dziedzinie immunologicznej diagnostyki chorób zakaźnych stworzyły PM. Wykazują one bardzo dużą swoistość, nieporównywalną z konwencjonalnymi przeciwciałami. We wszystkich testach

reagują z jednakowym powinowactwem. Fakt, że można je otrzymywać w praktycznie nieograniczonych ilościach sprawia, iż PM mogą umożliwić standaryzację różnych testów nie tylko w skali jednego laboratorium, ale na skalę międzynarodową.

PM o spodziewanych właściwościach diagnostycznych wyprodukowano już w stosunku do wielu wirusów [32, 76, 144, 194], bakterii [68, 162] i pasożytów [159, 169, 197, 200]. Obecnie, w wielu laboratoriach trwają prace nad szybkimi i łatwymi do przeprowadzenia testami diagnostycznymi opartymi na PM. Ich zastosowanie umożliwia skrócenie procesu rozpoznawania niektórych chorób od kilku dni nawet do kilku minut, np. w przypadku pewnych zakażeń przenoszonych drogą płciową (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Herpesvirus*) od 3–6 dni do 15–20 min. Równocześnie zmniejsza się możliwość popełnienia błędu diagnostycznego, zwłaszcza gdy doszło do zakażenia mieszanego. Ma to ogromne znaczenie, jeśli poszczególne czynniki patogenne są wrażliwe na odmienne leki, różne rokowniczo i epidemiologicznie. Wirusy, np. *Herpes* typu I, jak i typu II, powodują infekcje narządów płciowych, sprawiające problemy diagnostyczne. Jednocześnie rozpoznanie jest bardzo istotne, gdyż istnieje preferencja aktywności leków przeciwwirusowych w stosunku do poszczególnych typów wirusa. Inne jest też rokowanie [134].

Przeciwciała monoklonalne mogą znaleźć zastosowanie w testach radioimmunologicznych (radioimmunoassay — RIA), enzymoimmunologicznych (enzymoimmunoassay — EIA), immunofluorescencyjnych (IF) oraz wielu innych. Należy jednak pamiętać, że istnieją pewne ograniczenia w zastosowaniu PM. Wysoka swoistość może czasami okazywać się zbyt wąską i zachodzi wtedy konieczność użycia mieszaniny PM skierowanych przeciwko temu samemu patogenowi [162]. Zasadniczo PM nie aglutynują, stąd nie znajdują raczej zastosowania w testach opierających się na tej zasadzie.

Można mieć nadzieję, iż zastosowanie PM przyczyni się do dalszego udoskonalenia diagnostyki chorób zakaźnych. Być może w niedługim czasie laboratoria dysponować będą zestawami PM umożliwiającymi szybką i bezbłędną diagnozę. Jest też możliwe, że odpowiednie PM pozwolą analizować kodowane przez plazmidy białka odpowiedzialne za uodpornienie na leki. Tym samym łatwo będzie ustalić najlepszą terapię.

Należy również wspomnieć o próbach wykorzystania analizy komórek limfatycznych w badaniach nad chorobami zakaźnymi. Dotyczy to zwłaszcza komórek odpowiadających za immunoregulację (subpopulacje limfocytów T). Aczkolwiek zasięg tego rodzaju badań jest dotąd niewielki, to jednak można stwierdzić ściśle powiązanie między zmianami w subpopulacjach komórek immunoregulacyjnych i przebiegiem choroby zakaźnej. W doświadczeniach tych wykorzystuje się PM rozpoznające różne

rodzaje limfocytów T: pomocniczy (Th), supresorowy/cytotoksyczny (TsTc); Pan-T [204]. Stwierdzono np. podwyższenie poziomu komórek typu TsTc w ostrej fazie mononukleozy zakaźnej, który ulega normalizacji w trakcie rekonwalescencji [135, 173].

Pacjenci z ostrą infekcją cytomegalowirusem (CMV) wykazują obniżenie poziomu Th przy wzroście TsTc. Jest to istotne spostrzeżenie. Zakażenia CMV, występujące stosunkowo często u pacjentów z przeszczepami nerek, mogą poprzedzać infekcje bakteryjne i grzybicze. Być może jest za to odpowiedzialny opisywany w zakażeniu CMV spadek odporności organizmu [62].

W ostrej postaci wirusowego zapalenia wątroby typu B obserwuje się spadek stosunku Th/Tsc związany ze wzrostem poziomu limfocytów T supresyjnych, natomiast w WZW typu A notuje się wzrost stosunku Th/Tsc [62].

Podobne zmiany w subpopulacjach limfocytów T zanotowano także w pewnych chorobach bakteryjnych i grzybiczych [62]. Chociaż w chwili obecnej badania zmian regulacji immunologicznej w chorobach zakaźnych są we wczesnym stadium, być może w przyszłości pozwolą one ustalić czynniki wywołujące zaburzenia równowagi mikroorganizm — ustrój. Stałoby się wtedy możliwym zastosowanie terapii immunoregulacyjnej w leczeniu chorób zakaźnych.

BADANIA NAD RECEPTORAMI KOMÓRKOWYMI

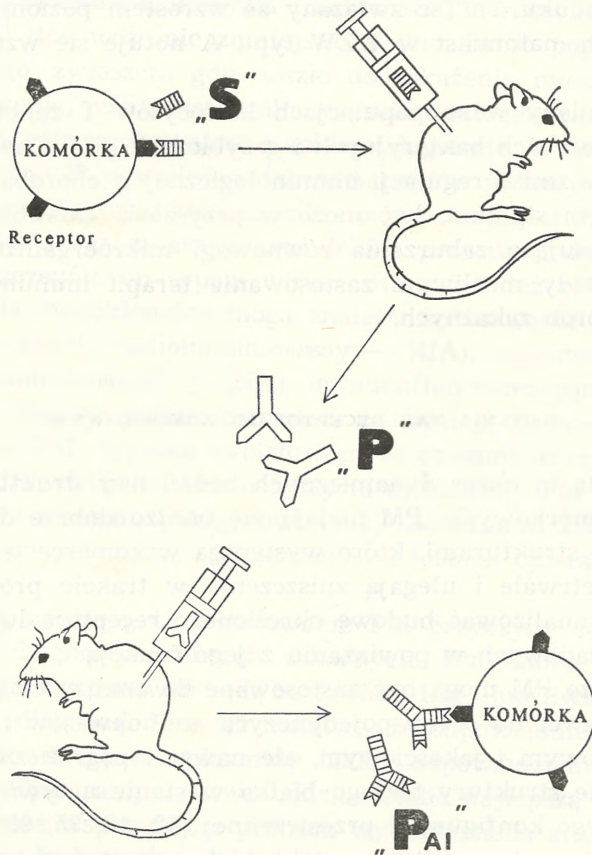
Ostatnie lata to okres dynamicznych badań nad strukturą i funkcją receptorów komórkowych. PM nadają się bardzo dobrze do badań nad receptorami — strukturami, które występują w komórce w małej ilości, a często są nietrwałe i ulegają zniszczeniu w trakcie prób preparacji. PM pozwalają analizować budowę określonego receptora lub poszczególnych części składowych w powiązaniu z jego funkcją.

Wykazano, że PM mogą być zastosowane do analizy budowy określonego białka, nawet do oceny pojedynczych aminokwasów i to nie tylko w sensie ilościowym i jakościowym, ale nawet topograficznym. Pozwala to na określenie struktury takiego białka w stanie natywnym, włącznie z poznaniem jego konfiguracji przestrzennej [12, 13, 35, 99].

Receptory neurotransmiterów, takie jak receptor dopaminergiczny, adrenergiczny czy muskarynowy receptor cholinergiczny, mogą w zależności od rodzaju komórki aktywować lub hamować te same lub bardzo podobne białka efektorowe (głównie o charakterze enzymatycznym). Istotne było więc poznanie ich struktury. PM, dzięki swej dużej swoistości, mogły odegrać decydującą rolę w badaniu budowy i funkcji tych

receptorów. Analizowano m.in. cholinergiczne receptory: nikotynowy [65, 175] i muskarynowy [179, 180]. Badano adrenergiczne receptory α_1 [94, 180], β_1 oraz β_2 [28, 55, 56]. Wykazano np. wcześniej niewykrywalne różnice w budowie między podtypami receptorów β -adrenergicznych oraz analizowano budowę tych receptorów *in situ* [55, 56].

Otrzymano PM antyidiotypowe skierowane przeciwko epitopom znajdującym się we fragmencie Fab immunoglobulin przeciwko określonym przekąźnikom. Użycie ich w badaniach nad receptorami komórkowymi ujawniło, że mogą one odgrywać rolę czynnika imitującego sygnał prze-



Ryc. 3. Produkcja przeciwciał przeciwko określonemu receptorowi bez immunizacji tym receptorem. Dysponując neurotransmiterem lub hormonem (S), reagującym z określonym receptorem komórkowym, produkuje się przeciwciała przeciwko niemu (P). Następnie przeciwciała (P) służy do immunizacji, w wyniku której otrzymuje się przeciwciała antyidiotypowe (PAI). Przeciwciała to reaguje z receptorem komórkowym w taki sam sposób jak neurotransmitter lub hormon

kazywany poprzez właściwy przekaźnik [147] lub też w pewnych sytuacjach sygnał ten blokować [29]. Spostrzeżenie to nasunęło możliwość produkcji przeciwciał przeciwko określonemu receptorowi, bez konieczności immunizacji tym receptorem. Jest to istotne i cenne osiągnięcie, gdyż często dysponuje się przekaźnikiem (neurotransmitter, hormon), natomiast otrzymanie receptora i wyprodukowanie przeciwko niemu przeciwciał jest bardzo trudne (ryc. 3). Wykorzystano PM do badań nad nużliwością mięśni (myasthenia gravis) [176], stosując m.in. PM anty-idiotypowe do wywoływania miastonii w układach doświadczalnych [25, 186].

Bardzo ciekawe informacje otrzymano używając PM do badań nad receptorami dla różnych hormonów. Analizowano strukturę receptora dla tyreotropiny (TSH) wykazując, że składa się on z glikoproteiny i gangliozydu zakotwiczonego w błonie komórkowej, przy czym PM skierowane przeciwko glikoproteinie dawały w efekcie hamowanie procesów zawiądywanych przez TSH, a przeciwciała łączące się z gangliozydem naśladowały efekt TSH.

Używając PM otrzymywanych z hybryd limfocytów pochodzących od pacjentów z chorobą Graves'-Basedowa badano rolę autoprzeciwciał stymulujących i hamujących występujących w tej chorobie [178, 199]. Wreszcie, wykorzystując PM opracowano metody klinicznych badań autoprzeciwciał u pacjentów z chorobą Graves'-Basedowa, które pozwalają ustalać sposób terapii i obserwować jej postępy [177]. Przeciwciała monoklonalne zastosowano w badaniach nad powstawaniem, budową i funkcją receptorów dla insuliny, IGF (z ang. insulinlike growth factor) [93] oraz nad budową, występowaniem i rolą receptora dla estrogenów w tkankach prawidłowych oraz nowotworowych (rak sutka) [64].

Ciekawe wyniki uzyskano wykorzystując PM do analizy receptorów dla LDL (z ang. low density lipoprotein) obecnych na komórkach zdrowych osobników oraz pacjentów z rodzinną hypercholesterolemią (z ang. familial hypercholesterolemia) (FH), wykazując m.in. syntezę nieprawidłowych receptorów, brak wytwarzania tych receptorów lub nieprawidłowe ich dojrzewanie w komórkach chorych z FH [10].

INNE ZASTOSOWANIA PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

Zdolność PM do swoistego i obdarzonego dużym powinowactwem wiązania cząsteczek o właściwościach antygenowych stworzyła nową możliwość oczyszczania różnych substancji, w tym zwłaszcza produktów naturalnych. Wiele z nich jest bardzo trudnych do wyodrębnienia i otrzymania w większej ilości. Swoiste PM można wykorzystać w technice

immunoadsorbcyjnej [113]. W tym celu zwierzęta (najczęściej myszy) poddaje się immunizacji mieszaniną, w której znajduje się poszukiwana substancja. Otrzymane w sposób wcześniej opisany PM wykorzystuje się do sporządzenia kolumny immunoadsorbcyjnej. Metoda taka pozwala na oczyszczanie różnych substancji nawet na skalę przemysłową [151].

Ciekawym zastosowaniem PM jest wyodrębnianie poszczególnych składników z mieszaniny całkowicie nieznanymi antygenów. Splenocyty zwierzęcia immunizowanego tą mieszaniną poddaje się fuzji z komórkami szpiczaka. Poszczególne PM służą do sporządzenia kolumny immunoadsorbcyjnej. W trakcie przechodzenia przez kolumnę PM o określonej swoistości łączy się i zatrzymuje odpowiedni antygen. W ten sposób, w kolejnych kolumnach pozostaną poszczególne, pojedyncze antygeny z mieszaniny nieznannej. Metoda ta nadaje się zarówno do analizy pojedynczych antygenów, jak również całych organelli komórkowych, czy wykazujących aktywność farmakologiczną ekstraktów komórkowych [113].

Przykładem ciekawego zastosowania PM w immunoterapii biernej jest praca Crawford i wsp. [30], którzy wyprodukowali ludzkie przeciwciała przeciwko antygenowi D układu Rh, stosując technikę transformacji limfocytów wirusem Epstein-Barra. Spośród wszystkich antygenów układu Rh, antygen D ma największe znaczenie kliniczne, gdyż jest najbardziej immunogenny. Na podstawie jego obecności w krwinkach czerwonych wprowadzono podział na dwie grupy ludzi: Rh dodatnich (Rh+) i Rh ujemnych (Rh-). Limfocyty użyte do transformacji pochodziły od osobników (Rh-) immunizowanych antygenem D. Uzyskana linia hybrydowa o symbolu UCHD4 utrzymywana była długotrwale w hodowli i produkowała PM w ilości 20 µg/ml. Otrzymane PM klasy IgG₁ reagowały swoiście z komórkami, które miały na swej powierzchni antygen D. Nie stwierdzono ani jednego przypadku reagowania z D-negatywnymi komórkami. PM reagowało w teście Coombsa pośrednim (z albuminą) z traktowanymi papainą erytrocytami i jak inne anty-D przeciwciała klasy IgG nie aglutynowało D-pozytywnych krwinek czerwonych w samej soli fizjologicznej. Otrzymane przeciwciało może być użyteczne przy oznaczaniu erytrocytów oraz, po oczyszczeniu, w zapobieganiu niedokrwistości hemolitycznej noworodków na tle konfliktu Rh.

Przedstawione zastosowania PM nie stanowią wszystkich możliwości, a są jedynie próbą zasygnalizowania ogromnego bogactwa dyscyplin naukowych, w których PM mogą zostać użyte. Praca Köhlera i Milsteina została szybko dostrzeżona przez innych badaczy i to nie tylko immunologów. Jej doniosłość bowiem polega na mnogości potencjalnych zastosowań, z których dotychczas prawdopodobnie tylko część została odkryta i wykorzystana.

LITERATURA

- [1] ALBINO, A. P., LLOYD, K. O., HOUGHTON, A. N., OETTGEN, H. F., OLD, L. J., Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient, *J. Exp. Med.*, **154**: 1764 - 1778, 1981.
- [2] ASHALL, F., BRAMWELL, M. E., HARRIS, H., A new marker for human cancer cells. I. The Ca antigen and Cal antibody, *Lancet*, **ii**: 1 - 6, 1982.
- [3] BALDWIN, R. W., EMBLETON, M. J., PIMM, M. V., Monoclonal antibodies for radioimmuno-detection of tumours and for targeting, *Bull. Cancer*, **70**: 132 - 136, 1983.
- [4] BALL, E. D., GRAZIANO, R. F., FANGER, M. W., A unique antigen expressed on myeloid cells and acute leukemia blast cells defined by monoclonal antibody, *J. Immunol*, **130**: 2937 - 2941, 1983.
- [5] BANKERT, R. B., DES SOYE, D., POWERS, L., Antigen promoted cell fusion: Antigen-coated myeloma cells fuse with antigen-reactive spleen cells, *Transplant. Proc.*, **12**: 443 - 446, 1980.
- [6] BARTAL, A. H., FEIT, C., ERLANDSON, R., HIRSHANT, Y., The presence of viral particles in hybridoma clones secreting monoclonal antibodies, *N. Engl. J. Med.*, **306**: 1423, 1982.
- [7] BAST, R. C., FREENEY, M., LAZARUS, H., NADLER, L. M., COLVIN, R. B., KNAPP, R. C., Reactivity of monoclonal antibody with human ovarian carcinoma, *J. Clin. Invest.*, **68**: 1331 - 1337, 1981.
- [8] BAST, R. C., RITZ, J., LIPTON, J. M., FEENEY, M., SALLAN, S. E., NATHAN, D. G., SCHLOSSMAN, S. F., Elimination of leukemic cells from human bone marrow using monoclonal antibody and complement, *Cancer Res.*, **43**: 1389 - 1394, 1983.
- [9] BAUMGARTNER, C., BRUN del RE, G., BUCHER, U., FORSTER, H. K., HIRT, A., IMBACH, P., LUTHY, A., MORELL, A., ODAVIC, R., WAGNER, H. P., Autologous bone marrow transplantation (ABMT) for advanced abdominal non-Hodgkin's lymphoma (NHL) after in vitro purging with anti-Y 29/55 monoclonal antibody and complement, *Exp. Hematol.*, **11** S14, 6, 1983.
- [10] BEISIEGEL, U., SCHNEIDER, W. J., GOLDSTEIN, J. L., ANDERSON, R. G. W., BROWN, M. S., Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia, *J. Biol. Chem.*, **256**: 11923 - 11931, 1981.
- [11] BERNSTEIN, I. D., TAM, M. R., NOWINSKI, R. C., Mouse leukemia: Therapy with monoclonal antibodies against a thymus differentiation antigen, *Science*, **207**: 68 - 71, 1980.
- [12] BERZOFSKY, J. A., BUCKENMEYER, G. K., HICKS, G., GURD, F. R. N., FELDMANN, R. J., MINNA, J., Topographic antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin, *J. Biol. Chem.*, **257**: 3189 - 3198, 1982.
- [13] BERZOFSKY, J. A., HICKS, G., FEDORKO, J., MINNA, J., Properties of monoclonal antibodies specific for determinants of a protein antigen, myoglobin, *J. Biol. Chem.*, **255**: 11188 - 11191, 1980.
- [14] BROCKHAUS, M., MAGNANI, J. L., BLASZCZYK, M., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., KARLSSON, K. A., LARSON, G., GINSBURG, V., Monoclonal antibodies directed against the human Le^b blood-group antigen, *J. Biol. Chem.*, **256**: 13223 - 13225, 1981.

- [15] BRODSKY, F. M., PARHAM, P., BARNSTABLE, C. J., CRUMPTON, M. J., BODMER, W. F., Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system, *Immunol. Rev.*, **47**: 3 - 61, 1979.
- [16] BUCKMAN, R., SHEPHERD, V., COOMBES, R. C., McILHINNEY, R. A. J., PATEL, S., NEVILLE, A. M., Elimination of carcinoma cells from human bone marrow, *Lancet* *ii*: 1428 - 1430, 1982.
- [17] BURCHELL, J., DURBIN, H., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., Complexity of expression of antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells, *J. Immunol.*, **13**: 508 - 513, 1983.
- [18] BURNETT, R. A., DEERY, A. R. S., ADAMSON, M. R., LIDDLE, C., THOMAS, M., ROBERTS, G. H., Evaluation of Ca1 antibody in pleural biopsy material, *Lancet*, *i*: 1158, 1983.
- [19] CAIRNCROSS, J. G., MATTES, M. J., BERESFORD, H. R., ALBINO, A. P., HOUGHTON, A. N., LLOYD, K. O., OLD, L. J., Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies: Identification of astrocytoma subsets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 5641 - 5645, 1982.
- [20] CARTER, N. P., CULLEN, P. R., THOMPSON, J. F., BEWICK, A. L. T., WOOD, R. F. M., MORRIS, P. J., Monitoring lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients, *Transplant. Proc.*, **15**: 1157 - 1159, 1983.
- [21] CHATAL, J. F., BOURDOISEAU, M., FUMOLEAU, P., DOUILLARD, J. Y., KREMER, M., CURTET, C., LE MEVEL, B., Utilisation d'anticorps monoclonaux radio-marqués pour la detection scintigraphique des cancers colorectaux humains. *Bull. Cancer*, **70**: 103 - 107, 1983.
- [22] CHATENOU, L., BAUDRIHAYE, M. F., CHKOFF, N., KREIS, H., BACH, J. F., Immunologic follow-up of renal allograft recipients treated prophylactically by OKT3 alone, *Transplant. Proc.*, **15**: 643 - 645, 1983.
- [23] CHEE, D. O., YONEMOTO, R. H., LEONG, S. P. L., RICHARDS, G. F., SMITH, V. R., KLOTZ, J. L., GOTO, R. M., GASCON, R. L., DRUSHELLA, M. M., Mouse monoclonal antibody to a melanoma-carcinoma-associated antigen synthesized by a human melanoma cell line propagated in serum-free medium, *Cancer Res.*, **42**: 3142 - 3147, 1982.
- [24] CHIORAZZI, N., WASSERMAN, R. L., KUNKEL, H. G., Use of Epstein-Barr virus-transformed B cell lines for the generation of immunoglobulin producing human B cell hybridomas, *J. Exp. Med.*, **156**: 930 - 935, 1982.
- [25] CLEVELAND, W. L., WASSERMAN, N. H., SARANGARAJAN, R., PENN, A. S., ERLANGER, B. F., Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idiotypic mechanism, *Nature*, **305**: 56 - 57, 1983.
- [26] CLEVELAND, W. L., WOOD, I., ERLANGER, B. F., Routine large-scale production of monoclonal antibodies in a protein-free culture medium, *J. Immunol. Methods.*, **56**: 221 - 234, 1983.
- [27] COSIMI, A. B., Anti-T-cell monoclonal antibodies in transplantation therapy, *Transplant. Proc.*, **15**: 1889 - 1892, 1983.
- [28] COURAUD, P. O., LU, B. Z., SCHMUTZ, A., DURIEU-TRAUTMANN, O., DELAVIER-KLUTCHO, C., HOEBEKE, J., STROSBERG, A. D., Immunological studies of β -adrenergic receptors, *J. Cell. Biochem.*, **21**: 187 - 193, 1983.
- [29] COURAUD, P. O., LU, B. Z., STROSBERG, A. D., Cyclical anti-idiotypic response to anti-hormone antibodies due to neutralization by autologous anti-anti-idiotypic antibodies which bind hormone, *J. Exp. Med.*, **157**: 1369 - 1378, 1983.

- [30] CRAWFORD, D. H., HARRISON, J. F., BARLOW, M. J., WINGER, L., HUEHNS, E. R., Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen, *Lancet*, i: 386 - 388, 1983.
- [31] CRAWFORD, D. H., HUEHNS, E. R., EPSTEIN, M. A., Therapeutic use of human monoclonal antibodies, *Lancet*, i: 1040, 1983.
- [32] CROCE, C. M., LINNENBACH, A., HALL, W., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus, *Nature*, 288: 488 - 489, 1980.
- [33] CUTTITTA, F., ROSEN, S., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., Monoclonal antibodies that demonstrate specificity for several types of human lung cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 4591 - 4595, 1981.
- [34] DAVIS, F. M., DICKE, K. A., JAGANNATH, S., RAO, P. N., Detection of leukemic cell colonies in agar plates by immunostaining for human malignancy-associated nucleolar antigen, *J. Immunol. Methods*, 58: 349 - 357, 1983.
- [35] DEAN, J., SCHECHTER, A. N., Conformation-specific antibodies to the α chain COOH terminus of hemoglobin A, *J. Biol. Chem.*, 254: 9185 - 9193, 1979.
- [36] DEARNALEY, D. P., SLOANE, J. P., ORMEROD, M. G., STEELE, K., COOMBES, R. C., CLINK, H. M. D., POWLES, T. J., FORD, H. T., GAZET, J. C., NEVILLE, A. M., Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen, *Br. J. Cancer*, 44: 85 - 90, 1981.
- [37] DENG, C., EL-AWAR, N., CICCARELLI, J., TERASAKI, P. I., BILLING, R., LAGASSE, L., Cytotoxic monoclonal antibody to a human leiomyosarcoma, *Lancet*, i: 403 - 405, 1981.
- [38] DILLMAN, R. O., SHAWLER, D. L., SOBOL, R. E., COLLINS, H. A., BEAUREGARD, J. C., WORMSLEY, S. B., ROYSTON, I., Murine monoclonal antibody therapy in 2 patients with chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 59: 1036 - 1045, 1982.
- [39] DIPPOLD, W. G., LLOYD, K. O., LI, L. T. C., IKEDA, H., OETTGEN, H. F., OLD, L. J., Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 6114 - 6118, 1980.
- [40] EHRlich, P. H., MOYLE, W. R., Cooperative immunoassays: Ultrasensitive assays with mixed monoclonal antibodies, *Science*, 221: 279 - 281, 1983.
- [41] EISENBARTH, G. S., LINNENBACH, A., JACKSON, R., SCEARCE, R., CROCE, C. M., Human hybridomas secreting anti-islet autoantibodies, *Nature*, 300: 264 - 267, 1982.
- [42] EMBLETON, M. J., GUNN, B., BALDWIN, R. W., Monoclonal antibodies against human osteogenic sarcoma cells, *Br. J. Cancer*, 43: 568 - 569, 1981.
- [43] EPENETOS, A. A., CANTI, G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., CURLING, M., BODMER, W. F., Use of two epithelium-specific monoclonal antibodies for diagnosis of malignancy in serous effusions, *Lancet*, ii: 1004 - 1006, 1982.
- [44] EPENETOS, A. A., MATHER, S., GRANOWSKA, M., NIMMON, C. C., HAWKINS, L. R., BRITTON, K. E., SHEPHERD, J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., DURBIN, H., MALPAS, J. S., BODMER, W. F., Targeting of iodine-123-labelled tumour-associated monoclonal antibodies to ovarian, breast, and gastrointestinal tumours, *Lancet*, ii: 999 - 1004, 1982.
- [45] FARRANDS, P. A., PIMM, M. V., EMBLETON, M. J., PERKINS, A. C., HARDY, J. D., BALDWIN, R. W., HARDCASTLE, J. D., Radioimmunodetection of human colorectal cancers by an anti-tumor monoclonal antibody, *Lancet*, ii: 397 - 400, 1982.

- [46] FAZEKAS de St. GROTH, S., Automated production of monoclonal antibodies in cytotat. *J. Immunol. Methods*, **57**: 121 - 136, 1983.
- [47] FAZEKAS de St. GROTH, S., SCHEIDEGGER, D., Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, *J. Immunol. Methods*, **35**: 1 - 21, 1980.
- [48] FINAN, P. J., WIGHT, D. G. D., LENNOX, E. S., SACKS, S. H., BLEEHEN, N. M., Human blood group isoantigen expression on normal and malignant gastric epithelium studied with anti-A and anti-B monoclonal antibodies, *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.*, **70**: 679 - 685, 1983.
- [49] FOON, K. A., Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody, *N. Engl. J. Med.*, **307**: 686, 1982.
- [50] FOON, K. A., SCHROFF, R. W., GALE, R. P., Surface markers on leukemia and lymphoma cells. Recent advances, *Blood*, **60**: 1 - 19, 1982.
- [51] FOSTER, C. S., EDWARDS, P. A. W., DINSDALE, E. A., NEVILLE, A. M., Monoclonal antibodies to the human mammary gland. I. Distribution of determinants in non-neoplastic mammary and extra-mammary tissues, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.*, **394**: 279 - 293, 1982.
- [52] FOSTER, C. S., DINSDALE, E. A., EDWARDS, P. A. W., NEVILLE, A. M., Monoclonal antibodies to human mammary gland. II. Distribution of determinants in breast carcinomas, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.*, **394**: 295 - 305, 1982.
- [53] FOX, P. C., BERENSTEIN, E. H., SIRAGANIAN, R. P., Enhancing the frequency of antigen-specific hybridomas, *Eur. J. Immunol.*, **11**: 431 - 434, 1981.
- [54] FRANKEL, A. E., CHU, T. M., ROUSE, R. V., WANG, M. C., HERZENBERG, L. A., Monoclonal antibodies to a human prostate antigen, *Cancer Res.*, **42**: 3714 - 3718, 1982.
- [55] FRASER, C. M., VENTER, J. C., Monoclonal antibodies to β -adrenergic receptors: use in purification and molecular characterization of β -receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 7034 - 7038, 1980.
- [56] — The size of the mammalian lung β_2 -adrenergic receptor as determined by target size analysis and immunoaffinity chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**: 21 - 29, 1982.
- [57] GALFRE, G., HOWE, S. C., MILSTEIN, C., BUTCHER, G. W., HOWARD, J. C., Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, *Nature*, **266**: 550 - 552, 1977.
- [58] GEFTER, M. L., MARGULIES, D. H., SCHARFF, M. D., A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells, *Somatic Cell Genet.*, **3**: 231 - 236, 1977.
- [59] GLASSY, M. C., HANDLEY, H., ASTARITA, R., STRAYER, D., LOWE, D. H., ROYSTON, I., The use of lymphocytes isolated from regional draining lymph nodes of cancer patients to generate human monoclonal antibodies, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **24**: 223, 1983.
- [60] GODING, J. W., Antibody production by hybridomas, *J. Immunol. Methods*, **39** S1: 285 - 308, 1980.
- [61] GOLDENBERG, D. M., NEVILLE, A. M., CARTER, A. C., GO, V. L. W., HOLYOKE, E. D., ISSELBACHER, K. J., SCHEIN, P. S., SCHWARTZ, M., CEA (carcinoembryonic antigen): Its role as a marker in the management of cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **101**: 239-242, 1981.
- [62] GOLDSTEIN, G., LIFTER, J., MITTLER, R., Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes, [w] *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, red. Mc MICHAEL, A, J.,

- FABRE, J. W., Academic Press (London), 39 - 70, 1982.
- [63] GREAVES, M. F., Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia, *Cancer Res.*, **41**: 4752 - 4766, 1981.
- [64] GREENE, G. L., NOLAN, C., ENGLER, J. P., JENSEN, E. V., Monoclonal antibodies to human estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 5115 - 5119, 1980.
- [65] GULICK, W. J., TZARTOS, S., LINDSTROM, J., Monoclonal antibodies as probes for acetylcholine receptor structure. I. Peptide mapping, *Biochemistry*, **20**: 2173 - 2180, 1982.
- [66] HANCOCK, W. H., BECKER, G. J., ATKINS, R. C., A comparison of fixatives and immunohistochemical techniques for use with monoclonal antibodies to cell surface antigens, *Am. J. Clin. Pathol.*, **78**: 825 - 831, 1982.
- [67] HANCOCK, W. H., THOMSON, N. M., ATKINS, R. C., Monoclonal antibody analysis of interstitial cell infiltrate during human renal allograft rejection, *Transplant. Proc.*, **15**: 352 - 355, 1983.
- [68] HANSEN, E. J., GULIG, P. A., ROBERTSON, S. M., FRISCH, C. F., HAANES, E. J., Immunoprotection of rats against *Haemophilus influenzae* type B disease mediated by monoclonal antibody against a *Haemophilus* outer membrane protein, *Lancet*, **i**: 366 - 368, 1982.
- [69] HANSEN, J. A., MARTIN, P. J., KAMOUN, M., TOROK-STORB, B., NEWMAN, W., NOWINSKI, R. C., THOMAS, E. D., Monoclonal antibodies recognizing human T cells: Potential role for preventing graft-versus-host reactions following allogeneic marrow transplantation, *Transplant. Proc.*, **13**: 1133 - 1137, 1981.
- [70] HENGARTNER, H., LUZZATI, A. L., SCHREIER, M., Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **81**: 92 - 99, 1978.
- [71] HERLYN, D. M., STEPLEWSKI, Z., HERLYN, M. F., KOPROWSKI, H., Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody, *Cancer Res.*, **40**: 717 - 721, 1980.
- [72] HERLYN, D., POWE, J., ALAVI, A., MATTIS, J. A., HERLYN, M., ERNST, C., VAUM, R., KOPROWSKI, H., Radioimmunodetection of human tumor xenografts by monoclonal antibodies, *Cancer Res.*, **43**: 2731 - 2735, 1983.
- [73] HERLYN, M., SEARS, H. F., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric, and pancreatic carcinoma, *J. Clin. Immunol.*, **2**: 135 - 140, 1982.
- [74] HITTELMAN, W. N., DAVIS, F. M., KEATING, M. J., Implications of premature chromosome condensation findings in human leukemia, [w] „Cancer: Etiology and Prevention” (wyd. R. G. Crispin), Elsevier, New York, 1 - 20, 1983.
- [75] HOUSTON, L. L., NOWINSKI, R. C., BERNSTEIN, I. D., Specific in vivo localization of monoclonal antibodies directed against the thy 1.1 antigen, *J. Immunol.*, **125**: 837 - 843, 1980.
- [76] IMAI, M., NOMURA, M., GOTANDA, T., SANO, T., TACHIBANA, K., MIYAMOTO, H., TAKAHASHI, K., TOYAMA S., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M., Demonstration of two distinct antigenic determinants on hepatitis B e antigen by monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, **128**: 69 - 72, 1982.
- [77] JONAK, Z. L., KENNETT, R. H., BECHTOL, K. B., Detection of neuro-

- blastoma cells in human bone marrow using a combination of monoclonal antibodies, *Hybridoma*, **1**: 349-368, 1982.
- [78] JONKER, M., MALISSEN, B., van VREESWIJK, W., MAWAS, C., GOLDSTEIN, G., TAX, W., BALNER, H., In vivo application of monoclonal antibodies specific for human T cell subset permits the modification of immune responsiveness in rhesus monkeys, *Transplant. Proc.*, **15**: 635-650, 1983.
- [79] KEIZER, H., LEVY, R., BROVALL, C., CIVIN, C. I., FULLER, D. J., HSU, S. H., LEVENTHAL, B. G., MILLER, R. A., MILVENAN, E. S., SANTOS, G. W., WHARAM, M. D., Autologous bone marrow transplantation in T-cell malignancies: A case report involving in vitro treatment of marrow with pan-T-cell monoclonal antibody, *J. Biol. Response Modifiers*, **1**: 233-243, 1982.
- [80] KEMSHEAD, J. T., FRITSCHY, J., GOLDMAN, A., MALPAS, J. S., PRITCHARD, J., Use of panels of monoclonal antibodies in the differential diagnosis of neuroblastoma and lymphoblastic disorders, *Lancet*, **i**: 12-14, 1983.
- [81] KEMSHEAD, J. T., GIBSON, F. J., UGELSTAD, J., REMBAUM, A., A flow system for the in vitro separation of tumour cells from bone marrow using monoclonal antibodies and magnetic microspheres, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **24**: 217, 1983.
- [82] KENNEL, S. J., LANKFORD, T., FLYNN, K. M., Therapy of a murine sarcoma using syngeneic monoclonal antibody, *Cancer Res.*, **43**: 2843-2847, 1983.
- [83] KENNETT, R. H., CILBERT, F., Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain, *Science*, **203**: 1120-1121, 1979.
- [84] KERMAN, R. H., VAN BUREN, C. T., PAYNE, W., FLECHNER, S., KAHAN, B. D., Monitoring of T-cell subsets and immune events in renal allograft recipients, *Transplant. Proc.*, **15**: 1170-1172, 1983.
- [85] KIRCH, M. E., HAMMERLING, U., Immunotherapy of murine leukemias by monoclonal antibody. I. Effect of passively administered antibody on growth of transplanted tumor cells, *J. Immunol.*, **127**: 805-810, 1981.
- [86] KOHLER, G., MILSTEIN, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **256**: 495-497, 1975.
- [87] KOHLER, G., MILSTIEN, C., Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur. J. Immunol.*, **6**: 511-519, 1976.
- [88] KOPROWSKI, H., SEARS, H. F., HERLYN, M., STEPLEWSKI, Z., Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma, *Science*, **212**: 53-55, 1981.
- [89] KOPROWSKI, H., STEPLEWSKI, Z., MITCHELL, K., HERLYN, M., HERLYN, D., FUHRER, P., Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies, *Somatic Cell Genet.*, **5**: 957-972, 1979.
- [90] KOZBOR, D., RODER, J. C., The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes., *Immunol. Today*, **4**: 72-79, 1983.
- [91] KOZBOR, D., LAGARDE, A. E., RODER, J. C., Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 6651-6655, 1982.
- [92] KRAUSZ, T. J., van NOORDEN, S., EVANS, D. J., Experience of the Oxford tumour marker, *Lancet*, **i**: 1097, 1983.
- [93] KULL, F. C., JACOBS, S., SU, Y. F., SVOBODA, M. E., VAN WYK, J. J., CUATRECASAS, P., Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C, *J. Biol. Chem.*, **258**: 6561-6566, 1983.

- [94] KUNOS, G., KAN, W. H., GREGUSKI, R., VENTER, J. C., Selective affinity labeling and molecular characterization of hepatic α_1 -adrenergic receptors with (^3H)-phenoxybenzamine, *J. Biol. Chem.*, **258**: 326 - 332, 1983.
- [95] LARSON, S. M., BROWN, J. P., WRIGHT, P. W., CARRASQUILLO, J. A., HELLSTROM, I., HELLSTROM, K. E., Imaging of melanoma with I-131-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.*, **24**: 123 - 129, 1983.
- [96] LEHMANN, F. G., WEGENER, T., Alpha-fetoprotein in liver cirrhosis. II. Early detection of hepatoma, w „Carminoembryonic Proteins. I.” (wyd. F. G. Lehmann), Elsevier, Amsterdam, 233 - 245, 1979.
- [97] LEVINE, G., BALLOU, B., REILAND, J., SOLTER, D., GUMERMAN, L., HAKALA, T., Localization of I-131-labeled tumor-specific monoclonal antibody in the tumor-bearing BALB/c mouse, *J. Nuclear Med.*, **21**: 570 - 573, 1980.
- [98] LEVY, R., DILLEY, J., FOX, R. I., WARNKE, R., A human thymusleukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 6552 - 6556, 1979.
- [99] LEWIS, R., FURIE, B. C., FURIE, B., Conformation-specific monoclonal antibodies directed against the calcium-stabilized structure of human prothrombin, *Biochemistry*, **22**: 948 - 954, 1983.
- [100] LITTLEFIELD, J. W., Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science*, **145**: 709 - 710, 1964.
- [101] LOCKHART, C. G., STINSON, R. S., MARGRAF, H. W., PARKER, C. W., PHILPOTT, G. W., Production of anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody by somatic cell hybridization, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **39**: 928, 1980.
- [102] LUBEN, R. A., BRAZEAU, P., BOHLEN, P., GUILLEMIN, R., Monoclonal antibodies to hypothalamic growth hormone-releasing factor with picomoles of antigen, *Science*, **218**: 887 - 889, 1982.
- [103] LUMBROSO, J., BERCHE, C., MACH, J. P., ROUGIER, P., AUBRY, F., BUCHEGGER, F., LASSER, P., PARMENTIER, C., TUBIANA, M., Utilisation en tomoscintigraphie d'anticorps monoclonaux radio-marques pour la detection chez l'homme des cancers digestifs et des cancers medullaires de la thyroide, *Bull. Cancer*, **70**: 96 - 102, 1983.
- [104] LUZZATI, A. L., HENGARTNER, H., SCHREIER, M. H., Induction of plaqueforming cells in cultured human lymphocytes by combined action of antigen and EB virus, *Nature*, **269**: 419 - 420, 1977.
- [105] MAZAHERI, R., LAUPACIS, A., KEOWN, P., HOWSON, W., SINCLAIR, N. R., STILLER, C. R., Lymphocyte subsets in the allograft recipient: Correlation of helper to suppressor ratio with clinical events, *Transplant. Proc.*, **14**: 676 - 678, 1982.
- [106] MCGEE, J. O., WOODS, J. C., ASHALL, F., BRAMWELL, M. E., HARRIS, H., A new marker for human cancer cells. 2. Immunohistochemical detection of the Ca antigen in human tissues with the Ca1 antibody, *Lancet*, **ii**: 7 - 10, 1982.
- [107] METZGAR, R. S., GAILLARD, M. T., LEVINE, S. J., TUCK, F. L., BOSSEN, E. H., BOROWITZ, M. J., Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies, *Cancer Res.*, **42**: 601 - 608, 1982.
- [108] MILLER, G., LIPMAN, M., Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**: 190 - 194, 1973.

- [109] MILLER, R. A., LEVY, R., Response of cutaneous T cell lymphoma to therapy with hybridoma monoclonal antibody, *Lancet*, ii: 226 - 230, 1981.
- [110] MILLER, R. A., MALONEY, D. G., McKILLOP, J., LEVY, R., In vivo effects of murine hybridoma monoclonal antibody in a patient with T-cell leukemia, *Blood*, 58: 78 - 86, 1981.
- [111] MILLER, R. A., MALONEY, D. G., LEVY, R. A., Reply to letter „Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody”, *N. Engl. J. Med.*, 307: 686 - 687, 1982.
- [112] MILLER, R. A., MALONEY, D. G., WARNKE, R., LEVY, R., Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.*, 306: 517 - 522, 1982.
- [113] MILSTEIN, C., Monoclonal antibodies, *Sci. American*, 243: 56 - 64, 1980.
- [114] MILSTEIN, C., LENNOX, E., The use of monoclonal antibody techniques in the study of developing cell surfaces, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 14: 1 - 32, 1980.
- [115] MINNA, J. D., CUTTITTA, F., ROSEN, S., BUNN, P. A., CARNEY, D. N., GAZDAR, A. F., KRASNOW, S., Methods for production of monoclonal antibodies with specificity for human lung cancer cells, *In vitro*, 17: 1058 - 1070, 1981.
- [116] MOSHAKIS, V., McILHINNEY, R. A. J., RAGHAVAN, D., NEVILLE, A. M., Monoclonal antibodies to detect human tumours: An experimental approach, *J. Clin. Pathol.*, 34: 314 - 319, 1981.
- [117] MURAKAMI, H., MASUI, H., SATO, G. H., SUEOKA, N., CHOW, T. P., KANOSUEOKA, T., Growth of hybridoma cells in serum-free medium: Ethanolamine is an essential component, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 1158 - 1162, 1982.
- [118] NADLER, L. M., RITZ, J., HARDY, R., PESANDO, J. M., SCHLOSSMAN, S. F., A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin, *J. Clin. Invest.*, 67: 134 - 140, 1981.
- [119] NADLER, L. M., STASHENKO, P., HARDY, R., KAPLAN, W. D., BUTTON, L. N., KUFEL, D. W., ANTMAN, K. H., SCHLOSSMAN, S. F., Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen, *Cancer Res.*, 40: 3147 - 3154, 1980.
- [120] NAIEM, M., GERDES, J., ABDULAZIZ, Z., SUNDERLAND, C. A., ALLINGTON, M. J., STEIN, H., MASON, D. Y., The value of immunohistological screening in the production of monoclonal antibodies, *J. Immunol. Methods*, 50: 145 - 160, 1982.
- [121] NARITOKU, W. Y., TAYLOR, C. R., A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: An evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 253 - 260, 1982.
- [122] NILSSON, K., SCHEIRER, W., MERTEN, O. W., OSTBERG, L., LIEHL, E., KATINGER, H. W. D., MOSBACH, K., Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules, *Nature*, 302: 629 - 630, 1983.
- [123] OKUNEWICK, J. P., MEREDITH, R. F., BRAUNSCHWEIGER, P. G., BUFFO, M. J., JONES, D. L., BESCHORNER, W. E., Definition and prevention of graft-versus-host disease with the use of monoclonal antibodies, *Exp. Hematol.*, 10 S12: 12 - 22, 1982.
- [124] OLSSON, L., Monoclonal antibodies in clinical immunobiology, *Allergy*, 38: 145 - 154, 1983.

- [125] OLSSON, L., KAPLAN, H.S., Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigen specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 5429 - 5431, 1980.
- [126] OSBAND, M., CAVAGNARO, J., KUPCHIK, H. Z., Successful production of human-human hybridoma IgG antibodies against Rh(D) antigen, *Blood*, **60** S1: 81a (Abstr.), 1982.
- [127] PALLESEN, G., JEPSEN, F. L., HASTRUP, J., IPSEN, A., HVIDBERG, N., Experience with the Oxford tumour marker (Ca1) in serous fluids, *Lancet*, **i**: 1326, 1983.
- [128] PARDUE, R. L., BRADY R. C., PERRY, G. W., DEDMAN, J. R., Production of monoclonal antibodies against calmodulin by in vitro immunization of spleen cells, *J. Cell Biol.*, **96**: 1149 - 1154, 1983.
- [129] PARKS, D. R., BRYAN, V. M., OI, V. T., HERZENBERG, L. A., Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 1962 - 1966, 1979.
- [130] PIZZOLO, G., SLOANE, J., BEVERLEY, P., THOMAS, J. A., BRADSTOCK, K. F., MATTINGLY, S., JANOSSY, G., Differential diagnosis of malignant lymphoma and non-lymphoid tumors using monoclonal antileukocyte antibody, *Cancer*, **46**: 2640 - 2647, 1980.
- [131] POYNTON, C. H., DICKE, K. A., CULBERT, S., FRANKEL, L. S., JAGANNATH, S., READING, C. L., Immunomagnetic removal of CALLA positive cells from human bone marrow, *Lancet*, **i**: 524, 1983.
- [132] PRENTICE, H. G., BLACKLOCK, H. A., JANOSSY, G., BRADSTOCK, K. F., SKEGGS, D., GOLDSTEIN, G., HOFFBRAND, A. V., Use of anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 to prevent acute graft-versus-host disease in allogeneic bone-marrow transplantation for acute leukaemia, *Lancet*, **i**: 700 - 703, 1982.
- [133] PRENTICE, H. G., JANOSSY, G., PRICE-JONES, L., TREJDOSIEWICZ, L. K., PANJWANI, D., GRAPHAKOS, S., IVORY, K., BLACKLOCK, H. A., GILMORE, M. J., TIDMAN, N., SKEGGS, D. B. L., BALL, S., PATTERSON, J., HOFFBRAND, A. V., Depletion of T- lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients, *Lancet*, **i**: 472 - 476, 1984.
- [134] REEVES, W. C., COREY, L., ADAMS, H. G., VONTVER, L. A., HOLMES, K. K., Risk of recurrence after first episodes of genital Herpes, *N. Engl. J. Med.*, **305**: 315 - 319, 1981.
- [135] REINHERZ, E. L., O'BRIEN, C., ROSENTHAL, P., SCHLOSSMAN, S. F., The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, **125**: 1269 - 1274, 1980.
- [136] RITZ, J., PESANDO, J. M., NOTIS-McCONARTY, J., CLAVELL, L. A., SALLAN, S. E., SCHLOSSMAN, S. F., Use of monoclonal antibodies as diagnostic and therapeutic reagents in acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res.*, **41**: 4771 - 4775, 1981.
- [137] RITZ, J., PESANDO, J. M., NOTIS-McCONARTY, J., LAZARUS, H., SCHLOSSMAN, S. F., A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen, *Nature*, **283**: 583 - 585, 1980.
- [138] RITZ, J., PESANDO, J. M., SALLAN, S. E., CLAVELL, L. A., NOTIS-McCONARTY, J., ROSENTHAL, P., SCHLOSSMAN, S. F., Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody, *Blood*, **58**: 141 - 152, 1981.
- [139] RITZ, J., BAST, R. C., CLAVELL, L. A., HERCEND, T., SALLAN, S. E.,

- LIPTON, J. M., FEENEY, M., NATHAN, D. G., SCHLOSSMAN, S. F., Auto-
logous bone-marrow transplantation in CALLA-positive acute lymphoblastic
leukemia after in vitro treatment with J5 monoclonal antibody and com-
plement, *Lancet*, ii: 60 - 63, 1982.
- [140] RODT, H., THIERFELDER, S., KUMMER, U., Effect of monoclonal anti-
bodies on GVHD in minor and MHC-incompatible mouse models, *Transplant.*
Proc., 15: 1472 - 1476, 1983.
- [141] ROSEN, A., PERSSON, K., KLEIN, G., Human monoclonal antibodies to
a genus-specific chlamydial antigen, produced by EBV-transformed B cells
J. Immunol., 130: 2899 - 2902, 1983.
- [142] RUITER, D. J., BHAN, A. K., HARRIST, T. J., SOBER, A. J., MIHM, M. C.,
Major histocompatibility antigens and mononuclear inflammatory infiltrate
in benign nevomelanocytic proliferations and malignant melanoma, *J. Im-
munol.*, 129: 2808 - 2815, 1982.
- [143] SCHLOM, J., WUNDERLICH, D., TERAMOTO, Y. A., Generation of human
monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells, *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 6841 - 6845, 1980.
- [144] SCHMALJOHN, A. L., JOHNSON, E. D., DALRYMPLE, J. M., COLE, G. A.,
Non-neutralizing monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus en-
cephalitis, *Nature*, 297: 70 - 72, 1982.
- [145] SCHNEGG, J. F., DISERENS, A. C., CARREL, S., ACCOLLA, R. S., TRI-
BOLET, N., Human glioma-associated antigens detected by monoclonal anti-
bodies, *Cancer Res.*, 41: 1209 - 1213, 1981.
- [146] SCHNEIDER, M. D., EISENBARTH, G. S., Transfer plate radioassay using
cell monolayers to detect anti-cell surface antibodies synthesized by lom-
phocyte hybridomas, *J. Immunol. Methods*, 29: 331 - 342, 1979.
- [147] SCHREIBER, A. B., COURAUD, P., ANDRE, C., VRAY, B., STROBERG,
A. D., Anti-alprenol anti-idiotypic antibodies bind to B-adrenergic receptors
and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase, *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U.S.A., 77: 7385 - 7389, 1980.
- [148] SEARS, H. F., HERLYN, M., DEL VIL ANO, B., STEPLEWSKI, Z., KO-
PROWSKI, H., Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associ-
ated antigen. II. A longitudinal evaluation of patients with colorectal cancer,
J. Clin. Immunol., 2: 141 - 149, 1982.
- [149] SEARS, H. F., HERLYN, D., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., Effects of
monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adeno-
carcinoma, *J. Biol. Resp. Modif.*, 3: 138 - 150, 1984.
- [150] SEARS, H. F., MATTIS, J., HERLYN, D., HAYRY, P., ATKINSON, B.,
ERNST, C., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., Phase-I-clinical trial of
monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours, *Lancet*, i:
762 - 765, 1982.
- [151] SECHER, D. S., BURKE, D. C., A monoclonal antibody for large-scale puri-
fication of human leukocyte interferon, *Nature*, 285: 446 - 450, 1980.
- [152] SHARP, T. G., SACHS, D. H., FAUCI, A. S., MESSERSCHMIDT, G. L.,
ROSENBERG, S. A., T-cell depletion of human bone marrow using monoclon-
al antibody and complement-mediated lysis, *Transplantation*, 35: 112 - 120,
1983.
- [153] SHOENFELD, Y., HSU-LIN, S. C., GABRIELS, J. E., SILBERSTEIN, L. E.,
FURIE, B. C., FURIE, B., STOLLAR, B. D., SCHWARTZ, R. S., Production
of autoantibodies by human-human hybridomas, *J. Clin. Invest.*, 70: 205 - 208,
1982.

- [154] SHOIVAL, D., SHAFRITZ, D. A., ZURAWSKI, V. R., ISSELBACHER, K. J., WANDS, J. R., Immunotherapy in nude mice of human hepatoma using monoclonal antibodies against hepatitis B virus, *Nature*, **298**: 567-569, 1982.
- [155] SIKORA, K., WRIGHT, R., Human monoclonal antibodies to lung cancer antigens, *Br. J. Cancer*, **43**: 696-700, 1981.
- [156] SIKORA, K., ALDERSON, T., PHILLIPS, J., WATSON, J. V., Human hybridomas from malignant gliomas, *Lancet*, **i**: 11-14, 1982.
- [157] SIMPSON, H. W., CANDLISH, W., LIDDLE, C., MCGREGOR, F. M., MUTCH, F., TINKLEN, B., Experience of the Oxford tumour marker, *Lancet*, **i**: 1097, 1983.
- [158] SMEDLEY, H. M., FINAN, P., LENNOX, E. S., RITSON, A., TAKEI, F., WRAIGHT, P., SIKORA, K., Localisation of metastatic carcinoma by a radiolabelled monoclonal antibody, *Br. J. Cancer*, **47**: 253-259, 1983.
- [159] SMITH, M. A., CLEGG, J. A., SNARY, D., TREJDOSIEWICZ, A. J., Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with an IgM monoclonal antibody, *Parasitology*, **84**: 83-91, 1982.
- [160] STEINITZ, M., KLEIN, G., EBV-transformation of surface IgA-positive human lymphocytes, *J. Immunol.*, **125**: 194-196, 1980.
- [161] STEINITZ, M., KLEIN, G., KOSKIMIES, S., MAKEL, O., EB-virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody, *Nature*, **269**: 420-422, 1977.
- [162] STEPHENS, R. S., TAM, M. R., KUO, C. C., NOWINSKI, R. C., Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: Antibody specificities and antigen characterization, *J. Immunol.*, **128**: 1083-1089, 1982.
- [163] STEPLEWSKI, Z., CHANG, T. H., HERLYN, M., KOPROWSKI, H., Release of monoclonal-antibody defined-antigens by human colorectal carcinoma and melanoma cells, *Cancer Res.*, **41**: 2723-2727, 1981.
- [164] STEPLEWSKI, Z., HERLYN, M., HERLYN, D., CLARK, W. H., KOPROWSKI, H., Reactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies with melanoma cells freshly isolated from primary and metastatic melanoma, *Eur. J. Immunol.*, **9**: 94-96, 1979.
- [165] STOCKER, J. W., HEUSSER, C. H., Methods for binding cells to plastic: Application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens, *J. Immunol. Methods*, **26**: 87-95, 1979.
- [166] STREEM, S. B., NOVICK, A. C., BRAUN, W. E., STEINMULLER, D., Anti-lymphocyte and antithymocyte globulines, *Transplant. Proc.*, **15**: 590-594, 1983.
- [167] TAGGART, R. T., SAMLOFF, I. M., Stable antibody-producing murine hybridomas, *Science*, **219**: 1228-1230, 1983.
- [168] TAKAHASHI, H., TERASAKI, P. I., KINUKAWA, T., CHIA, D., MIURA, K., OKAZAKI, H., IWAKI, Y., TAGUCHI, Y., HARDIWIWIDJAJA, S., ISHIZAKI, M., BILLING, R., Reversal of transplant rejection by monoclonal antilymphocyte antibody, *Lancet*, **ii**: 1155-1158, 1983.
- [169] TAYLOR, D. W., BUTTERWORTH, A. E., Monoclonal antibodies against surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni*, *Parasitology*, **84**: 65-82, 1982.
- [170] TERAMOTO, Y. A., MARIANI, R., WUNDERLICH, B., SCHLOM, J., The immunohistochemical reactivity of human monoclonal antibody with tissue sections of human mammary tumors, *Cancer*, **50**: 241-249, 1982.
- [171] THIERFELDER, S., HOFFMANN-FEZER, G., RODT, H., DOXIADIS, I., EULITZ, M., KUMMER, V., Antilymphocyte antibodies and marrow transplantation. VI. Absence of immunosuppression in vivo after injection of monoclo-

- nal antibodies blocking graft-versus-host reaction and humoral antibody formation in vitro, *Transplantation*, **35**: 249 - 254, 1983.
- [172] THOMPSON, J. J., HERLYN, M. F., ELDER, D. E., CLARK, W. H., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., Expression of DR-antigens in freshly frozen human tumors, *Hybridoma*, **1**: 161 - 168, 1982.
- [173] TOSATO, G., MAGRATH, I., KOSKI, I., DOOLEY, N., BLAESE, M., Activation of suppressor T cells during Epstein-Barr-virus-induced infectious mononucleosis, **301**: 1133 - 1137, 1979.
- [174] TSUNG, Y. K., MILUNSKY, A., ALPERT, E., Derivation and characterization of monoclonal hybridoma antibody specific for human alpha-fetoprotein, *J. Immunol. Methods*, **39**: 363 - 368, 1980.
- [175] TZARTOS, S., LINDSTROM, J. M., Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: Localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 755 - 759, 1980.
- [176] TZARTOS, S. J., SEYBOLD, M., LINDSTROM, J., Specificity of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 188 - 192, 1981.
- [177] VALENTE, W. A., VITTI, P., ROTELLA, C. M., VAUGHAN, M. M., ALOJ, S. M., GIROLLMAN, E. F., AMBESI-IMPIOBATO, F. S., KOHN, L. D., Antibodies that promote thyroid growth. A distinct population of thyroid-stimulating antibodies, *N. Engl. J. Med.*, **309**: 1028 - 1034, 1983.
- [178] VALENTE, W. A., VITTI, P., YAVIN, Z., YAVIN, E., ROTELLA, C. M., GROLLMAN, E. F., TROCCAFONDI, R. S., KOHN, L. D., Graves' monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: Stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 6680 - 6684, 1982.
- [179] VENTER, J. C., Muscarinic cholinergic receptor structure. Receptor size, membrane orientation and absence of major phylogenetic structural diversity, *J. Biol. Chem.*, **258**: 4842 - 4848, 1983.
- [180] VENTER, J. C., EDDY, B., HALL, L. M., FRASER, C. M., Monoclonal antibodies detect the conservation of muscarinic cholinergic receptor structure from *Drosophila* to human brain and possible structural homology with α_1 -adrenergic receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 272 - 276, 1984.
- [181] VOLIMERS, H. P., BIRCHMEIER, W., Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 3729 - 3733, 1983.
- [182] WADE, N., Hybridomas: The making of a revolution, *Science*, **215**: 1073 - 1075, 1982.
- [183] WAHL, R. L., PARKER, C. W., PHILPOTT, G. W., Improved radioimaging and tumour localization with monoclonal F(ab')₂, *J. Nucl. Med.*, **24**: 317 - 325, 1983.
- [184] WALDMANN, H., HALE, C., CIVIDALLI, G., WESHLER, Z., MANOR, D., RACHMILEWITZ, E. A., POLLIAK, A., OR, R., WEISS, L., SAMUEL, S., BRAUTBAR, C., SLAVIN, S., Elimination of graft-versus-host disease by in vitro depletion of alloreactive lymphocytes with a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (CAMPATH-1), *Lancet*, **ii**: 483 - 486, 1984.
- [185] WARE, J. L., PAULSON, D. F., PARKS, S. F., WEBB, K. S., Production of monoclonal antibody α PRO3 recognizing a human prostatic carcinoma antigen, *Cancer Res.*, **42**: 1215 - 1222, 1982.

- [186] WASSERMANN, N. H., PENN, A. S., FREIMUTH, P. I., TREPTOW, N., WENTZEL, S., CLEVELAND, W. L., ERLANGER, B. F., Anti-idiotypic route to antiacetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 4810 - 4814, 1982.
- [187] WATSON, J. V., ALDERSON, T., SIKORA, K., PHILLIPS, J., Subcutaneous culture chamber for continuous infusion of monoclonal antibodies, *Lancet*, **i**: 99 - 100, 1983.
- [188] WEBB, K. S., WARE, J. L., PARKS, S. F., BRINER, W. H., PAULSON, D. F., Monoclonal antibodies to different epitopes on a prostate tumor-associated antigen: Implications for immunotherapy, *Cancer Immunol. Immunother.*, **14**: 155 - 166, 1983.
- [189] WEINSTEIN, J. N., PARKER, R. J., KEENAN, A. M., DOWER, S. K., MORSE, H. C., SIEBER, S. M., Monoclonal antibodies in the lymphatics: Toward the diagnosis and therapy of tumor metastases, *Science*, **218**: 1334 - 1337, 1982.
- [190] WEINSTEIN, J. N., STELLER, M. A., KEENAN, A. M., COVELL, D. G., KEY, M. E., SIEBER, S. M., OEDHAM, R., HWANG, K. M., PARKER, R. J., Monoclonal antibodies in the lymphatics: Selective delivery to lymph node metastases of a solid tumor, *Science*, **222**: 423 - 426, 1983.
- [191] WEISS, R. A., Retroviruses produced by hybridomas, *N. Engl. J. Med.*, **307**: 1587, 1982.
- [192] WIELS, J., FELLOUS, M., TURSZ, T., Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 6485 - 6488, 1981.
- [193] WIKSTRAND, C. J., BIGNER, S. H., BIGNER, D. D., Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies, *Cancer Res.*, **43**: 3327 - 3334, 1983.
- [194] WIKTOR, T. J., KOPROWSKI, H., Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 3978 - 3942, 1978.
- [195] WILLIAMS, A. F., GALFRE, G., MILSTEIN, C., Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: Differentiation antigens of rat lymphocytes, *Cell*, **12**: 663 - 673, 1977.
- [196] WILLIAMS, L. K., SULLIVAN, A., McILHINNEY, R. A. J., NEVILLE, A. M., A monoclonal antibody marker of human primitive endoderm, *Int. J. Cancer*, **30**: 731 - 738, 1982.
- [197] WOOD, J. M., HUDSON, L., JESSELL, T. M., YAMAMOTO, M., A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites, *Nature*, **296**: 34 - 38, 1982.
- [198] WOODS, J. C., SPRIGGS, A. I., HARRIS, H., McGEE, J. O., A new marker for human cancer cells. Immunocytochemical detection of malignant cells in serous fluids with the Cal antibody, *Lancet*, **ii**: 512 - 515, 1982.
- [199] YAVIN, E., YAVIN, Z., SCHNEIDER, M., KOHN, L.D., Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: Implications for receptor structure and the actions of autoantibodies in Graves' disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 3180 - 3184, 1981.
- [200] GACIONG, Z., GÓRSKI, A., Przeciwciała monoklonalne, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **65**: 245 - 251, 1981.
- [201] GÓRECKI, D., *Immunotoksyny*, *Postępy Biologii Komórki*, **13**: 75 - 92, 1986.
- [202] IZDEBSKA-SZYMONA, K., Linie hybrydowe nowotworowo-limfocytowe, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **33**: 465 - 477, 1979.

- [203] OBLAKOWSKI, P., Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych, nowa era w hematologii, *Acta Haemat. Pol.*, **14**: 219 - 227, 1983.
- [204] PŁUŻAŃSKA, A., ROBAK, T., Przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkim limfocytom T, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **69**: 157 - 162, 1983.
- [205] ZABEL, M., Metody immunocytochemicznego wykrywania antygenów, *Postępy Biologii Komórki*, **11**: 263 - 298, 1984.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 00-095 Warszawa.

Otrzymano: 15 września 1985.

Przyjęto: 15 grudnia 1985.

ASPEKTY EWOLUCYJNE W METABOLIZMIE LIPIDÓW

EVOLUTIONARY ASPECTS IN LIPID METABOLISM

Jolanta BARAŃSKA

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

Streszczenie. Aspekty ewolucyjne w metabolizmie lipidów omówiono na przykładach unikalnej budowy zawierającej wyłącznie lipidy dwueterowe błony komórkowej Archaeobakterii, przebiegu biosyntezy beztlenowej i tlenowej jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w różnych grupach taksonomicznych oraz biosyntezy fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w tkankach zwierzęcych, roślinnych i u bakterii. Wskazano, że zdolność do syntezy jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na drodze tlenowej, która jest cechą charakterystyczną wszystkich organizmów eukariotycznych, pojawiła się po raz pierwszy u sinic. Stanowiło to skok ewolucyjny. Odmierna, w porównaniu z bakteriami, droga biosyntezy fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w komórkach zwierzęcych oraz różna wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymów syntetyzujących te fosfolipidy może również być traktowana jako wynik rozwoju filogenetycznego. W pracy przedyskutowano także hipotezę o bakteryjnym pochodzeniu mitochondriów.

Summary. The evolutionary aspects of lipid metabolism are reviewed with the use of examples of the unique diether lipid-containing cell membrane of Archaeobacteria, anaerobic and aerobic pathways of biosynthesis of mono- and polyunsaturated fatty acids in different taxonomic groups and biosynthesis of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in bacteria, plants and animal tissues. It is pointed out that the aerobic pathway of biosynthesis of mono- and polyunsaturated fatty acids, characteristic for eukaryotic organisms, appeared for the first time in blue-green algae and represents an important evolutionary step. Similarly, a different biosynthesis pathway and intercellular compartmentation of enzymes participating in the biosynthesis of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in animal tissues, as compared to bacteria, can also be considered as a result phylogenetic development. In addition, the hypothesis of bacterial origin of mitochondria is discussed.

WSTĘP

Biochemiczna jedność organizmów żywych przejawia się w wielu podobnych procesach metabolicznych. Wszystkie organizmy żywe są zbudowane z takich samych prostych biomolekuł i są wyposażone w analogiczne enzymy. Jednocześnie charakterystyczną cechą żywych organizmów jest ich złożoność przejawiająca się zarówno w budowie chemicznej, jak i w stopniu skomplikowania struktury komórki. Zasadnicze odmienności w budowie komórki spowodowały wyróżnienie dwóch typów organizmów — *Prokaryota* i *Eukaryota*, stanowiących dwa różne stadia ewolucji na poziomie komórkowym. Prokarionty to nieskomplikowane organizmy z jedną tylko błoną — komórkową. Nie zawierają otoczonego błoną jądra, ani obłonionych organelli wewnątrzkomórkowych. Głównymi ich przedstawicielami są bakterie oraz sinice. Organizmy eukariotyczne, do których należą pierwotniaki, glony, grzyby oraz pozostałe zwierzęta i rośliny, zawierają wewnętrzne organelle komórkowe otoczone błonami, jak jądro, mitochondria, chloroplasty, siateczkę śródplazmatyczną (endoplazmatyczne retikulum), aparat Golgiego i inne, dzięki czemu wiele reakcji metabolicznych przebiega w odrębnych przedziałach strukturalnych.

Lipidy, które stanowią składnik wszystkich błon komórkowych, nie są zasadniczo uważane za istotne w ewolucyjnym rozwoju organizmów, nie poświęca się im także zbyt dużej uwagi jako wyznacznikom filogenetycznym. Jednak informacje uzyskane dzięki biochemii porównawczej wykazały wyraźne różnice w składzie lipidów w organizmach należących do różnych grup filogenetycznych.

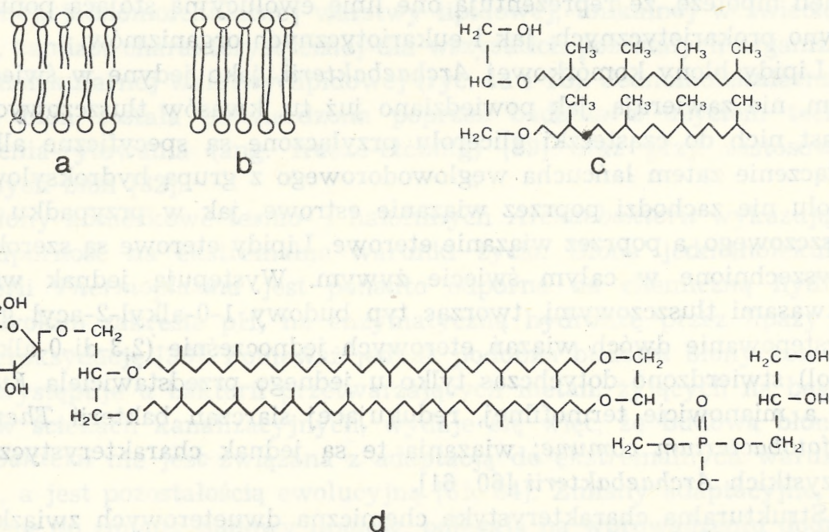
Praca przedstawia kilka wybranych zagadnień dotyczących aspektów ewolucyjnych w metabolizmie lipidów. Omawia różnice w występowaniu i biosyntezie nienasyconych kwasów tłuszczowych, a także różne drogi biosyntezy fosfolipidów, ze szczególnym uwzględnieniem fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy.

1. WYSTĘPOWANIE KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe, będące częścią składową lipidów, stanowią materiał budulcowy błon komórkowych wszystkich organizmów żywych. Wyjątkiem są bakterie zaliczane do tzw. *Archaeobakterii*.

Przyjmowany powszechnie płynno-mozaikowy model budowy błon, zaproponowany przez Singera i Nicolsona [79], opiera się na koncepcji dwumolekularnej warstwy lipidowej, w której lipidy umieszczone są po-

larnymi, hydrofilowymi „głowami” na zewnątrz, a hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych skierowane są do wnętrza błony (ryc. 1a). Organizmy eukariotyczne i większość prokariotycznych regulują płynność błon komórkowych przez wprowadzenie do polarnych lipidów różnej ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jednak niektóre prokarioty, szczególnie gatunki *Bacillus* i *Actinomyces* [33], zawierają nieznaczną ilość kwasów nienasyconych lub nie zawierają ich



Ryc. 1. Lipidy błony komórkowej *Archaeobakterii*

a — dwumolekularna warstwa lipidowa błony, b — bipolarna, jednomolekularna warstwa lipidowa błon komórkowych *Archeobakterii*, c — budowa 2-eterowych, jednopolarnych lipidów; w pozycji 2,3 glicerolu występują łańcuchy fytanylowe, d — budowa 4-eterowych, dwupolarnych lipidów *Thermoplasma acidophilum*

wcale. Zamiast kwasów nienasyconych bakterie te wprowadzają do cząsteczki lipidów nasycone, izo- lub anteizorozgałęzione kwasy tłuszczowe z podstawionymi grupami metylowymi. Zwiększa to płynność błony i obniża temperaturę topnienia lipidów poprzez rozluźnienie ciasno upakowanych łańcuchów węglowodorowych. Lipidy błon komórkowych *Archaeobakterii*, u których nie występują ani nasycone, ani nienasycone kwasy tłuszczowe, zawierają w części apolarnej wyłącznie rozgałęzione łańcuchy węglowodorowe.

1.1. LIPIDY ARCHAEBAKTERII

Odrębna budowa lipidów błon wysoce halofilnych i termokwasofilnych bakterii (ang. thermoacidophilic) oraz bakterii wytwarzających metan spowodowała wyodrębnienie ich jako prawdopodobnie najstarszych

form życia i określenie nazwą *Archaeobakterii*. Bakterie termokwasofilne i halofilne żyją w ekstremalnych warunkach, w regionach wulkanicznych, w gorących źródłach o temperaturze 60°–90°C i bardzo niskim pH (1–4), czy w jeziorach o prawie nasyconym stężeniu soli (2 M). Warunki te są podobne do tych, jakie występowały w czasie kształtowania się biosfery Ziemi [60]. *Archaeobakterie* charakteryzują się ponadto brakiem ściany komórkowej lub ścianą komórkową pozbawioną peptydoglikanów oraz odrębną sekwencją 16S RNA. Na tej podstawie Woes i wsp. [28, 92] wysunęli hipotezę, że reprezentują one linię ewolucyjną stojącą poniżej zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych organizmów.

Lipidy błony komórkowej *Archaeobakterii*, jako jedyne w świecie żywym, nie zawierają, jak powiedziano już tu, kwasów tłuszczowych. Zamiast nich do cząsteczki glicerolu przyłączone są specyficzne alkohole. Połączenie zatem łańcucha węglowodorowego z grupą hydroksylową glicerolu nie zachodzi poprzez wiązanie estrowe, jak w przypadku kwasu tłuszczowego, a poprzez wiązanie eterowe. Lipidy eterowe są szeroko rozpowszechnione w całym świecie żywym. Występują jednak wspólnie z kwasami tłuszczowymi, tworząc typ budowy 1-0-alkyl-2-acyl glicerol. Występowanie dwóch wiązań eterowych jednocześnie (2,3-di-0-alkyl glicerol) stwierdzono dotychczas tylko u jednego przedstawiciela *Eubakterii*, a mianowicie termofilnej, redukującej siarczan bakterii *Thermodesulfotobacterium comune*; wiązania te są jednak charakterystyczne dla wszystkich *Archaeobakterii* [60, 61].

Strukturalna charakterystyka chemiczna dwueterowych związków lipidowych została po raz pierwszy przeprowadzona przez Katesa i wsp. [50, 51] u halofilnych bakterii. Badacze ci wykazali, że lipidy błon komórkowych charakteryzują się budową typu 2,3-difytanyl-sn-glicerol (ang. 2,3-diphytanyl-sn-glicerol)*. Ten typ budowy został następnie stwierdzony u wszystkich pozostałych *Archaeobakterii* [36]. Oznacza to, że do cząsteczki glicerolu w pozycji 2 i 3 przyłączone są wiązaniem eterowym dwa nasycone 20-węglowe rozgałęzione łańcuchy węglowodorowe z czterema powtarzającymi się cyklicznie grupami metylowymi (ryc. 1c). 5-węglowe fragmenty z odgałęzioną grupą metylową swoją budową przypominają izopren. *Halobacterium cutirubum* i *Halobacterium marismortui* zawierają dwueterowe fytanylowe łańcuchy związane głównie z fosfatydyloglicerofosforanem (64%) oraz glikolipidami (25%) [52].

Bakterie halofilne składają się z jednopolarnych lipidów z dwoma łańcuchami fytanyłowymi [10, 50–52], podczas gdy lipidy bakterii termokwasofilnych, jak *Thermoplasma* lub *Sulfolobus*, charakteryzują się występowaniem dwupolarnych czteroeterowych lipidów [23, 58]. Lipidy te

* fytanyl — 2,6,8,12-tetra-metylo-heksadekanol.

są połączone poprzez równoległe łańcuchy fytanylowe wiązaniem C — C. Zawierają zatem dwie cząsteczki glicerolu i dwa 40-węglowe rozgałęzione łańcuchy węglowodorowe z ośmioma grupami metylowymi w każdym łańcuchu (ryc. 1d). Związki te stanowią około 80% frakcji glukozofosfolipidowej błony [60]. Bakterie wytwarzające metan zawierają mieszaninę lipidów z dwoma lub czterema wiązaniami eterowymi [84].

Występowanie dwupolarnych 4-eterowych lipidów (ang. tetra-0-di-bisphytanyl-diglycerol) prowadzi do powstania w błonie komórkowej bipolarnej, jednomolekularnej warstwy lipidowej, unikalnej w świecie żywym, zamiast charakterystycznej dla wszystkich pozostałych organizmów dwumolekularnej warstwy lipidowej (ryc. 1a i 1b). Jednomolekularna budowa błon została potwierdzona poprzez badania z użyciem techniki mrożenia-rytowania (ang. freeze-etching) [59] oraz przy zastosowaniu czarnych błon [32].

Błony komórkowe termo- i halofilnych *Archaeobakterii* wykazują dużą odporność na ekstremalne warunki życia. Błona jednomolekularna bakterii *Thermoplasma* jest ponadto odporna na chemiczną hydrolizę w szerokim zakresie pH, na enzymatyczną hydrolizę przez lipazy oraz na peroksydację [36]. Ponieważ jednak podobna budowa błony komórkowej występuje u bakterii przetwarzających metan, żyjących na bagnach lub w ściekach kanalizacyjnych, wydaje się więc, że budowa błon *Archaeobakterii* nie jest związana z adaptacją do ekstremalnych warunków życia, a jest pozostałością ewolucyjną [61, 84]. Zmiany adaptacyjne, prowadzące do zmiany budowy lipidów, polegają na wprowadzeniu dodatkowo do łańcucha fytanylowego od jednego do czterech pierścieni cyklopentanowych [23, 60]. Liczba pierścieni wzrasta wraz z temperaturą, w jakiej żyją bakterie *Thermoplasma* [93].

Przebieg biosyntezy omawianych lipidów jest jeszcze nie poznany. Ponieważ jednak łańcuchy fytanylowe przypominają budowę izoprenole, sugeruje to więc możliwość udziału w procesach biosyntetycznych kwasów mewalonowego i geranylogeranyl pirofosforanu [53].

1.2. BIOSYNTeza NIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Badania prowadzone w latach sześćdziesiątych w pracowni Blocha w Cambridge (USA) wykazały, że organizmy bakteryjne nie są zdolne do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [12, 77]. Wyniki tych badań są nadal aktualne. W wielkim i różnorodnym świecie mikroorganizmów znaleziono bowiem dotychczas kwasy wielonienasycone tylko u bakterii dwóch gatunków — *Bacillus lichniformis* [30] i *Flexibacter polymorphus* [43]. W pierwszym przypadku jest to kwas 5,10-heksadekadienowy, a więc 16-węglowy o dwóch podwójnych wiązaniach, w dru-

gim przypadku w łańcuchu rozgałęzionym kwasu tłuszczowego podwójne wiązania oddzielają kolejne grupy metylowe.

Te dwa wyjątki nie przeczą przyjętemu pogładowi, że brak kwasów wielonienasyconych jest cechą charakterystyczną dla komórek bakteryjnych [33]. W organizmach tych występują natomiast kwasy jednonienasycone. Poza nielicznymi wyjątkami [29, 45] powstają one na drodze beztlenowej, odkrytej także przez Blocha i wsp. [13, 14, 26, 49]. Synteza ta w pewnej części przebiega wspólnie z beztlenową syntezą nasyconych kwasów tłuszczowych. Podczas gdy beztlenowy przebieg syntezy kwasów nasyconych zachodzi w podobny sposób u wszystkich organizmów żywych [64, 65, 90], beztlenowe powstawanie kwasów jednonienasyconych jest charakterystyczne dla bakterii. Jedyny wyjątek występowania podobnego mechanizmu u zwierząt znaleziono u niosących się kur [75]. Prekursorami jednonienasyconych kwasów tłuszczowych są średniołańcuchowe kwasy nasycone. Przyłączenie do nich cząsteczki acylo-ACP (ang. ACP — acyl carrier protein) prowadzi do powstania odpowiednich β -hydroksykwasów. W wyniku odłączenia od nich cząsteczki wody w pozycji α,β , powstają kwasy α,β -nienasycone, z których po uwodowaniu powstają dłuższe o dwa atomy węgla kwasy nasycone. β -hydroksykwas może jednak w komórce bakteryjnej ulegać także β,γ -dehydracji prowadzącej do wytworzenia β,γ -kwasów nienasyconych. Podwójne wiązanie w tej pozycji jest odporne na redukcję enzymatyczną i pozostaje nie zmienione. Wraz z przyłączeniem następnych dwuwęglowych jednostek ulega kolejnym przesunięciom od grupy karboksylowej. W zależności od tego, czy odłączenie wody zaszło u hydroksykwasu o 10- czy 12-atomach węgla, powstają kwasy 18-węglowe: wakceninowy lub oleinowy z jednym podwójnym wiązaniem odpowiednio przy węglu 11 lub 9. Kwas wakceninowy jest głównym kwasem jednonienasyconym u bakterii. Anaerobowa droga syntezy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych występuje zarówno u beztlenowców, jak i u bakterii prowadzących życie w warunkach tlenowych, np. u *E. coli*, i zachodzi we frakcji rozpuszczalnej komórki [14, 48].

W odróżnieniu od bakterii, organizmy eukariotyczne cechuje zdolność syntezy zarówno jedno- jak i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [17, 30]. Wprowadzają one każde podwójne wiązanie do cząsteczki kwasu tłuszczowego na drodze tzw. oksydacyjnej desaturacji. W reakcjach tych zaktywowany kwas tłuszczowy przez połączenie z koenzymem A lub ACP, w obecności NADPH lub NADH i tlenu atmosferycznego, zostaje utleniony do kwasu jedno- lub odpowiednio dwu-, trój-, czy więcej nienasyconego. Dotychczas nie znaleziono intermediałów reakcji desaturacji. Wiadomo jednak, że tlen atmosferyczny jest akceptorem dwóch par elektronów pobieranych od tłuszczowego acylo-

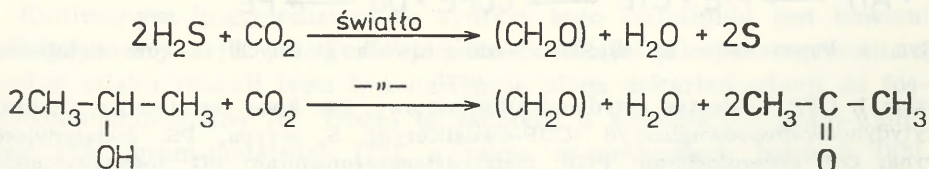
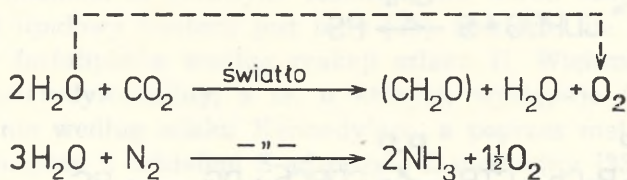
węgłu 9. Ze stearylo-CoA powstaje oleilo-CoA. U roślin natomiast powstanie jednonienasyconych kwasów wymaga ich aktywacji przez połączenie z ACP [54]. Dalsze jednak desaturacje zachodzą, podobnie jak u organizmów zwierzęcych, w obecności pochodnych z CoA [2, 54]. Ponadto u roślin desaturacji ulegają także kwasy tłuszczowe związane z glicerolem w cząsteczce fosfolipidu (fosfatydylocholinie) [2, 54]. W odróżnieniu od roślin, zwierzęta, wyższe kręgowce utraciły zdolność syntezy kwasu dwunienasyconego linolowego (ryc. 2). Jest on dla nich związkiem egzogennym niezbędnym do życia [67]. Rośliny zaś przeprowadzają tę reakcję i w następnej desaturacji wprowadzają trzecie podwójne wiązanie bliżej grupy metylowej, tworząc kwas α -linolenowy [2, 34, 35, 41, 54, 83]. Kwas ten występuje w chloroplastach związany z galaktolipidami i jest typowy dla organizmów roślinnych [2, 12, 34, 42, 82]. Kwas linolowy, uzyskany wraz z pożywieniem, ulega natomiast u zwierząt desaturacji do kwasu γ -linolenowego, a trzecie podwójne wiązanie zostaje wprowadzone w kierunku grupy karboksylowej [4, 18, 68]. Poprzez wydłużenie i następną desaturację powstaje z niego kwas arachidonowy (ryc. 2). Kwas γ -linolenowy i arachidonowy są na ogół związane z fosfolipidami i są typowymi kwasami wielonienasyconymi dla organizmów zwierzęcych [4, 12, 27, 68].

Jak przedstawiono już tu, bakterie zasadniczo nie są zdolne do syntezy kwasów wielonienasyconych. Natomiast sinice (*Anabaena variabilis*), innego rodzaju organizmy prokariotyczne, zawierają znaczne ilości kwasu linolowego i α -linolenowego związanego z galaktolipidami [63]. Kwasy te występują jednak wyłącznie w chromatoforach sinic. Chromatofory są zbudowane z błony komórkowej, która wpukła się, tworząc fotosyntezujące lamelle będące odpowiednikiem błon tylakoidalnych aparatu fotosyntezującego u eukariontów. W odróżnieniu od chloroplastów nie są one otoczone zewnętrzną błoną. Usunięcie chloroplastów powoduje usunięcie kwasów wielonienasyconych i w organizmie pozostają kwasy tłuszczowe wyłącznie typu bakteryjnego. Można było zatem sądzić, że zdolność do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest związana ze zdolnością do nowej fizjologicznej aktywności, której komórki bakteryjne nie mają. Wyniki sugerowały, że aktywnością tą może być fotosynteza. Zjawisko fotosyntezy jest jednak znane u bakterii, a bakterie fotosyntetyzujące, bezwzględnie beztlenowce, nie są zdolne do syntezy kwasów wielonienasyconych [77].

Dzięki klasycznym badaniom van Niela wiadomo, że w odróżnieniu od roślin zielonych, bakterie fotosyntezujące ani nie wytwarzają, ani nie zużywają tlenu [89]. Za wyjątkiem bakterii, wszystkie inne organizmy fotosyntetyzujące wykorzystują wodę jako donor elektronów do redukcji dwutlenku węgla lub innych akceptorów elektronów, jak np.

azotu cząsteczkowego (ryc. 3). Efektem tego działania jest wydzielenie cząsteczki tlenu, natomiast bakterie wykorzystują inne związki, bądź nieorganiczne, bądź organiczne jako donory elektronów i w reakcjach fotosyntezy przez nie przeprowadzanych tlen nie powstaje. Brak zatem kwasów wielonienasyconych u fotosyntetyzujących bakterii, a obecność kwasu α -linolenowego w chromatoforach sinic i chloroplastach roślin wyższych może sugerować związek tego kwasu z fotosyntezą, ale tego typu, w wyniku której następuje fotoliza wody i wydzielenie cząsteczki tlenu.

Synteza kwasu α -linolenowego zachodzi ponadto u krasnorostów (*Porphyridium cruentum*) [3, 12, 27]. Ponieważ nie zawierają one mitochondriów, ani organelli ruchu, można je wraz z sinicami uznać za najbardziej prymitywne organizmy charakteryzujące się tą zdolnością. Do grupy organizmów, dla których typowym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym jest kwas α -linolenowy, zaliczyć można również drożdże i grzyby [69] (choć ilość kwasów wielonienasyconych jest u nich nieznaczna) oraz zieleńce i rośliny wyższe [27]. Natomiast niektóre pierwotniaki należące do wiciowców (*Flagellata*), o właściwościach autotroficznych, jak i heterotroficznych, syntetyzują zarówno α - jak i γ -kwas linolenowy [3, 12, 27, 38]. Szczególnie dogodnym organizmem do badań jest *Euglena gracilis* [38]. Pierwotniak ten adaptowany do wzrostu w ciemnościach lub świetle zachowuje się jak heterotrof lub autotrof. *Euglena gracilis* przeniesiona do ciemności traci chloroplasty, galaktolipidy i kwas



Ryc. 3. Reakcje fotosyntetyczne

nad kreską: reakcje fotosyntezy zachodzące u wszystkich organizmów fotosyntetyzujących za wyjątkiem bakterii, przerywaną linią zaznaczono pochodzenie wydzielanego tlenu z atomów tlenu wody; pod kreską: reakcje fotosyntetyczne zachodzące u fotosyntetyzujących bakterii

fosfatydowym (PA), tworząc CDP-dwugliceryd (CDPDG) [19]. Związek ten, mający wysokoenergetyczne grupy fosforanowe, reaguje następnie z seryną [47] lub inozytalem [73], w wyniku czego powstają odpowiednie fosfolipidy — fosfatydyloseryna (PS) lub fosfatydyloinozytol (reakcja tworzenia fosfatydyloinozytolu nie jest pokazana na rycinie). CDP-dwugliceryd może reagować także z glicerofosforanem (GP). Produktem tej reakcji jest fosfatydyloglicerofosforan (PGP), z którego po odłączeniu cząsteczki fosforanu powstaje fosfatydyloglicerol (PG) [56], a dalej kardiolipina [37].

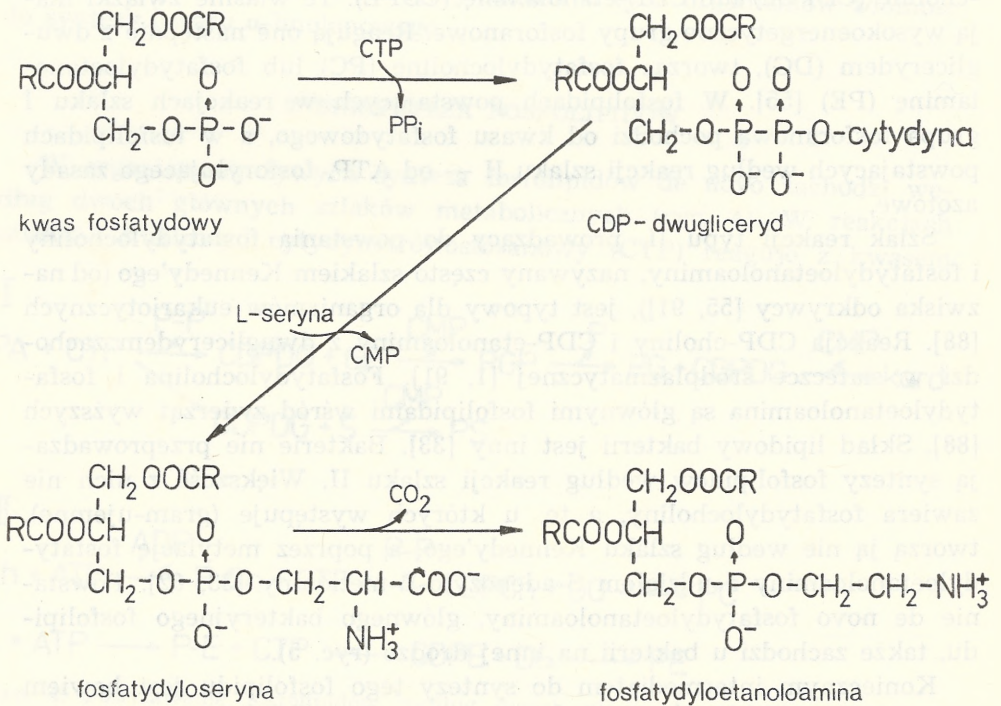
W II szlaku metabolicznym CTP reaguje z ufosforylowaną zasadą azotową, choliną (P-Ch) lub etanolaminą (P-E), tworząc odpowiednio CDP-cholinę (CDPCh) lub CDP-etanolaminę (CDPE). Te właśnie związki mają wysokoenergetyczne grupy fosforanowe. Reagują one następnie z dwuglicerydem (DG), tworząc fosfatydylocholinę (PC) lub fosfatydyloetanolaminę (PE) [55]. W fosfolipidach powstających w reakcjach szlaku I grupa fosforanowa pochodzi od kwasu fosfatydowego, a w fosfolipidach powstających według reakcji szlaku II — od ATP, fosforylującego zasady azotowe.

Szlak reakcji typu II, prowadzący do powstania fosfatydylocholin i fosfatydyloetanolaminy, nazywany często szlakiem Kennedy'ego (od nazwiska odkrywcy [55, 91]), jest typowy dla organizmów eukariotycznych [88]. Reakcja CDP-choliny i CDP-etanolaminy z dwuglicerydem zachodzi w siateczce śródplazmatycznej [1, 91]. Fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina są głównymi fosfolipidami wśród zwierząt wyższych [88]. Skład lipidowy bakterii jest inny [33]. Bakterie nie przeprowadzają syntezy fosfolipidów według reakcji szlaku II. Większość z nich nie zawiera fosfatydylocholin, a te, u których występuje (gram-ujemne), tworzą ją nie według szlaku Kennedy'ego, a poprzez metylację fosfatydyloetanolaminy z udziałem S-adenozyl-L-metioniny [33, 62]. Powstanie de novo fosfatydyloetanolaminy, głównego bakteryjnego fosfolipidu, także zachodzi u bakterii na innej drodze (ryc. 5).

Koniecznym intermedyatem do syntezy tego fosfolipidu jest bowiem fosfatydyloseryna [6, 76]. Fosfolipid ten powstaje, jak już wspomniano, według szlaku reakcji typu I, a następnie ulega dekarboksylacji do fosfatydyloetanolaminy [6]. Droga ta zachodzi u aerobowych gram-ujemnych [25], gram-dodatnich [72], a także anaerobowych bakterii [85], i została dokładnie przebadana u *Escherichia coli* [74]. Zgodnie z reakcjami szlaku I, bakterie syntetyzują także istotny dla nich fosfolipid — fosfatydyloglicerol, który następnie ulega przekształceniu do kardiolipiny (ryc. 4) [37].

Organizmy zwierzęce są zdolne do przeprowadzania syntezy fosfolipidów według I i II szlaku reakcji [88], z wyjątkiem syntezy fosfaty-

dyloseryny [6]. Fosfolipid ten powstaje bowiem zasadniczo na drodze reakcji wymiany zasady azotowej (ang. base exchange) [11, 16]. Reakcja ta nie jest syntezą de novo, polega na wprowadzeniu innej zasady azotowej do już istniejącego fosfolipidu i wymaga jedynie obecności jonów Ca^{++} [11, 16, 46]. W reakcjach tego typu powstaje także fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina [11, 24, 39]. Reakcje wymiany zasad azotowych zachodzą wyłącznie w siateczce śródplazmatycznej (endoplazmatycznym retikulum). Powstanie fosfatydyloseryny na drodze wymiany zasad azotowych zostało stwierdzone w wielu tkankach ssaków, ptaków, owadów [46], a także u pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* [22].



Ryc. 5. Droga syntezy fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w komórce bakteryjnej

Wydaje się, że tworzenie fosfatydyloseryny via CDP-dwugliceryd, czyli tzw. drogą bakteryjną lub przez wymianę zasad azotowych stanowi dwa wyłączające się wzajemnie procesy (tab. 1). Interesująca jest więc grupa organizmów należących do drożdży, grzybów i świata roślin zielonych. Drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) [20, 21, 57, 80] i grzyby (*Neurospora crassa*) [78], określane często mianem mikroorganizmów eu-

kariotycznych, cechuje zdolność syntezy fosfatydyloseryny według modelu bakteryjnego, tj. via CDP-dwugliceryd. Natomiast fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina powstają w tych organizmach zarówno według reakcji szlaku Kennedy'ego, jak i wymiany zasad azotowych. Synteza fosfatydyloseryny zachodzi w komórkach drożdży w mikrosomach i w mitochondriach [20] w ich zewnętrznej błonie [21]. Badania nad procesami biosyntezy fosfatydyloseryny u roślin zielonych są stosunkowo nieliczne. Wykazały jednak, że w liściach szpinaku, bulwach kartofla i korzeniach pomidora [31, 66] zachodzi synteza de novo na drodze typowej dla bakterii, podczas gdy nasiona różnych odmian fasoli tworzą fosfatydyloserynę wyłącznie według reakcji wymiany zasad azotowych [86].

TABELA 1

Drogi syntezy fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w organizmach bakteryjnych, zwierzęcych i roślinnych
(objaśnienia używanych skrótów w legendzie do ryc. 4)

| | FOSFATYDYLOSERYNA | | FOSFATYDYLOETANOLOAMINA | | |
|------------------|---------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------------------|
| | CDPDG+S → PS+CMP | PE+S → PS+E | CDPE+DG → PE+CMP | PS+E → PE+S | PS+CO ₂ → PE |
| Bakterie | + | - | - | - | + |
| Świat zwierząt | - | + | + | + | + |
| Świat roślin: | | | | | |
| drożdże i grzyby | + | - | + | + | + |
| rośliny zielone | +, - | -, + | + | + | + |

Drogi prowadzące do powstania fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy zestawiono w tab. 1. Organizmy eukariotyczne mają prawdopodobnie większe możliwości syntezy tych fosfolipidów niż prokariotyczne bakterie. Być może jest to związane ze zdolnością do syntezy nowych białek enzymatycznych przeprowadzających te reakcje, a zatem z powstaniem nowej organelli komórkowej, jaką jest siateczka śródplazmatyczna. Przedstawione w tabeli procesy, jak reakcja między CDP-etanolamioną a dwuglicerydem lub wymiana zasad azotowych, a także nie omawiane w tej pracy syntezy fosfatydyloinozytolu, sfingolipidów czy steroli, to typowe reakcje mikrosomalne, nie zachodzące w mitochondriach komórek eukariotycznych. W mitochondriach natomiast, w ich błonie wewnętrznej, ma miejsce reakcja dekarboksylacji fosfatydyloseryny do fosfatydyloetanolaminy [87, 94]. Mitochondria przeprowadzają także, nie wyjaśnioną ostatecznie, syntezę fosfatydyloseryny zależną od ATP i stymulowaną przez CMP, aczkolwiek ilość powstającego związku w warunkach in vitro jest nieznaczna [5, 6].

Mówiąc o rozwoju ewolucyjnym organizmów nie sposób pominąć hipotezy głoszącej, że mitochondria ewoluowały jako endosymbionty z tlenowych komórek bakteryjnych, które dokonały inwazji do innych, większych anaerobowych komórek prokariotycznych [8, 70]. Istotnie, między bakteriami a mitochondriami obserwuje się wiele podobieństw dotyczących budowy DNA, rybosomów, tRNA, wrażliwości syntezy białek na chloramfenikol i innych. Podobieństwo w zakresie metabolizmu omawianych w niniejszym artykule lipidów przedstawia tab. 2. Wśród wymienionych w tabeli reakcji na uwagę zasługują dwie ostatnie. W komórce zwierzęcej przebiegają one wyłącznie w mitochondriach, w ich błonie wewnętrznej, są także podstawowymi reakcjami komórek bakteryjnych. Ponadto większość bakterii nie syntetyzuje fosfatydyloinozytolu, sfingolipidów i steroli, a w komórce eukariotycznej głównym miejscem syntezy tych związków jest siateczka śródplazmatyczna (nie pokazane w tab.). Oprócz reakcji przedstawionych w tab. 2, mitochondria są jeszcze tylko

TABELA 2

Szlaki przemian metabolicznych lipidów bakterii, mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej (objaśnienia używanych symboli w legendzie do ryc.4)

| | Bakterie | Mitochondria | Siateczka śródplazma- tyczna |
|--|----------|--------------|------------------------------------|
| Synteza PC przez CDPCh | — | — | + |
| Synteza PE przez CDPE | — | — | + |
| Wymiana zasad azotowych PE+S → PS+E | — | — | + |
| Synteza PS przez CDPDG | + | — | — |
| | | (ATP, CMP) | |
| Dekarboksylacja PS → PE+CO ₂ | + | + | — |
| Synteza kardiolipiny z fosfatydyloglicerolu | + | + | — |

zdolne do syntezy kwasu fosfatydowego [8, 21], niezbędnego do syntezy fosfatydyloglicerolu i kardiolipiny (ryc. 4, szlak I). Inne związki lipidowe muszą być do nich dostarczane z zewnątrz, z głównego miejsca syntezy fosfolipidów — siateczki śródplazmatycznej. Transport fosfolipidów z jednych do drugich organelli wewnątrzkomórkowych odbywa się za pomocą specjalnych przenoszących białek cytoplazmatycznych [7, 8, 44]. Należy dodać, że w znanych obecnie przykładach endosymbiozy, np. autotroficzne sinice żyjąc jako symbionty z wiciowcami funkcjonują jako chloroplasty, a ich ściana komórkowa zanika [70]. Można zatem przy-

puszczać, że jeżeli mitochondria powstały także z symbiotycznego związku, to musiały stracić znaczną część swego materiału genetycznego, swoją autonomię i stać się strukturami semiautonomicznymi, którymi istotnie są.

3. UWAGI KOŃCOWE

Występowanie w lipidach błon komórek różnego rodzaju kwasów tłuszczowych może być uważane za wyznacznik filogenetyczny. Archaeobakterie reprezentujące najstarsze formy życia nie zawierają ich. U pozostałej większości bakterii spotykamy nasycone, rozgałęzione i jednonienasycone kwasy tłuszczowe, u organizmów tych nie występują natomiast kwasy wielonienasycone. Kwasy jednonienasycone powstają u bakterii zasadniczo według mechanizmu beztlenowego. Zdolność do syntezy kwasów jedno- i wielonienasyconych poprzez mechanizm tlenowy pojawiła się po raz pierwszy u sinic i jest cechą charakterystyczną wszystkich organizmów eukariotycznych. Można sądzić, że zdolność ta odegrała istotną rolę w rozwoju ewolucyjnym organizmów. Mechanizm biosyntezy kwasów wielonienasyconych wymaga bowiem tlenu atmosferycznego jako niezbędnego akceptora elektronów. Wzrost ilości tlenu w czasie ewolucji, szczególnie w momencie pojawienia się sinic około 2,5 miliarda lat temu, musiał być skokiem ewolucyjnym. Przejście do tlenowej desaturacji może być uważane jako krok w rozwoju ewolucyjnym organizmów.

Fosfatydyloseryna i fosfyoetanolamina są, podobnie jak kwasy tłuszczowe, syntetyzowane w odmienny sposób w organizmach należących do różnych grup filogenetycznych. W komórce eukariotycznej ma miejsce wyraźna kompartmentyzacja enzymów syntetyzujących fosfolipidy. Zjawisko to, a szczególnie występowanie różnych dróg syntezy tego samego fosfolipidu (fosfatydyloetanolaminy) w różnych wewnątrzkomórkowych organellach, mogłoby być wytłumaczone jako wynik rozwoju filogenetycznego, jeśliby przyjąć endosymbiotyczne pochodzenie mitochondriów. Przedstawione w pracy zbieżności przebiegu syntez lipidowych między bakteriami a mitochondriami nie są dowodem uzasadniającym słuszność hipotezy o bakteryjnym pochodzeniu mitochondriów, są jednak poszlakami wskazującymi na taką możliwość.

LITERATURA

- [1] ANSELL G. B., SPANNER S., Phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine phosphatidylcholine, [w] Phospholipids, red. J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, New York 1982, 1 - 49.

- [2] APPELQVIST L. Å., STYMNE S., Biosynthesis of linoleic and linolenic acids — substrates and sites, [w] *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, red. L. Å. Appelqvist, C. Liljenberg, (Development in Plant Biology, vol. 3), Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, New York 1979, 343 - 358.
- [3] BAGDASARIAN G., HULANICKA D., Drogi biosyntezy wyższych nienasyconych kwasów tłuszczowych i ich ewolucja w świecie drobnoustrojów, *Postępy Biochem.*, **11**: 179 - 194, 1965.
- [4] BARAŃSKA J., Współzależności metaboliczne pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w organizmie zwierzęcym, *Postępy Biochem.*, **14**: 233 - 242, 1968.
- [5] — Phosphatidylserine bisynthesis in mitochondria from Ehrlich ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **619**: 258 - 266, 1980.
- [6] — Biosynthesis and transport of phosphatidylserine in the cell, *Adv. Lipid Res.*, **19**: 163 - 184, 1982.
- [7] BARAŃSKA J., GRABAREK Z., Rat liver proteins binding and transferring phosphatidylserine, *FEBS Lett.*, **65**: 24 - 29, 1979.
- [8] BARAŃSKA J., WOJTCZAK L., Transfer of phosphatidic acid between microsomal and mitochondrial outer and inner membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**: 23 - 31, 1984.
- [9] BAXTER R., Origin and continuity of mitochondria, [w] *Origin and Continuity of Cell organelles*, red. J. Renert, H. Ursprung, Springer Verlag, Berlin, New York 1971, 46 - 64.
- [10] BAYLEY S. T., Halobacteria — a problem in biochemical evolution, *Trends in Biochem., Sciences*, **4**: 223 - 225, 1979.
- [11] BJERVE K. S., The Ca^{++} -dependent biosynthesis of lecithin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in rat liver subcellular particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **296**: 549 - 562, 1973.
- [12] BLOCH K., Lipid patterns in the evolution of organisms, [w] *Evolving Genes and Proteins*, red. V. Bryson, H. J. Vogel, Academic Press. New York 1965, 53 - 65.
- [13] — Enzymatic synthesis of monounsaturated fatty acids, *Accounts of Chem. Res.*, **2**: 193 - 202, 1969.
- [14] — B-hydroxythioester dehydrase, [w] *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, Academic Press. New York, **5**: 441 - 464, 1971.
- [15] BLOCH K., BARAŃSKA J., GALLI G., Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids, *Proc. Inter. Cong. Nutr.*, **213**: 92 - 94, 1969.
- [16] BORKENHAGEN L. F., KENNEDY E. P., FIELDING L., Enzymatic formation and decarboxylation of phosphatidylserine, *J. Biol. Chem.*, **236**: PC28-PC30, 1961.
- [17] BRENNER R. R., The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals, *Mol. Cell Biochem.*, **34**: 41 - 52, 1974.
- [18] BRENNER R. R., DE TOMAS M. E., PELUFFO R. O., Effect of polyunsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of linoleic to γ -linolenic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **106**: 640 - 642, 1965.
- [19] CARTER J. R., KENNEDY E. P., Enzymatic synthesis of cytidine diphosphate diglyceride, *J. Lipid Res.*, **7**: 678 - 683, 1966.
- [20] COBON G. S., CROWFOOT P. D., LINNANE A. W., Biogenesis of mitochondria. Phospholipid synthesis in vitro by yeast mitochondrial and microsomal fractions, *Biochem. J.*, **144**: 265 - 275, 1974.

- [21] DAUM G., Lipids in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**: 1 - 42, 1985.
- [22] DENNIS E. A., KENNEDY E. P., Enzymatic synthesis and decarboxylation of phosphatidylserine in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Lipid Res.*, **11**: 394 - 403, 1970.
- [23] DE ROSA M., DE ROSA S., GAMBACORTA A., MINALE L., BU'LOCK J. D., Chemical structure of the ether lipids in thermophilic acidophilic bacteria of the *Calderiella* group, *Phytochemistry*, **16**: 1961 - 1965, 1977.
- [24] DILLS R. R., HÜBSCHER G., Metabolism of phospholipids. III. The effect of calcium ions on the incorporation of labelled choline into rat-liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **46**: 503 - 513, 1961.
- [25] DUTT A., DOWHAN W., Intracellular distribution of enzymes of phospholipid metabolism in gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.*, **132**: 159 - 165, 1977.
- [26] ERWIN J., BLOCH K., Biosynthesis of unsaturated fatty acids in microorganisms. Structure and biosynthetic pathways are compared and related to physiological properties of the organism, *Science*, **143**: 1006 - 1012, 1964.
- [27] ERWIN J., HULANICKA D., BLOCH K., Comparative aspects of unsaturated fatty acid synthesis, *Comp. Biochem. Physiol.*, **12**: 191 - 207, 1964.
- [28] FOX G. E., STACKENBRANDT E., HESPELL R. B., GIBSON J., MANILOFF J., DYER T. A., WOLFE R. S., BALCH W. E., TANNER R. S., MAGRUM L. J., ZABLEN L. B., BLAKEMORE R., GUPTA R., BONNEN L., LEWIS B. J., STAHL D. A., LUEHRSEN K. R., CHEN K. N., WOESE C. R., The phylogeny of prokaryotes, *Science*, **209**: 457 - 463, 1980.
- [29] FULCO A. J., The biosynthesis of unsaturated fatty acids by *Bacilli*, *J. Biol. Chem.*, **244**: 889 - 895, 1969.
- [30] — Metabolic alterations of fatty acids, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 215 - 241, 1974.
- [31] GALLIARD T., Phospholipid metabolism in photosynthetic plants, [w] *Form and Function of Phospholipids*, red. G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson, Elsevier, Amsterdam 1973, 253 - 284.
- [32] GLIOZZI A., ROLANDI R., DE ROSA M., GAMBACORTA A., Monolayer black membranes from bipolar lipids of Archaeobacteria and their temperature-induced structural changes, *J. Membrane Biol.*, **75**: 45 - 56, 1983.
- [33] GOLDFINE H., Lipids of Prokaryotes — structure and distribution, [w] *Current Topics in Membranes and Transport*, red. S. Razin, S. Rotten, Academic Press, London, New York, **17**: 1 - 43, 1982.
- [34] HARRIS R. V., JAMES A. T., Linoleic and α -linolenic acid biosynthesis in plant leaves and a green alga, *Biochim. Biophys. Acta*, **106**: 456 - 465, 1965.
- [35] — The fatty acid metabolism of *Chlorella vulgaris*, *Biochim. Biophys. Acta*, **106**: 465 - 474, 1965.
- [36] HORROCKS L. A., SHARMA M., Plasmalogens and O-alkyl glycerophospholipids, [w] *Phospholipids*, red. J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York 1982, 51 - 93.
- [37] HOSTETLER K. Y., Polyglycerophospholipids: phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and bis (monoacylglycerol)phosphate, [w] *Phospholipids*, J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York 1982, 215 - 261.
- [38] HULANICKA D., ERWIN J., BLOCH K., Lipid metabolism of *Euglena gracilis*, *J. Biol. Chem.*, **239**: 2778 - 2787, 1964.
- [39] HÜBSCHER G., Metabolism of phospholipids. The effect of metal ions on the incorporation of L-serine into phosphatidylserine, *Biochim. Biophys. Acta*, **57**: 555 - 561, 1962.
- [40] INKPEN C. A., HARRIS R. A., QUACKENBUSH F. W., Differential responses

- to fasting and subsequent feeding by microsomal system of rat liver: 6- and 9-desaturation of fatty acids, *J. Lipid Res.*, **10**: 277-282, 1969.
- [41] JAMES A. T., The biosynthesis of long-chain saturated and unsaturated fatty acids in isolated plant leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**: 9-19, 1963.
- [42] — Biosynthesis of unsaturated acids by plants, *Chemistry in Britain*, **4**: 484-495, 1968.
- [43] JOHNS R. B., PERRY G. J., Lipids of the marine bacterium *Flexibacter polymorphus*, *Arch. Microbiol.*, **114**: 267-271, 1977.
- [44] KADER J. C., DONADY D., MAZLIAK P., Phospholipid transfer protein, [w] *Phospholipids*, red. J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, New York, 1982, 279-311.
- [45] KANEDA T., Major occurrence of cis- Δ^5 fatty acids in three psychrophilic species of *Bacillus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**: 298-302, 1971.
- [46] KANFER J. N., The base exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue, *Can. J. Biochem.*, **58**: 1370-1380, 1980.
- [47] KANFER J. N., KENNEDY E. P., Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **239**: 1720-1724, 1964.
- [48] KASS L. R., BLOCH K., On the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**: 1168-1173, 1967.
- [49] KASS L. R., BROCK D. J. H., BLOCH K., β -hydroxydecanol thioester dehydrase. I. Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, **242**: 4418-4431, 1967.
- [50] KATES M., Ether-linked in extremely halophilic bacteria, [w] *Ether Lipids: Chemistry and Biology*, red. F. Snyder, Academic Press. New York 1972, 351-358.
- [51] — The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria, *Prog. Chem. Fats other Lipids*, **15**: 301-342, 1978.
- [52] KATES M., KUSHWAHA S. C., The diphytanyl glycerol ether analogues of phospholipids and glycolipids in membranes of *Halobacterium cutirubrum*, [w] *Lipids*, red. R. Paoletti, C. Porcellati, G. Jacini, Raven, New York 1967, 267-275.
- [53] KATES M., PARK C. E., PALMETA B., JOO C. N., Synthesis of Diphytanyl Ether Analogues of phosphatidic acid and cytidine diphosphate diglyceride, *Can. J. Biochem.*, **49**: 275-281, 1971.
- [54] KATES M., WILSON A. C., DE LA ROCHE A. J., Lipid biosynthesis in plant cell cultures, [w] *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, red. L. Å. Appelqvist, C. Liljenberg, (Development in Plant Biology, vol. 3) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, New York 1979, 329-342.
- [55] KENNEDY E. P., Biosynthesis of complex lipids, *Fed. Proc.*, **20**: 934-940, 1961.
- [56] KIJASU J. Y., PIERINGER R.A., PAULUS H., KENNEDY E. P., The biosynthesis of phosphatidylglycerol, *J. Biol. Chem.*, **204**: 2293-2298, 1963.
- [57] KOVAC L., GIBELSKA I., POLIACHOVAB., SUBIK J., KOVACOVA V., Membrane mutants: a yeast mutant with lesion of phosphatidylserine biosynthesis, *Eur. J. Biochem.*, **111**: 491-501, 1980.
- [58] LANGWORTHY T. A., Long — chain diglycerol tetraethers from *Thermoplasma acidophilum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **487**: 37-50, 1977.
- [59] — Special features of thermoplasma, [w] *The Mycoplasma*, red. M. F. Barile, S. Razin, Academic Press. New York, **1**: 495-513, 1979.
- [60] LANGWORTHY T. A., Lipids of bacteria living in extreme environments, [w] *Current Topics in Membranes and Transport*, red. S. Razin, S. Rotten, Academic Press. London, New York, **17**: 45-77, 1982.

- [61] — Bacterial ether lipids, [w] 26th International Conference on the Biochemistry of Lipids, Graz, 1985, 42 - 43.
- [62] LENNARZ W. J., Bacterial lipids, [w] Lipid Metabolism, red. S. J. Wakil, Academic Press, New York 1970, 155 - 184.
- [63] LEVIN E. Y., LENNARZ W. J., BLOCH K., Occurrence and localization of α -linolenic acid containing galactolipids in the photosynthetic apparatus of *Anabaena variabilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, 84: 471 - 475, 1964.
- [64] LYNNEN F., Biosynthesis of saturated fatty acids, *Fed. Proc.*, 20: 941 - 951, 1961.
- [65] MAJERUS P. W., VAGELOS P. R., Fatty acids biosynthesis and the role of the acyl carrier protein, *Adv. Lipid Res.*, 5: 1 - 33, 1967.
- [66] MARSHALL M. O., KATES M., Biosynthesis of nitrogenous phospholipids in spinach leaves, *Can. J. Biochem.*, 52: 469 - 482, 1974.
- [67] MEAD J. F., The metabolism of unsaturated fatty acids, [w] Lipid Metabolism, red. K. Bloch, John Wiley, New York 1960, 41 - 68.
- [68] — Synthesis and metabolism of polyunsaturated acids, *Fed. Proc.*, 20: 952 - 955, 1961.
- [69] MEYER F., LIGHT R. J., BLOCH K., Fatty acids metabolism in anaerobic yeast, [w] Biochemical Problems of Lipids (BBA Library, vol. 1), red. A. C. Frazer, Elsevier, Amsterdam, 1963, 415 - 421.
- [70] MUNN E. A., Mitochondria, chloroplasts and bacteria, [w] Structure of mitochondria, Academic Press, London, New York 1974, 375 - 371.
- [71] OSHINO N., IMAI Y., SATO R., Electron-transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 128: 13 - 28, 1966.
- [72] PATTERSON P. H., LENNARZ W. J., Studies on the membranes of *Bacilli*: Phospholipid biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 246: 1062 - 1071, 1971.
- [73] PAULUS H., KENNEDY E. P., The enzymatic synthesis of inositol monophosphate, *J. Biol. Chem.*, 235: 1303 - 1311, 1960.
- [74] REATZ C. R. H., Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipids synthesis in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, 42: 614 - 659, 1978.
- [75] REISER R., MURTY N., RAKOFF H., Biosynthesis of linoleic acid by the laying hen, *J. Lipid Res.*, 3: 56 - 59, 1962.
- [76] ROCK O. C., CRONAN J. E. Jr., Regulation of bacterial membrane lipid synthesis, [w] Current Topics in Membranes and Transport, red. S. Razin, S. Rotten, Academic Press, London, New York, 17: 207 - 233, 1982.
- [77] SCHEUERBRANDT G., BLOCH K., Unsaturated fatty acids in microorganisms, *J. Biol. Chem.*, 237: 2064 - 2068, 1962.
- [78] SHERR S., BYK C., Choline and serine incorporation into phospholipids of *Neurospora crassa*, *Biochim. Biophys. Acta*, 239: 243 - 247, 1971.
- [79] SINGER S. J., NICHOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 1975: 720 - 731, 1972.
- [80] STEINER M. R., LESTER R. L., In vitro studies of phospholipids biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, 260: 222 - 243, 1972.
- [81] STRITTMATTER P., SPATZ L., CORCORAN D., ROGERS H. J., SETLOW B., REDLINE R., Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 4565 - 4569, 1974.
- [82] STUMPF P. K., Metabolism of fatty acids, *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 159 - 212, 1969.
- [83] STUMPF P. K., JAMES A. T., The biosynthesis of long-chain fatty acids by lettuce chloroplast preparation, *Biochim. Biophys. Acta*, 70: 20 - 42, 1963.
- [84] TORNABENE T. G., LANGWORTHY T. A., Diphytanyl and dibisphityanyl

- glycerol ether lipids of methanogenic Archaeobacteria, *Science*, **203**: 51-53, 1979.
- [85] TSUKAGOSKI N., PETERSON N. N., FRANKLIN R. M., Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. Characterization of some enzymes of glycerophosphatide metabolism of *Pseudomonas* BAL-31 and alteration in their activity after infection with bacteriophage PM2, *Eur. J. Biochem.*, **60**: 603-613, 1975.
- [86] VANDOR S. L., RICHARDSON K. E., Incorporation of ethanolamine-1,2-¹⁴C into plant microsomal phospholipids, *Can. J. Biochem.*, **46**: 1309-1315, 1968.
- [87] VAN GOLDE L. M. G., RABEN J., BATTENBURG J., FLEISCHER B., ZAMBRANO F., FLEISCHER S., Biosynthesis of lipids in Golgi complex and other subcellular fractions from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **360**: 179-192, 1974.
- [88] VAN GOLDE L. M. G., VAN DEN BERGH S. G., Introduction: General pathways in the metabolism of lipids in mammalian tissues, [w] *Lipid Metabolism in Mammals*, red. F. Snyder, Plenum Press. London, New York, **1**: 1-33, 1977.
- [89] VAN NIEL C. B., The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis, *Advan. Enzymol.*, **1**: 263-328, 1941.
- [90] WAKIL S. J., Mechanism of fatty acid synthesis, *J. Lipid Res.*, **2**: 1-24, 1961.
- [91] WILGRAM G. F., KENNEDY E. P., Intracellular distribution of some enzymes catalyzing reactions in the biosynthesis of complex lipids, *J. Biol. Chem.*, **238**: 2615-2619, 1963.
- [92] WOESE C. R. FOX G. E., Phylogenetics structure of procaryotic domain. The primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5088-5090, 1977.
- [93] YANG L. L., HANG A., Structure of membrane from *Thermoplasma acidophilum* adapted to growth at 37°C, *Biochim. Biophys. Acta*, **573**: 308-309, 1979.
- [94] ZBOROWSKI J., DYGAŚ A., WOJTCZAK L., Phosphatidylserine decarboxylase is located on the external side of the inner mitochondrial membrane, *FEBS Lett.*, **157**: 179-182, 1983.

POSTER BIOLOGICAL MEMORIAL

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the experimental procedures and the statistical analysis performed.

3. The third part of the document presents the results of the study. It includes a series of tables and graphs that illustrate the findings. The data shows a clear trend in the relationship between the variables studied.

4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It highlights the potential applications of the research in various fields and the need for further investigation.

5. The fifth part of the document concludes the study. It summarizes the key findings and provides a final statement on the overall significance of the research.

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 480 zł, półrocznie 240 zł

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa—Książka—Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

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

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TREŚĆ

| | |
|---|-----|
| H. STRZELECKA-GOŁASZEWSKA, Struktura filamentu aktynowego i jej implikacje biologiczne | 97 |
| B. RODKIEWICZ, J. BEDNARA, Rozwój i ultrastruktura żeńskiego gametofitu roślin okrytonasiennych . . . | 125 |
| R. DĄBROWSKA, Mechanizmy regulacji skurczu mięśni i ruchliwości komórkowej | 145 |
| A. GRĘBECKI, Organizacja przestrzenna mechanizmów napędowych i sterujących w ruchu amebowym . . . | 175 |
| J. DOROSZEWSKI, Hydrodynamiczne metody badania adhezyjnych oddziaływań komórkowych | 195 |
| D. GÓRECKI, Przeciwciała monoklonalne i ich niektóre zastosowania | 215 |
| J. BARAŃSKA, Aspekty ewolucyjne w metabolizmie lipidów | 259 |