

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

FUNKCJE RUCHOWE KOMÓREK
MOTOR FUNCTIONS OF THE CELLS



Tom 41

WARSZAWA 1992

Numer 1 (214)

Wydawnictwo Naukowe PWN

K O S M O S

Rok założenia 1876

Warszawa 1992

Wydawnictwo Naukowe PWN

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), *WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW*,
WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, *HENRYK SZARSKI*, *PRZEMYSŁAW TROJAN*,
ADAM URBANEK (przewodniczący), *KAZIMIERZ ZIELIŃSKI*
sekretarz: *JADWIGA KOBUSZEWSKA*

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, *WŁADYSŁAW GOLINOWSKI*, *LUCYNA GRĘBECKA*
ANTONI HOFFMAN, *WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW*,
KRZYSZTOF STAROŃ, *JERZY ŻUK*
(redaktor naczelny), *KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI*
sekretarz: *JADWIGA KOBUSZEWSKA*

Redaktor zeszytu: *LUCYNA GRĘBECKA*

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN — WARSZAWA, ul. MIODOWA 10

Ark. wyd. 12,5. Ark. druk. 9,0. Papier druk. offset III kl. 80g. Oddano do składania w lutym 1992 r.
Podpisano do druku w czerwcu 1992 r. Druk ukończono w czerwcu 1992 r.

SKŁAD, DRUK I OPRAWA: NO FUTURE — WARSZAWA, ul. WIEJSKA 7/15

WPROWADZENIE

Ruch ameboidalny — przemieszczanie się komórek bez udziału stałych struktur lokomotorycznych — już od połowy ubiegłego wieku stanowił przedmiot zainteresowania wielu uczonych. Początkowo badano przede wszystkim swobodnie żyjące ameby. W miarę rozwoju technik badawczych zwiększały się możliwości studiowania ruchów komórkowych na materiale trudniejszym do obserwacji; został on poszerzony o ruchliwe komórki tkankowe: leukocyty, epitelocyty, fibroblasty i inne. Za pomocą różnorodnych metod, w tym immunofluorescencji i interwencji genetycznych zbliżamy się do poznania podstaw molekularnych ruchu tych komórek. Zostały zidentyfikowane białka cytoszkieletu, określono funkcjonowanie kompleksu błona — cytoszkielet w lokomocji.

Zagadnieniu temu poświęcony jest artykuł A. Grębeckiego *Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych*. Autor analizuje ogromny materiał — wyniki badań prowadzonych zarówno na swobodnie żyjących amebach, jak i na komórkach tkankowych. Zwraca uwagę na te podstawowe mechanizmy ruchu, które u obu grup komórek zachowują podobieństwo niezależnie od odmiennych warunków środowiska i pełnionych funkcji.

Część poświęconą ruchliwym komórkom tkankowym rozpoczyna artykuł W. Korohody. Autor — znany badacz ich ruchu — zajmuje się w swoim artykule migracją epitelocytów. Artykuł zawiera pełną informację o lokomocji tych komórek — zarówno prawidłowych, jak i transformowanych. Szczególną uwagę poświęca autor roli cytoszkieletu, współzależności kształtu migrujących komórek nabłonkowych i ich aktywności mitotycznej oraz czynnikom wpływającym na migrację. Artykuł ten kończy się przeglądem aktualnych hipotez dotyczących mechanizmu ruchu komórek epitelialnych i fibroblastów.

Makrofagi, będące jednym z preferowanych obiektów w badaniach ruchu ameboidalnego, omawia J. Kołodziejczyk. Autorka przedstawia hipotezy dotyczące mechanizmów molekularnych leżących u podstaw ich lokomocji. Pisząc o migracji i fagocytozie makrofagów, autorka wskazuje, że prawidłowy przebieg obu tych zjawisk jest warunkiem koniecznym do spełnienia przez makrofagi ich funkcji obronnych w organizmie.

W następnym artykule, W. Kłopocka zajmuje się limfocytami, komórkami odpowiedzialnymi głównie za swoistą odpowiedź organizmu na czynniki mu zagrażające. Specyfika tych komórek zobligowała autorkę do poszerzenia tematu o niektóre kwestie immunologiczne, istotne dla powiązania lokomocji limfocytów z rolą, jaką pełnią one w organizmie.

Artykuł L. Grębeckiej *Migracje komórek tkankowych. Czynniki ograniczające i pobudzające* zawiera informacje dotyczące dwóch zagadnień. Pierwsze, to istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy inwazyjnością komórek a występowaniem połączeń międzykomórkowych. Drugie, to działanie substancji stymulujących ruchliwość i lokomocję, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji takich substancji przez metastazujące komórki nowotworowe (melanoma).

Rolą białek wiążących wapń, jako markerów stanów patologicznych, zajmują się J. Kuźnicki i J. Kordowska. W artykule swoim autorzy poświęcają lokomocji komórkowej niewiele miejsca, ale przedstawione przez nich wnikliwe omówienie występowania białek wiążących wapń w komórce i w organizmie pozwala stwierdzić, że te białka pojawiają się w komórkach nowotworowych, w tym także w nowotworach o dużym stopniu uzłośliwienia, jak np. czerniaki (melanoma).

Ostatnia pozycja odbiega nieco charakterem od poprzednich. P. Pomorskiego *W poszukiwaniu mikroskopu idealnego. Rzecz o mikroskopii konfokalnej* dotyczy jednej z najnowocześniejszych technik obserwacji materiału biologicznego. Znajduje ona szczególne zastosowanie w badaniach cytoszkieletu i zjawisk dynamicznych w komórce. Z tego powodu, a także dlatego, że brak jest literatury tego typu w języku polskim, zwróciłam się do autora o napisanie tego artykułu.

Podjmując się przygotowania monotematycznego numeru „Kosmosu” poświęconego ruchowi ameboidalnemu, kierowałam się przede wszystkim własną fascynacją tym problemem. Może dlatego zdaję sobie sprawę, że zebrane tu artykuły stanowią niepełny i z konieczności niejednorodny przegląd wiedzy o różnych aspektach tego zjawiska. Mam jednak nadzieję, że zachęcą one innych autorów do kontynuowania tego tematu na łamach naszego pisma.

Wszystkim Autorom, którzy zechcieli poświęcić swój czas i przygotować materiały do tomu poświęconego ruchom ameboidalnym, składałam tą drogą serdeczne podziękowania.

Lucyna Grębecka

INTRODUCTION

The study of amoeboid movement, a directed locomotion of such motile cells which never develop any permanent motor organelles, has been for many years focused mostly on the large unicellular amoebae, that is on the protozoan cells. However, the leukocytes, lymphocytes, fibroblasts and many other metazoan cells belonging to the various tissues, are also capable of autonomous locomotion. Their locomotory patterns often present special features. Nevertheless, most investigators agree to the existence of common mechanisms operating among the large variety of the motile cells. The crucial problem is then to elucidate the universal principles of cell migration.

Different new techniques were recently developed for examining the cell as a whole and exploring functions of its constituent macromolecules. Among these methods, the immunofluorescence and DNA recombination procedures permit looking into the mechanisms of amoeboid movement at the molecular level. During the last years much has been learned about the cytoskeletal network bordering the margins of the nonmuscle motile cells, its interactions with the cell membrane and their common contribution to cell locomotion.

That last topic is discussed by A. Grębecki in the article *Membrane and cytoskeletal movements in amoeboid cells*. The experimental data concerning motor relations between the cytoskeleton, membrane and cell surface during locomotory and non-locomotory movements are reviewed and compared in the free-living amoebae and tissue cells.

The second paper in this volume *migration of epithelial cells* by W. Korohoda, deals about locomotion of the keratinocytes, which became recently very popular in the cell motility studies. The article brings a large body of information about the molecular background of their motion, role of the cytoskeleton, relations between the cell shape and locomotion and factors modulating cell migration.

The locomotion of macrophages and the role of their migration in the inflammatory process is the subject of the article *Macrophages - Migrating and phagocytizing cells of immune system* by J. Kołodziejczyk. The spatial organization and regulation of the macrophage actin cytoskeleton is described, and the surface proteins that mediate macrophage adhesion and migration to the inflammation sites.

W. Kłopocka reviewed the migration of lymphocytes which are, like the leukocytes, an invasive, infiltrative cell type. The recirculation, adhesion to a specialized endothelium type and homing of the lymphocytes, are described as

components of their behaviour in the organism, which is generally under the control of histocompatibility system.

In my article *Tissue cell migration — Some factors limiting and stimulating motility* on the first place the correlation is shown between the loss of intercellular connections and cell invasiveness. Then, the influence exerted on cell locomotion by motogenic cytokines, such as Scatter Factor, Migration Stimulating Factor and Autocrine Stimulating Factor, is discussed.

The important role of Ca-binding proteins, as markers of cell and organism pathologies, is the subject of the article written by J. Kuźnicki and J. Kordowska. It seems significative that of the S-100 protein belonging to that group, is present in the highly metastatic cells, as melanoma.

In the last paper, P. Pomorski explains the principles of confocal microscopy and shows the scope of its applications in the cell biological research. The article is illustrated by some results produced with the confocal microscope installed in the Nencki Institute of Experimental Biology, in Warsaw.

When undertaking the initiative of preparing this special issue of *Kosmos* dedicated to the cell motility and migration I was in a large extent directed by my own fascination for that problem. I was therefore lucky that some colleagues have shared my enthusiasm and took on them the task of writing the reviews in the fields of their interest.

Lucyna Grębecka

ANDRZEJ GRĘBECKI

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

RUCHY BŁONY I CYTOSZKIELETU W KOMÓRKACH AMEBOIDALNYCH

Wczesne teorie ruchu błony u ameb. Wczesne teorie ruchu błony u komórek tkankowych. Ruchy białek błonowych i receptorów (capping). Hipoteza autonomicznego przepływu lipidów. Krytyka koncepcji ogólnego przepływu błony lub lipidów. Holowanie białek błonowych przez cytoszkielet i bierny przepływ lipidów.

Związek białek błonowych z cytoszkieletem. Ruchy dośrodkowe podbłonowego cytoszkieletu u ameb. Teoria ogólnego „przepływu” korteksu kurczliwego. Odklejanie się cytoszkieletu od błony pod przednią krawędzią komórki. Problem udziału miozyny w ruchach cytoszkieletu w strefie czołowej. Repolimeryzacja sieci aktynowej w czole komórki. Regulacja dynamiki błony i cytoszkieletu w czołowej krawędzi komórki.

Ruchem ameboidalnym poruszają się zarówno liczne organizmy jednokomórkowe, ameby słodkowodne, morskie i pasożytnicze, jak i wiele komórek tkankowych, fibroblasty, komórki układu odpornościowego, komórki embrionalne oraz nowotworowe w stadium inwazyjnym. Komórki ameboidalne są zdolne do przemieszczania się pod warunkiem kontaktu ze stałym podłożem. W stanie zawiesiny są one zwykle zaokrąglone i zachowują się biernie. Po przyłączeniu do podłoża mniej lub bardziej się rozplaszczają oraz zyskują polaryzację ruchową, tzn. strukturalne i funkcjonalne wyróżnienie okolicy czołowej, która przyrasta, zmienia kształt i posuwa się do przodu, oraz tylnej, która jest obkurczana i wycofywana. Siłą napędową ruchu jest aktywność skurczowa aktomiozynowego cytoszkieletu.

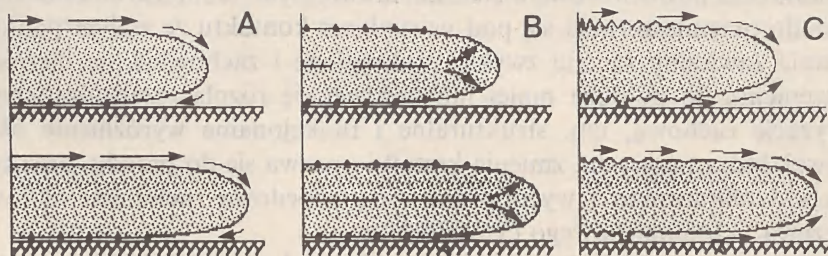
Komórki ameboidalne nie mają narządów ruchu o stałej strukturze i stałym położeniu. Zarówno same wypustki wytwarzane w ich przedniej części, zwane nibynóżkami, jak i cytoszkielet, ulegają stopniowej dezintegracji w miarę wykonywania swych funkcji ruchowych. Muszą być one zatem zastępowane nowymi i są nieprzerwanie odbudowywane w strefie czołowej. Ów stan ciągłej morfologicznej i molekularnej płynności w komórce ameboidalnej powoduje, że komórka taka w trakcie lokomocji nie tylko przemieszcza się jako całość względem podłoża, lecz wszystkie elementy jej struktury także przesuwały się względem siebie. Przedmiotem niniejszego artykułu jest udział w ruchu ameboid-

dalnym przemieszczeń błony komórkowej oraz podścielającej ją cytoszkieletalnej warstwy kurczliwej.

WCZESNE TEORIE RUCHU BŁONY U AMEB

Podstawowe pytanie, skąd się biorą i w jaki sposób są transportowane rezerwy błony komórkowej niezbędne dla okrycia wciąż przyrastających i zmieniających kształt przednich części pełzającej komórki, postawili sobie — jako pierwsi — badacze ruchu ameb swobodnie żyjących.

Na początku przyjmowano jako pewnik pogląd, że błona jest strukturą raczej permanentną. Zatem poruszająca się ameba musiałaby ją w jakiś sposób przenosić na swojej powierzchni do przodu. Tłumaczyła to koncepcja przetaczania błony (z ang. *rolling*) sformułowana blisko sto lat temu przez *J e n n i n g s a* (1904), a potem nadal akceptowana przez najbardziej znane teorie ruchu amebowego (*M a s t* 1926; *A l l e n* 1961). Obrazowo porównywano zachowanie się błony ameby do ruchu gąsienicy czołgu (rys. 1A). Oznaczałoby to, że błona jest nieruchoma po stronie brzusznej, gdzie przylega do podłoża, natomiast po stronie grzbietowej przesuwana do przodu dwukrotnie prędeziej niż cała komórka. Potwierdzały to obserwacje zachowania się przyczepionych do błony cząstek karminu albo innych podobnych znaczników. Na górnej powierzchni poruszały się one do przodu, wyprzedzając zarówno struktury cytoplazmatyczne widoczne pod błoną, jak i elementy konturu zewnętrznego wędrującej komórki. Powiedzmy od razu, że były to obserwacje poprawne w odniesieniu do części znaczników i do środkowych okolic ciała ameby.



Rys. 1. Hipotetyczne sposoby przenoszenia błony ku przedniej krawędzi ameby według teorii przetaczania błony (A), jej stacjonarności (B) i rozfaldowywania (C). We wszystkich trzech przypadkach przemieszczenie błony pokazano w dwóch kolejnych stadiach ruchu postępowego czołowej strefy komórki

Rewolucyjnie odmienną teorię ogłosił *G o l d a c r e* (1961). Zauważył on, że w roztworach barwników przyżyciowych, które wiążą się z glikoproteinami okrywającymi powierzchnię ameby, intensywne zabarwienie pojawia się w samym tyle komórki, natomiast świeżo wysuwane nowe nibynóżki wydają się

wolne od barwnika. W tyle zbierają się również niektóre znaczniki mechaniczne, np. włoski szklane, które ponadto pozostają nieruchome, gdy przylegają do bocznej powierzchni ameby. Pod wpływem tych obserwacji Goldacre sformułował teorię stacjonarności błony (rys. 1B). Zgodnie z nią błona na bocznej powierzchni pełzającej ameby pozostaje w ogóle nieruchoma, jest zaś nieprzerwanie dezintegrowana i pobierana do wnętrza w wycofywanym tyle komórki, przenoszona do przodu przez strumień płynącej cytoplazmy, a wreszcie wbudowywana ponownie w powierzchnię w strefie czołowej. Zatem transport materiału okrywającego przyrastające przednie okolice ameby nie odbywałby się na powierzchni, ale przez cytoplazmę. Goldacre jest więc właściwym twórcą koncepcji obiegu błony pomiędzy powierzchnią komórki a jej wnętrzem, chociaż liczni współcześni badacze tego zjawiska u komórek tkankowych prawie nigdy się na niego nie powołują.

Teoria błony stacjonarnej początkowo pociągnęła wielu badaczy swym nowatorstwem i prostotą, od razu jednak zaczęła budzić wątpliwości innych. Logiczną jej konsekwencją jest konieczność całkowitego odnowienia błony na powierzchni, gdy wędrująca ameba pokona odległość równą swej własnej długości. Potrzebuje ona na to około 3 minut. Czy wymiana między powierzchniami a wewnętrznymi zasobami błony istotnie może być aż tak szybka? Wolpert i O'Neill (1962) w jednej z pierwszych na świecie prac wykonanych metodą immunofluorescencji wykazali, że okres połowicznego zaniku fluorescencji na powierzchni ameby wynosi około 5 h, wymiana jest więc o dwa rzędy wielkości powolniejsza, niż należałoby się spodziewać.

We wcześniejszych obserwacjach zachowania się różnych znaczników na powierzchni ameby (cząstek stałych i barwników) tkwił paradoks — znaczniki wędrują do przodu, a ostatecznie zbierają się w tyle komórki. Teoria przetaczania błony powołuje się na to pierwsze, a teoria stacjonarności na drugie. Wyjaśnieniem tej sprawy zajęliśmy się w naszej pracowni (Czarska i Grębecki 1966). Okazało się m.in., że różnice w zabarwieniu tylnej części ameby i nowych nibynózek nie powstają stopniowo w wyniku lokomocji, ale od razu — z powodu silnego pofałdowania powierzchni w tyle, a jej gładkości w przodzie. Cząstki stałe na powierzchni ameby istotnie przesuwały się do przodu w stosunku do podłoża i do powoli zmieniającego się bocznego konturu komórki, ale ich średnia prędkość nie przekracza prędkości przesuwu komórki jako całości. Dlatego nie mogą gromadzić się na przodzie. Ruch niektórych jest opóźniony (z przyczyn wówczas nam nie znanych) i te gromadzą się w tyle. W żadnym razie ich ruch na stronie grzbietowej nie jest dwukrotnie szybszy od ruchu komórki. Ruch cząstek ma natomiast charakter symetryczny — zachodzi również po stronie brzusznej. Ponadto w warunkach podwyższonej lepkości środowiska wokół ameby powstają symetryczne prądy cieczy, o rozkładzie i prędkości odpowiadającej przesuwanemu się całej komórki i wszystkich jej części.

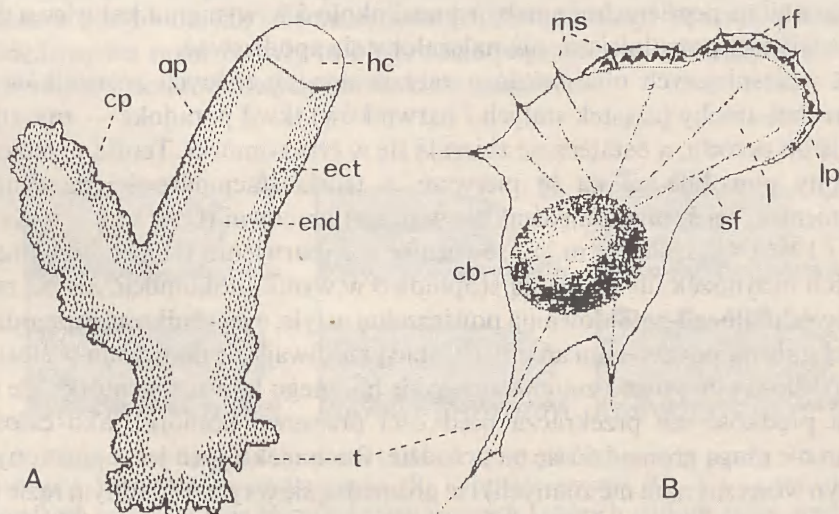
Ostatecznie więc paradoks został wyjaśniony, ale w sposób niezgodny ani z teorią przetaczania błony, ani z teorią stacjonarności. Zastąpiliśmy je teorią

fałdowania i rozfałdowywania, według której błona jest przenoszona do przodu na powierzchni ameby adekwatnie do zmian kształtu i położenia komórki, wskutek procesów nieprzerwanego fałdowania w rejonach obkurczanych i wycofywanych, wraz z równoczesnym rozfałdowywaniem w okolicach przyrastających i wysuwanych do przodu (rys. 1C).

Koncepcja ta została w krótkim czasie potwierdzona metodami filmowej analizy ruchu oraz analizy ukształtowania błony w mikroskopie elektronowym (Haberay i in. 1969, Stockem i in. 1969). Wolpert i Gingell (1968) połączyli ją zaś z koncepcją płynności błony. Dodajmy tu nawiasem, że idea płynności błony była wysunięta przez Wolperta o kilka lat wcześniej, zanim do jej sformułowania doszli ci, którzy ją potem upowszechnili.

WCZESNE TEORIE RUCHU BŁONY U KOMÓREK TKANKOWYCH

W ciągu następných dwudziestu lat nikt więcej nie zajmował się zachowaniem się błony podczas ruchu ameb swobodnie żyjących. Natomiast od samego początku lat siedemdziesiątych podjęto tę kwestię u ruchliwych komórek tkankowych, zwłaszcza u fibroblastów. Fibroblast pod względem budowy i ruchu znacznie różni się od ameb (rys. 2). Nic więc dziwnego, że zachowanie się jego błony objaśniano, przynajmniej na początku, w sposób odmienny.



Rys. 2. Schematy istotnych dla lokomocji cech budowy ameby (A) i fibroblastu (B). U **ameby**: ect — żel ektoplazmatyczny, end — endoplazma płynąca do przodu, hc — hialinowy czepek czołowy, ap — rosnąca nibynóżka, cp — nibynóżka obkurczana, t — wycofywana część zwana ogonową. U **fibroblasty**: cb — wypukłe ciało komórkowe z jądrem, l — rozplaszczona lamella, lp — lamellipodium, rf — pofałdowania błony (ruffles), ms — mikrokolce (microspikes), sf — włókna naprężeniowe (stress fibers), t — wycofywane tylne okolice komórki. Dla jasności rysunku znacznie ograniczono liczbę rf, ms i sf

W czasie ruchu fibroblastu jego ciało komórkowe zawierające jądro wytwarza, zamiast płatowatych nibynózek, jak u ameb, bardzo silnie spłaszczoną wachlarzowatą wypustkę zwaną lamellą. Na przodzie lamella przechodzi w tzw. lamellipodium, mające zaledwie kilka mikrometrów długości i około jednej piątej mikrometra grubości. Fibroblast jest przytwierdzony do podłoża za pomocą przyczepów punktowych (focal contacts) tworzonych wzdłuż nasady lamellipodium. Samo lamellipodium jest więc strukturą swobodną, która przyrasta i zmienia kształt. Między innymi wytwarza ono pofałdowania zwane ruffles, które stopniowo jedno po drugim usuwają się z krawędzi czołowej i wędrują po powierzchni lamellipodium do tyłu, w kierunku lamelli. Na krawędzi przedniej są oczywiście wciąż zastępowane przez nowe fałdki. Zjawisko to jest uważane za jeden z głównych przejawów motorycznej aktywności fibroblastu.

Wyłania się zatem ta sama kwestia, co w przypadku ameb. Jakie jest źródło błony, która ma pokryć wypustki wytwarzane przez krawędź czołową? Czy rezerwy błony są przesuwane po powierzchni komórki w miarę jej ruchu, czy pochodzą z pęcherzyków błonowych przenoszonych przez jej wnętrze i wbudowywanych w skład powierzchni na przodzie?

Na początku dominowała druga hipoteza. Jest ona oczywiście pokrewna koncepcji błony stacjonarnej u ameb (Goldacre 1961). W odróżnieniu od niej sądzono jednak, że u fibroblastów wydajność wewnątrzkomórkowego obiegu błony przewyższa potrzeby wynikłe z ruchu komórki do przodu. Skoro tak, to błona na powierzchni powinna w trakcie lokomocji komórki przesuwać się jako całość do tyłu (a więc przeciwnie, niż to obserwowaliśmy u ameb). Jest to teoria ogólnego wstecznego przepływu błony, która w latach siedemdziesiątych była poglądem najbardziej rozpowszechnionym.

Zaznaczmy od razu, że dziś znamy ruchy wsteczne wielu struktur komórkowych, białek błonowych, zewnętrznych znaczników powierzchni komórkowej itp. Zwane są one również ruchami dośrodkowymi i uważane za zjawisko powszechne we wszystkich komórkach ruchliwych (Bray i White 1988, Heath i Hollifield 1991). Występowanie ich nie jest jednak samo przez się dowodem, że błona jako całość przetacza się po powierzchni komórki do tyłu.

Historycznie pierwszym argumentem za ogólnym wstecznym przepływem całej błony powierzchniowej była obserwacja Marcusa (1962), że białko wirusa Newcastle wydostaje się na powierzchnię komórek HeLa wyłącznie w przodzie lamelli, po czym rozprzestrzenia się do tyłu.

Teorię ogólnego przepływu całej błony najbardziej rozpowszechniły badania ruchu fibroblastów przez Abercrombiego ze współpracownikami (1970, 1971, 1972). Zanalizował on wspomniany już tutaj wsteczny transport pofałdowań lamellipodiów, a także rozmaitych znaczników przywierających do powierzchni komórek, receptorów błonowych związanych z konkanawaliną, pod błoną zaś „serii nieokreślonych cieni wciąż uciekających jeden przed drugim do tyłu”. Ruchy te Abercrombie obserwował na grzbietowej stronie

lamellipodium i lamelli, a tłumaczył je właśnie jako skutek inkorporacji nadmiaru błony z wnętrza komórki do jej przedniej krawędzi. Sądził zaś, że po stronie brzusznej adhezja przeszkadza swobodnemu przepływowi błony do tyłu, natomiast umożliwia napędzanie lokomocji przez kurczliwy cytoszkielec.

Z tego okresu pochodzą także powszechnie cytowane badania *Harrisa* (1973, 1976), który pierwszy zauważył, że w nie przyczepionym do podłoża przodzie fibroblastu ruchy wsteczne są symetryczne, tzn. zachodzą również na brzusznej stronie lamellipodium. Sądził, że ten sam ogólny skurcz cytoszkieletu ciągnie komórkę do przodu, działając w miejscach jej adhezji do podłoża, a w okolicach swobodnych — ciągnie błonę do tyłu. W przypadku rosnącego neuronu postulowano (*Bra y* 1970, 1973), że system aktomiozynowy napędza transport błonowych pęcherzyków wewnątrz aksonu do przodu, a ich włączenie na przodzie w skład powierzchni powoduje odpływ całej błony zewnętrznej do tyłu.

RUCHY BIAŁEK BŁONOWYCH I RECEPTORÓW (CAPPING)

Należy mocno podkreślić, że wszystkie wczesne teorie wstecznego przepływu błony jako całości dopatrywały się siły napędowej tego ruchu w kurczliwości cytoszkieletu. Co prawda w owym czasie o budowie i funkcjach systemu aktomiozynowego w ruchliwych komórkach mięśniowych wiedziano jeszcze stosunkowo niewiele. Ponadto teorie te budowano zanim został ogłoszony tzw. mozaikowy model błony komórkowej *Singera* i *Nicholsona* (1972). Zgodnie z tym modelem dwuwarstwa lipidowa jest płynna w płaszczyźnie błony, zaś częściowo w niej pograżone cząsteczki białkowe mogą się poruszać w sposób od niej względnie niezależny. Wobec takiej budowy i reologicznych właściwości błony, wydaje się niemożliwe przyczepienie do niej elementów kurczliwych w taki sposób, aby mogły one poruszać nią jako całością.

Mniej więcej w tymże czasie zostało ponownie odkryte zjawisko cappingu. Było ono najpierw opisane (a termin „cap” użyty) u ameb przez *Ra y* (1951), ale stało się powszechnie znane znacznie później, gdy wykryto je u limfocytów (*Ta ylor i in.* 1971). Próby jego wytłumaczenia silnie się splótły z teoriami ruchu błony komórkowej. Białkowe lub związane z integralnymi białkami błonowymi receptory powierzchniowe mogą być krzyżowo wiązane („sieciovane”) przez różne ligandy, szczególnie przeciwciała i lektyny. Utworzone w ten sposób kompleksy (patches) rozpoczynają wsteczną lub dośrodkową wędrówkę po powierzchni komórki, aż zbiorą się w jeden konglomerat (tzw. cap). Stamtąd mogą być zrzucane do środowiska, albo pobierane do wnętrza komórki na drodze endocytozy.

Najwcześniejsze (*De Petris i Raff* 1973), a zarazem najpowszechniej przyjęte (*Bourguignon i Bourguignon* 1984) wytłumaczenie kierunkowego ruchu receptorów powierzchniowych w trakcie cappingu polega na ich holowaniu przez cytoszkielec. Istotnie, po paru latach zaczęły pojawiać się

pierwsze informacje o połączeniach podbłonowej warstwy aktywnej, tzw. korteksu kurczliwego, z receptorami powierzchniowymi za pośrednictwem białek wiążących aktynę, a mianowicie u fibroblastów (Ash i in. 1977; Bourguignon i Singer 1977; Toh i Hard 1977), komórek nabłonkowych (Albertini i Anderson 1977) i limfocytów (Braun i in. 1978; Flanagan i Koch 1978). Innych dowodów dostarczyły dość dawno temu badania cappingu w warunkach upośledzenia funkcji cytoszkieletu aktynowego. Już odkrywcy cappingu u limfocytów (Taylor i in. 1971) wykazali, że jest on hamowany przez cytochalazynę. Inni szybko to potwierdzili na szerszym materiale (Lor 1981). Ostatnio wyprodukowano u *Dictyostelium* (śluzowiec komórkowy mający amebowe stadium rozwoju) mutanta nie zawierającego klasycznej miozyny (De Lozanne i Spudich 1987); okazał się on niezdolny do cappingu (Pasternak i in. 1989).

A zatem ruchy na powierzchni byłyby istotnie spowodowane aktywnością skurczową cytoszkieletu, lecz przecież nie mógłby on ciągnąć wstecz całej błony. Ciągnąłby tylko „wyspy” białkowe, a otaczające je „morze” lipidów przepływałoby wokół nich w sposób niezależny, zapewne wymuszony przez zmiany kształtu i położenia frontu pęłnącej komórki.

HIPOTEZA AUTONOMICZNEGO PRZEPIYU LIPIDÓW

Przyjęcie mozaikowego modelu błony spowodowało jednak także pojawienie się krańcowo odmiennej koncepcji jej zachowania się u komórek ruchliwych. Wsunął ją i podtrzymuje Bretschler (1976, 1982, 1984). Zastąpił on dawne teorie ogólnego wstecznego przepływu błony jako całości teorią wstecznego przepływu samej warstwy lipidowej. Postuluje następujący ciąg zjawisk: endocytoza receptorowa zachodzi w tylnych częściach komórki; lipidy przechodzą w skład pęcherzyków endosomalnych; w tej postaci są przenoszone ku frontowi komórki; zostają wbudowane na drodze egzocytozy w dwuwarstwę lipidową przedniej krawędzi zewnętrznej; powoduje to wsteczny przepływ lipidów na powierzchni spowrotem ku miejscom ich endocytozy. Zachowanie się białek jest natomiast bierne, zależne od wypadkowej trzech czynników: ich swobodnej dyfuzji w lipidach, unoszenia przez płynące lipidy, ewentualnego zakotwiczenia w strukturach podbłonowych. Motoryczna rola cytoszkieletu jest przez Bretschlera całkowicie odrzucana. Autonomiczny przepływ lipidów służy mu również do logicznego, a bardzo prostego objaśnienia lokomocji i cappingu. Zatrzymanie lipidowej gąsienicy po stronie brzusznej, wskutek adhezji do podłoża, automatycznie spowoduje przesunięcie komórki do przodu. Gdy zaś chodzi o capping, białka receptorowe będą unoszone do tyłu przez płynące lipidy, jeśli ich współczynnik dyfuzji nie jest zbyt wysoki.

KRYTYKA KONCEPCJI OGÓLNEGO PRZEPLYWU BŁONY LUB LIPIDÓW

W tej sytuacji rozpatrzmy argumenty, które były i są podnoszone przeciw teorii ogólnego przepływu błony, a później w szczególności przeciw teorii autonomicznego przepływu lipidów.

Zdania co do tego, czy wydajność wewnątrzkomórkowego obiegu błony może sprostać zapotrzebowaniu wynikłemu z lokomocji i zmian kształtu, są co najmniej podzielone. Według *Abercrombiego* (1980) u fibroblastów „można je uważać za adekwatne”, a w rosnącym neuronie jest to pewne (*Bra y* 1970, 1973). Natomiast u ameb wydajność takiego obiegu błony jest niewystarczająca (*Stoc k e m* 1972). Zapewne jest także niedostateczna u granulocytów.

Wspomnijmy, że materiał powierzchniowy po internalizacji nie zawsze wraca na powierzchnię wyłącznie w przodzie. Na przykład receptory konkanawaliny są ponownie wbudowywane w powierzchnię wzdłuż całej komórki (*Vasiliev i in.* 1976). Inny wczesny kontrargument podali *Ericsson i Trinkaus* (1976). Wykazali oni, że powierzchnia fibroblastów rozplaszczonych i wędrujących wcale nie jest większa niż fibroblastów oderwanych od podłoża i zaokrąglonych, a to dlatego, że w tej drugiej sytuacji jest ona o wiele silniej sfalderowana. W sposób oczywisty przypomina się wcześniej omawiana teoria fałdowania i rozfałdowywania błony w ruchu ameb.

Najnowsze badania wskazały na trudność innego rodzaju. Zarówno w czołowej strefie fibroblastów (*Heath* 1981; *Fisher i in.* 1988), jak i ameb (*Grębecki i Kwiatkowska* 1988; *Grębecki* 1990) pojawiają się odsuwające się spod błony warstwy sieci aktywnej, które tworzą filtr nie dopuszczający większych elementów strukturalnych, a w tej liczbie pęcherzyków błonowych do właściwej krawędzi czołowej. Sieć aktywna w fibroblastach zatrzymuje już elementy o średnicy 24 nm (*Luby-Phelps i Taylor* 1988). U makrofagów rozmiary oczek w sieci aktywnej określono na 100 nm (*Hartwig i Yin* 1988; *Yin i Hartwig* 1988).

Rozważmy teraz specyficzne konsekwencje teorii autonomicznego przepływu lipidów według *Bretschera*. Jego objaśnienie lokomocji komórek, logicznie tak atrakcyjne, jest jednak fałszywe. Stwierdzono (*Geiger i in.* 1982), że w miejscach punktowej adhezji podlega unieruchomieniu około 50% białek błonowych, natomiast lipidy nadal poruszają się swobodnie. Oczywiście, bez unieruchomienia warstwy lipidowej w miejscu przyczepu do podłoża, pogląd że lipidy są odpowiedzialne za przesuw komórki do przodu musi upaść automatycznie.

Za teorią *Bretschera* ma przemawiać m.in. to, że cappingowi mogą również podlegać glikolipidy, które przecież nie mają bezpośredniego połączenia z cytoszkieletem. Mogą one jednak być z nim połączone za pośrednictwem białek transmembranowych, co niedawno udowodniono u limfocytów (*Turner i Shotton* 1987).

Według koncepcji *Bretschera* łączenie receptorów przez ligandy w większe kompleksy tylko dlatego wywołuje capping, że znacznie obniża ich współ-

czynnik dyfuzji, wobec czego zaczynają one ulegać przepływowi lipidów. Zatem capping powinien być niespecyficzny, niezależny od innych właściwości receptorów. W rzeczywistości capping jest względnie specyficzny. Tym samym argument okazuje się mało wartościowy, bo obosieczny. B r e t s c h e r powołuje się na przypadki niespecyficzności cappingu, a jego przeciwnicy na przejawy specyficzności tego zjawiska.

Bardzo ważny kontrargument wysuwają Heath i Holifield (1991). Empirycznie mierzone współczynniki dyfuzji większości białek błonowych są zbyt niskie, by mogły się one przeciwstawić przepływowi lipidów z prędkością postulowaną przez B r e t s c h e r a . Receptory powierzchniowe powinny więc być unoszone do tyłu zawsze, bez konieczności ich sieciowania w większe kompleksy. W rzeczywistości zaś są one rozproszone równomiernie, dopóki odpowiednie ligandy nie indukują cappingu.

Wreszcie kontrargument bardzo bezpośredni. Badano rozmieszczenie na powierzchni fibroblastów dwóch integralnych białek błonowych: PGP i jednej z hemaglutynin, które mają prawie identyczne współczynniki dyfuzji. Mimo to, po dodaniu specyficznych przeciwciał jedno z nich (PGP) podlegało cappingowi, a drugie (hemaglutynina) pozostawało w rozproszeniu (H o l i f i e l d i in. 1990). Możemy podsumować stwierdzeniem, że objaśnianie cappingu jako interakcji swobodnej dyfuzji białek w błonie z hipotetycznym wstecznym przepływem lipidów nie wytrzymuje krytyki doświadczalnej.

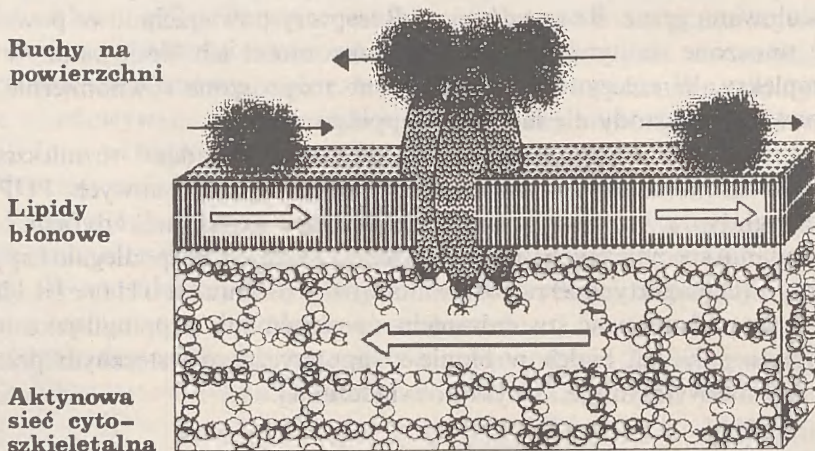
HOLOWANIE BIAŁEK BŁONOWYCH PRZEZ CYTOSZKIELET I BIERNY PRZEPLÝW LIPIDÓW

W przypadku ameb żyjących swobodnie już kilka lat wcześniej sformułowaliśmy wniosek, że nie autonomiczny przepływ lipidów, ale holowanie białek przez cytoszkielet jest przyczyną wstecznego ruchu znaczników związanych z receptorami powierzchniowymi (G r e b e c k i 1986, 1987a, 1988). Doszliśmy do tego za pomocą stosunkowo prostych metod, dzięki szczególnym zaletom ameb jako modelu do badania ruchów komórkowych.

Metodą kinematografii poklatkowej analizowano ruch na powierzchni *Amoeba proteus* i *Saccamoeba limax* cząstek lateksu, szkła i zawiesziny strąconego błękitu alcjanoowego (barwnika specyficznego dla glikoprotein powierzchni komórkowej). Jednocześnie utrzymywano pod kontrolą ruchy ziarnistości ektoplazmatycznych po drugiej stronie błony. Dodajmy od razu, że ruchy tych ostatnich są wskaźnikiem zachowania się podbłonowej sieci aktynowej, która jak dowiedliśmy nieco wcześniej (G r e b e c k i 1984, 1985, 1987b), obkurcza się u tych ameb dośrodkowo ku miejscom adhezji do podłoża (a więc w przedniej części komórki przesuwają się wstecznie).

Wykazano współlistnienie na powierzchni ameb dwóch zupełnie różnych ruchów badanych cząstek (Rys. 3). Cząstki związane adhezyjnie przemieszczają się zgodnie z ruchami ziarnistości ektoplazmatycznych po przeciwległej stronie

blony; odległości między nimi pozostają niezmiennie. Są więc one przenoszone dośrodkowo, ruchem wstecznym w przodzie komórki, a postępowym w jej tylnej części. Natomiast cząstki luźno przylegające do powierzchni, a nawet pozostające w zawieszynie w jej bezpośrednim sąsiedztwie, płyną nieprzerwanie do przodu wzdłuż całej komórki. Przepływ ich jest zupełnie nie skoordynowany z zachowaniem się ektoplazmy z drugiej strony błony, ogólnie zaś zależny od zmian położenia i kształtu czoła pełzającej ameby.



Rys. 3. Objasnienie dwukierunkowego ruchu materiałów przylegających z zewnątrz do powierzchni ameby: ich wsteczny transport (na lewo) wraz z białkami błonowymi holowanymi w tym kierunku przez cytoszkielet, albo unoszenie ku przodowi komórki (na prawo) wraz z przepływem lipidów. Dla czytelności schematu pominięto złożony charakter połączenia integralnych białek błonowych zarówno z siecią aktynową, jak z materiałami pozakomórkowymi na powierzchni

Ruchy obu tych rodzajów współwystępują w tym samym czasie na tym samym bardzo niewielkim obszarze powierzchni komórki. Na przykład, cząstki transportowane do tyłu oraz płynące do przodu często mijają się w odległości około $1 \mu\text{m}$. Ponadto, ta sama cząstka może zmienić charakter ruchu przechodząc z jednej kategorii do drugiej.

Można skonstatować ogólnie, że ruch cząstek związanych z powierzchnią ameby adhezyjnie ma taki sam charakter, jak ruch receptorów powiązanych ligandami w trakcie cappingu u komórek tkankowych (De Petris i Raff 1973), natomiast ruch cząstek luźno przylegających dokładnie odpowiada przepływowi zawieszin wokół komórki, który wykryliśmy dawniej w związku z rozfałdowywaniem się powierzchni pełzającej ameby (Czarska i Grębecki 1966). Pierwszy typ ruchu trzeba więc interpretować jako wynik holowania receptorów powierzchniowych przez cytoszkielet, czyli odzwierciedlenie czynnego zachowania się podbłonowego systemu kurczliwego, drugi zaś jako przejaw

biernego przepływu lipidów błonowych do przodu wymuszonego przez przesunięcia i rozbudowę przedniej krawędzi migrującej komórki.

Wnioski te, które wysunęliśmy kilka lat temu badając stosunkowo prostymi metodami ameby, znajdują obecnie potwierdzenie w wyniku zastosowania najnowocześniejszych technik badawczych do komórek tkankowych. Na przykład grupa *Sheetz* analizowała, korzystając z aparatury wideo o rozdzielczości sięgającej nanometrów, ruchy cząstek złota o średnicy 40 nm, pokrytych konkanawaliną, na powierzchni makrofagów i keratocytów ryb (*Sheetz* i in. 1989; *Kucik* i in. 1989, 1990). W granicach tego samego bardzo niewielkiego obszaru niektóre cząstki wykazywały przypadkową dyfuzję, a inne ruch kierunkowy zarówno postępowy, jak wsteczny; ponadto ta sama cząstka mogła w trakcie obserwacji przechodzić od jednego typu ruchu do innego. Zdaniem autorów ruch jednych cząstek jest przejawem cappingu, a inne biernie dryfują zgodnie z ruchem całej komórki. Zgodność tych rezultatów i ich interpretacji z prawidłowościami zaobserwowanymi wcześniej u ameb jest więc stuprocentowa.

Cząstki koloidalnego złota pokrywano także poly-L-lizynami o różnej długości łańcucha (4 kD i 240 kD), po czym badano ich ruch na powierzchni fibroblastów (*De Brabander* i in. 1991). Pierwsze wykazywały tylko ruchy Browna i dyfuzję, a drugie podlegały transportowi wstecznemu (hamowanemu przez cytochalazynę). Pierwsze więc odzwierciedlały bierne zachowanie się lipidów w błonie, a drugie ruchy podbłonowego cytoszkieletu.

Wreszcie, nasze obserwacje wskazujące, że u ameb lipidy błony nie płyną do tyłu, lecz przesuwają się do przodu ruchem wymuszonym przez przyrost czołowej strefy komórki, znalazły ostatnio bezpośrednie potwierdzenie na granulocytach (*Lee* i in. 1990). Po włączeniu fluorescencyjnego analogu lipidowego do błony granulocytu wygaszono za pomocą wiązki laserowej świecenie małego prostokątnego obszaru na jego powierzchni. W ciągu 5 sekund zanim powróciła fluorescencja obszar ten przesunął się do przodu z taką samą prędkością, jak czołowa krawędź komórki.

Wszystkie badania ruchów na powierzchni komórek ameboidalnych, zarówno swobodnie żyjących jak tkankowych, dowodzą więc zgodnie, że ich siłą napędową są ruchy podbłonowego cytoszkieletu, a nie hipotetyczny wsteczny przepływ lipidów. Dodajmy, że po zignorowaniu motorycznej roli cytoszkieletu brakłoby siły napędowej także dla wewnątrzkomórkowego ramienia obiegu lipidów, przede wszystkim dla ich transportu przez cytoplazmę ku przodowi komórki, ale także dla ich endocytozy i egzocytozy. Dowody na motoryczne funkcje systemu aktomiozynowego w komórkach ameboidalnych są tak ważne i obfite, że podjęta ostatnio izolowana próba szukania źródła ich siły napędowej w potencjałach błonowych (*Dooly* 1987) zapewne nie ma szans powodzenia.

ZWIĄZEK BIAŁEK BŁONOWYCH Z CYTOSZKIELETEM

Do tej pory wielokrotnie, ale raczej dość ogólnikowo odwoływaliśmy się do odpowiedzialności cytoszkieletu za ruchy powierzchni komórki. Aby konkretniej uzasadnić i wyjaśnić tę jego funkcję, trzeba wykazać po pierwsze, że peryferyjna sieć aktynowa jest połączona z błoną, a ściślej mówiąc, z białkami błonowymi; po drugie, że sama wykonuje ruchy lateralne w płaszczyźnie błony; wreszcie po trzecie, należałoby przedstawić współczesne poglądy na molekularne mechanizmy tej funkcji cytoszkieletu.

Oczywiście, związek ruchów zachodzących na powierzchni komórki z ruchami cytoszkieletu wymaga mechanicznego połączenia białek błonowych z podbłonową siecią aktynową. Nie jest to połączenie bezpośrednie. Pośrednikami są niektóre spośród białek wiążących aktynę, te które mają ponadto inne specyficzne miejsca wiązania pozwalające im przyłączać się z drugiej strony do białek transmembranowych, albo wchodzić w skład złącz bardziej złożonych. Opisano już co najmniej dziesiątki takich białek (por. Tilney 1983; Schliwa 1986; Bershady i Vasiliev 1988; Manges 1988). Spośród ważniejszych i szeroko rozpowszechnionych w różnych komórkach wymienimy spektrynę i białka do niej podobne, jak fodryna, ankiryne, winkulinę, α -aktyninę.

Ameby swobodnie żyjące, które tak często okazywały się znakomitym obiektem eksperymentu fizjologicznego, są przeciwnie, bardzo trudnym materiałem dla prac biochemicznych, a nawet immunocytochemicznych. Z tego powodu dopiero w ostatnim czasie zaczęły się pojawiać pierwsze informacje o białkach wiążących ich aktynę z błoną komórkową. Znamy już jednak pontikulinę, która pełni tę rolę w amebowym stadium śluzowca *Dictyostelium* (Wuestehube i Luna 1987). Stosunkowo nieźle jest poznana pod względem biochemicznym niewielka *Acanthamoeba*; u tej ameby znane są analogi spektryny (Pollard 1984; Kwiatkowska i Sobota 1990). U *Amoeba proteus*, która jest najczęściej używana jako obiekt w fizjologii ruchu, znaleziono α -aktyninę i winkulinę. Stosując metody immunofluorescencyjne, Brix i in. (1990) stwierdzili obecność bardzo cienkiej warstwy α -aktyniny pomiędzy błoną a warstwą aktynową, winkulina zaś skupiała się w miejscach przyczepu ameby do podłoża.

Nie ma więc żadnych wątpliwości, ani w przypadku komórek tkankowych, ani ameb swobodnie żyjących, co do samego istnienia i natury połączeń warstwy aktynowej z błoną komórkową. O ich funkcjonalnym znaczeniu zaświadczyło zastosowanie do komórek będących w toku cappingu metody podwójnej immunofluorescencji lub technik pokrewnych. Równocześnie stosowano z jednej strony oznakowane ligandy wiążące receptory powierzchniowe, a z drugiej oznakowane przeciwciała specyficzne dla poszczególnych białek cytoszkieletu. Przede wszystkim ujawniono tym sposobem, że aktyna (Gabbiani i in. 1977; Tohi i Hard 1977) albo aktyna i miozyna (Bourguignon i Singer 1977) skupiają się pod kompleksami powiązanych receptorów oraz przesuwały się wraz z nimi w trakcie cappingu (Heath 1983b). Inni wykazali

skupianie się w tych samych miejscach białek wiążących aktynę oraz uczestniczących w jej połączeniach z białkami błonowymi (np. α -aktyliny, spektryny, fodryny, ankiryny). Te transmembranowe połączenia między receptorami powierzchniowymi a cytoszkieletem są na tyle trwałe, że nie zrywają się po ekstrakcji lipidowej frakcji błony z użyciem detergentów. Mało tego, nawet wtedy mogą zachować zdolność działania. Mianowicie, według *Bershadsky i Vasiliev* (1988) limfocyty poddane ekstrakcji saponiną mogą nadal dokonywać cappingu konkanawaliny po podaniu ATP. W doświadczeniu tym capping powierzchniowych kompleksów białkowych zostaje zatem wykonany przez sam „wypreparowany” cytoszkielet.

RUCHY DOŚRODKOWE PODBŁONOWEGO CYTOSZKIELETU U AMEB

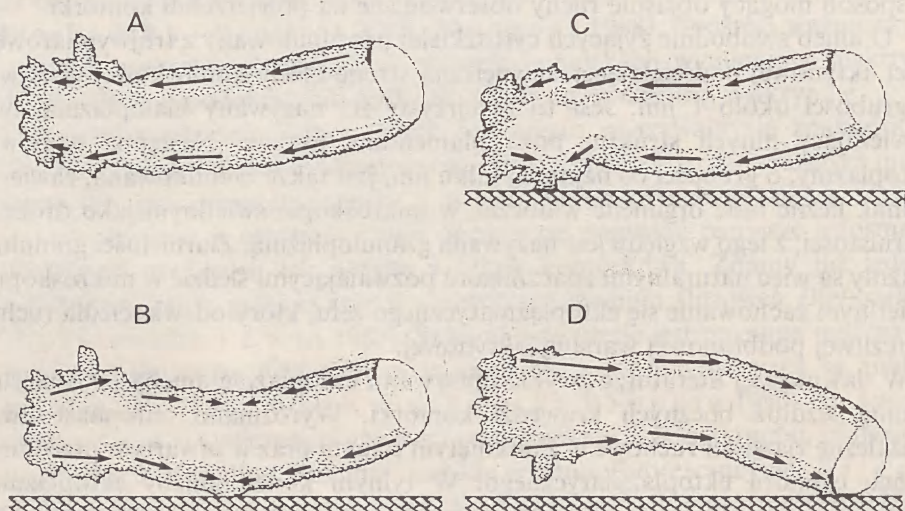
Przejdźmy z kolei do drugiego z uprzednio postawionych pytań: czy peryferyjny cytoszkielet komórek ameboidalnych sam przesuwają się pod błoną w sposób mogący objaśnić ruchy obserwowane na powierzchni komórki.

U ameb swobodnie żyjących cytoszkielet jest zbudowany z trójwymiarowej sieci aktynowej podścielającej wewnętrzną stronę błony komórkowej warstwą o grubości około 1 μm . Jest to przejrzysty żel nazywany hialoplazmą, nie zawierający innych struktur poza filamentami aktyny. Następna warstwa ektoplazmy, o grubości co najmniej kilku μm , jest także żelifikowana, zawiera jednak liczne inne organelle widoczne w mikroskopie świetlnym jako drobne ziarnistości; z tego względu jest nazywana granuloplazmą. Ziarnistości granuloplazmy są więc naturalnymi znacznikami pozwalającymi śledzić w mikroskopie świetlnym zachowanie się ektoplazmatycznego żelu, który odzwierciedla ruchy kurczliwej podbłonowej warstwy aktynowej.

W dawniejszej literaturze zwykle opisywano ektoplazmę ameby jako nieruchomą wzdłuż bocznych krawędzi komórki. Wyróżniano natomiast dwa niezależne zjawiska ruchowe w zamkniętym tylnym oraz w otwartym przednim końcu cylindra ektoplazmatycznego. W tylnym końcu ameby ektoplazma porusza się do przodu w związku z wycofywaniem się strefy ogonowej. Na samym przodzie natomiast może ona ruchem wstecznym odsuwać się od krawędzi czołowej, pod którą jest nieprzerwanie odtwarzana na drodze żelifikacji endoplazmy (tzn. polimeryzacji aktyny). Zjawisko to nazwano ruchem fontannowym, bo istotnie napływająca środkiem endoplazma, a wokół niej powracająca ektoplazma, razem tworzą przestrzenną pętlę w kształcie fontanny.

Tradycyjny pogląd, że peryferyjna warstwa kurczliwa pozostaje nieruchoma wzdłuż prawie całej komórki sprawdzaliśmy za pomocą filmowej analizy zachowania się granuloplazmy u dwóch gatunków i kilku form morfologicznych ameb swobodnie żyjących (*Grębecki* 1984, 1985, 1987b). Ameby te były badane w warunkach różnego kontaktu z podłożem oraz — całkowitego braku przyczepu.

Ameba oczywiście nie może posuwać się wzdłuż podłoża, jeśli jest pozbawiona kontaktu z nim. Wewnątrz unieruchomionej w ten sposób komórki cytoszkieletalny motor jednak nadal pracuje, chociaż „na jałowym biegu”. Endoplazma jak zwykle środkiem płynie do przodu, wobec czego zżelifikowana ektoplazma wycofuje się jako całość, wzdłuż boków ameby aż do samego jej tyłu, a nie tylko w strefie czołowej (rys. 4A). Analiza rozkładu prędkości tego wstecznego ruchu pod błoną ameby dowiodła, że cała peryferyjna warstwa kurczliwa funkcjonuje równomiernie — nie ma odcinków biernie wleczonych, lecz wszystkie w trakcie wycofywania same się skracają. A więc, wbrew dawniejszym opisom, cały podbłonowy cytoszkielet ameby jest kurczliwy i zdolny do skoordynowanego przesuwu wstecznego, właśnie takiego, jaki może powodować wsteczne ruchy występujące po drugiej stronie błony, na powierzchni komórki.



Rys. 4. Przesuwanie się całego żelu ektoplazmatycznego do tyłu komórki u ameby zawieszony w środowisku bez kontaktu z podłożem (A), oraz jego dośrodkowe obkurczanie się ku miejscom adhezji u ameby przyczepionej do podłoża po środku swej brzusznej powierzchni (B), w strefie ogonowej (C) albo w strefie czołowej (D). Długości strzałek pokazują, że szybkość przesuwu przyrasta w miarę oddalania się od miejsca przyczepu

Obraz ten ulega tylko wtórnym modyfikacjom, gdy ameba pozostaje w warunkach naturalnych i pełźnie do przodu. Zwykle jest ona wówczas przyczepiona do podłoża gdzieś w środkowo-przedniej okolicy ciała. Wtedy cała peryferyjna warstwa cytoplazmy obkurcza się dośrodkowo, od obu swobodnych biegunów komórki ku strefie przyczepu (rys. 4B). Analiza prędkości wskazuje ponownie, że jest to ruch związany z równomiernym skurczem wzdłuż całej

komórki, choć kierunki przesuwu materiału są przeciwne w jej przedniej i tylnej części. Zatem od dawna niezależnie opisywane wycofywanie strefy ogonowej i ruch fontanny w strefie czołowej wcale nie są dwoma różnymi zjawiskami; są to tylko lokalne przejawy tego samego wspólnego procesu — nieprzerwanego dośrodkowego obkurczania się całego cytoszkieletu. U normalnie pełzającej ameby wsteczny ruch cytoszkieletu obserwuje się więc w nie przytwierdzonym do podłoża przednim odcinku komórki, dokładnie tam gdzie również rozmaite znaczniki powierzchni komórkowej są transportowane do tyłu.

W trakcie lokomocji ameba zdarza się, że chwilowo przylega ona do podłoża tylko przednim, albo tylko tylnym końcem swej strony brzusznej. Oczywiście w takich przypadkach cytoszkielet przesuwa się jako całość albo wyłącznie do przodu, albo wyłącznie do tyłu (rys. 4C, D). We wszystkich sytuacjach przesuw podbłonowej warstwy kurczliwej jest całkowicie zgodny z ruchami na powierzchni tych znaczników, które przylegają do niej adhezyjnie.

Opisane tu zjawiska posłużyły do opracowania modelu i komputerowej symulacji dynamiki cytoszkieletu u ameb (D e m b o 1989).

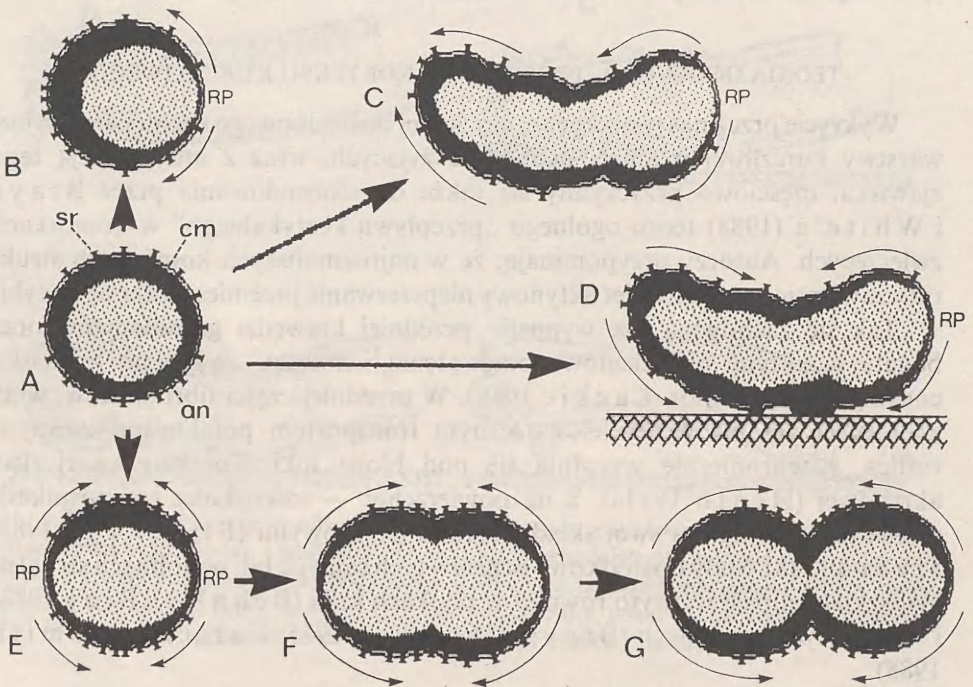
TEORIA OGÓLNEGO „PRZEPLYWU” KORTEKSU KURCZLIWEGO

Wykrycie przez nas wstecznego, czy ściślej dośrodkowego ruchu peryferyjnej warstwy kurczliwej u ameb swobodnie żyjących, wraz z interpretacją tego zjawiska, częściowo przyczyniły się także do sformułowania przez B r a y a i W h i t e ' a (1988) teorii ogólnego „przepływu korykalnego” w komórkach zwierzęcych. Autorzy przypominają, że w najrozmaitszych komórkach struktury zawierające cytoszkielet aktywny nieprzerwanie przemieszczają się do tyłu.

Tak się zachowują np. wypustki przedniej krawędzi granulocytów oraz bogate w aktyne pierścieniowe przewężenia ich ciała, zwane po angielsku constriction rings (por. L a c k i e 1986). W przedniej części fibroblastów, wraz z opisywanym już wcześniej wstecznym transportem pofałdowań zwanych ruffles, synchronicznie wycofują się pod błoną łuki skondensowanej sieci aktynowej (H e a t h 1983a), a na powierzchni — mikrokolce (microspikes), zwane też, z uwagi na swój skład, żebrami aktynowymi (F i s h e r i in. 1988; I z z a r d 1988). Stały dośrodkowy przesuw tych samych lub podobnych struktur cytoszkieletalnych wykryto również w płytkach krwi (B e h n k e i B r a y 1988) i w rosnących neuronach (B r a y i C h a p m a n 1985; F o r s c h e r i S m i t h 1988).

Zgodnie z koncepcją ogólnego przepływu korykalnego aktywność skurczowa podbłonowej sieci aktynowej nie jest równomierna. W jednych okolicach bywa ona wzmożona, a gdzie indziej zachodzi lokalna relaksacja. Od tego zależy rozkład ruchów warstwy korykalnej pod powierzchnią komórki. Przesuwa się ona zawsze od ośrodków relaksacji ku okolicom silniej się kurczącym. Jest to w istocie ta sama zasada, którą wcześniej stosowaliśmy do ameb, tłumacząc wycofywanie się ich peryferyjnej warstwy kurczliwej ze zrelaksowanej strefy przedniej.

Teoria B r a y a i W h i t e ' a oczywiście odwołuje się do połączeń pomiędzy białkami cytoszkieletu a białkami integralnymi błony i receptorami powierzchniowymi (rys. 5A). Zatem, jeżeli gdzieś w korteksie komórki zachodzi miejscowa relaksacja, warstwa aktynowa musi płynąć do przeciwnego bieguna i holować za sobą receptory powierzchniowe; w sytuacji takiej komórka może nie być jeszcze ani przytwierdzona do podłoża, ani spolaryzowana morfologicznie, będzie jednak wykonywać capping (rys. 5B). W komórce zaś z rozwiniętą polaryzacją ruchową, ale bez kontaktu z podłożem, peryferyjny cytoszkielet musi „na jałowym biegu” wycofywać się aż do tylnego krańca komórki (rys. 5C). Po przytwierdzeniu do podłoża wsteczny ruch warstwy kurczliwej spowoduje automatycznie przesuwanie komórki do przodu, a sam rozłoży się wokół strefy adhezji (rys. 5D). Przepomnijmy, że te dwie ostatnie sytuacje przewidziane w teorii B r a y a i W h i t e ' a były już wcześniej zarejestrowane w rzeczywistości u ameb (por. rys 4).



Rys. 5. Schemat ogólnego przepływu kortykalnego według B r a y a i W h i t e ' a (zmodyfikowany). Komórka nie spolaryzowana (A), dokonująca cappingu (B), spolaryzowana ruchowo, lecz nie przyczepiona do podłoża (C), poruszająca się po podłożu (D) oraz w trakcie podziału (E-G). W kompleksie kortykalnym zaznaczono błonę (cm), receptory powierzchniowe (sr), sieć aktynową (an); nie są zachowane rzeczywiste proporcje rozmiarów tych elementów. RP — biegun zrelaksowany, strzałki oznaczają spodziewane kierunki przesuwania się kortykalnej warstwy kurczliwej.

Szczegółowe objaśnienia w tekście

Według Braya i White'a wsteczny przepływ uformowanego cytoszkieletu pod błoną wędrującej komórki musi być zawsze skompensowany przepływem przez cytoplazmę zdepolimeryzowanego materiału kurczliwego ku przodowi. Teoria przepływu kortykalnego odwołuje się więc do istnienia prądu cytoplazmatycznego od dawna doskonale poznanego u ameb, lecz wciąż dyskusyjnego u komórek tkankowych.

Teorią ogólnego przepływu kortykalnego autorzy starają się objaśnić nawet zachowanie się peryferyjnej warstwy kurczliwej w trakcie podziału komórkowego, czyli cytokinezę. Wychodzą z założenia, że powstają wówczas dwa bieguny relaksacji (rys. 5E). Pogląd taki nie jest powszechny, ale był już wysuwany w przeszłości (Wolpert 1960) i współcześnie (Devore i in. 1989; Fukui i Inoué 1991). Znajduje on m.in. oparcie w badaniach Hiramoto (1963) świadczących, że w jajach jeżowca przed bruzdkowaniem naprężenie warstwy kortykalnej najpierw ogólnie rośnie, a potem raptownie spada w miejscach dwóch przyszłych biegunów. Wobec tego kortykalna sieć aktynowa powinna przesuwać się od obu biegunów w kierunku równika (rys. 5F) i utworzyć tam, pod bruzdą podziałową pierścień materiału kurczliwego (rys. 5G). Takie pierścienie kurczliwe i ich aktynowy charakter znane są od dawna. Wiadomo też, że w ich skład wchodzi również miozyna (Yumura i Fukui 1985; Schroeder 1987; Schroeder i Otto 1988; Fukui i Inoué 1991). Zgodnie z przewidywaniami przesuwały się cytoszkielet holuje w kierunku równika kompleksy receptorów powierzchniowych. Na przykład dzielące się makrofagi potraktowane konkanawaliną wykonują capping do bruzdy podziałowej (Koppel i in. 1982). To samo obserwuje się w innych komórkach i przy użyciu innych ligandów.

Zatem według teorii ogólnego przepływu kortykalnego aktomiozyny cytoszkielet nie rozwija się wskutek polimeryzacji białek kurczliwych na miejscu pod bruzdą podziałową, ale w postaci już uformowanej nasuwa się od strony obu biegunów. Komputerowa symulacja takiego mechanizmu (White i Borisov 1983) wykazała dużą zgodność z rzeczywistym przebiegiem cytokinezy. Jest to koncepcja niewątpliwie pociągająca dla badaczy ruchów amebowych, bo zakłada odtwarzanie się cytoszkieletu na drodze polimeryzacji w zrelaksowanych okolicach dzielącej się komórki (tak jak w czole pełzającej ameby), a nie odwrotnie.

ODKLEJANIE SIĘ CYTOSZKIELETU OD BŁONY POD PRZEDNIĄ KRAWĘDZIĄ KOMÓRKI

Na czym polega relaksacja czoła ameby w toku lokomocji i jakie jest jej funkcjonalne znaczenie? O samym jej istnieniu świadczą eksperymenty fizjologiczne. Lokalne anestetyki przykładane mikropipetką do bocznej powierzchni ameby wywołują powstawanie w tych miejscach nowych stref czołowych, a przykładane do części przedniej intensyfikują przyrost i ruch szczytów już

istniejących tam nibynózek (Goldacre 1952; Korohoda 1972, 1977; Kalisz i Korohoda 1976). W ten sam sposób działa miejscowe zacienianie szczytów nibynózek, natomiast drażnienie wąską wiązką światła odwrotnie, prowadzi do ich zatrzymania, obkurczania i wycofywania; takie same bodźce świetlne przykładane do bocznych i tylnych okolic ameby wywierają przeciwne skutki — bodziec skurczowy przyspiesza, a rozkurczowy zwalnia ruch całej komórki (Grębecki 1980, 1981). Zatem ogólnie cała warstwa peryferyjna zachowuje się jakby była w stanie skurczu, z wyjątkiem czoła będącego w stanie relaksacji.

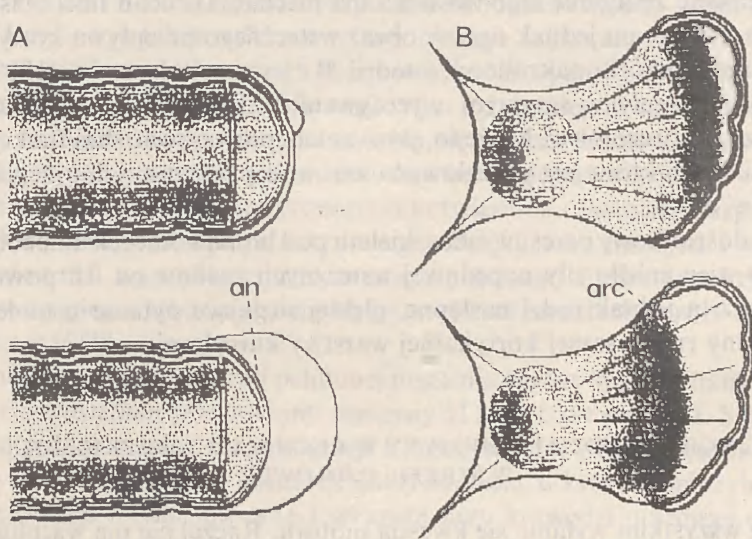
Z drugiej strony jednak, opisywaliśmy już tutaj intensywny ruch wsteczny cytoszkieletu właśnie w czołowej strefie ameby, zwanej z tego powodu strefą fontannową, a także pod przednią krawędzią ameboidalnych komórek tkankowych. Nie może więc tam zachodzić relaksacja samego systemu aktomiozynowego, bo wówczas ustałyby ruchy cytoszkieletu. Jest natomiast coś, co powoduje nieefektywność tych ruchów z punktu widzenia lokomocji komórki. Układ pozostaje biochemicznie funkcjonalny, ale staje się mechanicznie niesprawny.

Już ponad dziesięć lat temu wykazano w mikroskopie elektronowym, że pod samą przednią krawędzią wędrującej ameby peryferyjna sieć aktynowa nie przylega bezpośrednio do błony, lecz jest od niej znacznie odsunięta (Grębecka i Hrebenda 1979; Wehland i in. 1979; Stockem i in. 1982). Powstała wolna przestrzeń zajmuje przejrzysta cytoplazma (tz. czepek hialinowy), z której wszystkie większe elementy strukturalne zostały odfiltrowane przez sieć aktynową. Wiadomo zaś przecie, że warstwa kurczliwa nie przytwierdzona do błony nie może przekazać siły napędowej, choćby się sama poruszała.

Wspomnijmy przy okazji, że funkcjonalna relaksacja czoła ameby spowodowana lokalnym zerwaniem kontaktu między błoną a cytoszkieletem leży u podstawy współczesnej koncepcji ruchu amebowego, zwanej teorią ogólnej kurczliwości kortykalnej (Grębecki 1981, 1982, 1987c; Grębecka 1988; Stockem i Kłopocka 1988). Peryferyjny skurcz całej sieci aktynowej przyczepionej do błony podnosi ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz komórki, z wyjątkiem strefy czołowej, gdzie cytoszkielet jest od błony oderwany. Ciśnienie w przodzie jest więc niższe, co powoduje przepływ cytoplazmy w tym kierunku. Strefy czołowe, w których związek błony z cytoszkieletem jest zerwany (lub odbudowywany), pełnią więc rolę zaworów, których otwieranie i przemykanie reguluje kierunek i intensywność przepływu wewnątrzkomórkowego, a tym samym steruje ruchem całej ameby.

W ostatnich latach, m.in. dzięki zastosowaniu najnowszych technik wideo-mikroskopii i komputerowego wzmacniania kontrastu, udało się zaobserwować u żywych ameb o błonie zdestabilizowanej szokiem cieplnym (Grębecki i Kwiatkowska 1988; Kłopocka i in. 1988), a także w trakcie normalnego ruchu i endocytozy (Grębecki 1990, 1991), jak dochodzi do zrywania i odtwarzania kontaktu cytoszkieletu z błoną. Oba te procesy nieprzerwanie zachodzą w przodzie ameby i mają charakter cykliczny. Mniej

więcej co 2 s odrywa się warstwa sieci aktynowej, powodując uwypuklenie krawędzi czołowej i jej raptowne przesunięcie do przodu. Oderwana warstwa cytoszkieletu wędruje w tym czasie do tyłu z prędkością kilku μm na sekundę. Pod błoną zaś następuje repolimeryzacja sieci aktynowej, już wcześniej pokazana metodami immunofluorescencyjnymi (G a w l i t t a i i n. 1980b; S t o c k e m i i n. 1983), która prowadzi do jej odbudowy, następnego odklejenia i następnego „kroku” do przodu (rys. 6A). Bodźce dodatnie przyspieszają postępowy ruch czoła ameby, bo wzmagają odrywanie się warstw cytoszkieletu od błony. Ujemne natomiast hamują to zjawisko, wobec czego sieć aktynowa, wciąż przesuując się wstecz, ciągnie za sobą błonę krawędzi przedniej i powoduje wycofanie się dawnego czoła.



Rys. 6. Schematy ilustrujące fazy odrywania się podbłonowej sieci aktynowej (an) i jej wycofywania się w strefie czołowej ameby (A) oraz dwa stadia wstecznego ruchu tzw. łuków aktynowych w lamelli fibroblastów (B)

Konieczność rozerwania związku warstwy aktynowej z błoną w przedniej krawędzi komórki wynika również z komputerowej symulacji dynamiki cytoszkieletu u ameb przeprowadzonej przez D e m b o (1989).

Także w przypadku makrofagów odklejenie się błony od cytoszkieletu wskutek rozrywania filamentów jest uważane za warunek wysuwania pseudopodiów (H a r t w i g i Y i n 1988). Podobne znaczenie funkcjonalne zapewne ma brak fodryny, jednego z białek wiążących aktynę z błoną, obserwowany pod przednią krawędzią pobudzonych komórek nabłonkowych tarczycy (G a b r i o n i i n. 1990).

Zjawisko bardzo podobne do odsuwania się kolejnych warstw kurczliwych od przedniej krawędzi czoła ameby było już wcześniej opisane u fibroblastów

(Heath 1981, 1983a; Soranno i Bell 1982). Jest ono widoczne w lamelli (rys. 6B). Pod jej powierzchnią grzbietową seryjnie przesuwają się ku tyłowi koncentryczne łuki skondensowanej sieci aktynowej. Ruch ich jest skoordynowany z wycofywaniem receptorów powiązanych ligandami (Heath 1983b) oraz innych struktur powierzchniowych i cytoplazmatycznych (Fisher i in. 1988). Przesuw łuków aktynowych w lamelli fibroblastów jest kilkadziesiąt razy wolniejszy ($0,1-0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) niż w strefie czołowej ameb, podobnie jednak różnią się między sobą prędkości lokomocji tych komórek. Na razie nie wiemy, czy warstwa kurczliwa w fibroblastach odkleja się od samej ich przedniej krawędzi, bo do tej pory wędrówkę łuków aktynowych obserwowano jedynie na terenie lamelli, a nie w lamellipodium. W związku z tym o wiele jest trudniej zinterpretować znaczenie tego zjawiska dla mechaniki ruchu fibroblastów, niż dla ameb. Na pewno jednak ogólny obraz wstecznego przepływu kortykalnego wzdłuż całej komórki nakreślony w teorii Braya i White'a (1988) warto uzupełnić nieciągłym, seryjnym wycofywaniem kolejnych warstw sieci aktynowej ze strefy czołowej. Może to, jak u ameb, powodować stan funkcjonalnej relaksacji czoła, która jest postulowana zarówno przez nas, jak przez Braya i White'a.

Stały dośrodkowy przesuw cytoszkieletu pod błoną komórek ameboidalnych tłumaczy więc źródło siły napędowej wstecznych ruchów na ich powierzchni. Odpowiedź ta jednak rodzi następne, głębiej sięgające pytania o molekularne mechanizmy ruchu samej kortykalnej warstwy kurczliwej.

PROBLEM UDZIAŁU MIOZYNY W RUCHACH CYTOSZKIELETU W STREFIE CZOŁOWEJ

Przede wszystkim wyłania się kwestia motoru. Raczej nie ma wątpliwości, że dośrodkowy przepływ kortykalnego cytoszkieletu jest wynikiem interakcji aktyny z miozyną. Ale rozmieszczenie w komórkach miozyny II tzn. „konwencjonalnej” miozyny dwugłówkowej analogicznej do miozyny mięśniowej, nie jest zgodne z topografią obserwowanych ruchów. Wsteczny przesuw aktynowego cytoszkieletu zaczyna się bowiem już od przedniej krawędzi komórki, gdzie z reguły nie znajduje się miozyny II, ani w postaci grubych filamentów widocznych w mikroskopie elektronowym, ani metodami immunofluorescencyjnymi.

W fibroblastach miozyna II jest obecna w tyle komórki, wzdłuż bocznych peryferii oraz w lamelli, ale nie w lamellipodium (Heath 1983a). U ameb swobodnie żyjących grube filamenty miozynowe są skoncentrowane w obkurczających się i wycofywanych okolicach ciała, a nieobecne w strefie czołowej (Stocckem i in. 1982), co ostatnio potwierdziły badania immunocytochemiczne (Brix i in. 1990). Zgodnie z tym, w warstwach aktynowych szeregowo odklejających się spod przedniej krawędzi ameby brakuje miozyny II, a pojawia

się ona dopiero po ich wycofaniu w głąb komórki (Kłopotcka i in. 1988). Również w amebowym stadium *Dictyostelium* miozyna II została wykryta immunologicznie tylko w tylnych okolicach komórki (Yumura i in. 1984; Fukui i Yumura 1986). W toku podziału *Dictyostelium* miozyna II jest rozmieszczona równikowo w pierścieniu kurczliwym, natomiast po stronie obu biegunów, tzn. na terenie przyszłych czoł komórek potomnych, jest nieobecna (Fukui i Inoué 1991).

W związku z tym ostatnio często przypisuje się napęd intensywnych ruchów cytoszkieletu w przedniej strefie komórek ameboidalnych innej miozynie, obecnej tylko w komórkach niemięśniowych, miozynie I. Prawie dwadzieścia lat temu Pollard i Korn (1973) wykryli ją u swobodnie żyjącej *Acanthamoeba*, zidentyfikowano ją także u *Dictyostelium*, obecnie zaś uważa się ją za rozpowszechnioną również w komórkach tkankowych. Miozyna I nie tworzy filamentów oraz jest jednogłówkowa. Ma więc tylko jedno miejsce wiązania z aktyną wrażliwe na ATP i zdolne do przesuwania się wzdłuż filamentu aktynowego. Występują w niej natomiast jedno albo dwa inne miejsca wiązania — na ATP niewrażliwe, ale zdolne do statycznego zakotwiczenia cząsteczki bezpośrednio do błony do innego filamentu aktynowego. Dzięki temu miozyna I wywołuje w odpowiednich warunkach przesuwanie się jednego filamentu aktynowego względem drugiego, albo względem błony, w eksperymentach *in vitro* (Adams i Pollard 1989).

Pewne fakty świadczą o roli pełnionej przez nią *in vivo*. Wspominany już tutaj mutant *Dictyostelium* pozbawiony miozyny II (De Lozanne i Spudich 1987) jest jednak zdolny do lokomocji i fagocytozy, a zawiera on miozynę I. U genetycznie normalnych komórek *Dictyostelium*, u których miozyna II jest skoncentrowana z tyłu, miozynę I wykryto przy krawędzi przedniej (Fukui i in. 1989). Przypuszcza się, że także w komórkach tkankowych, np. w strefie czołowej rosnącego neuronu albo w lamellipodiach fibroblastów miozyna I może zastępować nieobecną tam „konwencjonalną” miozynę II (Smith 1988; Adams i Pollard 1989; Heath i Holifield 1991). Rozwiązywałoby to zagadkową kwestię motoru napędzającego intensywny wsteczny transport warstwy aktynowej spod przedniej krawędzi komórek ameboidalnych.

Istnieją co prawda hipotezy proponujące alternatywne rozwiązania. Na przykład Heath (1983a) dopuszczał możliwość ciągnięcia sieci aktynowej w lamellipodium przez skurcz zachodzący poza nim, na obszarze lamelli gdzie już występuje miozyna II. Ale w taki razie cała warstwa korytkalna w strefie czołowej powinna być wleczone z jednakową prędkością, jak jeden bierny blok. U ameb taki mechanizm został wykluczony. Pomiar prędkości przesuwu cytoszkieletu wzdłuż całej komórki (Grębecki 1984, 1987a) wskazały, że sieć aktynowa pod krawędzią przednią wycofuje się aktywnie, bo po drodze sama się kurczy.

REPOLIMERYZACJA SIECI AKTYNOWEJ W CZOLE KOMÓRKI

Istnieje jeszcze inne objaśnienie wstecznego ruchu aktywny w przodzie komórki. Jest ono oparte na sposobie polimeryzacji filamentów aktynowych przylegających do błony. Filamenty ułożone prostopadle do błony zawsze są do niej zwrócone jednym ze swych końców, zwanym po angielsku *barbed end*. Jest tak m.in. u *Acanthamoeba* (Pollard i Korn 1973) i w lamellipodiach fibroblastów (Small 1981). Ten właśnie skierowany do błony koniec filamentu jest zarazem odpowiedzialny za jego wydłużanie się wskutek przyłączania nowych monomerów aktywny. Filament rośnie więc, jak paznokieć — od nasady. A zatem wszystkie cząsteczki wchodzące wcześniej w jego skład muszą odsuwać się od błony w miarę wbudowywania nowych monomerów. Czy zjawisko to (po angielsku zwane *treadmilling*) może posłużyć zamiast skurczu do wytłumaczenia wstecznego ruchu warstwy aktywny w lamellipodiach fibroblastów i w strefie czołowej ameb?

Próbowano kwestię tę rozstrzygnąć doświadczalnie. Wang (1985) wstrzykiwał do migrujących fibroblastów fluorescencyjnie oznaczoną aktywną monomeryczną, a gdy rozpoczęło się jej wbudowywanie w cytoszkielecie przedniej krawędzi komórki, wygaszał wiązką laserową świecenie na małym jej obszarze. Obszar ten rzeczywiście odsuwał się do tyłu z prędkością $0,013 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. W ten sposób samo występowanie zjawiska *treadmilling* zostało u fibroblastów potwierdzone *in vivo*. Z drugiej strony okazało się ono jednak około dziesięć razy zbyt powolne dla objaśnienia wycofywania się warstwy aktywny w strefie czołowej ($0,1-0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u fibroblastów).

Dodatkowy kłopot sprawia to, że filamenty aktynowe mogą być przytwierdzone do błony nie końcami, lecz bocznie. Spotyka się to zarówno u ameb (Stockem i in. 1982) i *Dictyostelium* (Bennet i Condeelis 1984; Goodloe-Holland i Luna 1984), jak i w niektórych komórkach tkankowych (Tilney 1983). Obecnie uważa się oba te sposoby połączenia filamentów aktynowych z błoną za współistniejące.

Alternatywne tłumaczenia odsuwania się warstwy aktywny od przedniej krawędzi komórki są więc wątpliwe. Zdecydowana większość badaczy przychyliła się do jego objaśniania mechanizmem miozynowym (Fisher i Smith 1988; Smith 1988; Mitchison i Kirschner 1988; Adams i Pollard 1989; Heath i Holifield 1991; Theriot i Mitchison 1991).

Chociaż repolimeryzacja aktywny pod przednią krawędzią komórki sama raczej nie stanowi siły napędowej wstecznego ruchu cytoszkieletu w tej strefie, to jednak oczywiście musi być z nim skoordynowana. Sieć aktywna winna być odbudowywana w tempie adekwatnym do jej wycofywania. W związku z tym częstotliwość odrywania się kolejnych warstw w szczytach nibynózek ameb (mniej więcej co 2 s — Grębecki 1990) może wydawać się bardzo wysoka. Również matematyczne modelowanie dynamiki cytoszkieletu ameby wskazuje na jego ogromną labilność — średni czas pozostawania w nim każdego elementu w stanie spolimeryzowanym powinien wynosić tylko około 12 s (Dembo 1989). Nie są to jednak wartości nieprawdopodobne w zestawieniu np. z reorganizacją

cytoszkieletu aktynowego u *Dictyostelium* dokonującą się pod wpływem bodźca chemotaktycznego w ciągu zaledwie 3 do 5 sekund (McRobbie i Newell 1983), albo około 10 s u granulocytów po indukcji fagocytozy (Shetterline i in. 1984). Heath i Holifield (1991) obliczają, że dla kompensacji wycofywania aktyny w fibroblastach z prędkością $0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ każdy filament pod przednią krawędzią powinien przyłączać 66 monomerów na sekundę. W mikroskopkach nabłonka jelitowego stwierdzono przyłączanie około 70 monomerów na sekundę, co odpowiadałoby przyrostowi filamentu o $0,24 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Pollard i Mooseker 1981). Aktyna może więc repolimeryzować w tempie adekwatnym do jej wycofywania się z czoła komórki.

REGULACJA DYNAMIKI BŁONY I CYTOSZKIELETU W CZOŁOWEJ KRAWĘDZI KOMÓRKI

Rozszczepienie kompleksu błona—cytoszkielet w przedniej krawędzi komórki ameboidalnej najprawdopodobniej jest powodowane miejscowym wzrostem stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Można tego się domyślać już dlatego, że aktynowy żel cytoplazmatyczny ameb swobodnie żyjących — zarówno *in vitro*, jak i na miejscu w komórce — ulega upłynnieniu, jeżeli stężenie wolnego wapnia osiąga wartości mikromolarne (Taylor i in. 1973; Taylor 1977). Iniekcja do wnętrza ameby aequoryny, naturalnego luminoforu świecącego w obecności wolnych jonów wapnia pokazała, że podczas ruchu komórki stężenie wapnia wzrasta rytmicznie w strefie czołowej co 1–4 s (Taylor i in. 1980). Nadmiar wolnych jonów wapnia pojawia się więc w tym samym rytmie, co odrywanie kolejnych warstw aktynowych spod błony. Bardzo silnie to przemawia za przypuszczeniem, że właśnie wapń wyzwała procesy prowadzące najpierw do rozszczepienia kompleksu cytoszkielet—błona w czole ameby, a w konsekwencji — do przesunięcia warstwy aktynowej w głąb cytoplazmy, a przedniej krawędzi komórki do przodu.

U amebowych form *Dictyostelium* reakcja na pozytywny bodziec chemiczny i tworzenie nowych nibynózek są związane z podniesieniem poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego (Wick i in. 1978; Malchow i in. 1982; Fukui i Yumura 1986). Podobnie jest u poruszających się komórek tkankowych. Wzrost stężenia wolnego wapnia przy przedniej krawędzi komórek nabłonkowych aktywizuje ich lamellipodia (Strohmeier i Bereiter-Hahn 1984; Mittal i Bereiter-Hahn 1985). Wolne jony wapnia pojawiają się w nadmiarze w strefach czołowych granulocytów podczas fagocytozy (Sawyer i in. 1985) i w toku ich reakcji na bodźce chemiczne (Truett i in. 1988), a także u fibroblastów drażnionych prądem elektrycznym (Onuma i Hui 1988).

Wapń pełni w tych reakcjach raczej tylko rolę sygnału. Samo zaś rozluźnianie lub rozrywanie warstwy korytkalnej we frontach komórek ruchliwych zapewne zależy od białek regulujących polimeryzację aktyny albo zwartość sieci aktynowej. Tak np. cytochalazyna B, która blokuje dalszą polimeryzację aktyny na

końcach filamentów przylegających do błony, powoduje gwałtowne wycofywanie się warstwy kurczliwej spod krawędzi stożków wzrostu neuronów (F o r s c h e r i S m i t h 1988). Taki sam efekt wywołuje cytochalazyna u ameb (G r ę b e c k a, dane niepubl.). DNAaza I, która wiąże się z aktywną monomeryczną uniemożliwiając tym samym jej repolimeryzację, powoduje u ameb w miejscu iniekcji rozszczepienie kompleksu błona — cytoszkielet i wytworzenie tam nowego czoła lokomocji (W e h l a n d i i n. 1979.). Innym białkiem blokującym monomery aktywny jest profilina, szeroko rozpowszechniona w różnych komórkach tkankowych (C a r l s s o n i i n. 1977). Występuje ona również u ameb i śluzowców (R e i c h s t e i n i K o r n 1979; O z a k i i H a t a n o 1984; S o n o b e i i n. 1986) i może uczestniczyć w regulacji dynamiki ich cytoszkieletu w strefach czołowych.

Na największą uwagę zasługują te białka związane z aktyną, które mogą rozrywać filamenty aktynowe, a spośród nich przede wszystkim żelsolina i białka z nią blisko spokrewnione. Dla swego działania wymagają one właśnie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia do poziomu kilku mikromoli. Zdaniem H a r t w i g a i Y i n (1988) żelsolina jest obok profiliny głównym regulatorem dynamiki aktynowego cytoszkieletu u makrofagów. Pod wpływem dodatkiego bodźca zewnętrznego w cytoplazmie makrofaga zostają uwolnione jony wapniowe. W ich obecności żelsolina wiąże się do boków filamentów aktynowych i rozcina je na krótsze odcinki. W podrażnionej okolicy komórki następuje więc rozluźnienie sieci aktynowej, a wreszcie jej oderwanie od błony i wysunięcie nibynóżki.

Żelsolina jest obecna w znacznych ilościach w rozmaitych komórkach tkankowych. Białka do niej podobne, również rozcinające filamenty aktynowe w obecności nadmiaru jonów wapnia, są znane u śluzowców bezkomórkowych i komórkowych: fragmina u *Physarum* (H a s e g a w a i i n. 1980; H i n s s e n 1981) i seweryna u *Dictyostelium* (B r o w n i i n. 1982). Na razie nie wiadomo, czy występują one także w cytoplazmie ameb swobodnie żyjących. Ale fragmina ze śluzowca wstrzyknięta pod powierzchnię ameby powoduje lokalne odsunięcie warstwy kurczliwej od błony i powstanie nowego czoła lokomocji (G a w l i t t a i i n. 1980a). Wolno więc przypuszczać, że być może u ameb też jest obecne jakieś białko lub białka z grupy żelsoliny, które rozrywając strukturę sieci aktynowej pod przednią krawędzią komórki umożliwiają wsteczny ruch całego cytoszkieletu wraz ze związanymi z nim strukturami powierzchniowymi.

PODSUMOWANIE

Współczesne informacje o zachowaniu się aparatu kurczliwego ameb swobodnie żyjących i ameboidalnych komórek tkankowych pozwalają sądzić, że ich peryferyjny cytoszkielet znajduje się w stanie skurczu powodującego jego ciągłe i równomierne przesuwanie się pod błoną od krawędzi przedniej ku tyłowi komórki, albo ku miejscom jej przyczepu do podłoża. Za motor tego ruchu

najpowszechniej uważa się interakcję aktyny z miozyną II lub I. Pod samą krawędzią przednią kolejne warstwy aktynowe cyklicznie odrywają się od błony, a następne są rekonstruowane na drodze polimeryzacji aktyny. Oba te zjawiska są regulowane przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, zapewne za sprawą białek organizujących i dezorganizujących sieć aktynową.

Filamenty aktynowe tworzące podbłonowy cytoszkielet są, za pośrednictwem innych białek, połączone z wieloma białkami integralnymi błony. Kompleksy białek błonowych są więc holowane przez cytoszkielet i powtarzają wiernie jego przesuw, wsteczny lub dośrodkowy. Wskutek tego związane z nimi kompleksy receptorów powierzchniowych z ligandami cząsteczkowymi albo z cząstkami obcymi adcherującymi do powierzchni również powtarzają ruchy cytoszkieletu zachodzące po przeciwległej stronie błony komórkowej. Są więc także transportowane wstecznie lub dośrodkowo (zjawisko cappingu). Cytoszkielet może w ten sposób transportować powiazaną z nim część białek błonowych, lecz nie całą błonę. Jej frakcja lipidowa zapewne płynie do przodu wzdłuż powierzchni komórki ruchem wymuszonym przez translokację strefy czołowej (a częściowo jest unoszona do przodu przez cytoplazmę).

MEMBRANE AND CYTOSKELETAL MOVEMENTS IN AMOEBOID CELLS

Summary

Behaviour of the cortical layers of free-living amoebae and amoeboid tissue cells indicates a steady contraction state within the cytoskeletal network around the cell periphery. That results in a continuous and uniform cytoskeleton sliding beneath the plasma membrane from the frontal edge to the rear body end, or centripetally toward the cell-to-substratum attachment sites. Generation of the force needed for this retrograde transport of cytoskeleton is most commonly attributed to the interaction of myosin II or I with actin network. Under the leading edge successive actin layers are rhythmically detached from the plasma membrane and retracted. The submembrane network is simultaneously reconstructed by actin polymerization. Both phenomena depend on the filament severing and cross-linking proteins operating under control of the cytoplasmic Ca concentration.

Actin filaments building the submembrane network in amoebae are, like in other cells, indirectly connected to some of the integral membrane proteins. Patches of membrane proteins are therefore hauled by the cytoskeleton and replicate its retrograde or centripetal movement. As a further consequence, the surface receptors carried by them and cross-linked by soluble ligands or adhering particles, also repeat movements of the cytoskeleton on the opposite side of cell membrane. Eventually, the contractile network withdraws them toward the cell's centre or rear pole (the phenomenon of capping). In that way the cytoskeleton may transport those membrane proteins which are connected to the actin network, but not the whole surface material. The membrane lipids move in amoebae independently forwards, along the cell surface (though a part of them are re-cycled through the cytoplasm). Lipids on the surface are probably forced to a forward flow by tensions created by the advancement of cell's leading edge.

LITERATURA

- Abercrombie M. — *The crawling movement of metazoan cells*. Proc. R. Soc. London 207: 129–147, 1980.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. I. Movements of the leading edge. Exp. Cell Res. 59: 393–398, 1970a.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. II. „Ruffling”. Exp. Cell Res. 60: 437–444, 1970b.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. Exp. Cell Res. 62: 389–398, 1970c.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. IV. Electron microscopy of the leading lamella. Exp. Cell Res. 67: 359–367, 1971.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. V. Surface marking with concanavalin A. Exp. Cell Res. 73, 536–539, 1972.
- Adams R.J., Pollard T.D. — *Membrane-bound myosin-I provides new mechanisms in cell motility*. Cell Motil. Cytosk. 14: 178–182, 1989.
- Albertini D.F., Anderson E. — *Microtubule and microfilament rearrangements during capping of concanavalin A receptors on cultured ovarian granulosa cells*. J. Cell Biol. 73: 111–127, 1977.
- Allen R.D. — *A new theory of amoeboid movement and endoplasmic streaming*. Exp. Cell Res. (Suppl.) 8: 17–31, 1961.
- Ash J.F., Louvard D., Singer S.J. — *Antibody induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5584–5588, 1977.
- Behnke O., Bray D. — *Surface movements during the spreading of blood platelets*. Eur. J. Cell Biol. 46: 207–216, 1988.
- Bennet H., Condeelis J. — *Decoration with myosin subfragment-1 disrupts contacts between microfilaments and the membrane in isolated Dictyostelium cortices*. J. Cell Biol. 99: 1434–1440, 1984.
- Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. — *Cytoskeleton*. Plenum Press. New York, London, 1988.
- Bourguignon L.Y.W., Bourguignon G.J. — *Capping and the cytoskeleton*. Int. Rev. Cytol. 87: 195–224, 1984.
- Bourguignon L.Y.W., Singer S.J. — *Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by their specific ligands*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5031–5035, 1977.
- Braun J., Fujiwara K., Pollard T.D., Unanue E.R. — *Two distinct mechanisms for redistribution of lymphocyte surface macromolecules. I. Relationship to cytoplasmic myosin*. J. Cell Biol. 79: 409–418, 1978.
- Bray D. — *Surface movements during the growth of single explanted neurons*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 65: 905–910, 1970.
- Bray D. — *Model for membrane movements in the neuronal growth cone*. Nature 244: 93–96, 1973.
- Bray D., Chapman K. — *Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone*. J. Neurosci. 5: 3204–3213, 1985.
- Bray D., White J. G. — *Cortical flow in animal cells*. Science 239: 881–888, 1988.
- Bretscher M. S. — *Directed lipid flow in cell membranes*. Nature 260: 21–23, 1976.
- Bretscher M. S. — *Surface uptake by fibroblasts and its consequences*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46: 707–712, 1982.
- Bretscher M. S. — *Endocytosis: relation to capping and cell locomotion*. Science 224: 681–686, 1984.
- Brix K., Reinecke A., Stockem W. — *Dynamics of the cytoskeleton in Amoeba proteus. III. Influence of microinjected antibodies on the organization and function of the microfilament system*. Eur. J. Cell Biol. 51: 279–284, 1990.

- Brown S. S., Yamamoto K., Spudich J. A. — *A 40,000 dalton protein from Dictyostelium discoideum affects assembly properties of actin in a Ca-dependent manner.* J. Cell Biol. 93: 205–210, 1982.
- Carlsson L., Nystrom L. E., Sundquist I., Markey F., Lindberg U. — *Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in nonmuscle cells.* J. Mol. Biol. 115: 465–483, 1977.
- Czarska L., Grębecki A. — *Membrane folding and plasma-membrane ratio in the movement and shape transformation in Amoeba proteus.* Acta Protozool. 4: 201–239, 1966..
- De Brabander M., Nuydens R., Ishihara A., Holifield B., Jacobson K., Geerts H. — *Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with nanovid microscopy.* J. Cell Biol. 112: 111–124, 1991.
- De Lozanne A., Spudich J. A. — *Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination.* Science 236: 1086–1091, 1987.
- Dembo M. — *Mechanics and control of the cytoskeleton in Amoeba proteus.* Biophys J. 55: 1053–1080, 1989.
- De Petris S., Raff M. C. — *Fluidity of the plasma membrane and its implications for cell movement.* Locomotion of tissue cells. Porter R., Fitzsimmons D. W. red., Ciba Found. Symp. 14: 27–40, 1973.
- Devore J. J., Conrad G. W., Rappaport R. — *A model for astral stimulation of cytokinesis in animal cells.* J. Cell Biol. 109: 2225–2232, 1989.
- Dołowy K. — *Membrane-potential-controlled lipid vesicle recycling and amoeboid locomotion.* J. Bioelectr. 6: 109–128, 1987.
- Erickson C. A., Trinkaus J. P. — *Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading.* Exp. Cell Res. 99: 375–384, 1976.
- Fisher G., Conrad P. A., DeBiasio R. L., Taylor D. L. — *Centripetal transport of cytoplasm, actin and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts.* Cell Motil. Cytosk. 11: 235–247, 1988.
- Flanagan J. Koch. G. L. E. — *Cros-linked surface Ig attaches to actin.* Nature 273: 278–281, 1978.
- Forscher P., Smith S. J. — *Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone.* J. Cell. Biol. 107: 1505–1516, 1988.
- Fukui Y., Inoué S. — *Cell division in Dictyostelium with special emphasis on actomyosin organization in cytokinesis.* Cell Motil. Cytosk. 18: 41–54, 1991.
- Fukui Y., Lynch T. J., Brzeska H., Korn E. D. — *Myosin I is located at the leading edges of locomoting Dictyostelium amoebae.* Nature 341: 328–331, 1989.
- Fukui Y., Yumura S. — *Actomyosin dynamics in chemotactic amoeboid movement of Dictyostelium.* Cell Motil. Cytosk. 6: 662–673, 1986.
- Gabbiani G., Chaponnier C., Zumbe A., Vassalli P. — *Actin and tubulin co-cap with surface immunoglobulin in mouse B lymphocytes.* Nature 269: 697–698, 1977.
- Gabrion J. B., Barrière H., Nguyen Than Dao B., Chambard M., Mauchamp J., Regnouf F., Pradel L. A. — *Absence of fodrin (spectrin-like protein) under the pseudopod membrane in stimulated thyroid cells.* Eur. J. Cell Biol. 52: 282–290, 1990.
- 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, 1980a.
- 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, 1980b.
- Geiger B., Avnur Z., Schlessinger J. — *Restricted mobility of membrane constituents in cell substrate focal contacts of chicken fibroblasts.* J. Cell Biol. 93: 495–500, 1982.
- Goldacre R. J. — *The action of general anaesthetics on amoebae and the mechanisms of the response to touch.* Symp. Soc. Exp. Biol. 6: 126–144, 1952.

- Goldacre R. J. — *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.
- Goodloe-Holland C. M., Luna E. J. — *A membrane cytoskeleton from Dictyostelium discoideum. III. Plasma membrane fragments bind predominantly to the sides of actin filaments.* J. Cell Biol. 99: 71–78, 1984.
- Grębecka L. — *Polarity of the motor functions in Amoeba proteus. I. Locomotory behaviour.* Acta Protozool. 27: 83–96, 1988.
- 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.
- Grębecki A. — *Behaviour of Amoeba proteus exposed to light-shade difference.* Protistologica 16: 103–116, 1980.
- Grębecki A. — *Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications.* Eur. J. Cell Biol. 24: 163–175, 1981.
- Grębecki A. — *Supramolecular aspects of amoeboid movement.* Progress in Protozoology. Proc. VI Int. Congr. Protozool. Acta Protozool. (special issue) 1: 117–130, 1982
- Grębecki A. — *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites. I. Behaviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon.* Protoplasma 123: 116–134, 1984.
- Grębecki A. — *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.
- Grębecki A. — *Two-directional pattern of movements on the cell surface of Amoeba proteus.* J. Cell Sci. 83: 23–35, 1986.
- Grębecki A. — *Velocity distribution of the anterograde and retrograde transport of extracellular particles by Amoeba proteus.* Protoplasma 141: 126–134, 1987a.
- Grębecki A. — *Locomotion of Saccamoeba limax.* Arch. Protistenkd. 134: 347–365, 1987b.
- Grębecki A. — *Mechanizmy ruchów amebowych.* Komórka — Jej budowa i ruch. 133–186. Ossolineum, 1987c.
- Grębecki A. — *Bidirectional transport of extracellular material by the cell surface of locomoting Saccamoeba limax.* Arch. Protistenkd. 136: 139–151, 1988.
- Grębecki A. — *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement.* Protoplasma 154: 98–111, 1990.
- Grębecki A. — *Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae.* Protoplasma 160: 144–158, 1991.
- Grębecki A., Kwiatkowska E. M. — *Dynamics of the membrane-cortex contacts demonstrated in vivo in Amoeba proteus pretreated by heat.* Eur. J. Protistol. 23: 262–272, 1988.
- Haberey M., Wohlfarth-Bottermann K. E., Stockem W. — *Pinocytose und Bewegung von Amöben. VI. Kinematographische Untersuchungen über das Bewegungsverhalten der Zelloberfläche von Amoeba proteus.* Cytophysiologie 1: 70–84, 1969.
- Harris A. K. — *Cell surface movements related to cell locomotion.* Locomotion of Tissue Cells. Porter R., Fitzsimmons D. W. red., Ciba Found. Symp. 14: 3–26, 1973.
- Harris A. K. — *Recycling of dissolved plasma membrane components as an explanation of the capping phenomenon.* Nature 263: 781–783, 1976.
- Hartwig J. H., Yin H. L. — *The organization and regulation of the macrophage actin skeleton.* Cell Motil. Cytosk. 10: 117–126, 1988.
- 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.
- Heath J. P. — *Arcs: curved microfilament bundles beneath the dorsal surface of the leading lamellae of moving chick embryo fibroblasts.* Cell. Biol. Int. Rep. 5: 975–980, 1981.
- Heath J. P. — *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface.* J. Cell. Sci. 60: 331–354, 1983a.

- Heath J. P. — *Direct evidence for microfilament-mediated capping of surface receptors on crawling fibroblasts*. Nature 302: 532–534, 1983b.
- Heath J. P., Holifield B. F. — *Cell locomotion: New research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow*. Cell Motil. Cytosk. 18: 245–257, 1991.
- Hinssen H. — *An actin-modulating protein from Physarum polycephalum. I. Isolation and purification*. Eur. J. Cell Biol. 23: 225–233, 1981a.
- Hinssen H. — *An actin-modulating protein from Physarum polycephalum. II. Ca-dependence and other properties*. Eur. J. Cell Biol. 23: 234–240, 1981b.
- Hiramoto Y. — *Mechanical properties of sea urchin eggs. II. Changes in mechanical properties from fertilization to cleavage*. Exp. Cell. Res. 32: 76–88, 1963.
- Holifield B. F., Ishihara A., Jacobson K. — *Comparative behavior of membrane protein-antibody complex on motile fibroblasts: Implications for a mechanism of capping*. J. Cell Biol. 111: 2499–2512, 1990.
- Izzard C. S. — *A precursor of the focal contact in cultured fibroblasts*. Cell Motil. Cytosk. 10: 137–142, 1988.
- Jennings H. S. — *Contributions to the study of the behavior of lower organisms. VI. The movements and reactions of Amoeba*. Carnegie Inst. Washington Publ. 16: 129–234, 1904.
- Kalisz B., Korohoda W. — *Experimental study on locomotion of Amoeba proteus. I. Movements in the nucleated and enucleated fragments of the amoebae after removal of the part of their cytoplasm*. Acta Protozool. 15: 345–361, 1976.
- Kłopotcka W., Stockem W., Grębecki A. — *Fine structure and distribution of contractile layers in Amoeba proteus preincubated at high temperature*. Protoplasma 147: 117–124, 1988.
- Koppel D. E., Oliver J. M., Berlin R. D. — *Surface functions during mitosis. III. Quantitative analysis of ligand-receptor movement into the cleavage furrow: diffusion versus flow*. J. Cell Biol. 93: 950–960, 1982.
- Korohoda W. — *Positive chemotactic reactions of Amoeba proteus to general anaesthetics*. Acta Protozool. 11: 333–336, 1972.
- Korohoda W. — *Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of Amoeba proteus and its bearing on the theories of amoeboid movement*. Cytobiologie 14: 338–349, 1977.
- Kucik D. F., Elson E. L., Sheetz M. P. — *Forward transport of glycoproteins on leading lamellipodia in locomoting cells*. Nature 340: 315–317, 1989.
- Kucik D. F., Elson E. L., Sheetz M. P. — *Cell migration does not produce membrane flow*. J. Cell Biol. 111: 1617–1622, 1990.
- Kwiatkowska K., Sobota A. — *Alpha-spectrin immunoanalog in Acanthamoeba cells*. Histochemistry 94: 87–93, 1990.
- Lackie J. M. — *Cell Movement and Cell Behaviour*. Allen and Unwin. Winchester, 1986.
- Lee J., Gustafsson M., Magnusson K. E., Jacobson K. — *The direction of membrane lipid flow in locomoting polymorphonuclear leukocytes*. Science 247: 1229–1233, 1990.
- Loor F. — *Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions*. Adv. Immunol. 30: 1–120, 1981.
- Luby-Phelps K., Taylor D. L. — *Subcellular compartmentalization by local differentiation of cytoplasmic organization*. Cell Motil. Cytosk. 10: 28–37, 1988.
- Malchow D., Böhme R., Gras U. — *On the role of calcium in chemotaxis and oscillations of Dictyostelium cells*. Biophys. Struct. Mech. 9: 131–136, 1982.
- Mangeat P. H. — *Interaction of biological membranes with the cytoskeletal framework of living cells*. Biol. Cell 64: 261–281, 1988.
- Marcus P. I. — *Dynamics of surface modification in myxovirus infected cells*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27: 351–365, 1962.
- Mast S. O. — *Structure, movement, locomotion and stimulation in Amoeba*. J. Morph. 42: 347–425, 1926.

- McRobbie S.J., Newell P.C. — *Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of Dictyostelium discoideum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 351–359, 1983.
- Mitchison T., Kirschner M. — *Cytoskeletal dynamics and nerve growth*. Neuron 1: 761–772, 1988.
- Mittal A.K., Bereiter-Hahn J. — *Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells. I. Role of calcium influx*. Cell Motil. 5: 123–136, 1985.
- Onuma E.K., Hui S.W. — *Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent*. J. Cell Biol. 106: 2067–2075, 1988.
- Ozaki K., Hatano S. — *Mechanism of regulation of actin polymerization by Physarum profilin*. J. Cell Biol. 98: 1919–1925, 1984.
- Pasternak C., Spudis J.A., Elson E.L. — *Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin*. Nature 341: 549–551, 1989.
- Pollard T.D. — *Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from Acanthamoeba that share antigenic determinants with vertebrate spectrins*. J. Cell Biol. 99: 1970–1980, 1984.
- Pollard T.D., Korn E.D. — *Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin*. J. Biol. Chem. 248: 4682–4690, 1973.
- Pollard T.D., Mooseker M.S. — *Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores*. J. Cell Biol. 88: 654–659, 1981.
- Ray D.L. — *Agglutination of bacteria: a feeding mechanism in the soil amoeba Hartmanella sp.* J. Exp. Zool. 118: 443–464, 1951.
- Reichstein E., Korn E.D. — *Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation*. J. Biol. Chem. 254: 6174–6179, 1979.
- Sawyer D.W., Sullivan J.A., Mandell G.L. — *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. Science 230: 663–666, 1985.
- Schliwa M. — *The Cytoskeleton. An Introductory Survey*. Springer-Verlag, Wien, New York, 1986.
- Schroeder T.E. — *Fourth cleavage of sea urchin blastomeres: Microtubule patterns and myosin localization in equal and unequal cell divisions*. Dev. Biol. 124: 9–22, 1987.
- Schroeder T.E., Otto J.J. — *Immunofluorescent analysis of actin and myosin in isolated contractile ring of sea urchin eggs*. Zool. Sci. 5: 713–725, 1988.
- Sheetz M.S., Turney S., Qian H., Elson E.L. — *Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not draw membrane glycoprotein movements*. Nature 340: 284–288, 1989.
- Shetterline P., Gallagher K., Rickard J.E., Richards R.C. — *Control of actin assembly in the cortical contractile network of neutrophil leukocytes during phagocytosis*. J. Submicrosc. Cytol. 16: 57–58, 1984.
- Singer S.J., Nicholson G.L. — *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science 175: 720–731, 1972.
- Small J.V. — *Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks*. J. Cell Biol. 90: 222–235, 1981.
- Smith S.J. — *Neuronal cytomechanics: the actin-based motility of growth cones*. Science 242: 708–715, 1988.
- Sonobe S., Takahashi S., Hatano S., Kuroda K. — *Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization*. J. Biol. Chem. 261: 14837–14843, 1986.
- Soranno T., Bell E. — *Cytoskeletal dynamics of spreading and translocating cells*. J. Cell Biol. 95: 127–136, 1982.
- Stockem W. — *Membrane turnover during locomotion of Amoeba proteus*. Acta Protozool. 11: 83–93, 1972.

- 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.
- 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.
- Stockem W., Kłopotcka W. — *Ameboid movement and related phenomena*. Int. Rev. Cytol. 112: 137–183, 1988.
- Stockem W., Wohlfarth-Bottermann K.E., Haberey M. — *Pinocytose und Bewegung von Amöben. V. Konturveränderungen und Faltungsgrad der Zelloberfläche von Amoeba proteus*. Cytozoologie 1: 37–57, 1969.
- Strohmeier R., Bereiter-Hahn J. — *Control of cell shape and locomotion by external calcium*. Exp. Cell Res. 154: 412–420, 1984.
- Taylor D.L. — *The contractile basis of amoeboid movement. IV. The viscoelasticity and contractility of Amoeba cytoplasm in vivo*. Exp. Cell Res. 105: 413–426, 1977.
- Taylor D.L., Blinks J.R., Reynolds G. — *The contractile basis of amoeboid movement. VIII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis, and capping*. J. Cell Biol. 86: 599–607, 1980.
- Taylor D.L., Condeelis J.S., Moore P.L., Allen R.D. — *The contractile basis of amoeboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm*. J. Cell Biol. 59: 378–394, 1973.
- Taylor R.B., Duffus W.P.H., Raff M.C., De Petris S. — *Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody*. Nature 233: 225–229, 1971.
- Theriot J.A., Mitchison T.J. — *Actin microfilament dynamics in locomoting cells*. Nature 352: 126–131, 1991.
- Tilney L.G. — *Interactions between actin filaments and membranes give spatial organization to cells*. Modern Cell Biol. 2: 163–199, 1983.
- Toh B.H., Hard G.C. — *Actin co-caps with concanavalin A receptors*. Nature 269: 225–229, 1977.
- Truett A.P., Verghese M.V., Dillon R.B., Snyderman R. — *Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1549–1553, 1988.
- Turner C.E., Shotton D.M. — *Isolation and initial biochemical characterization of caps of two major rat thymocyte glycoproteins: evidence for the involvement of a 205 K Con A binding protein and cytoskeletal components in capping*. Cell Motil. Cytosk. 8: 37–43, 1987.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M., Domnina L.V., Dorfman N.A., Pletyushkina O.Y. — *Active cell edge and movements of concanavalin A receptors of the surface of epithelial and fibroblastic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 4085–4089, 1976.
- Wang Y.L. — *Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role or treadmilling*. J. Cell Biol. 101: 597–602, 1985.
- Wehland J., Weber K., Gawlitta W., Stockem W. — *Effects of the actin-binding protein DNase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 199: 353–372, 1979.
- White J.G., Borisy G.G. — *On the mechanisms of cytokinesis in animal cells*. J. Theor. Biol. 101: 289–316, 1983.
- Wick U., Malchow D., Gerisch G. — *Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of Dictyostelium discoideum*. Cell Biol. Int. Rep. 2: 71–79, 1978.
- Wolpert L. — *The mechanisms and mechanics of cleavage*. Int. Rev. Cytol. 10: 163–216, 1960.
- Wolpert L., Gingell D. — *Cell surface membrane and amoeboid movement*. Symp. Soc. Exp. Biol. 22: 169–198, 1968.

- Wolpert L., O'Neill C.H. — *Dynamics of the membrane of Amoeba proteus studied with labeled specific antibody*. Nature 196: 1261–1266, 1962.
- Wuestehube L.J., Luna E.J. — *F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulin, a 17-kD integral glycoprotein from Dictyostelium discoideum plasma membranes*. J. Cell Biol. 105: 1741–1751, 1987.
- Yin H.L., Hartwig J.H. — *The structure of the macrophage actin skeleton*. J. Cell Sci., Suppl. 9: 169–184, 1988.
- Yumura S., Fukui Y. — *Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in Dictyostelium*. Nature 314: 194–196, 1985.
- Yumura S., Mori H., Fukui Y. — *Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence*. J. Cell Biol. 99: 894–899, 1984.

WŁODZIMIERZ KOROHODA

Zakład Biologii Komórki
Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

MIGRACJA KOMÓREK NABŁONKOWYCH

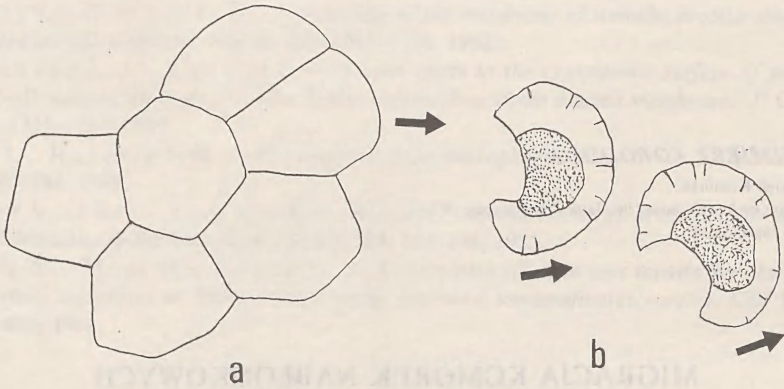
WSTĘP

Nabłonki są tkankami, które ograniczają i pokrywają powierzchnie jam ciała i zewnętrzne powierzchnie organizmów zwierzęcych. Zbudowane są z pojedynczych albo wielowarstwowych arkuszy komórek, które z jednej strony przylegają do leżących pod nimi tkanek lub błon podstawnych (swoją powierzchnią bazalną), zaś z drugiej, przeciwnej, mają wolne powierzchnie zwrócone do jam ciała lub do środowiska zewnętrznego (jest to ich powierzchnia apikalna). *In vivo* komórki nabłonków są zatem strukturalnie spolaryzowane, co ma duże znaczenie dla ich czynności.

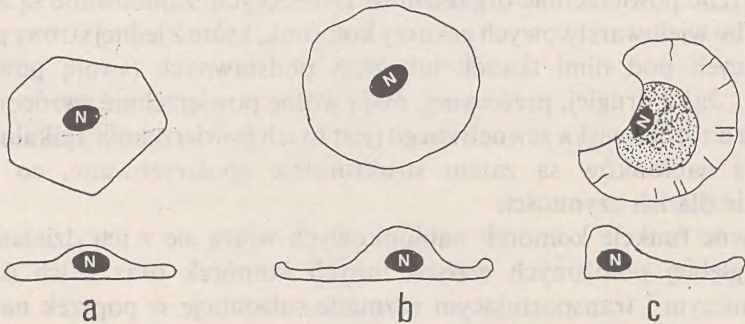
Główne funkcje komórek nabłonkowych wiążą się z ich działaniem jako osłony głębiej położonych warstw innych komórek oraz z ich działaniem wydzielniczym i transportującym rozmaite substancje w poprzek nabłonków. W nabłonkach jednowarstwowych pojedyncze komórki wykazują wyraźną polaryzację struktury i funkcji. Odpowiada temu polaryzacja składu chemicznego i organizacji budowy błony komórkowej. Inne właściwości ma błona po stronie apikalnej komórki, a inne po stronie bazalnej.

Po stronie apikalnej powierzchnia komórek może być gładka, mogą na niej wytwarzać się rozmaite dodatkowe osłony zbudowane najczęściej z keratyn, lub też mogą na niej być wytwarzane mikrokosmki (microvilli). Po stronie bazalnej natomiast występują hemidezmosomy, układy białek tworzących kontakty zogniskowane (ang. focal contacts) oraz receptory dla białek macierzy międzykomórkowej (dla laminin, kolagenów i fibronektyn). Powierzchnia apikalna komórek nie może wykazywać takiej samej adherencji jak powierzchnia bazalna, gdyż powodowałoby to zarastanie i zamykanie światła jam ciała i naczyń.

Również potrzeba zwartości warstwy komórek jako osłony wiąże się z występowaniem rozmaitych połączeń lateralnych między komórkami. Występują tutaj złącza międzykomórkowe typu tight junction, gap junctions, dezmosomy, zona adherens, a także połączenia, w których uczestniczą białka typu CAM (ang. cell adhesion molecules).



Ryc. 1. Morfologia komórek nabłonkowych w hodowli *in vitro*: a) grupa przylegających do siebie komórek nabłonkowych, w której tylko komórki brzeżne wykazują aktywność ruchową, b) pojedyncze migrujące komórki nabłonkowe. Strzałki wskazują na kierunek ruchu



Ryc. 2. Kształty komórek nabłonkowych w hodowli *in vitro*: a) wielokątna komórka nie wykazująca aktywności ruchowej (taką morfologię wykazują komórki położone wewnątrz kolonii lub bezpośrednio po izolacji z tkanki), b) niespolaryzowana komórka w formie „sądownego jaja”, c) migrująca komórka nabłonkowa

W organizmie komórki nabłonkowe zazwyczaj nie wykazują aktywnej migracji. Odnowianie nabłonków odbywa się w wyniku aktywności proliferacyjnej ich komórek, a ubytki pojedynczych komórek uzupełnione są w wyniku podziału komórek sąsiednich. W nabłonkach wielowarstwowych następuje ciągle odnowianie komórek w wyniku podziałów mitotycznych w warstwie rozrodczej (przy powierzchni bazalnej nabłonka) i następnie wypychania kolejnych warstw komórek ku powierzchni apikalnej nabłonka.

Aktywna migracja komórek nabłonkowych występuje:

a) podczas rozwoju zarodkowego organizmów, zarówno jego wczesnych stadiów (np. gastrulacji), jak i w trakcie kształtowania się narządów (organogenezy);

- b) podczas gojenia się ran;
- c) podczas rozwoju chorób nowotworowych, np. w trakcie lokalnej inwazji komórek carcinoma.

W hodowlach *in vitro* można obserwować migrację komórek w układach stanowiących uproszczone modele wyżej wymienionych trzech sytuacji. Migracja nabłonków przez wiele lat była badana mniej intensywnie niż migracja komórek mezenchymalnych (najczęściej fibroblastów), jednak w ostatnich latach lokomocja komórek nabłonkowych, szczególnie keratynocytów kręgowców (ludzkich, myszy, ropuchy *Xenopus*, ryb), badana jest w wielu pracowniach.

MIGRACJA KOMÓREK NABŁONKOWYCH *IN VIVO*

Podczas rozwoju organizmów w procesach morfogenezy nabłonki wielokrotnie przyjmują nowe kształty i formy dzięki aktywnym ruchom budujących je komórek. Trinka us (1976) rozróżnia dwa podstawowe typy rozprzestrzania się nabłonków:

- a) dzięki aktywnej migracji komórek położonych na wolnych brzegach arkuszy komórek nabłonkowych, tak jak to ma miejsce podczas epibolii w rozwoju ptaków i ryb kostnoszkieletowych (teleost and avain epiboly),
- b) ruch bez wolnego brzegu arkusza komórek nabłonkowych dzięki aktywności wszystkich komórek budujących arkusz tkanki nabłonkowej, tak jak to występuje podczas gastrulacji u płazów.

Pierwszy z typów ruchu charakteryzuje się dużą aktywnością komórek brzeżnych, które ciągną za sobą całość komórek arkusza wzajemnie ze sobą związanych, ale słabo przylegających do podłoża i mało aktywnych. Ten typ przesuwania się warstw komórek nabłonkowych po dwuwymiarowym podłożu występuje podczas zamykania się ran. Tylko brzeżne, aktywnie migrujące komórki silnie przylegają do podłoża, tworząc liczne wypustki o charakterze lamellipodiów. Wielokrotnie wykazywano za pomocą mikromanipulacji, że dalej od brzegu rany położone komórki łatwo jest oderwać od podłoża, podobnie jak podczas epibolii u płazów i ptaków (por. Trinka us 1988).

MIGRACJA KOMÓREK NABŁONKOWYCH *IN VITRO*

PRZYCZEPNOŚĆ KOMÓREK DO PODŁOŻA

Wzrost keratynocytów izolowanych ze skóry ludzkiej i tworzenie się dużych tzw. „megakolonii” hodowanych na warstwie zabitych promieniowaniem ultrafioletowym fibroblastów (ang. „feeder layer”) silnie zależy od obecności czynników wzrostowych w pożywce. Naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF) powoduje, że komórki z brzegu kolonii migrują szybko odśrodkowo i kolonie rosnące w obecności EGF mają ośmiokrotnie większy promień niż kolonie pierwotne. Jeszcze silniej działa transformujący czynnik wzrostowy α (ang.

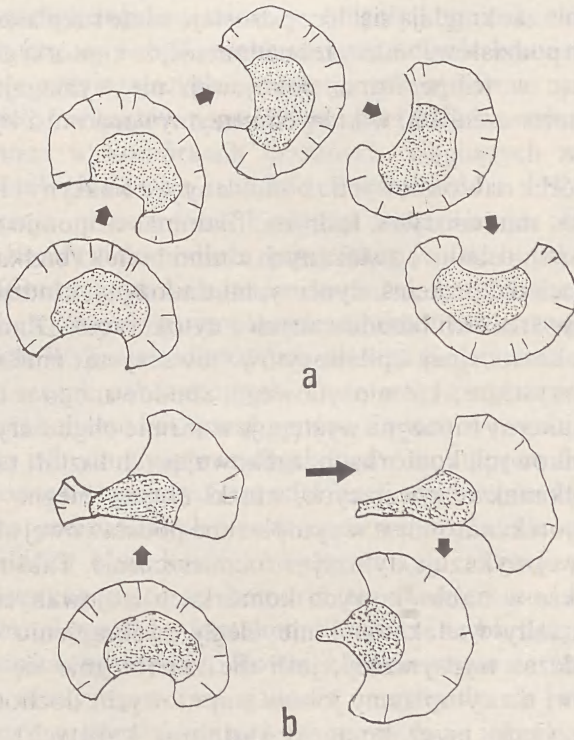
TGF- α), powodując dziesięciokrotny wzrost promienia kolonii, co odpowiada odpowiednio 30–50 razy większej ich powierzchni. Szybkość migracji w obecności tych peptydowych czynników wzrostowych wynosi około 1 mm/dobę (czyli ok. 40 $\mu\text{m}/\text{h}$).

Grinnell i współpracownicy zaobserwowali, że świeżo izolowane keratynocyty ze skóry ludzkiej wykazują małą zdolność do migracji po powierzchniach pokrytych fibronektyną lub kolagenem I. Dopiero po kilku dniach „aktywacji” komórek w hodowli *in vitro* podejmują one migrację. Aktywacja ta związana jest z wytwarzaniem się dopiero po kilku dniach hodowli kontaktów zogniskowanych (ang. „focal contacts”) oraz zwiększeniem ilości integryny w błonach komórkowych (łańcucha $\beta 1$), po stronie spodniej, kontaktującej się z podłożem stałym i na brzegach migrujących komórek. Badania te wiążą się z analizą procesów gojenia się ran w skórze, gdzie migracja keratynocytów zaczyna się zazwyczaj 24 h po zranieniu. Również *in vivo* aktywacja keratynocytów następuje w gojących się ranach i izolowane z takich ran keratynocyty wykazują zwiększoną przyczepność do podłoża.

MORFOLOGIA MIGRUJĄCYCH KOMÓREK NABŁONKOWYCH

Migrujące epitelioocyty, podobnie jak fibroblasty, wykazują polaryzację struktury — wiodące lamellipodium jest wytwarzane tylko przy jednym biegunie komórki. Ten typ funkcjonalnej polaryzacji migrujących komórek nie odpowiada spolaryzowaniu struktury komórek w gruczołach i w wielowarstwowych tkankach nabłonkowych. Różne komórki epitelialne różnią się między sobą trwałością funkcjonalnej polaryzacji kształtu migrujących komórek. O ile np. komórki upigmentowane siatkówki oka zarodków kurcząt nie wykazują polaryzacji i są bardzo silnie rozplaszczone, to w wypadku komórek, np. epitelium rogówki, widoczna jest wyraźna polaryzacja morfologii (Brown i Middleton 1985). Wyjątkowo wyraźną i trwałą polaryzację kształtu wykazują podczas migracji keratynocyty ryb, płazów i ssaków (Cooper i Schliwa 1985; Bereiter-Hahn i in. 1990). Wędrują one po podłożu stosunkowo szybko, z prędkością do ok. 30 μm na minutę (w temperaturze pokojowej), zachowując kształt wachlarza z rozległym lamellipodium w kształcie półksiężyca i znacznie grubszym, też w kształcie półksiężyca ciałem komórki. Lamellipodium jest zawsze wytwarzane po stronie wiodącego frontu komórki i zmiana kierunku migracji następuje najczęściej tak, jak gdyby komórki wędrowały „po łuku”. Znacznie rzadziej obserwuje się zmianę kierunku przez podział wiodącego lamellipodium na dwa mniejsze, w wyniku lokalnego skurczu i wycofania części lamellipodium, a następnie dominację jednego z tych lamellipodiów podczas gdy drugie szybko jest wycyfowane i przekształcane w tzw. „retraction fibres”. Towarzyszy temu przebudowa organizacji morfologicznej całej komórki. Lamellipodium ma grubość około 1 μm , natomiast ciało komórki około 5–7 μm . W wypadku, gdy mikrochirurgicznie zostanie

odcięty fragment komórki zawierający jądro komórkowe, następuje odtworzenie polaryzacji i kształtu komórki przez bezjądrowy cytoplasm.



Ryc. 3. Zmiany kierunku migracji komórek nabłonkowych, a) migracja „po łuku” — zmiana kierunku następuje bez zmiany polaryzacji organizacji struktur komórkowych, b) zmiana kierunku w wyniku przebudowy organizacji lamellipodium komórki

ORGANIZACJA CYTOSZKIELETU W MIGRUJĄCYCH KOMÓRKACH NABŁONKOWYCH

Do badań organizacji cytoszkieletu (aktyny, tubuliny) bardzo dogodnym materiałem okazały się komórki epitelialne słodkowodnych gąbek (*Spongilla lacustris*, *Porifera*), a także komórki ustalonej linii wyprowadzonej z endotelialnych komórek serca kijanki ropuchy południowoafrykańskiej *Xenopus laevis* (linia XTH-2). Ze względu na to, że komórki te bardzo silnie rozplaszczają się na podłożu i grubość ich wynosi mniej niż jeden mikrometr, można stosować do badań zarówno techniki obserwacji struktur trójwymiarowych za pomocą mikroskopii elektronowej, jak i układu Allenowskiego wzmocnienia obrazu z mikroskopu z kontrastem różnicowym (ang. AVEC — Allen's video enhancing contrast) lub też techniki mikroskopii akustycznej. Mała grubość komórek pozwala na rozróżnianie poszczególnych struktur cytoplazmy i bezpośrednio

obserwacje ruchów pojedynczych mitochondriów lub pojedynczych mikrotubul w żywych, migrujących komórkach epitelialnych. Również fakt, że komórki te, w odróżnieniu od innych prawidłowych komórek kręgowców, podczas mitozy nie zaokrąglają się, lecz pozostają silnie rozplaszczone, pozwala na obserwacje ich podziałów. Należy też nadmienić, że komórki gąbek i ropuchy, migrując i rosnąc w temperaturze pokojowej, nie wymagają prowadzenia obserwacji w pomieszczeniach, w których utrzymywana musi być temperatura 37°C.

Szkielet komórek nabłonkowych zbudowany jest z aktyny i białek towarzyszących (miozyna, minimiozyna, fodryna, filamina, tropomiozyna, profilina, kalmodulina i inne), tubulin i związanych z nimi białek (białka MAP — ang. mikrotubule associated proteins, dyneiny, minimiozyny, kinezyne) oraz szkieletu filamentów pośrednich (zbudowanych z cytokeratyn). Zmianom kształtu i aktywności lokomocyjnej epiteliocytów towarzyszą zmiany organizacji układu przede wszystkim aktomiozynowego, zbudowanego w odróżnieniu od mięśni głównie z aktyny (miozyna występuje w formie oligomerycznej i w małej ilości). W nabłonkowych komórkach, zachowujących kształt taki jak w zwartych arkuszach tkanek okrywających, wiązki aktyny biegną równolegle do powierzchni komórek, natomiast w cytoplazmie podstawowej aktyna w formie sieci anizotropowej wykazuje dyfuzyjne rozmieszczenie. Taki rozkład aktyny obserwujemy także w nabłonkowych komórkach izolowanych tak, aby zachowały one kształty wielokątne i nie uległy zaokrągleniu pod wpływem izolacji (np. podczas trypsynizacji, jeśli nie zapobiegnie się uszkodzeniom błony i napływowi do cytoplazmy jonów wapniowych, dochodzi do skurczu cytoplazmy i przyjęcia przez komórki kształtów kulistych). Z chwilą gdy komórki nabłonkowe przyczepią się do podłoża stałego, zmianie ulega układ aktyny w komórce. Początkowo obserwujemy oderwanie aktyny (i fodryny — nieerytrocytarnej spektryny) od błony i przemieszczenie ku obszarowi cytoplazmy perinuklearnej. Następuje wówczas jak gdyby obkurczenie ciała komórki, ziarnistej cytoplazmy otaczającej jądro komórkowe, i pozostawienie rozległego, niespolaryzowanego lamellipodium. Komórka nabłonkowa przyjmuje postać opisywaną jako forma „sadzonego jaja” (ang. „fried egg morphology”). Aktyna grupuje się pod powierzchnią błony ciała komórki i przy brzegach lamellipodium. Dopiero później zaczyna się proces polaryzacji komórki. Część lamellipodium zostaje wycofana, ciało komórki wraz z jądrem przesuwa się ku jednemu brzegowi i zaczyna się wykształcać spolaryzowana forma migrującej komórki w kształcie wachlarza lub półksiężyca. W tak migrującej komórce zazwyczaj nie obserwujemy tworzenia się wiązek aktyny zwanych włóknami naprężeniowymi (ang. „stress fibres”), a F-aktyna zorganizowana jest w formie anizotropowej sieci w cytoplazmie podstawowej. Włókna naprężeniowe zostają wykształcone zazwyczaj znacznie później, po kilku dniach w wypadku hodowli pierwotnych, i ich pojawienie się w cytoplazmie związane jest z równoczesnym wykształcaniem się kon-

taktów zogniskowanych (ang. focal contacts) z podłożem. Kontakty takie nigdy się nie tworzą w szybko migrujących komórkach keratynocytów w hodowlach pierwotnych. Dużą liczbę włókien naprężeniowych i kontaktów zogniskowanych obserwujemy natomiast w liniach komórek nabłonkowych oraz wtedy, gdy tworzą się w hodowlach większe kolonie komórek nabłonkowych ściśle do siebie przylegających i wędrujących w formie większego arkusza. Szczególnie wiele kontaktów zogniskowanych i włókien naprężeniowych obserwujemy wówczas w komórkach brzeżnych, ciągnących za sobą pozostałą warstwę komórek (K o l e g a , 1986; B e r e i t e r - H a h n i in. 1990). Taka organizacja przestrzenna F-aktyny wskazuje na znaczenie punktów przyczepienia komórki do podłoża, przez integryny do białek macierzy międzykomórkowej (fibronektyn, kolagenów, laminin), warunkujących pojawianie się skurczów izometrycznych w cytoplazmie, niezbędnych do tworzenia się włókien naprężeniowych. Wykształcenie się tych włókien nie jest warunkiem niezbędnym do migracji komórek nabłonkowych. Dużą wagę przypisuje się im natomiast w regulacji metabolizmu i ekspresji genów. Zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego są jednym z pierwszych objawów fenotypowych zmian w komórkach nabłonkowych ulegających transformacji nowotworowej. Brak możliwości tworzenia się zorganizowanych przestrzennie w cytoplazmie i przyczepionych do białek integralnych błon komórkowych włókien aktynowych jest uważany często za przyczynę tego, że komórki transformowane nowotworowo nie wykazują korelacji pomiędzy kształtem komórki i szybkością migracji a syntezą DNA i aktywnością mitotyczną. Również często uważa się, że jest to bezpośrednia przyczyna niewystępowania zjawiska naprowadzania przez kontakt (ang. contact guidance) w komórkach nowotworowych. Są jednak znane wyjątki, gdy komórki nabłonkowe transformowane nowotworowo za pomocą rakotwórczych substancji chemicznych zachowują się odmiennie i mimo charakteru nowotworowego *in vivo*, w hodowlach ich morfologia odpowiada komórkom prawidłowym. Dopiero po wszczepieniu do zwierzęcia zmieniają swoje cechy fenotypowe i ujawnia się wówczas ich charakter komórek rakowych.

Y o n e d a i in. (1990) z Kyoto University prowadzili badania rozmieszczenia fodryny w linii Pam 212 mysich keratynocytów. Stosując przeciwciała związane ze złotem i kontrastowanie dodatkowe srebrem wykazali, że w hodowlach w pożywkach o niskim stężeniu jonów wapnia (0,06 mmoli) fodryna jest rozproszona w cytoplazmie podstawowej wzdłuż filamentów aktynowych. W pożywce o standardowym stężeniu wapnia (1,87 mmoli) koncentruje się pod błoną plazmatyczną. Natomiast w komórkach w niskim stężeniu wapnia, ale traktowanych przez dwie godziny TPA (12-oktotetradekanoylforbolu-13-octan — 10 ng/ml) fodryna także lokalizuje się pod błoną komórkową. Ponieważ TPA powoduje podobne rozmieszczenie fodryny jak wysokie stężenie jonów wapniowych („calcium switch”), autorzy przypuszczają, że położenie fodryny w cytoplazmie może zależeć od jej fosforylacji.

Szkielet zbudowany z cytokeratyn tworzących filamenty pośrednie (o średnicy 11 nm) zdaje się stanowić mechaniczny układ zapewniający pewną sprężystość cytoplazmy migrujących komórek. Nie zmienia się on wyraźnie przy zmianach kształtu komórek i filamenty pośrednie nie ustawiają się wzdłuż linii naprężeń mechanicznych cytoplazmy (K o l e g a 1986).

W przeciwieństwie do fibroblastów, polaryzacja migrujących komórek nabłonkowych nie jest związana z układem mikrotubuli w cytoplazmie. Jak wykazali B r o w n i M i d d l e t o n (1985) oraz M i d d l e t o n i i n . (1988), kolcemid i nokodazol, które prowadzą do zaniku mikrotubul hamując ich odtworzenie (cząsteczki tych związków wiążą się z końcem „+” mikrotubul), nie mają większego wpływu na morfologię migrujących epitelioocytów z rogówki oka i ze skóry 12-dniowych embrionów kurzych. W komórkach epitelialnych, inaczej niż w fibroblastach, zanik mikrotubul nie prowadzi do dezorganizacji cytoszkieletu filamentów pośrednich. W fibroblastach filamenty pośrednie zbudowane są z wimentyny, natomiast w epitelioocytach — z cytokeratyn. Z drugiej jednak strony, sam zanik cytokeratynowych filamentów pośrednich w linii PtK1 i PtK2, bez rozbicia mikrotubul, także nie zmienia morfologii tych komórek epitelialnych (E c k e r t 1985).

WSPÓLZALEŻNOŚĆ KSZTAŁTU KOMÓREK I ICH MIGRACJI ORAZ AKTYWNOŚCI MITOTYCZNEJ

C a s t o r w cyklu prac ogłoszonych w latach 1968–1972, badając wzrost i migrację komórek nabłonkowopodobnych linii wyprowadzonych ze śledziony, wykazał, że w komórkach tych występuje korelacja pomiędzy kształtem komórek a ich aktywnością podziałową oraz pomiędzy szybkością migracji komórek a ich aktywnością mitotyczną (C a s t o r 1968, 1970). Im bardziej komórki były rozplaszczone i im szybciej migrowały, tym aktywniej rosły i tym krótsze były ich czasy generacji. Korelacje te nie są jednak zachowane w komórkach nowotworowych (np. w komórkach raka HeLa). Wyniki te zostały wielokrotnie potwierdzone w następnych latach i wymienione korelacje są badane w wielu pracowniach, nie tylko w odniesieniu do komórek epitelialnych (F o l k m a n i M o s c o n a 1978).

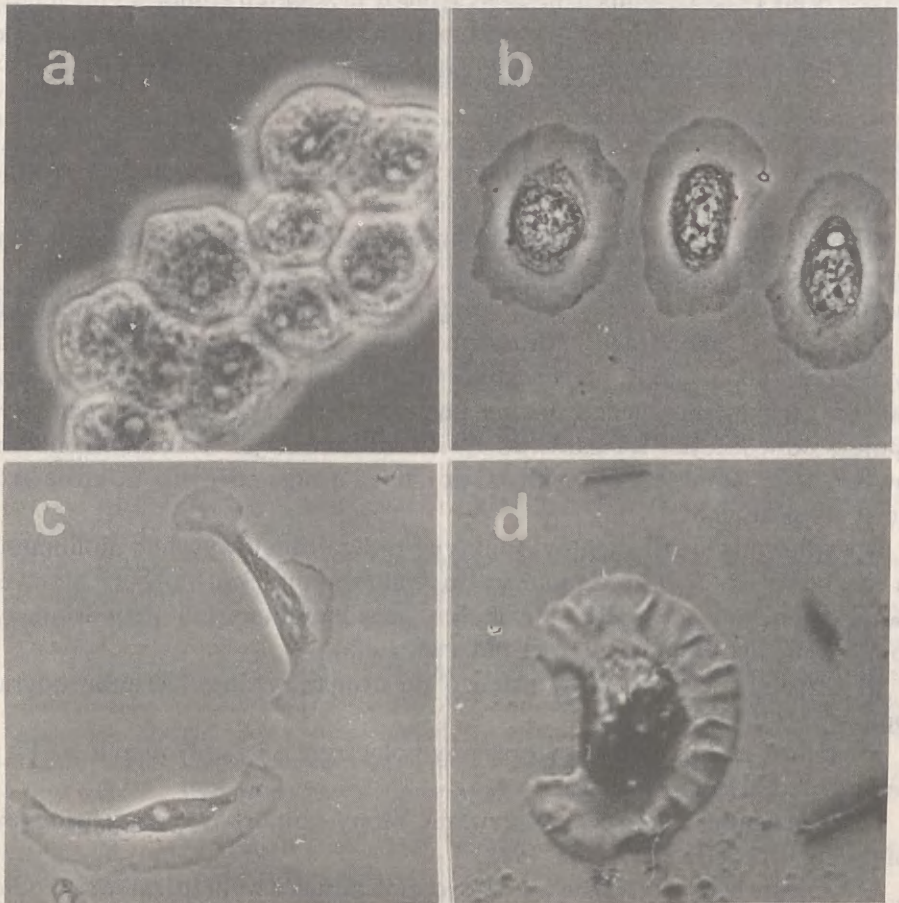
H e c k m a n i i n . (1987) obserwowali zmiany kształtu komórek z nabłonków izolowanych z wątroby i z tchawicy szczura podczas transformacji nowotworowej komórek w hodowlach *in vitro*. Wykazali oni, że zachodzi wówczas wygładzenie konturów komórek i zmniejszenie obszaru przylegania do podłoża.

BADANIA DOTYCZĄCE WPLYWU RÓZNYCH CZYNNIKÓW NA MIGRACJĘ KOMÓREK NABLONKOWYCH

Keratynocyty ryb i płazów są wyjątkowo dogodnym obiektem do badania mechanizmów elektrotaksji, chemotaksji i reakcji na bodźce mechaniczne. Migrując w temperaturze pokojowej ze znaczną stosunkowo prędkością oraz

wykazując wyraźną polaryzację struktury, pozwalają na obserwacje lokalnych zmian w komórce reagującej na bodźce zewnętrzne. I tak mikroiniekcja do nich małych ilości jonów wapniowych lub delikatne dotknięcie mikroigłą stymulują wytworzenie lamellipodium i migracje w kierunku bodźca. Silny bodziec powoduje lokalny skurcz i zmianę kierunku migracji lub zaokrąglenie się komórki (Korohoda i in. 1991; Mittal i Bereiter-Hahn 1985). W stałym polu elektrycznym keratynocyty migrują w kierunku katody (Cooper i Schliwa 1986, 1988). Podobnie jak fibroblasty i inne komórki prawidłowe, także prawidłowe epitelioocyty wykazują wrażliwość na rzeźbę podłoża i naprowadzanie przez kontakt (contact guidance) (Brunette 1986).

Bereiter-Hahn i Voth (1988) badali wpływ jednowartościowych i dwuwartościowych kationów na migrację keratynocytów izolowanych



Ryc. 4. Keratynocyty kijanki *Xenopus laevis* w hodowli *in vitro*: a) grupa wielokątnych komórek naskórka bezpośrednio po izolacji z ogona kijanki, b) niespolaryzowane keratynocyty rozplaszczone na szkło, c) migrujące komórki; jedna z nich zmienia kierunek ruchu przez podział lamellipodium, d) migrujący keratynocyt widziany w mikroskopie z oświetleniem skośnym za pomocą oświetlacza ze światłowodami

ze skóry kijanek *Xepunus laevis*. Spośród jednowartościowych kationów niezbędne do migracji okazały się jony sodu — jeśli ich stężenie obniżono poniżej 4 mmoli, komórki przestawały migrować. Amylorid, inhibitor antyportu Na^+/H^+ , w pożywce o pH 7,2 zmniejszał szybkość migracji do jednej trzeciej wartości kontrolnej, natomiast przy pH 6,6 nieznacznie wpływał na ruchy komórek. Ouabaina (strofantyna G), inhibitor pompy Na^+/K^+ , niemal nie wpływa na lokomocję, natomiast potęguje efekt amyrolidu. Hyperpolaryzacja błony przez jonofor dla jonów sodu — monenzynę także obniża prędkość migracji do jednej trzeciej wartości kontrolnej już po 30 minutach, a po godzinie do około 12% wartości kontrolnej. Valinomycyna, jonofor dla jonów potasowych, całkowicie hamuje migrację.

O ile energia wymagana do migracji fibroblastów może pochodzić zarówno z glikolizy jak i z oddychania tlenowego, o tyle w przypadku komórek epitelialnych niemal wyłącznym źródłem ATP jest glikoliza, a zasadniczym substratem dla cyklu Krebsa jest nie pirogronian, lecz glutaminian (G i b b i n s 1972).

HIPOTEZY DOTYCZĄCE MECHANIZMU RUCHU KOMÓREK NABŁONKOWYCH

Odpowiedź na pytanie, jaki jest mechanizm migracji komórek nabłonkowych, nie jest jeszcze pełna. Niemal wszyscy badacze zgodnie uważają, że podstawą ruchu są procesy mechanochemiczne zamiany energii chemicznej w kinetyczną, zachodzące z udziałem białek kurczliwych. Nie jest jednak wyjaśnione, jak procesy przebiegające na poziomie molekularnym są przekładane na zjawiska zachodzące na poziomie komórki. Spośród rozmaitych hipotez, odnoszących się zarówno do fibroblastów, jak i komórek nabłonkowych, a wzajemnie się nie wykluczających, na uwagę zasługują te, które kładą nacisk na znaczenie:

i) wydłużania się filamentów F-aktyny przez dobudowywanie monomerów do ich końca „+” przyczepionego do białek kompleksu powierzchniowego komórki, zachodzące przy wierzchołku pseudopodium lub przy wiodącym froncie lamellipodium (C o n d e e l i s i i n. 1988),

ii) ślizganie się filamentów jednego po drugim wzdłuż kierunku migracji komórek (H u x l e y 1976),

iii) skurcz żżelifikowanej cytoplazmy połączony z jej upłynnianiem (T a y l o r i F e c h h e i m e r 1982),

iv) rozciąganie się i rozbudowywanie błony komórkowej przy wiodącym końcu komórki (B r e t s c h e r 1988),

v) ciśnienie hydrostatyczne w komórce powodujące wybrzuszenie się komórki i odpływ cytoplazmy do miejsc najmniejszego naprężenia i skurczu kompleksu powierzchniowego komórki (B e r e i t e r - H a h n 1990).

Większość badań dotyczących mechanizmów ruchów i migracji komórek prowadzono na fibroblastach i leukocytach. Dopiero w ostatnich latach, dzięki

opracowaniu metod umożliwiających szybkie uzyskiwanie hodowli migrujących epiteliocytów, liczba badań na nich wykonanych zaczęła szybko wzrastać. Należy oczekiwać, że najbliższe lata przyniosą wiele nowych, znaczących wyników badań dotyczących molekularnej organizacji systemów ruchowych komórek nabłonkowych.

MIGRATION OF EPITHELIAL CELLS

Summary

The locomotory activity of fibroblasts cells has been studied extensively for many years. Recently also epithelial cells became an object of intensive research in many laboratories. These cells have appeared to represent a particularly suitable model for investigations concerned with the polarization of cell structure and function, functions of cellular cytoskeleton and cell membrane, and responses of cells to many external factors. Besides of epitheliocytes from warm blood animals the epitheliocytes (in particular skin keratinocytes) from fishes and tadpoles of *Xenopus laevis* become more and more broadly used as an excellent model system for the study of various aspects of cellular motile activity. These cells locomote at room temperature with relatively high speed (10–20 $\mu\text{m}/\text{min}$), are easy to isolate and already one–two hours after isolation show motile activity. Additionally, they have very thin and well polarized lamellipodia.

The article reviews the recent works concerning structure of epitheliocytes and their movement *in vivo*, adhesiveness of epithelial cells *in vitro*, the morphology and organization of cytoskeleton in cells migrating in tissue culture, a correlation between cell shape, migration and mitotic activity, responses of epitheliocytes to various extracellular factors and changes in cellular organization and activity associated with the neoplastic transformation of cells.

LITERATURA

- Barrandon Y., Green H., 1987, *Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor*. Cell 50, 1131–1137.
- Bereiter-Hahn, J., 1987, *Scanning acoustic microscopy visualizes cytomechanical responses to cytochalasin D*. J. Microscopy 146, 29–39.
- Bereiter-Hahn, J., Vöth, M., 1988, *Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells. II. Role of monovalent cations*. Cell Motility and Cytoskeleton 10, 528–536.
- Bereiter-Hahn J., Lück M., Miebach T., Stelzer H.K., Vöth M., 1990, *Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements*. J. Cell Sci. 96, 171–188.
- Bereiter-Hahn J., Braun N., Vöth M., 1990, *Continuity of movement and preservation of architecture during cell locomotion*. W. Alt i G. Hoffmann (red.), *Lecture Notes in Biomathematics*, Biological Motion, Proceed. Königswinter 1989. Springer-Verlag, str. 68–82.
- Bretscher M. S., 1988, *Fibroblasts on the move*. J. Cell Biol. 106, 235–237.
- Brunette D. M., 1986, *Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata*. Exp. Cell Res. 167, 203–217.
- Brown R. M., Middleton C. A., 1985, *Morphology and locomotion of individual epithelial cells in culture*. J. Cell Sci. 78, 105–115.
- Castor L. N., 1968, *Contact regulation of cell division in an epithelial-like cell line*. J. Cellular Physiology 72, 161–172.
- Castor L. N., 1970, *Flattening, movement and control of division of epithelial-like cells*. J. Cellular Physiology 75: 57–64.
- Cooper M. S., Schliwa M., 1985, *Electrical and ionic controls of tissue cell locomotion in DC electric fields*. J. Neuroscience Res. 13, 223–244.

- Condeelis J., Hall A., Bresnick A., Warren V., Hock R., Bennett H., Ogiyama S., 1988, *Actin polymerization and pseudopod extension during amoeboid chemotaxis*. Cell Motil. Cytoskel. 10, 77–90.
- Cooper M.S., Schliwa M., 1986, *Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields*. J. Cell Biol. 102, 1384–1399.
- Eckert B.S., 1985, *Alteration of intermediate filament distribution in PtK1 cells by acrylamide*. Europ. J. Cell Biol. 37, 169–174.
- Folkman J., Moscona A., 1978, *Role of cell shape in growth control*. Nature 273, 345–349.
- Garrod, D.R., 1984, *The adhesions of epithelial cells*. Str. 43–105 [W:] H. J. Marthy, 1984, *Cellular and Molecular Control of Direct Cell Interactions*. Plenum Press, New York and London, pp. 376.
- Gibbins J.R., 1972, *Metabolic requirements for epithelial migration as defined by the use of metabolic inhibitors in organ culture*. Exp. Cell Res. 71, 329–337.
- Grinnell F., Toda K.I., Takashima A., 1987, *Activation of keratinocyte fibronectin receptor functioning during cutaneous wound healing*. J. Cell Sci. Suppl. 8, 199–209.
- Gueo M., Toda K.I., Grinnell F., 1990, *Activation of human keratinocyte migration on type I collagen and fibronectin*. J. Cell Sci. 96, 197–205.
- Harris A.K., 1973, *Cell surface movements related to cell locomotion*. [W:] Ciba Found. Symp. *Locomotion of Tissue Cells*. Elsevier North-Holland, str. 3–26.
- Heckman C.A., Campbell A.E., Wetzel B., 1987, *Characteristic shape and surface changes in epithelial transformation*. Exp. Cell Res., 169: 127–148.
- Kolega J., 1986, *Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture*. J. Cell Biol. 102, 1400–1411.
- Kolega J., 1986, *The cellular basis of epithelial morphogenesis*, [W:] *Developmental Biology*, Vol. 2. L. W. Browder red., Plenum Publ. Co.
- Korohoda W., Vöth M., Bereiter-Hahn J., 1991, *Two-phase responses of human polymorphonuclear leukocytes and keratinocytes from tadpoles of *Xenopus laevis* to mechanical stimulation*. Protoplasma 147.
- Middleton C.A., Brown, A.F., Brown R.M., Roberts D.J.H.G., 1988, *The shape of cultured epithelial cells does not depend on the integrity of their microtubules*. J. Cell Sci. 91, 337–345.
- Mittal A.K., Bereiter-Hahn J., 1985, *Ionic control of locomotion and shape of epithelial cell. I. Role of calcium influx*. Cell Motil. 5, 123–136.
- Nelson W.J., 1989, *Development and Maintenance of Epithelial Polarity: A Role of the Submembranous Cytoskeleton*. [W:] *Functional Epithelial Cells in Culture*, str. 3–42, Alan R. Liss, Inc.
- Taylor D.L., Fechtmeier M., 1982, *Cytoplasmic structure and contractility: the solation-contraction coupling hypothesis*. Philos. Trans. R. Soc. London (Biol.) 299, 185–197.
- Trinka J.P., 1988, *Directional cell movement during early development of the teleost *Blennius pholis*: I. Formation of epithelial cell clusters and their pattern and mechanism of movement*. J. Expetl Zool. 245, 157–186.
- Wachtmann D., Stockem W., Weissenfels N., 1990, *Cytoskeletal organization and cell organelle transport in basal epithelial cells of the fresh-water sponge *Spongilla lacustris**. Cell and Tissue Research 261, 145–154.
- Yoneda K., Hujimoto T., Imamura S., Ogawa K., 1990, *Fodrin is localized in the cytoplasm of keratinocytes cultured in low calcium medium: immunoelectron microscopic study*. Acta Histochem. Cytochem. 23, 139–148.

*JOANNA KOŁODZIEJCZYK*Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

MAKROFAGI — MIGRUJĄCE I FAGOCYTUJĄCE KOMÓRKI UKŁADU OBRONNEGO

Makrofagi, należące do białych ciałek krwi (leukocytów), stanowią istotną linię obrony organizmu, reagując aktywnie na czynniki naruszające jego homeostazę. Komórki te biorą udział u nieswoistych reakcjach odpornościowych. Mają one zdolność migracji i fagocytozy, tj. wchłaniania i trawienia ciał obcych, drobnoustrojów oraz uszkodzonych i martwych komórek. Makrofagi, podobnie jak wiele innych komórek systemu obronnego, powstają w szpiku kostnym. Ze szpiku uwalniane są do krwi cyrkulujące formy makrofagów, zwane monocytami. Komórki te pozostają w krwiobiegu przez krótki czas (do 48 godz.), po czym migrują do różnych tkanek organizmu. Zależnie od lokalizacji i pełnionych funkcji, makrofagi przybierają różne formy morfologiczne. W tkance łącznej występują więc makrofagi — histiocyty, w wątrobie — komórki Kupffera, w płucach — makrofagi alweolarne. Makrofagi gromadzą się też w węzłach limfatycznych.

WPROWADZENIE

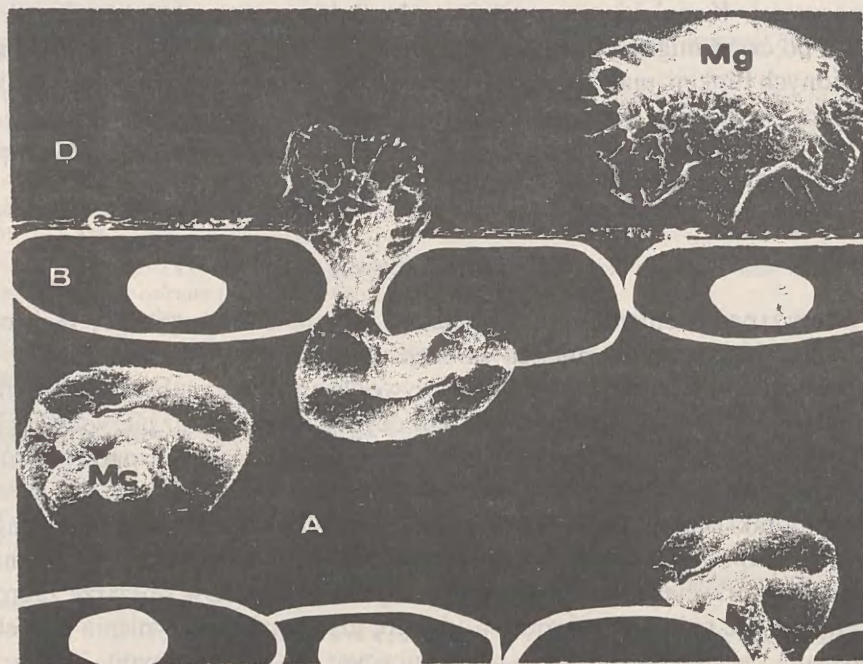
Wraz z pojawieniem się w organizmie czynnika inwazyjnego, makrofagi zaczynają migrować do miejsca infekcji. Migracja ich jest związana z występowaniem pozytywnej chemotaksji, wywoływanej przez substancje wydzielane w miejscu zapalnym. Chemotaksję leukocytów opisał po raz pierwszy *Leber* w roku 1888, obserwując ruchy tych komórek w podrażnionej rogówce królika (*McCutcheon* 1946).

Chemotaksja odgrywa podstawową rolę nie tylko w kierowaniu makrofagów do miejsc zapalnych, ale i w zatrzymywaniu ich w tych rejonach. Czynniki powodujące przyciąganie i gromadzenie się makrofagów w obszarze zagrożonym mogą być różne, w zależności od tego, czy mamy do czynienia z infekcją bakteryjną, wirusową, urazem mechanicznym czy termicznym. Zasięg odpowiedzi na uszkodzenie lub zakażenie też jest różny i zależy od ogólnej kondycji organizmu, wieku, a także od rodzaju urazu lub czynnika inwazyjnego. Niezależnie jednak od tych różnic, przebieg samej odpowiedzi immunologicznej jest zawsze podobny. Inicjuje ją pojawienie się w miejscu zainfekowanym

substancji przyciągających makrofagi i inne leukocyty, uwalnianych bądź przez uszkodzone tkanki gospodarza, bądź przez organizmy obce. Oprócz substancji oddziałujących bezpośrednio i kierunkowo, do czynników chemotaktycznych należą też związki, które nie mając właściwości chemotaktycznych *per se*, indukują powstawanie atraktantów. Do takich substancji należą między innymi kompleksy antygen—przeciwciało, czy *gamma*-globuliny (Keller, Sorokin 1968; Mc Cutcheon 1946).

Oprócz przyciągania makrofagów do ognisk zapalnych, czynniki chemotaktyczne odgrywają też rolę w reakcjach komórek odpornościowych na przeszczepy, w chorobach alergicznych, w niektórych chorobach autoimmunologicznych (Keller, Sorokin 1968).

Najwcześniejszą, prawie natychmiastową odpowiedzią organizmu na uszkodzenie jest zwiększony napływ krwi do obszaru zapalnego. Naczynia krwionośne w tym rejonie stają się przepuszczalne dla białek, których rola polega również na indukowaniu lokomocji leukocytów. Po odebraniu bodźca komórki układu obronnego opuszczają naczynia krwionośne (ekstrawazacja) i przeciskając się między komórkami śródbłonka (diapedeza, rys. 1) przenikają do uszkodzonych tkanek (Keller, Sorokin 1968; Marchesi, Gowans 1964; Mc Cutcheon 1946). Początk-



Rys. 1. Schemat przedstawiający wydoświadczenie makrofagów z naczyń krwionośnych (diapedeza). A — światło naczynia krwionośnego, B — komórki śródbłonka, C — błona podstawna, D — przestrzeń międzykomórkowa, Mc — monocyty unoszone prądem krwi, Mg — makrofag wędrujący w przestrzeni międzykomórkowej

kowo liczebnie przeważają leukocyty polimorfonuklearne, które szybciej reagują na obecność substancji chemotaktycznych, ale w miarę upływu czasu proporcje zmieniają się i wzrasta liczba makrofagów. Czas odpowiedzi chemotaktycznej makrofagów szacuje się na około 4–5 godz. (W a r d 1968). Procentowy wzrost ich ilości w późniejszych fazach walki z infekcją można tłumaczyć dłuższą przeżywalnością makrofagów, a także zachowaną przez nie zdolnością do podziałów poza szpikiem kostnym, w rejonie, w którym aktualnie działają.

Pozytywna chemotaksja makrofagów nie zawsze jest etapem walki z infekcją w organizmie, czasem jest ona istotnym czynnikiem w patogenezie pewnych chorób. Tak jest na przykład w przypadku stwardnienia tętnic, gdzie adhezja makrofagów do ścian naczyń krwionośnych w pierwszych etapach tej choroby zachodzi pod wpływem białkowego czynnika chemotaktycznego MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein — 1). Substancja ta wydzielana jest przez komórki mięśni gładkich naczyń, endotelium i prawdopodobnie przez limfocyty. MCP-1 odgrywa ważną rolę w migracji makrofagów do przestrzeni subendotelialnej i w ich adhezji do ścian naczyń krwionośnych, w których tworzą patologiczne złoże i uszkodzenia (Y l a - H e r t u a l a i in. 1991). Ten przykład patogenego działania migrujących makrofagów nie zmienia jednak faktu, że migracje tych komórek mają podstawowe znaczenie przede wszystkim w reakcjach obronnych organizmu.

Związana z chemotaksją migracja jest zawsze pierwszą odpowiedzią makrofagów na zagrożenie organizmu. Końcowym etapem w walce tych komórek z infekcją jest fagocytoza, tj. niszczenie obcych organizmów przez ich wchłonięcie i strawienie. Mechanizmy molekularne obu tych zjawisk są zbliżone.

LOKOMOCJA MAKROFAGÓW

GENEROWANIE SIŁY MOTORYCZNEJ

Większość makrofagów osiąga średnicę 30–40 μm (B e s s i s 1973). Makrofagi nieruchome mają okrągławy kształt i mało pofałdowaną błonę komórkową (I n g l o t 1987) (rys. 1 — Mc). Makrofagi migrujące mają błonę silnie pomarszczoną, tworzącą liczne hialinowe wypustki i rozległe, rozplaszczone lamellipodia (rys. 1 — Mf). Błona migrujących makrofagów jest ruchliwa, faluje, jedne fałdy zanikają, a na ich miejsce powstają nowe (B e s s i s 1973; H a r t w i g, S h e v l i n 1986; R o g e r s 1983). Szczególnie aktywne są pozbawione organelli, hialinowe obszary na obrzeżach komórki, definiowane przez niektórych badaczy jako korteks. Rejon ten pełni zasadniczą rolę w lokomocji makrofagów, w formowaniu różniących się kształtem i wielkością pseudopodiów, przejściowych struktur lokomotorycznych wytwarzanych podczas migracji i fagocytozy. Pojawianie się nowych pseudopodiów jest precyzyjnie skorelowane z wycofywaniem wcześniej utworzonych (S t o s s e l 1982). Makrofagi poruszają się z prędkością około 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ (T r a c z y k, T r z e b s k i 1989).

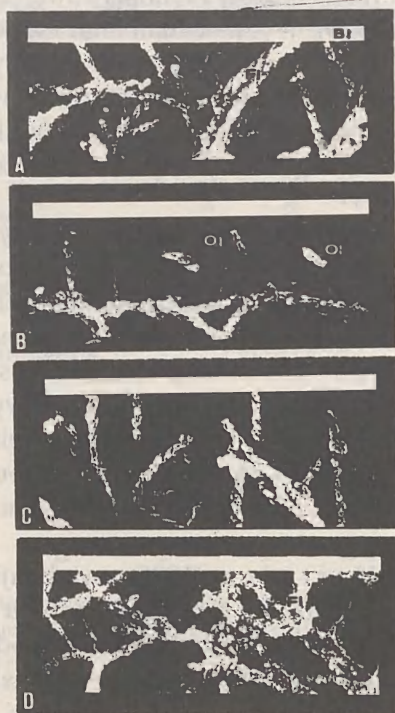
Jedną z pierwszych teorii ruchu leukocytów (nie różnicowano jeszcze wtedy białych ciałek krwi) traktowała te komórki jako krople płynu, mające tendencję do przybierania sferycznego kształtu. Przemieszczanie ich uważano za pasywną reakcję cytoplazmy wynikłą z obniżenia napięcia powierzchniowego (McCutcheon 1946). Następnie przez długi czas uważano, że u podstaw ruchu makrofagów leżą przekształcenia korytkalnej cytoplazmy, która jako układ koloidalny może występować w postaci żelu lub ulegać solifikacji. Zżelifikowana cytoplazma umożliwiałaby wywieranie napięcia skurczowego o różnym nasileniu, generującego siłę motoryczną konieczną dla ruchu komórki (Lewis 1939).

Obecnie, gdy dysponujemy szeroką gamą metod badawczych, w tym mikroskopią elektronową i immunofluorescencją, możliwe stało się poznanie molekularnych podstaw ruchu makrofagów. Już pierwsze obserwacje w transmisyjnym mikroskopie elektronowym uwidoczniły struktury cytoplazmatyczne znajdujące się pod błoną i z nią związane (Boyles, Bainton 1979). Okazało się, że korytkalna cytoplazma makrofagów zawiera gęstą, trójwymiarową sieć filamentów aktynowych i związanych z nimi białek (Rogers 1983; Yin, Hartwig 1988; Yin, Stossel 1980). Elementy sieci rozgałęziają się głównie pod kątem prostym (Hartwig, Shevlin 1986). Włókienka aktynowe są stosunkowo proste i sztywne (Nagashima, Asakura 1980), osiągają średnicę 4–10 nm i długość około 0,5 μm (Reaven, Axline 1973; Yin, Hartwig 1988). Stwierdzono, że aktyna pochodząca z makrofagów wiąże ciężką meromiozynę w sposób typowy dla filamentów aktynowych pochodzących z mięśni (Allison, Davies, De Petris 1971). Filamenty aktynowe stanowią ponad 95% ogólnej puli filamentów sieci korytkalnej w makrofagach (Yin, Hartwig 1988). Sieć ta nie jest jednak strukturą statyczną i trwałą. Struktury aktynowe są dynamiczne, mogą się rozpadać, przemieszczać i odtwarzać od nowa. W konsekwencji oprócz fibrylarniej F-aktyny, w cytoplazmie makrofagów występują też monomery G-aktyny. Przekształcenia aktyny, a więc polimeryzacja i depolimeryzacja tego białka leżą właśnie u podstaw ruchu makrofagów (Yin, Hartwig 1988).

Filamenty aktynowe w komórkach makrofagów mogą być uporządkowane w rozmaite współdziałające struktury, od anizotropowych równoległych wiązek (stress fibers), aż do izotropowych ortogonalnych sieci (Yin, Hartwig 1988). Organizacja wielobiałkowej struktury w cytoplazmie makrofagów regulowana jest w tych komórkach na kilku poziomach. Za utrzymanie ortogonalnej sieci filamentów aktynowych, bądź jej rozpad, a więc za zmienny stan cytoszkieletu, odpowiedzialne są między innymi białka wiążące aktynę (actin binding proteins). Dotychczas udało się zlokalizować i scharakteryzować wiele takich białek. W cytoplazmie makrofagów wykryto obecność dużej ilości profiliny (DiNuble, Southwick 1985; Korn 1982; Yin, Hartwig 1988) i żel-soliny (Yin, Hartwig 1988; Yin, Stossel 1980), a także akumentynę (Southwick, Hartwig 1982). Profilina jest jednym z białek wiążących się z monomerami aktynowymi i przez to zmniejszających zdolność aktyny do

tworzenia filamentów. Żelsolina, skracająca filamenty aktynowe, jest głównym białkiem regulującym przekształcenia żelu aktynowego w sol. Wykryta została po raz pierwszy w makrofagach z płuc królika (Yin, Stossel 1979). W cytoplazmie makrofagów żelsolina występuje w wysokich stężeniach (Yin, Hartwig 1988). Interakcje żelsoliny i aktyny w komórkach są złożone i uzależnione od wielu czynników.

Próba wyjaśnienia udziału żelsoliny w lokomocji makrofagów jest hipoteza opracowana przez Yin i Hartwiga (1988) (rys. 2). Według tej hipotezy w korykalnej cytoplazmie makrofagów spoczynkowych filamenty aktynowe zorganizowane są w trójwymiarową sieć (rys. 2A), a żelsolina w postaci wolnej znajduje się w cytoplazmie. Stymulacja powoduje zmiany w niektórych fosfolipidach błony komórkowej. Ulegają one przekształceniom w inne związki, m.in. w trójfosforan inozytolu. Ten ostatni powoduje uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Jony wapnia aktywują cząsteczki żelsoliny. Żelsolina łącząc się z filamentami aktynowymi fragmentuje je. Powstają



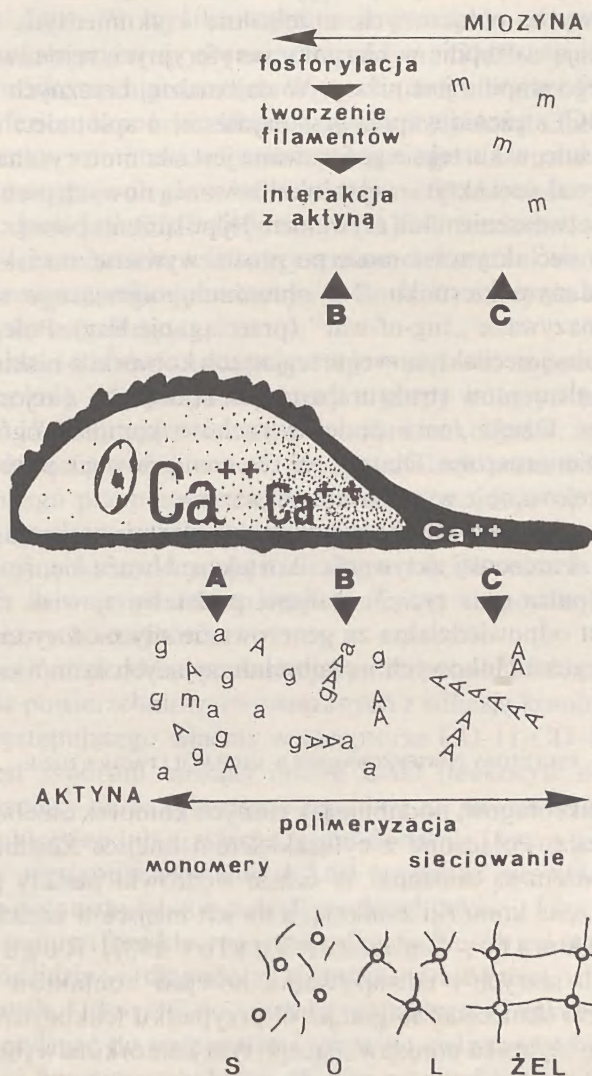
Rys. 2. Struktury aktynowe i ich związki z błoną podczas lokomocji makrofaga. A — trójwymiarowa sieć filamentów aktynowych połączona z błoną komórkową, B — częściowa depolimeryzacja aktyny — oligomery aktynowe swobodnie dyfundują w cytoplazmie, C — ponowne nawiązywanie łączności rosnących polimerów aktynowych z błoną, D — odbudowanie trójwymiarowej sieci filamentów połączonych z błoną, B1 — błona komórkowa, Ol — oligomery aktynowe, Fl — filamenty aktynowe (wg Yin, Hartwig 1988)

liczne krótkie aktynowe oligomery, które mogą swobodnie dyfundować w cytoplazmie. Wskutek tych przemian zachodzi lokalne odrywanie cytoszkieletu aktynowego od błony komórkowej (rys. 2B), co prawdopodobnie jest początkiem powstania pseudopodium. Następnie wolny wapń cytosolowy jest ponownie gromadzony w wewnątrzkomórkowych magazynach, a oligomery aktynowe dyfundują w kierunku błony (rys. 2C). Następuje uwolnienie cząsteczek żelsoliny z oligomerów aktynowych, ponowna polimeryzacja aktyny i odtworzenie sieci filamentów (rys. 2D). Wielofunkcyjność żelsoliny i uzależnienie jej działania od obecności jonów wapnia sugeruje obecność funkcjonalnych i regulacyjnych domen w cząsteczce tego białka. Stwierdzono, że żelsolina zawiera co najmniej trzy miejsca wiążące aktynę (Yin, Hartwig 1988).

Odrywanie, a następnie odsuwanie filamentowej sieci aktynowej od błony frontu wysuwanego pseudopodium wiąże się bezpośrednio z kierunkową lokomocją ameboidalnych komórek. Zjawisko to uwidoczniło się po raz pierwszy w fibroblastach (Heath 1981, 1983). Stwierdzono, że rozwarstwienie korteksu i odsunięcie jego części filamentarnej zachodzi również w swobodnie żyjących amebach (Grębecki 1990). Wyniki badań immunofluorescencyjnych (Kłopotcka, Stockem, Grębecki 1988) potwierdziły, że i w tym przypadku przemieszczająca się warstwa zbudowana jest z aktyny. Jest to jeszcze jedno potwierdzenie zgodności podstaw molekularnych zjawisk ruchowych w przemieszczających się ruchem ameboidalnym, swobodnie żyjących i tkankowych komórkach ruchliwych.

Białkiem, mającym również wpływ na stan aktyny w komórkach makrofagów jest akumentyna (Stossel 1982). Białko to, wyizolowane po raz pierwszy z ludzkich leukocytów polimorfonuklearnych, występuje w makrofagach w bardzo wysokim stężeniu jednej cząsteczki na każde 5 monomerów aktynowych (Southwick, Hartwig 1982; Stossel 1982). Akumentyna również oddziałuje na długość filamentów aktynowych, choć jej zdolność wiązania się z nimi jest mniejsza, niż w przypadku żelsoliny. Różnice między akumentyną i żelsoliną pozwalają na współdziałanie obu tych białek w komórce i precyzyjną kontrolę długości filamentów aktyny (Southwick, Hartwig 1982; Stossel 1982).

Propozycje Yin i Hartwiga (1988) wyjaśniające biochemiczne podstawy ruchu makrofagów, wiążą się w pewnym stopniu z hipotezą opracowaną przez Stossela (1982). Autor ten przedstawił model zmian przestrzennej organizacji cytoplazmy kortykalnej podczas migracji makrofagów, zależnych od stężenia jonów wapnia w komórce. Poziom wolnego wapnia w cytoplazmie makrofagów jest zmienny. Jego fluktuacje kontroluje między innymi wapniowa pompa jonowa. Zmieniające się stężenie wapnia komórkowego reguluje strukturę sieci aktynowej, wpływając tym samym na zjawiska ruchowe. Według Stossela, komponenty sieci aktynowej, a więc aktyna, profilina, żelsolina i akumentyna są produkowane w tych obszarach komórki, gdzie poziom wolnego wapnia jest wysoki (rys. 3A). W wysokim stężeniu wapnia cząsteczki



Rys. 3. Schemat formowania cytoplazmy korytkalnej w komórce makrofaga (wg St o s e l a 1982). A, B, C (duże litery z grotami strzał) wskazują regiony komórki o różnych stężeniach Ca^{2+} , A — region o stężeniu najwyższym, B — strefa przejściowa, C — obszar o najniższym stężeniu wolnego wapnia. Litery bez strzałek symbolizują pojedyncze cząsteczki białek: A — monomery aktynowe, a — akumentyna, g — żelsolina, m — miozyna

Opis rysunku: W regionie A (o najwyższym poziomie wapnia) syntetyzowane są monomery aktynowe (A), a także cząsteczki białek wiążących się z aktyną — akumentyna (a) wiąże się do „pointed”, a żelsolina (g) do „barbed” zakończeń oligomerów aktynowych. Oba te białka blokują polimeryzację aktyny. W regionie B — o niższym poziomie wapnia, następuje odrywanie żelsoliny, a następnie akumentyny — rozpoczyna się budowanie filamentów aktynowych. Dalszym etapem, odbywającym się już w regionie C o najniższym poziomie Ca^{2+} — jest sieciowanie aktynowych polimerów i związana z tym żelifikacja cytoplazmy. Zmiany miozyny, również związane ze stężeniem Ca^{2+} (region C) idą w przeciwnym kierunku. Monomery miozyny występują w regionie o najniższym poziomie Ca^{2+} (region C). W regionie B o wyższym poziomie wapnia — następuje fosforylacja miozyny, która w tych warunkach tworzy biopolarne filamety i reaguje z aktyną, generując siłę motoryczną i powodując przemieszczenie aktyny w komórce.

zelsoliny ulegają aktywacji. Tworzą się jednostki, zbudowane z krótkich filamentów aktynowych, połączonych z żelsoliną i akumentyną (ryc. 3B). Jednostki te dyfundują następnie w kierunku peryferyjnych rejonów komórki, gdzie poziom wolnego wapnia jest niższy. W najbardziej brzeżnych obszarach makrofagów (ryc. 3C) stężenie wapnia jest najniższe, a spłot sieci aktynowej najsilniejszy. Tu właśnie, w korteksie generowana jest siła motoryczna i formują się pseudopodia. Udział sieci aktynowej w lokalizowaniu nowych pseudopodiów nie zawsze wiąże się z tworzeniem lub zrywaniem jej połączeń z błoną. *Stossel* sugeruje, że rosnąca sieć aktynowa może po prostu wywierać nacisk na błonę, pchając ją w pożądanym kierunku. Na obrzeżach migrującego makrofaga zachodzi zjawisko, nazywane „tug-of-war” (przeciąganie liny). Polega ono na formowaniu kortykalnej sieci aktynowej w regionach komórki o niskim stężeniu wapnia, z udziałem elementów strukturalnych pochodzących z rejonów o wyższym jego stężeniu. Dzięki temu podczas ruchów komórki ogólna masa korteksu pozostaje nienaruszona. Dlatego też tworzenie nowych pseudopodiów jest precyzyjnie skorelowane z wycyfywaniem starych.

Obecność cząsteczek miozyny w kortykalnej cytoplazmie makrofagów wiąże się z jej udziałem w skurczowej aktywności korteksu. Uważa się, że interakcja aktyny z miozyną (patrz opis ryc. 3) stanowi podstawę zjawisk ruchowych w makrofach i jest odpowiedzialna za generowanie siły motorycznej w tych i innych ameboidalnych tkankowych i swobodnie żyjących komórkach.

ADHEZJA — RECEPTORY POWIERZCHNIOWE W MIGRACJI I FAGOCYTOZIE

Dla lokomocji makrofachów, podobnie jak i innych komórek ameboidalnych, konieczna jest adhezja. Połączone z cytoszkieletem miejsca kontaktu błony komórkowej z podłożem są zmienne. W czasie wędrówki punkty przyczepu w środkowo-tylnej części komórki zanikają, a na ich miejsce w części wiodącej pojawiają się nowe (*Amato, Unanue, Taylor 1983; Rogers 1983*). Łatwość w zrywaniu starych i nawiązywaniu nowych kontaktów jest podstawowym warunkiem skutecznej migracji. W przypadku leukocytów adhezja pełni dodatkowo rolę czynnika umożliwiającego tym komórkom wydostanie się ze strumienia krwi, w którym są one biernie unoszone. Aby leukocyty (makrofagi) mogły wędrować ku ognisku zapalnemu, muszą one najpierw zatrzymać się i przyłgnąć do komórek śródbłonna w pobliżu celu wędrówki. Zatrzymywanie się i skupianie leukocytów przy ścianach naczynia nosi nazwę marginacji. Marginacja, a potem diapedeza odbywa się z pomocą adhezyjnych glikoproteinowych receptorów znajdujących się bądź na powierzchni leukocytów, (LAM-1, CD 11 a, b, c), bądź na powierzchni komórek endotelialnych (GMP 140, CD 62, ELAM-1). Większość wymienionych wyżej receptorów należy do grupy selektyn. Selektyny, zwane inaczej receptorami lektynowymi lub lektynopodobnymi, mają homologiczne do lektynowych domeny końcowe NH₂. Pozwala im to wiązać się z odpowiednimi ligandami innych komórek. Typowym

przedstawicielem tej rodziny receptorów jest GMP-140 (granule-membrane-protein 140). W wyniku stymulacji komórek endotelialnych histaminą, białkiem uwalnianym w obszarze zapalnym, GMP-140 jest zwalniany z wewnątrzkomórkowych granул sekrecyjnych (ciałek Weibel-Palade'a), przenoszony ku peryferiom komórki i wbudowywany w jej błonę. Obecność tego receptora na powierzchni komórek endotelialnych jest ograniczona w czasie (*in vitro* około 30 min), a następnie ulega on internalizacji na drodze endocytozy. Pojawienie się selektyn takich jak GMP-140, czy ELAM-1 (endothelial-leukocyt adhesion molecule — 1) na powierzchni aktywowanych komórek endotelialnych pozwala na zlokalizowaną adhezję monocytów do ścian naczynia krwionośnego w pobliżu ogniska zapalnego.

Diapedeza stanowi następny etap wędrówki monocytów. Tym razem decydującą rolę odgrywają receptory z grupy integryn (dokładnie integryny CD 11/CD 18, znajdujące się na powierzchni leukocytów. Są one wbudowywane do błony leukocytu dopiero po jego stymulacji przez komórki endotelialne. Według innego przypuszczenia, receptory te znajdują się na błonie leukocytu zawsze, lecz w postaci nieczynnej, a stymulacja powoduje w nich takie zmiany konformacyjne, które decydują o ich aktywności. I wreszcie bierze się pod uwagę możliwość, że w wyniku stymulacji następują na powierzchni komórki przegrupowania tych receptorów.

Znakomitym przykładem ilustrującym zależność lokomocji (i fagocytozy) od receptorów powierzchniowych związanych z adhezją komórek są konsekwencje defektu występującego właśnie w receptorze CD 11/CD 18. Rezultatem tego defektu jest syndrom noszący nazwę LAD (leukocyte adhesion deficiency). Ludzie cierpiący na to schorzenie zapadają na nawracające, zagrażające życiu infekcje bakteryjne lub grzybicze, gram-dodatnie i gram-ujemne. U pacjentów, u których występuje syndrom LAD, stwierdza się krańcową leukocytozę, a mimo to organizm ich nie potrafi zwalczyć infekcji. Dzieje się tak dlatego, że leukocyty polimorfonuklearne i makrofagi tych osób nie mają zdolności adhezji, a co za tym idzie — diapedezy. Komórki te nie mogą wydostać się z naczyń krwionośnych i dotrzeć do ogniska zapalnego. Leukocyty takie nie mogą również przylegać do patogenów (nawet opsonizowanych), a więc niemożliwa jest również fagocytoza bakterii. W tym przypadku więc brak adhezji makrofagów do komórek endotelium i ciał obcych powoduje ogromne zagrożenie organizmu i upośledzenie jego zdolności obronnych (Wright, Detmers 1988).

Po diapedezie makrofagi muszą sforsować podścielającą endotelium błonę podstawną. Nawiązują kontakt z jej stałym składnikiem — lamininą, a następnie za pomocą odpowiednich enzymów proteolitycznych, takich jak kolagenaza IV, czy heparanaza, degradują błonę miejscowo. Przez powstały otwór makrofagi przedostają się na teren interstycjalnej stromy. Elementy strukturalne stromy — włókna kolagenów interstycjalnych, fibronektyna, to szlaki komunikacyjne wędrujących komórek. Makrofagi (i inne ruchliwe komórki organizmu) nawią-

zują z nimi kontakt za pomocą integryn. Te uniwersalne heterodimery mogą łączyć cytoszkielet komórki ze wszystkimi elementami pozakomórkowej macierzy i, jak już wspomniano, łatwo nawiązują i łatwo zrywają kontakty z ligandami podłoża. Poprzez pozakomórkową macierz makrofagi docierają do chorych tkanek. Tu właśnie zachodzi ostatni etap akcji obronnej — fagocytoza.

Warto przypomnieć, że podczas fagocytozy w komórkach makrofagów zachodzą podobne zjawiska, jak podczas migracji. Makrofagi spoczynkowe mają jednolitą, ciekłą warstwę filamentów podścielających równomiernie całą błonę komórkową z jej licznymi drobnymi fałdami i wypustkami. Makrofagi fagocytykujące zachowują natomiast ciekłą warstwę peryferyjnych filamentów tylko w obszarach niezaangażowanych w fagocytozę. W regionach komórki, przylegających do fagocytowanego obiektu, wytwarzają one pseudopodia wypełnione gęstą siecią filamentów aktynowych (podobnie jak w nibynóźce lokomotorycznej — patrz rys. 3). Nie wnikając w dalsze szczegóły możemy powiedzieć, że pseudopodia te (Berlin, Oliver 1978) otaczają obce ciała przylegające do ich powierzchni i zamykając je w fagosomach wprowadzają do wnętrza komórki. Tam następuje trawienie z udziałem enzymów wydzielanych przez lizosomy. Czynnikiem sprzyjającym fagocytozie jest opsonizacja fagocytowanego obiektu. Ogólnie rzecz biorąc, zjawisko to polega na otaczaniu takiego obiektu białkami osocza — opsoninami, co ułatwia przyłgnięcie jego powierzchni do powierzchni makrofaga (Traczyk, Trzebski 1989). Z makrofagami współdziałają też inne białka osocza, np. lizozym, układ dopełniacza oraz properdyny i bakteriocydyny. Białka te naruszają błonę bakterii czyniąc je bardziej dostępnymi dla fagocytykujących makrofagów.

W artykule tym starano się pokrótce przedstawić rolę makrofagów jako czynnych komórek układu obronnego naszego organizmu. Wypełnianie funkcji obronnych przez te komórki możliwe jest między innymi dzięki temu, że makrofagi mają zdolność przylegania — adhezji. Adhezja do podłoża, wytwarzanie siły motorycznej oraz polaryzacja komórki umożliwiają makrofagom przemieszczanie się w organizmie, co stanowi podstawowy warunek skuteczności ich działania.

MACROPHAGES — MIGRATING AND PHAGOCYTIZING CELLS OF IMMUNE SYSTEM

Summary

Macrophages play an important role in antigen recognition and induction of the immune response, as well as removal of debris and destruction of target cells. They derive from the bone marrow cells and may be found in the bloodstream (monocytes) or in the tissue. Macrophages participate in the inflammatory response. Their positive chemotaxis plays a major role in this process, especially in the accumulation of macrophages in the injured tissues. Chemotactic stimulation of

macrophages may result in directional migration of these cells to the inflammatory sites. The common pattern of the response of organism to an inflammatory process, and the role of macrophages in it, are described on the first pages of the article. In the second part, the morphology of the macrophages and spatial organization of macrophage cortical cytoplasm (actin network) are described. The structure of macrophages actin cytoskeleton is controlled at several levels by Ca^{2+} — dependent actin binding proteins. Receptor stimulation induces a massive actin polymerization at the cell cortex, changes in macrophage shape and active cellular movements. Selectins and integrins are the families of cell surface proteins that mediate macrophage adhesion and migration to the inflammation sites. Their role in these phenomena and in phagocytosis is referred in the last part of the present article.

LITERATURA

- Allison A.C., Davies P., De Petris S. — *Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis*. Nature New Biol. 232: 153–155, 1971.
- Amato P., Unanue E., Taylor D. — *Distribution of actin in spreading macrophages: A comparative study on living and fixed cells*. J. Cell. Biol. 96, 3: 750–726, 1983.
- Berlin R. D., Oliver J.M. — *Analogous ultrastructure and surface properties during capping and phagocytosis in leucocytes*. J. Cell. Biol. 77: 789–804, 1978.
- Bessis M. — *Living blood cells and their ultrastructure*. Springer-Verlag, 477–517, 1973.
- Boyles J., Bainton D.F. — *Changing patterns of plasma membrane associated filaments during the initial phases of polymorphonuclear leucocyte adherence*. J. Cell. Biol. 82: 347–369, 1979.
- Di Nuble M.J., Southwick F.S. — *Effects of macrophage profilin on actin in the presence of acumentin and gelsolin*. J. Biol. Chem. 260: 7402–7409, 1985.
- Gordon S., Perry V.H., Rabinowitz S., Chung L-P., Rosen H. — *Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. Macrophage plasma membrane receptors: structure and function*. Gordon S. (red.), J. Cell. Science, Suppl 9, 1–27, 1988.
- Grębecki A. — *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement*. Protoplasma 154: 98–111, 1990.
- Hartwig J.H., Shevlin P. — *The architecture of actin filaments and the ultrastructural location of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages*. J. Cell. Biol. 103: 1007–1021, 1986.
- Heath J.P. — *Arcs: curved microfilament bundles beneath the dorsal surface of the leading lamellae of moving chick embryo fibroblasts*. Cell. Biol. Int. Rep. 5: 975–980, 1981.
- Heath J.P. — *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arcshaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface*. J. Cell. Biol. 60: 331–354, 1983.
- Inglot A.D. — *Zbuntowane komórki*. Warszawa, KAW 1987.
- Keller K.U., Sorkin E. — *Chemotaxis of leucocytes*. Experientia 24: 641–652, 1968.
- Kłopotcka W., Stockem W., Grębecki A. — *Fine structure and distribution of contractile layers in Amoeba proteus preincubated at high temperature*. Protoplasma 147: 117–124, 1988.
- Korn E.D. — *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiol. Rev. 62: 672–737, 1982.
- Lewis W. H. — *The role of a superficial plasmagel layer in changes of form, locomotion and division of cells in tissue cultures*. Arch. Exp. Zellforsch. 23: 1–7, 1939.
- Marchesi V.T., Gowans J.L. — *The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study*. Proc. Royal Soc. 975: 283–291, 1964.
- Mc Cutcheon M. — *Chemotaxis in leucocytes*. Physiol. Rev. 26, 3: 319–337, 1946.
- Mc Ever R.P. — *GMP-140: A receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium*. J. Cell. Biochem. 45: 156–161, 1991.
- Nagashima H., Asakura S. — *Dark-field light microscopic study of the flexibility of F-actin complexes*. J. Molec. Biol. 136: 169–182, 1980.

- Reaven E.P., Axline S.G. — *Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages*. J. Cell. Biol. 59: 12–27, 1973.
- Rogers A.W. — *Cells and tissues. An introduction to histology and cell biology*. Acad. Press, 1983.
- Southwick F.S., Hartwig J.H. — *Acumentin, a protein in macrophages which caps the "pointed" end of actin filaments*. Nature 297: 303–307, 1982.
- Stossel T.P. — *The spatial organization of cortical cytoplasm in macrophages*. *Modern cell biology*. Satir B.H. (red.), Alan R. Liss Inc., New York, 1982.
- Traczyk W., Trzebski A. — *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Warszawa, PZWL 1989.
- Ward P.A. — *Chemotaxis of mononuclear cells*. J. Exp. Med. 128: 45: 1201–1221, 1968.
- Wright S.D., Detmers P.A. — *Adhesion-promoting receptors on phagocytes. Macrophage plasma membrane receptors: structure and function*. Gordon S. (red.), J. Cell. Sci., Suppl. 9: 99–121, 1988.
- Yin H.L., Hartwig J.H. — *The structure of the macrophage actin skeleton. Macrophage plasma membrane receptors: structure and function*. Gordon S. (red), J. Cell. Sci., Suppl. 9: 169–185, 1988.
- 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.
- Yin H.L., Stossel T.P. — *Purification and structural properties of gelsolin: a Ca^{++} — activated regulatory protein of macrophages*. J. Biol. Chemistry 255, 19: 9490–9493, 1980.
- Yla-Hertuala S., Lipton B.A., Rosenfeld M.E., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E.J., Witztum J.L., Steinberg D. — *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5252–5256, 1991.

WANDA KŁOPOCKA

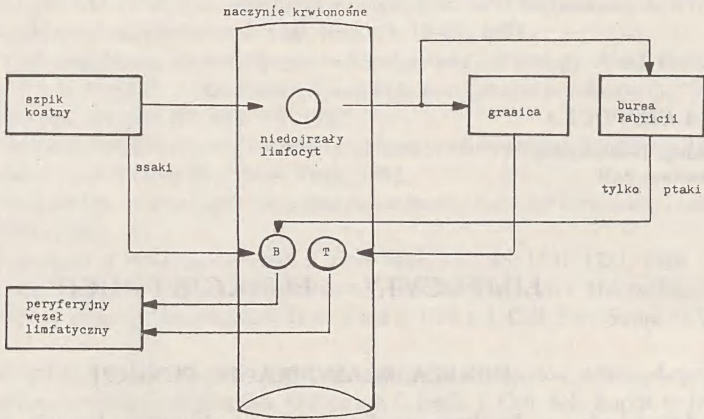
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

LIMFOCYTY — FUNKCJE I RUCH

GENEZA, KLASYFIKACJA, FUNKCJE

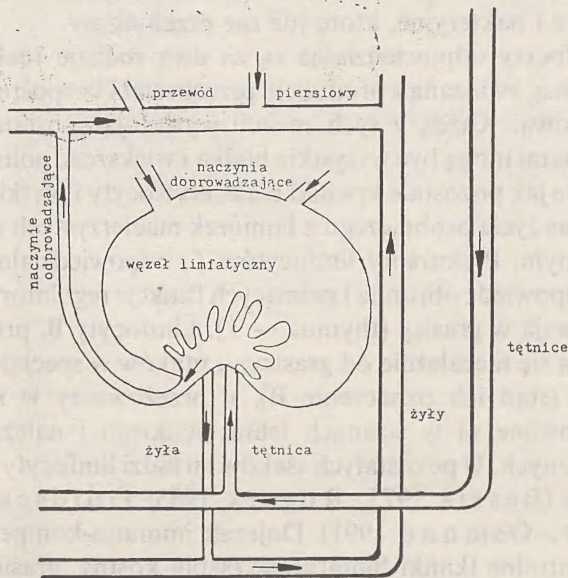
Podczas gdy u bezkręgowców system obronny bazuje na komórkach fagocytujących, u kręgowców tzw. profesjonalne komórki fagocytarne, głównie makrofagi i polimorfonuklearne leukocyty są tylko częścią znacznie bardziej skomplikowanej strategii obronnej. Centralnymi elementami tej strategii są limfocyty (stanowiące ok. 1/4 ogólnej liczby wszystkich białek komórek krwi), odpowiedzialne za zespół swoistych reakcji organizmu, zwanych odpowiedzią immunologiczną, a skierowanych przeciw czynnikowi obcemu. System immunologiczny kręgowców jest wysoce specyficzny i ma zdolność odróżniania komórek obcych od własnych. Ma również zdolność „zapamiętywania”, dzięki czemu przez całe życie mamy zwiększoną odporność na te pospolite choroby wirusowe i bakteryjne, które już raz przebyliśmy.

Limfocyty odpowiedzialne są za dwa rodzaje reakcji immunologicznych: humoralną, związaną z produkcją przeciwciał i bezpośrednią swoistą odpowiedzią komórkową. Każdą z tych reakcji wywołują substancje zwane antygenami. Antygenami mogą być wszystkie białka i większość polisacharydów. Limfocyty, podobnie jak pozostałe krwinki białe, erytrocyty i płytki krwi rozwijają się przez cały okres życia osobniczego z komórek macierzystych zlokalizowanych w szpiku kostnym. Prekursory limfocytów T, odpowiedzialnych za swoistą komórkową odpowiedź obronną i pełniących funkcje regulatorowe dzielą się, różnicują i dojrzewają w grasicy (thymus — T). Limfocyty B, produkujące przeciwciała, rozwijają się niezależnie od grasicy; u ptaków w specjalnym narządzie — bursa Fabricii (stąd ich oznaczenie B), u przeżuwaczy w kępkach Peyer'a, które zlokalizowane są w ścianach jelita cienkiego i należą do wtórnych tkanek limfatycznych. U pozostałych ssaków i u ludzi limfocyty B rozwijają się w szpiku kostnym (Bessis 1973; Rogers 1983; Goldschneider 1980; Gallagher, Osmond 1991). Dojrzałe immuno-kompetentne limfocyty opuszczają centralne tkanki limfatyczne (szpik kostny, grasicę) i w strumieniu krwi rozpoczynają wędrówkę do węzłów limfatycznych — peryferyjnych i związanych z przewodem pokarmowym, a także do śledziony (rys. 1). W przeciwieństwie do erytrocytów i płytek krwi, które żyją i funkcjonują tylko we wnętrzu naczyń krwionośnych, a także granulocytów, które opuszczają układ krwionośny



Rys. 1. Miejsca dojrzewania i drogi cyrkulacji prekursorów limfocytów T i B*

i nigdy do niego nie wracają, limfocyty cyrkulują przez całe życie pomiędzy limfą i krwią. Przechodzą z naczyń krwionośnych do węzłów limfatycznych lub tkanek w miejscach zapalnych, a stamtąd w strumieniu limfy przez sieć naczyń limfatycznych przenoszone są do przewodu piersiowego i uwalniane z powrotem do krwi (rys. 2). Ta stale powtarzająca się wędrówka ma umożliwić dużej liczbie limfocytów wejście w kontakt z antygenem, który penetruje do organizmu w dowolnym miejscu.



Rys. 2. Schemat recyrkulacji limfocytów pomiędzy układem krwionośnym i tkankami limfatycznymi. Strzałkami zaznaczono kierunki przepływu krwi i limfy

* Uwaga. We wszystkich rysunkach ilustrujących artykuł zachowano analogiczne oznaczenia rodzajów komórek i receptorów komórkowych.

System odpornościowy musi reagować na miliony obcych antygenów w sposób wysoce specyficzny. Możliwość sprostania tak trudnemu zadaniu wyjaśnia teoria selekcji klonalnej (Burnet 1959), która sugeruje, że już podczas dojrzewania limfocytów, w każdej komórce rozwija się zdolność do reagowania z określonym antygenem, przejawiająca się obecnością na jej powierzchni specyficznego białka receptorowego. Komórki takie tworzą klony. System immunologiczny zawiera miliony różnych klonów limfocytów T oraz B, których komórki mają tą samą specyficzność antygenową. Oznacza to, że dany antygen aktywuje tylko te klony, które mają zdolność związania go na swej powierzchni.

Specyficzne rozpoznanie i związanie antygeny zachodzi przez prezentowane na powierzchni dojrzałych limfocytów T kompleksy receptorowe TCR-CD3 (Klausner i in. 1990); Clevers i in. 1988) oraz poprzez związane z błoną komórek B formy IgM i IgD immunoglobulin (przeciwciała), zwane kompleksami BCR (Konig 1991). Funkcją tych receptorów jest również przekazanie do wnętrza komórki sygnału, powodującego jej aktywację. Zarówno kompleksy TCR jak i BCR mają regiony stałe, o sekwencji aminokwasów identycznej dla wszystkich klonów oraz regiony zmienne, będące miejscami wiązania określonego antygeny, charakterystyczne dla jednego klonu limfocytów.

Ten fragment antygeny, który łączy się z wiążącym go miejscem na cząsteczce przeciwciała lub receptorze powierzchniowym limfocyty, nazywa się determinantą antygenową. Większość antygenów posiada wiele różnych determinant i może stymulować różne klony limfocytów. Taką reakcję nazywa się poliklonalną. Monoklonalną natomiast, nazywa się odpowiedź tylko jednego klonu komórek T albo B, stymulowaną przez pojedynczą determinantę antygenową. Przeciwciała produkowane przez taki klon limfocytów B mają te same miejsca wiązania antygeny i zwane są przeciwciałami monoklonalnymi. Działanie przeciwciał nie ogranicza się tylko do ich zdolności wiązania obcych cząsteczek. Każdy związany z immunoglobuliną antygen jest niszczone biologicznie, a o sposobie jego dezintegracji decyduje budowa tzw. fragmentu Fc cząsteczki przeciwciała. Immunoglobuliny o tych samych miejscach wiązania antygeny mają zróżnicowane fragmenty Fc, które umożliwiają im włączenie się w różne procesy biologiczne. Mogą one wiązać się specyficznie z receptorami na powierzchni komórek fagocytujących, takich jak makrofagi i polimorfonuklearne leukocyty, zwiększając tym samym efektywność niszczenia mikroorganizmów. Mogą łączyć się z wirusami i uniemożliwiać im wiązanie się do receptorów powierzchniowych i infekcję własnych komórek. Mogą wiązać się z receptorami na powierzchni komórek tucznych i kwasochłonnych leukocytów, stymulując wydzielanie biologicznie aktywnych amin, przede wszystkim histaminy, będącej jednym z mediatorów reakcji zapalnej. Mogą wreszcie wchodzić w kontakt z pierwszym komponentem układu dopełniacza, uruchamiając w ten sposób cały łańcuch biochemicznych reakcji powodujących liż mikroorganizmów inwazyjnych. Przeciwciała w połączeniu z układem dopełniacza są głównym narzędziem walki kręgowców z infekcjami bakteryjnymi.

Komórkowa reakcja immunologiczna, za którą odpowiedzialne są limfocyty T, skierowana jest przede wszystkim przeciw infekcjom wirusowym, grzybiczym, przeszczepom i własnym zmutowanym komórkom somatycznym. Różne reakcje limfocytów T zachodzą za pośrednictwem różnych subpopulacji tych komórek:

1) cytotoksycznych limfocytów (Tc), selektywnie zabijających komórki obce i własne zainfekowane wirusem.

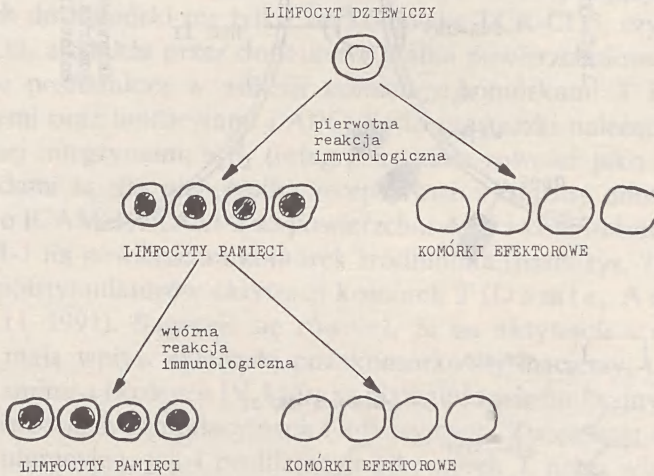
2) limfocytów regulatorowych, do których należą limfocyty (Th) wspomagające reakcje pomiędzy komórkami T i B, limfocytami i makrofagami oraz limfocyty supresorowe (Ts), znoszące aktywność efektorowych komórek T i B, jak również subpopulacji limfocytów wspomagających.

Powstaje więc rodzaj sprzężenia zwrotnego, które w sposób ciągły reguluje aktywność różnych subpopulacji limfocytów i jest jednym z elementów skomplikowanego systemu interakcji pomiędzy komórkami układu obronnego. Kooperacja pomiędzy komórkami T, B i makrofagami jest konieczna do wystąpienia większości reakcji immunologicznych. Limfocyty B, na przykład, wymagają do produkcji i wydzielania przeciwciał obecności zarówno komórek T, jak i wyspecjalizowanych komórek prezentujących antygeny (APC), którymi są komórki dendrytyczne i makrofagi.

Większość komórek T, w przeciwieństwie do limfocytów B, nie reaguje na antygeny w formie rozpuszczonej, ale na związane z powierzchnią komórek. Limfocyty Th reagują na antygeny prezentowane przez makrofagi, niektóre komórki T i większość limfocytów B. Komórki Tc reagują na antygeny związane z powierzchnią komórek obcych lub własnych zainfekowanych wirusem. Większość komórek T rozpoznaje antygeny na powierzchni innych komórek tylko jeżeli są one połączone z antygenami, tzw. głównego układu zgodności tkankowej (MHC). Antygeny MHC klasy I i klasy II znajdują się na powierzchni komórek kręgowców wyższych. Cząsteczki MHC I występują na powierzchni prawie wszystkich komórek somatycznych, a glikoproteiny MHC II są charakterystyczne dla komórek systemu immunologicznego. Różne subpopulacje limfocytów T rozpoznają antygeny połączone z różnymi klasami glikoprotein głównego układu zgodności tkankowej. Komórki Tc rozpoznają antygen związany z białkiem MHC klasy I. Komórki Th reagują przeciw antygenom tworzącym kompleksy z cząsteczkami białek MHC klasy II. Również niektóre komórki supresorowe mogą rozpoznawać antygen w połączeniu z cząsteczką MHC II.

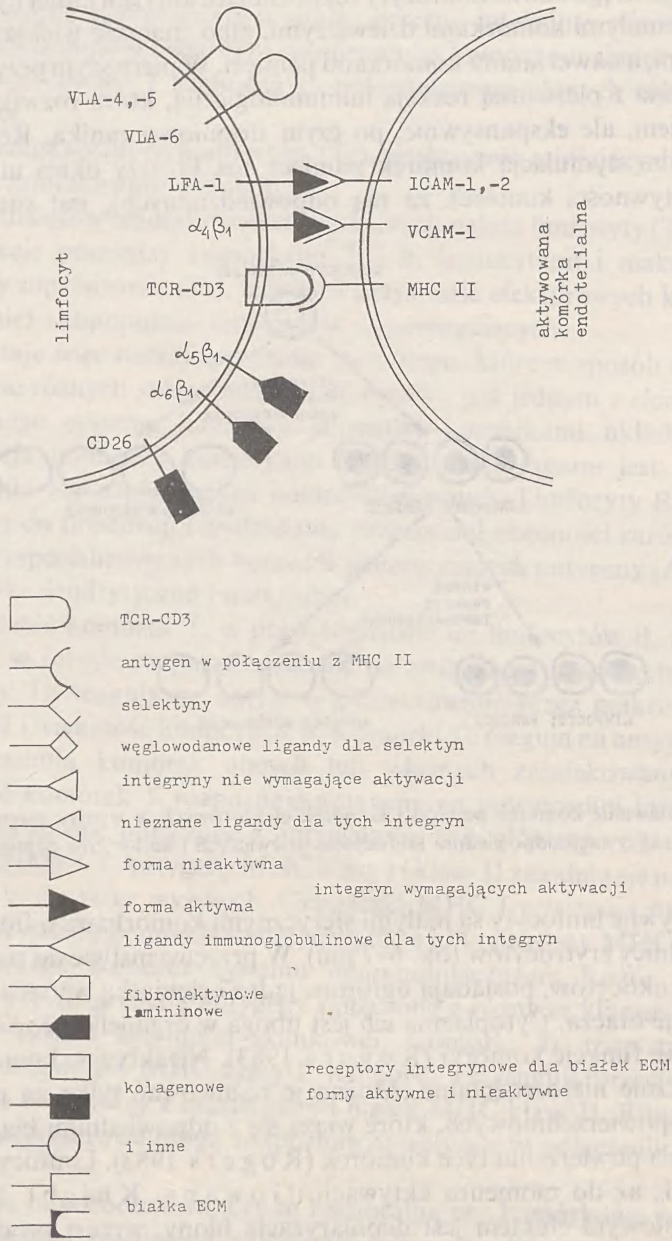
Reakcja odpornościowa, czy to humoralna czy komórkowa pojawia się po okresie utajenia trwającym najczęściej kilka dni. W tym czasie, na skutek stymulacji, komórki T i B rosną, dzielą się i różnicują tworząc duże populacje aktywnych komórek efektorowych oraz komórek pamięci zdolnych do szybkiej reakcji immunologicznej w przypadku powtórnego spotkania danego antygeny (rys. 3). To dzięki klonalnej ekspansji i długiej przeżywalności tych komórek istnieje pamięć immunologiczna, będąca fundamentalną cechą systemu odpor-

nościowego kręgowców. Limfocyty rozpoznające antygen mogą być albo krótko żyjącymi, małymi komórkami dziewiczymi, albo znacznie większymi, żyjącymi miesiącami, a nawet latami komórkami pamięci. W pierwszym przypadku mamy do czynienia z pierwotną reakcją immunologiczną, która rozwija się z dużym opóźnieniem, ale ekspansywnie, po czym stopniowo zanika. Reakcja wtórna związana ze stymulacją komórek pamięci, ma krótszy okres utajony (dzięki hiperreaktywności komórek za nią odpowiedzialnych), jest silniejsza i trwa dłużej.



Rys. 3. Powstawanie komórek pamięci i komórek efektorowych w wyniku pierwotnej i wtórnej aktywacji odpowiednio limfocytów dziewiczych i limfocytów pamięci

Nieaktywne limfocyty są małymi sferycznymi komórkami o średnicy zbliżonej do średnicy erytrocytów (ok. 6–7 μm). W przeciwieństwie do polimorfonuklearnych leukocytów, posiadają ogromne jądro i cieniutką warstwę cytoplazmy, która je otacza. Cytoplazma ich jest uboga w organelle odpowiedzialne za podstawowe funkcje komórki (Rogers 1983). Nieaktywne komórki B i T są morfologicznie nierozróżnialne. Można je różnicować tylko za pomocą tzw. markerów powierzchniowych, które wiążą się z odpowiednimi białkami receptorowymi na powierzchni tych komórek (Rogers 1983). Limfocyty pozostają w stanie G_0 aż do momentu aktywacji (Gowans, Knight 1964), której natychmiastowym efektem jest depolaryzacja błony, wzrost produkcji InsP_3 , wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wolnego wapnia, aktywacja białkowej kinazy C (Steel, Hutchins 1989). Gromadzenie się i migracja aktywowanych limfocytów wokół makrofagów, czy to w miejscach zapalnych, czy w węzłach limfatycznych (peripolexis) (Bessis 1973; Rogers 1983; van Maarsseveen i in. 1990), służy wiązaniu prezentowanego przez makrofaga antygeny do odpowiednich receptorów komórek T (TCR) i komórek B (BCR)



Rys. 4. Schemat połączeń pomiędzy limfocytem i komórką śródbłonnka w pobliżu miejsca zapalnego. W wyniku stymulacji limfocytu poprzez sieciowanie TCR-CD3 uaktywniane są zarówno receptory adhezywne (LFA-1, $\alpha_4\beta_1$), jak też receptory dla białek ECM ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, CD23, VLA-4, -5, -6). Aktywowana na skutek działania cytokin komórka endotelialna prezentuje ligandy (ICAM-1, -2, VCAM-1) dla adhezywnych receptorów z powierzchni limfocytu

(Klausner i in. 1990; Koning 1991; Clevers i in. 1988). Sygnał przekazywany za pośrednictwem tych receptorów do wnętrza komórki uruchamia wiele zmian, które prowadzą do przekształcenia nieaktywnych limfocytów w tzw. plazmocyty (plasma cells), będące stacjonarnymi komórkami syntetyzującymi i uwalniającymi przeciwciała, lub w efektorowe komórki T, które zachowują zdolność migracji i, przemieszczając się w obrębie wtórnej tkanki limfatycznej, rozszerzają reakcję immunologiczną. Ostatnie badania wykazały, że efektywność stymulacji komórek T zależy od aktywujących sygnałów przesyłanych do komórki nie tylko *via* kompleks TCR-CD3, czy antygenowy receptor CD2, ale także przez dodatkowe białka powierzchniowe. Te ostatnie jednocześnie pośredniczą w adhezji pomiędzy komórkami T i komórkami endotelialnymi oraz limfocytami i APC. Są to cząsteczki należące do rodziny białek zwanej integrynami: $\alpha_1\beta_2$ (integryna znana również jako LFA-1) oraz $\alpha_4\beta_1$. Ligandami są dla nich białka receptorowe z rodziny immunoglobulin, odpowiednio ICAM-1, ICAM-2 na powierzchni APC i komórek endotelialnych oraz VCAM-1 na powierzchni komórek śródbłonna (patrz rys. 7). Odgrywają one rolę współstymulatorów aktywacji komórek T (Dahmele, Aruffo 1991; Ruoslahti 1991). Sugeruje się również, że na aktywację i różnicowanie limfocytów mają wpływ składniki pozakomórkowej macierzy, takie jak fibronektyna, laminina i kolagen IV, które są białkami wielofunkcyjnymi o niezależnych właściwościach stymulacyjnych i adhezyjnych. Zwiększają one zarówno aktywność migracyjną, jak i proliferacyjną komórek T przez wiązanie się do grupy receptorów z rodziny integryn: VLA-4, -5, -6 i prawdopodobnie również do białek błonowych związanych z GPI (de Sousa i in. 1991). Komórki pamięci mają znacznie niższy próg aktywacji niż komórki dziewicze. W porównaniu z komórkami dziewiczymi charakteryzują się one trzy-, a nawet czterokrotnie zwiększoną ekspresją cząsteczek adhezyjnych, takich jak LFA-1, VLA-4, -5, -6, służących również jako receptory aktywujące. Kompleksy TCR—CD3 na powierzchni tych komórek są zasocjowane z innymi receptorami antygenowymi (CD4, CD5). Oznacza to, że komórki pamięci są skutecznie aktywowane przez niższy poziom antygeny lub przeciwciała anti-CD3. Stymulowany właściwym bodźcem limfocyt rośnie, powiększając nawet trzykrotnie swoją objętość. Zmienia się ultrastruktura jego wnętrza. Zwiększa się nieregularność powierzchni. Rozpoczyna się synteza i sekrecja substancji, zwanych limfokinami, do których należą m.in. Il-2, -3, -4, -6 oraz $\text{INF}\gamma$. Działają one w sposób para- lub autokryny i są niezbędne dla rozwoju dalszych etapów reakcji immunologicznej, tj. proliferacji i różnicowania. Wzrasta ekspresja niektórych białek receptorowych, m.in. receptora dla Il-2 i Il-4.

Przy dużych infekcjach do węzłów limfatycznych przedostaje się wiele antygenów pierwotnych i wtórnych, które aktywują jednocześnie limfocyty dziewicze i limfocyty pamięci. Interesujące jest współdziałanie pomiędzy tymi dwiema subpopulacjami komórek oparte z jednej strony na różnicach w ilości i rodzaju syntetyzowanych limfokin, z drugiej na podobnej ekspresji receptorów

dla tych substancji. Komórki dziewicze produkują np. Il-2 w nadmiarze, podczas gdy komórki pamięci w ilości niedostatecznej dla swojej optymalnej proliferacji. W wyniku tego egzogenna Il-2 może podnosić proliferacyjną aktywność komórek pamięci. Natomiast cytokiny uwalniane przez komórki pamięci — głównie Il-4, Il-6 — intensyfikować mogą reakcję komórek dziewiczych. Gdy wygasa reakcja pierwotna, która zawsze trwa krócej niż wtórna i na placu boju pozostają już tylko limfocyty pamięci, podstawowym czynnikiem aktywującym proliferację pozostaje wyłącznie autokrynnie działająca Il-4 (A k b a r i in. 1991).

Skuteczność odpowiedzi immunologicznej czy to pierwotnej, czy wtórnej, humoralnej czy komórkowej zależna jest m.in. od zdolności limfocytów do osiągnięcia ogniska infekcji. Tak więc, zarówno komórki dziewicze jak i limfocyty pamięci obu subpopulacji T i B muszą mieć zdolność penetrowania do przestrzeni interstycjalnej w miejscach zapalnych. Muszą one również dotrzeć do węzłów limfatycznych, których główną funkcją jest zatrzymywanie antygenów, i w których za pośrednictwem makrofagów i komórek dendrytycznych prezentowane są one limfocytom.

* * *

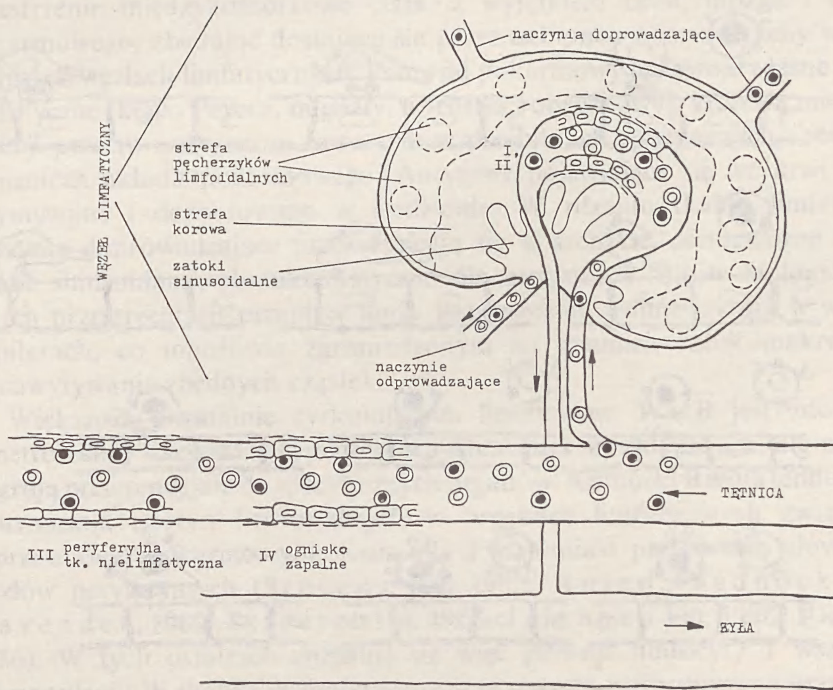
Zagadnienia omówione w pierwszej części artykułu stanowią wprowadzenie, i siłą rzeczy nie wyczerpują tematu. Czytelników zainteresowanych funkcjami i rozwojem limfocytów odsyłamy zatem do następujących pozycji literatury.

- 1) *Molecular Biology of the Cell*, 1989, pod redakcją Bruce Alberts i in.
- 2) *Cytofizjologia*, 1990, pod redakcją Kazimierza Ostrowskiego i Jerzego Kawiaka
- 3) *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, 1990, pod redakcją Władysława Z. Traczyka i Andrzeja Trzebskiego

RECYRKULACJA LIMFOCYTÓW I JEJ MOLEKULARNA REGULACJA

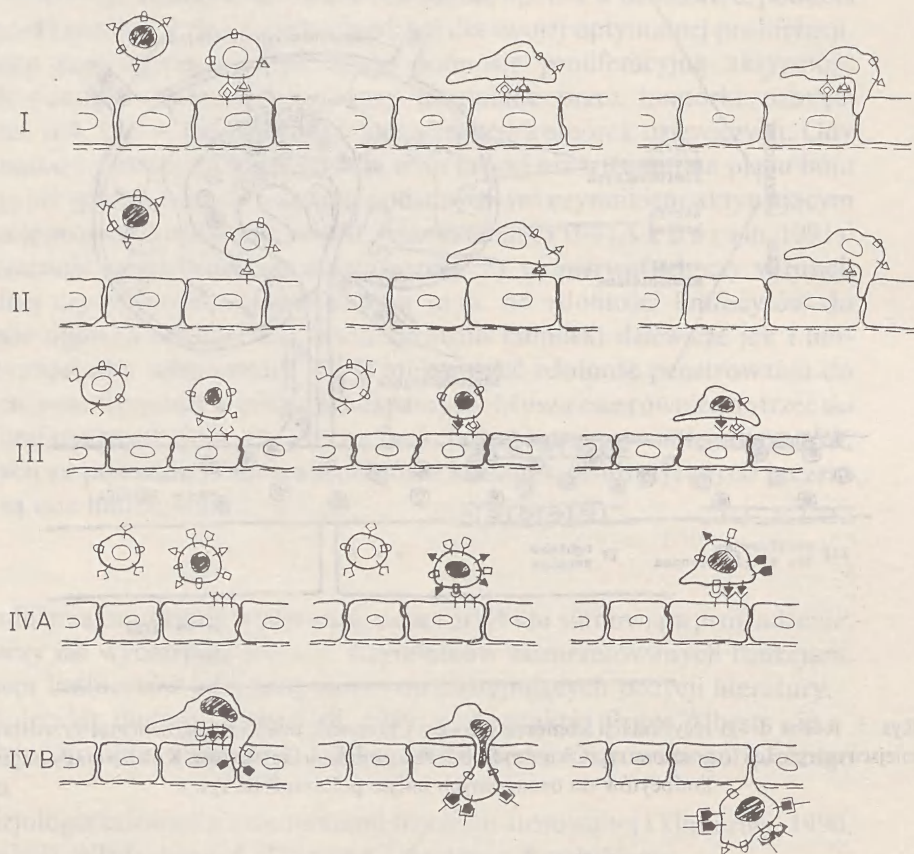
Dla prawidłowego funkcjonowania systemu immunologicznego konieczna jest stała recyrkulacja limfocytów pomiędzy układem krwionośnym i tkankami limfatycznymi. Jej celem jest przede wszystkim zwiększenie prawdopodobieństwa interakcji pomiędzy limfocytami i komórkami prezentującymi antygeny, ale też segregacja limfocytów o określonych funkcjach do różnych organów limfatycznych organizmu.

Limfocyty opuszczają strumień krwi i wchodzą do wtórnych tkanek limfatycznych oraz ognisk zapalnych przez ściany pozawłośniczkowych tętniczek krwionośnych (Jalkanen, Butcher 1985) (patrz rys. 5). Wychodzenie leukocytów z naczyń krwionośnych określa się terminem ekstrawazacji. Wyróżnić w nim można dwa etapy: adhezję krwinek do apikalnych powierzchni śródbłonek wyspecjalizowanych lub czasowo aktywowanych, zwaną marginacją oraz przedostawanie się pomiędzy komórkami endotelium (Gowans, Knight 1964) do przestrzeni interstycjalnej, zwane diapedezą



Rys. 5. Różne drogi recyrkulacji komórek pamięci i komórek dziewiczych. Schemat przedstawia miejsca marginacji (oznaczone rzymskimi cyframi) obu populacji limfocytów. Kolejne etapy migracji limfocytów do oznaczonych miejsc pokazano na rys. 6

(patrz rys. 6). Szczególnym przypadkiem ekstrawazacji jest przechodzenie limfocytów z naczyń krwionośnych do parenchymy węzłów limfatycznych, określane jako „homing”. Białka błonowe, które rozpoznają odpowiednie ligandy na komórkach śródbłonna wtórnych tkanek limfatycznych i wiążą się z nimi, to receptory „homing” (Ford 1975; Gallatin i in. 1983; Caven-der 1989). Znalaziono je na powierzchni limfocytów wszystkich badanych gatunków kręgowców. „Homing” limfocytów po raz pierwszy zaobserwowali Gowans i Knight w roku 1964. Limfocyty opuszczają naczynia krwionośne w obrębie substancji korowej węzła (patrz rys. 5). W jej trójwymiarowej sieci zbudowanej z lamininy i kolagenu IV napotyka pola makrofagów i komórek dendrytycznych, prezentujących antygeny. Tam też przebywają przez jakiś czas komórki T, podczas gdy komórki B kolonizują pęcherzyki limfoidalne tworzone przez sieć komórek dendrytycznych. Spotkanie odpowiedniego antygeny zatrzymuje dany klon limfocytów w obrębie węzła. Opuszczają go dopiero po kilku dniach duże populacje komórek efektorowych i komórek pamięci. Zbiega się to w czasie z pojawieniem się we krwi specyficznych przeciwciał i jest jednoznaczne z ujawnieniem się reakcji immunologicznej. Te limfocyty, które nie spotykają



Rys. 6. Ekstrawazacja limfocytów. I, II, „Homing” limfocytów dziewiczych do peryferyjnego węzła limfatycznego (I) oraz do tkanki limfatycznej związanej z przewodem pokarmowym (II). III adhezja i polaryzacja komórki pamięci na powierzchni śródbłonna płaskiego w pozawłośniczkowej tętniczce tkanki łącznej skóry. IVA, B marginacja i diapedeza limfocyta pamięci pomiędzy aktywowanymi komórkami endotelium do ogniska infekcji

antygeny, opuszczają węzeł limfatyczny po 18-20 godzinach. Przedostają się one do sinusoidalnych naczyń rdzeniowych, skąd w strumieniu limfy przez odprowadzające naczynie limfatyczne i przewód piersiowy dostają się do krwi (patrz rys. 2) i rozpoczynają nowy cykl swojej wędrówki. Na recyrkulację limfocytów składają się więc: bierne przenoszenie przez krew i limfę oraz migracja poprzez ściany naczyń krwionośnych i w trójwymiarowej sieci tkanki łącznej, a także w parenchymie węzłów limfatycznych. Te komórki, które przechodzą ze światła naczyń do tkanek w miejscach zapalnych (makrofagi, niektóre limfocyty), osiągają węzły limfatyczne przez naczynia doprowadzające. Sieć limfatycznych naczyń doprowadzających drenaże właściwie wszystkie

przestrzenie międzykomórkowe ciała, z wyjątkiem oczu, mózgu i układu pokarmowego, zbierając dostające się przez nabłonek obce antygeny w peryferyjnych węzłach limfatycznych. Przewód pokarmowy ma swoje własne tkanki limfatyczne (kępki Peyera, migdały, wyrostek robaczkowy), które są miejscami reakcji przeciw antygenom zawartym w produktach spożywczych i mikroorganizmom układu pokarmowego. Antygeny pojawiające się we krwi są zatrzymywane i degradowane w śledzionie. W rdzeniu tkanki limfatycznej naczynia doprowadzające przekształcają się w szerokie, nieregularne zatoki, zwane sinusoidami, charakterystyczne dla wszystkich filtrów biologicznych. W ich przestrzeniach przepływ limfy jest znacznie wolniejszy niż w wąskich kapilarach, co umożliwia zgromadzoną na ścianach zatok makrofagom wychwytywanie zbędnych cząstek.

Większość normalnie cyrkulujących limfocytów T i B jest zdolna do penetrowania wszystkich typów wtórnych tkanek limfatycznych, ale niektóre migrują preferencyjnie do specyficznych organów. Komórki B mają tendencję do opuszczania naczyń krwionośnych w organach limfatycznych związanych z przewodem pokarmowym. Komórki T natomiast przechodzą głównie do węzłów peryferyjnych (Stevens i in. 1982; Rosen, Yednock, 1986; Cavender, 1989; Streeter i in. 1988; Jalkanen i in. 1988; Pals i in. 1986). W tych ostatnich znajdują się więc głównie limfocyty T wszystkich subpopulacji. W tkankach limfatycznych przewodu pokarmowego przeważają natomiast komórki B, limfocyty T reprezentowane są głównie przez subpopulację komórek wspomagających (Ford 1975; Gallatin i in. 1986). Limfocyty aktywowane wędrują specyficznie do miejsc zapalnych oraz do przeszczepów (Billingham i in. 1977). Genetyczny polimorfizm zdolności rozpoznawania tkanek służy niewątpliwie ujednoczeniu charakteru reakcji immunologicznych w danym rejonie oraz powiększa funkcjonalną specjalizację komórek.

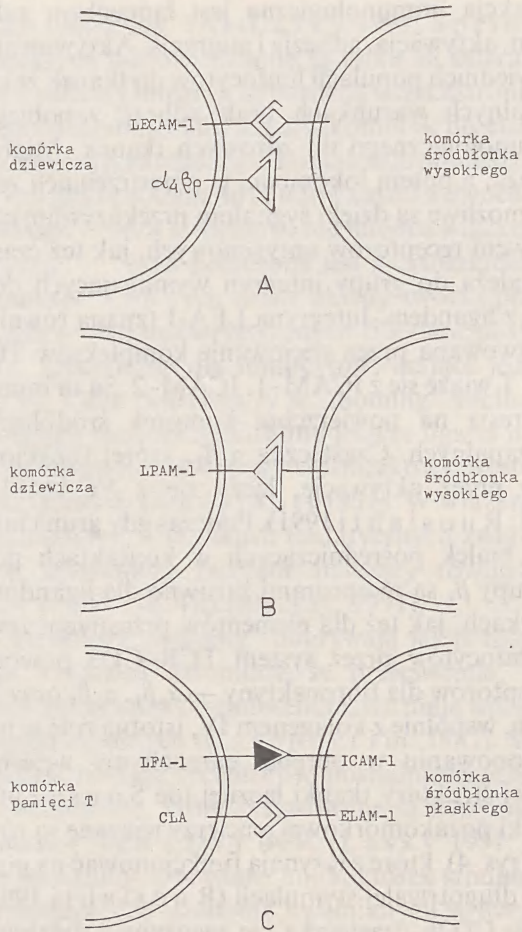
Adhezja limfocytów do komórek śródbłonna jest regulowana zarówno przez ekspresję odpowiednich receptorów na powierzchni komórek immunokompetentnych, jak też odpowiadających im ligandów na powierzchni komórek endotelialnych. W 1983 roku Gallatin i współpracownicy wyizolowali monoklonalne przeciwciało — Mel-14, które wiążąc się z determinantami receptorów na powierzchni limfocytów, w sposób specyficzny blokowało ich adhezję do śródbłonnków naczyń w węzłach peryferyjnych. Nie wpływało to więc na ekstrawazację w obrębie kępek Peyera. Prace z początku lat 80. pokazały również, że blokowane Mel-14 receptory limfocytów wchodzi w interakcję z mannozo-6-fosforanem (Stoolman i in. 1984). Dziś wiadomo, że „homing receptor” limfocytów, ułatwiający adhezję do endotelium naczyń krwionośnych w peryferyjnych węzłach limfatycznych, należy do rodziny białek adhezywnych, tzw. selektyn. Posiadają one N-terminalne domeny homologiczne do lektyn zwierzęcych i wykazują aktywność zależną od Ca^{2+} . „Homing receptor”, który został ostatecznie określony jako LECAM-1 (Anderson i in. 1991) wiąże się specyficznie z węglowodanowym ligandem prezentowanym na powierzchni

komórek endotelialnych (patrz rys. 7A) (Lasky 1991; Springer, Lasky 1991). Podczas gdy selektyny odpowiedzialne są tylko za interakcje komórka — komórka, receptory z rodziny integryn są bardziej wszechstronnymi białkami adhezywnymi. Są zarówno mediatorami adhezji komórek do elementów pozakomórkowej macierzy, jak też pośredniczą w kontaktach pomiędzy komórkami. Integryny są integralnymi glikoproteinami zbudowanymi z dwóch podjednostek α i β . Obie podjednostki uczestniczą w formowaniu miejsca wiązania dla liganda. Domena cytoplazmatyczna integryn połączona jest z cytoszkieletem komórki. Różne rodzaje podjednostek α i β i ich różne układy tworzą przynajmniej 16 integryn, z których wiele jest charakterystycznych dla danego typu komórek. Należy do nich białko, specyficzne dla limfocytów, mające jedyną w swoim rodzaju podjednostkę β_p , które pośredniczy w „homingu” limfocytów. Jest to integryna $\alpha_4\beta_p$ rozpoznająca niezidentyfikowany jeszcze ligand na powierzchni komórek endotelialnych (patrz Rys. 4A) pozawłośniczkowych tętniczek w peryferyjnych węzłach limfatycznych (Ruoslahti 1991). W wiązaniu limfocytów do komórek śródbłonna naczyń w tkankach limfatycznych związanych z przewodem pokarmowym, uczestniczy receptor należący również do rodziny integryn, tzw. LPAM-1 (patrz rys. 4B) (Mackay, 1991).

Nie jest jasne, czy receptory „homingu” odgrywają jakąś rolę w ogniskach zapalnych. Od dawna wiadomo natomiast, że przeciwciała, które hamują niestymulowaną adhezję limfocytów do endotelium, nie mają wpływu na adhezję stymulowaną w miejscach zapalnych (Cavender i in. 1987). Sugeruje się, że w tym drugim przypadku funkcje receptorów pośredniczących w „homingu” przejmują inne białka adhezywne, które aktywowane są w wyniku sieciowania antygenowych kompleksów TCR-CD3 i BCR (Lasky 1991; Ruoslahti 1991). Odpowiadające im ligandy z powierzchni komórek śródbłonna udostępniane są na skutek stymulującego działania uwalnianych w miejscach infekcji cytokin. Zarówno TNF (produkowany przez niektóre limfocyty i makrofagi), jak też Il-1 (wydzielana przez makrofagi, niektóre aktywowane limfocyty B oraz komórki endotelialne) zwiększają adhezywność endotelium dla limfocytów (Cavender i in. 1987; Cavender i in. 1986; Cavender, Edelbaum 1988). Stymulujące działanie cytokin jest niespecyficzne tkankowo. Oznacza to, że rozwijająca się reakcja zapalna może indukować adhezję limfocytów do ścian pozawłośniczkowych tętniczek krwionośnych w dowolnym miejscu organizmu, znajdującym się w pobliżu ogniska infekcji (Cavender i in. 1987; Cavender 1989). Działanie cytokin nie ogranicza się tylko do stymulacji adhezji. Wpływają one w różny sposób na rozwój procesów zapalnych. TNF stymuluje syntezę i uwalnianie Il-1 przez komórki śródbłonna oraz ekspresję receptorów Il-1R na powierzchni tych komórek (Nawroth i in. 1986; Kurt-Jones i in. 1987). Il-1, natomiast indukuje proliferację komórek śródbłonna (Ooi i in. 1985), zwiększa proliferację komórek T (Mizel 1988) i komórek B (Falkoff i in. 1983), działa jako czynnik chemotaktyczny dla limfocytów (Miossec i in. 1984).

Każda reakcja immunologiczna jest łańcuchem zależności, którego ogniwami są m.in. aktywacja, adhezja i migracja. Aktywowana adhezja pozwala na wejście odpowiednich populacji limfocytów do tkanek zakażonych. Równocześnie, w normalnych warunkach brak adhezji zapobiega migracji komórek systemu immunologicznego do zdrowych tkanek. Migracja limfocytów, najpierw diapedeza, a potem lokomocja w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych i wokół APC możliwe są dzięki sygnałom przekazywanym do wnętrza komórek za pośrednictwem receptorów antygenowych, jak też cząsteczek adhezywnych. Te ostatnie należą do grupy integryn wymagających doraźnej aktywacji dla połączenia się z ligandem. Integryna LFA-1 (znana również jako CD11a/CD18 lub $\alpha_1\beta_2$) aktywowana przez sieciowanie kompleksów TCR-CD3 na powierzchni komórek T wiąże się z ICAM-1, ICAM-2. Są to immunoglobuliny (rys. 4), których ekspresja na powierzchni komórek śródbłonna wzrasta znacznie w miejscach zapalnych. Cząsteczka $\alpha_4\beta_1$, której funkcjonowanie jest również kontrolowane przez aktywację, łączy się z VCAM-1 (rys. 4) (D a m l e , A r u f f o 1991; R u o s l a h t i 1991). Podczas gdy grupa integryn z podjednostką β_2 należy do białek pośredniczących w kontaktach pomiędzy komórkami, integryny z grupy β_1 są receptorami zarówno dla ligandów prezentowanych na innych komórkach, jak też dla elementów przestrzeni zewnątrzkomórkowych. Stymulacja limfocytów przez system TCR-CD3 powoduje natychmiastową aktywację receptorów dla fibronektyny — $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ oraz lamininy $\alpha_6\beta_1$ (rys. 4), odgrywających, wspólnie z kolagenem IV, istotną rolę w migracji komórek oraz w ich pozycjonowaniu w obrębie parenchymy węzłów limfatycznych czy trójwymiarowej struktury tkanki łącznej (de S o u s a i in. 1991; R u o s l a h t i 1991). Składniki pozakomórkowej macierzy wiązane są również przez integryny VLA-4, -5, -6 (rys. 4), które zaczynają funkcjonować na powierzchni limfocytów poddawanych długotrwałej stymulacji (R u o s l a h t i 1991). Kolagen IV wiąże się z antygenem CD26, cząsteczką nie związaną z rodziną integryn (de S o u s a i in. 1991).

Ostatnie badania wykazały, że drogi recyrkulacji dwóch subpopulacji limfocytów, komórek pamięci i komórek dziewiczych są różne. Komórki dziewicze opuszczają naczynia krwionośne tylko w obrębie węzłów limfatycznych, komórki pamięci penetrują głównie do tkanek nielimfatycznych. Pojawiają się więc one w naczyniach limfatycznych doprowadzających, podczas gdy komórki dziewicze obserwuje się tylko w naczyniach odprowadzających (rys. 5) (M a c k a y 1991). Komórki pamięci lokalizują się głównie w tkance łącznej skóry (F o s t e r i in. 1990), epitelialnej powierzchni płuc (S a l t i n i i in. 1990) i w błonie właściwej jelit, a także w miejscach infekcji, podobnie jak aktywowane komórki T (D a m l e , D o y l e , 1990; P i t z a l i s i in. 1988). Nawet *in vitro* aktywowane limfocyty T nie penetrują do węzłów limfatycznych, lecz do tkanek skóry i jelita (S p r e n t 1976; H a l l i in. 1972). Odpowiedzialna za drogi recyrkulacji limfocytów pamięci i limfocytów dziewiczych jest zróżnicowana ekspresja cząsteczek adhezywnych na powierzchni tych komórek. Receptory



Rys. 7. Zróżnicowana ekspresja receptorów na powierzchni komórek dziewiczych oraz komórek pamięci. A — receptory związane z „homing” do peryferyjnych węzłów limfatycznych. B — receptor odpowiedzialny za „homing” w obrębie wysepek Peyera. C — receptory umożliwiające adhezję do śródbłoków kapilar w tkankach nielifatycznych

ułatwiający adhezję do śródbłoka płaskiego, wyściełającego peryferyjne naczynia w tkankach nielifatycznych, m.in. LFA-1, VLA-4 prezentowane są głównie na powierzchni komórek pamięci T (Rys. 6IV i 7C) oraz limfocytów aktywowanych. Ich ekspresja jest regulowana i wzrasta w miejscach zapalnych (Sanders i in. 1988; Beverley 1990; MacDonald i in. 1990; Shimizu i in. 1990; Springer 1990; Akbar i in. 1990). Jednocześnie, na powierzchni komórek śródbłoka, wzrasta indukowana cytokinami ekspresja odpowiadających receptorom adhezywnym ligandów immunoglobulinowych. Aktywowane komórki endotelialne, głównie w pozawłośniczkowych naczyniach skóry, prezentują poza tym adhezywny receptor ELAM-1, należący do rodziny selektyn.

Ułatwia on adhezję neutrofilom, monocytom, a także pewnym komórkom pamięci T. Te ostatnie wiążą się z nim prawdopodobnie za pośrednictwem specyficznego antygenu CLA (rys. 6III i 7C) (P i c k e r i in. 1991). Adhezja limfocytów do tzw. wysokiego śródbłonka, charakterystycznego dla tętniczek krwionośnych węzłów limfatycznych, zachodzi za pośrednictwem receptorów „homing”, przede wszystkim LECAM-1, prezentowanych na powierzchni właściwie wszystkich ludzkich limfocytów dziewiczych (rys. 6I i 7A), ale tylko nielicznych komórek pamięci (T e d d e r i in. 1990). Interesujące jest podobieństwo w budowie integryn ułatwiających „homing” limfocytów dziewiczych do tkanek limfatycznych przewodu pokarmowego (rys. 6II i 7B) oraz komórek pamięci do śródbłonek aktywowanych. Ponieważ LPAM-1 jest integryną z łańcuchem α homologicznym do łańcucha α_4 VLA-1, a jej ekspresja jest regulowana podobnie jak ekspresja VLA-1, sugeruje się, że śródbłonek naczyń jelitowych tkanek limfatycznych działa analogicznie jak aktywowane endotelium w miejscach zapalnych (M a c k a y 1991).

Opisane modele recyrkulacji limfocytów pozwalają na natychmiastową reakcję komórek pamięci i limfocytów stymulowanych skierowaną przeciw antygenom, które przedostaną się do organizmu przez naskórek, nabłonek jelit czy płuc. Jednocześnie, umożliwiają komórkom dziewiczym pobyt we wtórnych tkankach limfatycznych, których mikrośrodowisko spełnia ściśle określone wymagania dla aktywacji tych komórek (M a c k a y 1991)

MIGRACJA LIMFOCYTÓW

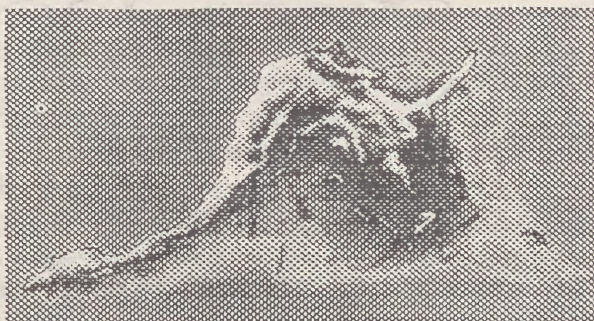
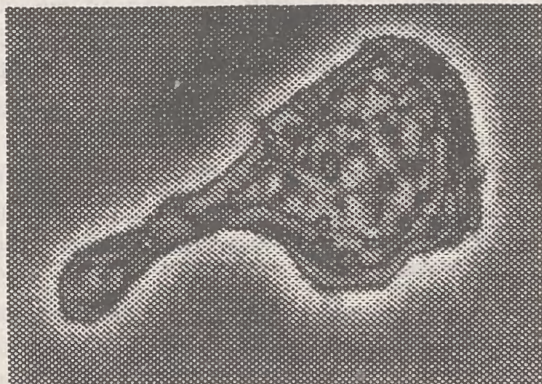
Cytoszkielek komórkowy zbudowany jest z trzech współdziałających ze sobą systemów fibrylarnych: sieci aktyno-miozynowej, mikrotubul i filamentów pośrednich. Bierze on udział w takich podstawowych zjawiskach jak migracja, zmiany kształtu, adhezja, interakcje międzykomórkowe, a być może również przekazywanie informacji z błony komórkowej do jądra. Aby spełniać te funkcje, filanty muszą być połączone z błoną bądź bezpośrednio, bądź poprzez białka łączące. W komórkach migrujących połączenia aktyny z błoną są krótkotrwałe, równie szybko się tworzą, jak i rozpadają. W komórkach nie migrujących są silniejsze i bardziej trwałe. Połączenia cytoszkieletu z błoną z jednej strony stabilizują więc kształt komórki, z drugiej, dzięki swej dynamice, umożliwiają jego zmiany: wysuwanie i wycofywanie pseudopodiów, formowanie mikrokosmków, endo- i egzocytozę.

Organizacja cytoszkieletu jest ściśle związana z kształtem komórki i mechanizmem lokomocji. Cytoszkielek większości komórek, które formują pseudopodia, charakteryzuje się lokalizacją sieci aktyno-miozynowej pod błoną komórkową, promienistym układem mikrotubul wzrastających od centrum ku peryferiom komórki oraz siecią filamentów pośrednich, łączących organelle komórkowe ze strukturami podbłonowymi. Taką organizację cytoszkieletu mają zwierzęce komórki tkankowe, które poruszają się ruchem ameboidalnym: neurony,

fibroblasty, ruchliwe komórki epitelialne, granulocyty, makrofagi i limfocyty (Bershadsky, Vasiliev 1988). Różnią się one między sobą typem filamentów pośrednich, stopniem rozwoju systemu mikrotubularnego oraz peryferyjnego korteksu komórki. Wydaje się, że u leukocytów podobnie jak u swobodnie żyjących ameb korteks osiągnął znacznie wyższy stopień organizacji niż u fibroblastów, co ułatwia wysuwanie i wycofywanie pseudopodiów, a więc szybką reorganizację kształtu komórki. Leukocyty charakteryzują się też tzw. mikrotubulowo-niezależnym wariantem stabilizacji, który polega na wysuwaniu nowych pseudopodiów w kierunku mniej więcej równoległym do orientacji filamentów aktynowych. Ten rodzaj stabilizacji jest znacznie mniej efektywny niż stabilizacja fibroblastów i pozwala na częstą zmianę kierunku ruchu (prostoliniowe odcinki szlaków migracji leukocytów mają długość tylko 30-70 μm) (Gudima i in. 1988; Bershadsky, Vasiliev 1988). U fibroblastów za polaryzację i stabilizację kształtu komórki odpowiedzialny jest system mikrotubularny, rozwinięty lepiej niż u leukocytów. Depolaryzacja mikrotubul nie hamuje aktywności pseudopodialnej fibroblastów, ale hamuje ich ruch kierunkowy po podłożu. U fibroblastów traktowanych substancjami działającymi destrukcyjnie na mikrotubule (kolchicyna, vinblastyna, kolcemid) miejsce formowania pseudopodiów jest całkowicie przypadkowe. Dezintegracja mikrotubul u leukocytów natomiast nie hamuje ich migracji, choć wpływa na pewne zjawiska związane z funkcjami lokomotorycznymi tych komórek (Gudima i in. 1988; Bershadsky, Vasiliev 1988). Stwierdzono, że kolchicyna wzmacnia swobodną migrację limfocytów zależną od stężenia czynnika chemokinetycznego w nieobecności gradientu. Jednak traktowane kolchicyną lub vinblastyną, komórki te tracą zdolność do rozpoznawania gradientu i reakcji chemotaktycznej (Russell i in. 1975). Rola mikrotubul ogranicza się więc u leukocytów do podtrzymywania takich zjawisk, jak: chemotaksja (Anderson i in. 1982; Ramsey, Harris 1973), interakcja limfocytów T z innymi komórkami (Geiger i in. 1982), czy fagocytoza u makrofagów (Piasek, Thyberg 1980). Integracja mikrotubul w tych komórkach nie jest więc wymagana do lokomocji jako takiej, ale odgrywa ważną rolę w ukierunkowywaniu ruchu. Podobną funkcję jak system mikrotubularny w komórkach tkankowych, u swobodnie żyjących ameb pełni jądro komórkowe (Grębecka 1992).

Pomimo olbrzymich biologicznych i morfologicznych różnic pomiędzy amebami i leukocytami, wszystkie te komórki mają pewne wspólne cechy. W przeciwieństwie do fibroblastów nie rozplaszczają się na podłożu (ich ciało jest wydłużone, ale nie płaskie) i poruszają się znacznie szybciej. Fibroblasty migrują z prędkością 0,5-2 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, leukocyty mogą się poruszać z szybkością 10-15 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Najszybciej spośród białych krwinek migrują limfocyty, najwolniej makrofagi (Gudima i in. 1988; Bershadsky, Vasiliev 1988). Podczas gdy rozplaszczenie jest konieczne do migracji fibroblastów, hamuje ono lokomocję komórek krwi. Rozplaszczone, nieruchome granulocyty są tak silnie przyczepione do podłoża, że nie odrywa ich siła z powodzeniem wystarczająca do

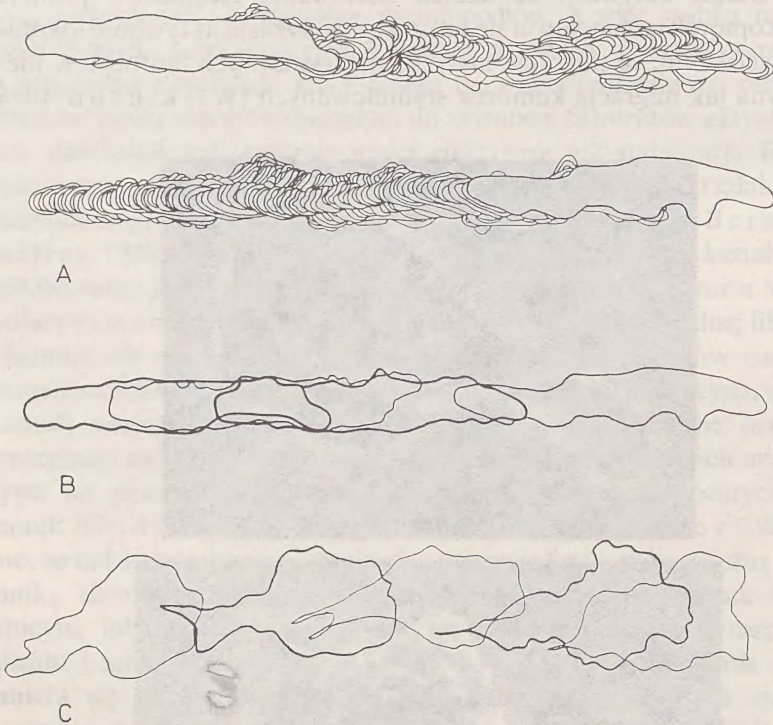
zerwania kontaktów pomiędzy podłożem a komórkami migrującymi (D o r o - s z e w s k i, K i w a ł a 1988). Zarówno makrofagi, jak i granulocyty zaprzestają migracji po kontakcie z antygenem, który powoduje ich „spreading” (rozplaszczanie) (G u d i m a i in. 1988). Odmiennie reagują na kontakt z antygenem limfocyty. Dzięki aktywacji na skutek sieciowania receptorów powierzchniowych u komórek tych pojawia się lub znacznie wzrasta aktywność lokomotoryczna. Stwierdzono, że migracja małych, spoczynkowych limfocytów nie jest tak efektywna jak migracja komórek stymulowanych (W i l k i n s o n 1986).



Rys. 8. Migrujący limfocyt. A — widok z góry. B — widok z boku. Rekonstrukcje te wykonano na podstawie zdjęć publikowanych w „Living Blood Cells and Their Ultrastructure”, Marcel Bessis

Już L e w i s (1931) zaobserwował, że migracja limfocytów jest podobna do migracji ameb (rys. 9). Za przepływ endoplazmy i ruch tych komórek uczynił odpowiedzialnym skurez warstwy peryferyjnej, połączony z jej solifikacją w tylnym biegunie komórki. Wysuwanie pseudopodiów wiązał z lokalnymi zmianami w korteksie komórki oraz żelifikacją warstwy kurczliwej u podstawy nibynóżki. Zlokalizował punkty przyczepu komórki tylko w jej strefie przedniej, co wyjaśniło gwałtowne przesuwanie się tylnych rejonów komórki podczas

zmiany kierunku ruchu. Scharakteryzował też „przeciskanie się” limfocytu przez dynamiczne przewężenie komórkowe, analogiczne do występującego u ameb „constricting ring”.



Ryc. 9. Schemat migracji ortotaktycznej formy *Amoeba proteus* (A i B) oraz limfocytu T (C). Podobieństwo lokomocji obu typów komórek widoczne jest dzięki zastosowaniu tej samej techniki analizy ruchu (B i C). Właściwe proporcje pomiędzy rozmiarami komórek oraz tempem ich migracji celowo nie zostały zachowane dla uzyskania lepszej czytelności rysunku. Długość *Amoeba proteus* ok. $600\ \mu\text{m}$. Tempo migracji ok. $200\ \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$. Długość migrującego limfocytu ok. $15\ \mu\text{m}$. Tempo migracji ok. $10\ \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$

Pierścień kurczliwy stanowi morfologiczne odzwierciedlenie fali skurczów, której usytuowanie wzdłuż długiej osi komórki jest zmienne. Pierścień kurczliwy pojawia się u podstawy formującego się pseudopodium i staje się coraz wyraźniejszy w miarę wydłużania się nibynóżki. Za jądrem komórki średnica pierścienia wyraźnie się zmniejsza i przestaje on być widoczny na powierzchni wydłużonego uropodu. W komórkach przyklejonych do podłoża pierścień kurczliwy pozostaje nieruchomy w stosunku do punktów podłoża. Czas, w którym komórka przeciska się przez pierścień, wynosi 20-30 s. W komórkach zawieszonych w roztworze pierścień przesuwa się wzdłuż nieruchomego limfocytu (H a s t o n , S h i e l d s 1984). Pierścienie formowane są w czasie migracji

w nieregularnych odstępach czasu, a głębokość kolejnych bruzd może być różna, co świadczy o zróżnicowanej sile skurczów.

Stymulacja limfocytu, niezależnie od tego czy wywołana jest specyficznym antygenem, przeciwciałem, adhezją do komórek endotelialnych lub niekomórkowego podłoża, czy też czynnikiem chemotaktycznym zawsze prowadzi do zmiany kształtu komórki ze sferycznego do wydłużonego, spolaryzowanego (G u d i m a i in. 1988). Limfocyty polaryzują się w ciągu 0,5-1 min od momentu adhezji do podłoża (G u d i m a i in. 1988), przybierając charakterystyczny kształt zwierciadła z rączką, którą stanowi wydłużony uropod (rys. 8). Na jego powierzchni stale tworzone są i wycofywane liczne mikrokosmki, za pośrednictwem których limfocyt łączy się z powierzchnią innych limfocytów albo makrofagów (M c F a r l a n d 1969). Te wyspecjalizowane struktury są jedynymi w swoim rodzaju. U pozostałych komórek ssaków, jeśli występują, zlokalizowane są przede wszystkim na przednim biegunie komórki. W strefie frontalnej migrującego limfocytu stale wysuwane jest nowe lamellipodium (ryc. 8B), które przylega do podłoża. W przypadku diapedezy wbudowuje się ono w wąską szczelinę pomiędzy komórkami warstwy endotelium (V e r s c h u e r e n i in. 1990).

Z morfologicznymi zmianami kształtu stymulowanych limfocytów wiąże się polaryzacja struktur cytoszkieletalnych, a także redystrybucja komponentów błonowych. Niezależnie od tego, jaką drogą przekazywany jest sygnał aktywujący do wnętrza komórki, zawsze jednym z pierwszych zjawisk występujących na skutek aktywacji jest wzrost stężenia wolnego wapnia w cytoplazmie (L e e i in. 1988; J o r d a n i in. 1991; B o u r g u i g n o n, B o u r g u i g n o n 1984). Zależne od CA^{++} : fosforylacja i defosforylacja miozyny (F e c h h e i m e r, C e b r a 1982), dezorganizacja i integracja mikrotubul (B o u r g u i g n o n, B o u r g u i g n o n 1984) polimeryzacja i depolimeryzacja filamentów aktynowych (K o r n 1988; B o u r g u i g n o n, B o u r g u i g n o n 1984; Y i n, H a r t w i g 1988) oraz wiązanie receptorów powierzchniowych z białkami cytoszkieletalnymi (B o u r g u i g n o n, B o u r g u i g n o n 1984) odpowiedzialne są za regulację ruchu komórki i agregację receptorów powierzchniowych. Sieciowanie receptorów przez różne ligandy związane jest z ruchem białek integralnych w płaszczyźnie błony. Prowadzą one do ich agregacji najpierw w małe grupy, zwane „patches”, a potem w jeden duży kompleks — „cap”. Zjawisko to określane anglojęzycznym terminem „capping” wiąże się z aktywacją i polaryzacją limfocytów. Występuje głównie w komórkach migrujących. Agregaty receptorów zbierają się zawsze w strefie formującej uropod w aktywowanych sferycznych limfocytach oraz w tylnym biegunie poruszających się komórek. Już w 1971 roku T a y l o r i współpracownicy, odkrywcy „capping’u” u limfocytów, sugerowali udział filamentów kurczliwych w tym zjawisku. Dalsze badania „capping’u” u limfocytów potwierdziły tę sugestię. Stwierdzono, że skupiające się receptory powierzchniowe limfocytów tworzą dość stałe połączenia z cytoszkieletem (H a s t o n, S h i e l d s 1984;

Bourguignon, Bourguignon 1981; Bourguignon i in. 1978; Butman i in. 1980; Flanagan, Koch 1978). Siła tych połączeń wzrasta gdy białka błonowe powiązane są przez ligandy. Ustalono również, że wiązanie receptorów z cytoszkieletem zachodzi przed formowaniem „cap” (Haston, Shields 1984; Bourguignon, Singer 1977). Bezpośrednio pod powierzchnią „cap” znaleziono skumulowane filamenty aktyny i miozyny (Bourguignon 1980; Bourguignon, Rozek 1980; Bourguignon, Singer 1977; Bourguignon i in. 1978; Butman i in. 1980; Singer i in. 1978; Sundqvist, Ehrnst 1976; Toh, Hard 1977; Gabbiani i in. 1977). Dziś wiadomo, że dla wystąpienia „capping” konieczna jest pewna dezorganizacja mikrotubul (Bourguignon, Bourguignon 1984) i kurczenie się sieci aktyno-miozynowej. Inhibitory interakcji między aktyną i miozyną (cytochalazyna B i D) hamują zarówno „capping”, jak i migrację limfocytów (Barshadsky, Vasiliev 1988), podczas gdy działanie kolchicyną może prowadzić nawet do spontanicznego formowania „cap” bez udziału ligandów (Bourguignon, Bourguignon 1984; Bershadsky, Vasiliev 1988). Właściwie wszystkie elementy cytoszkieletu komórkowego zaangażowane są w polarne ruchy białek błonowych. Z „capping’iem” związana jest nie tylko polaryzacja aktyny i miozyny, ale także polaryzacja białek wiążących filamenty aktynowe z białkami integralnymi oraz białek sieciujących filamenty aktynowe, a także polaryzacja filamentów pośrednich. Pod agregatem receptorów gromadzą się u limfocytów oprócz aktyny i miozyny takie białka jak α -aktynina, fodryna, ankyryna (Bourguignon, Bourguignon 1984; Bershadsky, Vasiliev 1988), a także vimentyna, która jest podstawowym składnikiem filamentów pośrednich w komórkach T i B (Dellagi, Brouet 1982; Bourguignon, Bourguignon 1984). Sugeruje się, że polarność komponentów cytoszkieletu może odgrywać istotną rolę przy kontaktach limfocytów z innymi komórkami (Lee, Repasky 1987).

Nie bez znaczenia dla ruchu receptorów powierzchniowych pozostaje również stopień płynności błony komórkowej. Zwiększa się on na skutek aktywacji limfocytów i być może związanej z nią redystrybucji spektryny w cytoplazmie komórki (Lee i in. 1988). Prawdopodobnie białko to bierze udział w utrzymywaniu asymetrycznego układu fosfolipidów w obu warstwach błony. Wydaje się, że podobnie jak u erytrocytów, organizacja lipidów w błonie komórkowej limfocytów jest również skorelowana z rozmieszczeniem spektryny. Gdy zerwane są połączenia spektryny z dwuwarstwą lipidową następuje przesegregowanie lipidów pomiędzy warstwą wewnętrzną i zewnętrzną błony, co prowadzi do rozluźnienia upakowania cząsteczek w tej ostatniej i zwiększenia jej płynności. Luźno uorganizowane lipidy mogą ułatwiać nie tylko „capping” receptorów, ale również sprzyjać adhezji komórek (DeL Buono i in. 1988).

Aktywacja limfocyta, jego adhezja do podłoża i polaryzacja to przygotowanie komórki do migracji. Wydaje się, że kurczenie korteksu komórkowego, generujące siłę motoryczną, zachodzi u leukocytów dzięki interakcji aktyny

i miozyny. Lamellipodia leukocytów w przeciwieństwie do pseudopodiów innych komórek zawierają duże ilości miozyny (Bershadsky, Vasiliev 1988). Wsuwanie każdego pseudopodium związane jest z lokalną reorganizacją cytoszkieletu komórkowego (formowanie sieci aktyno-miozynowej pod błoną nowo powstającej nibynóżki, odśrodkowy wzrost mikrotubul, przyrost filamentów pośrednich). Zmiany te może wywołać oddziaływanie specyficznych substancji sygnałowych. Sygnał odbierany przez receptor przekazywany jest do wnętrza komórki. Najlepiej poznanym mechanizmem aktywacji limfocytów T jest przekazywanie sygnału za pośrednictwem białek G na błonowy enzym PLC. Katalizuje ona hydrolizę jednego z fosfolipidów inozytolowych znajdujących się w błonie komórkowej, a mianowicie PIP_2 do $Ins(1,4,5)P_3$ (zwanego potocznie trifosfoinozytolem) oraz DG. Związki te są wewnątrzkomórkowymi przekaźnikami informacji. DG pozostaje w błonie komórkowej aktywując kinazę białkową C, która odpowiedzialna jest za defosforylację $InsP_3$ do nieaktywnych $Ins(1,4)P_2$ i $Ins(4)P$. Natomiast trifosfoinozytol zostaje uwolniony do cytosolu, gdzie wraz ze wzrostem jego stężenia rośnie stężenie jonów Ca^{2+} (Poddana, Baranska 1991; Bershadsky, Vasiliev 1988). Indukuje ono lokalną polimeryzację aktyny. Czas, w którym $InsP_3$ wywołuje wewnątrzkomórkową mobilizację Ca^{2+} jest rzędu sekund. Równie szybko przekaźnik ulega defosforylacji. Spada wówczas stężenie wolnego wapnia, a nowe filamety, zgodnie z teorią Yin i Hartwig (1988), przesuwają błonę komórkową ku przodowi.

Sugeruje się, że u limfocytów sygnał związany z działaniem czynnika chemotaktycznego przekazywany jest przez białka G, a więc aktywuje PLC oraz cyklazę adenylową katalizującą tworzenie cAMP (Braaten i in. 1984; Wilkison, Watson 1990). Natomiast aktywacja lokomotoryczna związana z pobudzeniem do wzrostu, proliferacji i różnicowania komórek nie jest przekazywana via białko G. Sygnał dla tego typu reakcji może być przekazywany drogą taką jak dla zjawisk indukowanych mitogenami (Wilkison, Watson 1990), a więc poprzez integryny związane bezpośrednio z cytoszkieletem lub białka związane z GPI. Jednym z takich białek jest antygen CD73, występujący na powierzchni ludzkich limfocytów T i B (Robinson 1991). Siciowanie tego białka jest związane ze wzrostem stężenia Ca^{2+} w cytosolu komórki, ale nie wiadomo czy jest konsekwencją działania $InsP_3$, czy też wapń pochodzi z innych źródeł, np. środowiska. Aktywacja limfocytów przez białka połączone z GPI jest ściśle związana z produkcją Il-2 i prowadzi do proliferacji komórek. Ponieważ ruchliwość stymulowanych limfocytów zależna jest od fazy cyklu komórkowego (rozpoczyna się w fazie G_1 po kilkugodzinnej interakcji limfocytów z APC i wygasa w fazie G_2) (Cavender, Edelbaum 1988; Wilkison, Watson 1990) jest bardzo prawdopodobne, że sygnał dla niej przekazywany jest właśnie za pośrednictwem GPI.

Lokomocja zarówno ameb, jak i leukocytów kontrolowana jest przez czynniki zewnętrzne. Każdy typ komórek ma swoje charakterystyczne spektrum

czynników, które indukują wysuwanie pseudopodiów oraz różne rodzaje powierzchni, do których pseudopodia te mogą adherować. Te różnice zależą od obecności rozmaitych receptorów prezentowanych na powierzchni różnych komórek. Mogą one albo jednocześnie przekazywać sygnał aktywujący do wnętrza komórki i pośredniczyć w tworzeniu punktów przyczepu, albo pełnić tylko jedną z tych funkcji. Ligandy indukujące tworzenie nibynózek nie muszą więc być takie same jak cząsteczki substratu, do których nibynóżki te będą adherowały. Błony limfocytów, podobnie jak innych migrujących komórek, zawierają receptory dla wielu białek ECM, takich jak kolageny różnych typów, laminina czy fibronektyna. Glikoproteiny te wyznaczają szlaki migracji i pozycjonują limfocyty w pozakomórkowej macierzy oraz parenchymie węzłów limfatycznych. Wspomniane receptory wiążą się albo bezpośrednio (receptor lamininowy), albo pośrednio poprzez białka łączące (receptor fibronektynowy) z filamentami cytoszkieletu zaangażowanymi również w adhezję komórek (Niggli, Burger 1987).

Lokomocja limfocytów może być również kierowana przez czynniki chemo-taktyczne. Immunokompetentne komórki reagują zarówno na zmiany stężeń tych czynników (chemokineza), jak też na gradient stężenia chamoatraktanta (chemotaksja) (Russeil i in. 1975; Fehheimer, Cebra, 1982). Reakcja chemokinetyczna polega tylko na zwiększeniu lub spadku szybkości migracji komórek. Wzrost stężenia czynnika chemokinetycznego może powodować zmianę tempa lokomocji z 4 do 15 $\mu\text{m}/\text{min}^{-1}$. (Harris 1953). Gradient chemotaktyczny nie tylko przyspiesza ruch, ale również go ukierunkowuje. Populacje limfocytów różnią się między sobą reakcjami na czynniki chemotaktyczne (Russeil i in. 1975) co może mieć związek z proponowanymi różnicami w mechanizmie lokomocji występującymi pomiędzy komórkami T i B (Pinks-ton, Finch 1981; Hoffmann i in. 1983; Shields i in. 1984). Sugeruje się, że limfocyty odbierają gradient analogicznie do sposobu proponowanego dla polimorfonuklearnych leukocytów. Posługują się one, tzw. przestrzennym mechanizmem sensorycznym, który umożliwia komórkom zlokalizowanie źródła gradientu i właściwe ukierunkowanie bez wykonywania ruchów penetrujących w różnych kierunkach (Noble, Bentley 1981).

Chemotaksja, jak wiele innych zjawisk biologicznych może mieć pozytywny lub negatywny skutek dla organizmu. Dzięki reakcji chemotaktycznej limfocyty migrują do miejsc zapalnych, w których produkowane są i wydzielane różne czynniki chemotaktycznie pozytywne — cytokiny. Stwierdzono ostatnio, że tylko fagocyty makrofagi są źródłem bodźca chemotaktycznego, obok komórek nie fagocytyujących limfocyty przechodzą obojętnie nawet jeśli dzieli je od nich zaledwie 10 μm (Wilkinson 1990). „Homing” prekursorów komórek T do grasicy zachodzi również dzięki chemotaksji. Równocześnie jednak, negatywna chemotaksja może uniemożliwić limfocytom podjęcie walki z komórkami nowotworowymi. Chociaż wczesne i przedzłośliwe stadia zmian nowotworowych mogą indukować nawet pozytywną reakcję chemotaktyczną lim-

focytów, mikrośrodowisko nowotworów inwazyjnych niezmiennie hamuje ich lokomocję. Uniemożliwia ono limfocytom dotarcie poprzez ECM do patologicznie zmienionych komórek (Noble, Bentley 1980; Applegate i in. 1990). Chemotaksja jest więc w tym przypadku czynnikiem ograniczającym właściwości obronne organizmu.

* * *

Skróty użyte w tekście:

APC	— komórki prezentujące antygeny (antigen presenting cells)
BCR	— antygenowy receptor komórek B (B-cell receptor)
cAMP	— cykliczne AMP (adenozyno mono-fosforan)
CLA	— cutaneous lymphocyte associated antigen
DG	— 1,2-diacyloglicerol
ECM	— pozakomórkowa macierz (extracellular matrix)
ELAM-1	— endothelium-leukocyte adhesion molecule 1
GPI	— glikofosfatydyloinozytol
ICAM-1-2	— intracellular cell adhesion molecule 1 i 2
Il-1, -2, -3, -4, -6	— interleukina 1,2,3,4,6
INF γ	— interferon γ
Ins(4)P	— inozytolo-4-monofosforan
Ins(1,4)P ₂	— inozytolo-1, 4-dwufosforan
InsP ₃	— inozytolo-1,4,5-trójfosforan
LECAM-1	— leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1
LFA-1	— lymphocyte function-associated antigen 1
LPAM-1	— lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule 1
MHC	— główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex)
PIP ₂	— fosfatydylo-inozytolo-4,5-dwufosforan
PLC	— fosfolipaza C
TCR-CD3	— antygenowy receptor komórek T (T-cell receptor) i związany z nim kompleks cząsteczkowy CD3
T _c	— limfocyty cytotoksyczne (cytotoxic T-cells)
T _h	— limfocyty wspomagające (helper T-cells)
T _s	— limfocyty supresorowe (supressor T-cells)
TNF	— tumor necrosis factor
VCAM-1	— vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4, 5-, 6-	— very late antigens

LYMPHOCYTES — FUNCTIONS AND MOVEMENT

Summary

Lymphocytes are central elements of the immune system. They are extraordinarily mobile cells, continuously circulating between the peripheral lymphoid organs via the lymph and blood throughout much of their life span. Circulating lymphocytes leave the bloodstream by binding to specialized high endothelial cells (HEV) lining postcapillary venules in lymphoid organs or adhering to activated endothelium near the sites of inflammation, and then migrating through the vessel wall into the surrounding tissue. The mode of locomotion of the lymphocytes is essentially similar to that of the amoeba. The capacity of lymphocytes to recognize and bind to HEV is a regulated property of

mature lymphocytes and probably plays a fundamental role in controlling lymphocytes traffic and recirculation in animals and humans. Lymphocyte recirculation is a complex process. The dynamics of this system provides each lymphoid organ with millions of newly entering lymphocytes each day. The constant flux of lymphocytes throughout the lymphoid tissue appears to be a necessary component of the functional immune system. An invasion of microorganisms may occur anywhere on the body surface, and they may be distributed by lymph or blood flow to any tissue. The migration of recirculating lymphocytes from the bloodstream to particular lymphoid sites has been called „homing”, and the cell structures they used to recognize and adhere to lymphoid organ HEV has been called „homing receptors”. Lymphocyte homing to these sites appear to be regulated by the expression of complementary adhesion molecules on two different types of cells — the mature recirculating immunocompetent lymphocytes, and the specialized lymphoid organ-specific HEV.

LITERATURA

- Akbar A.N., Salmon M., Janosy G. — *The synergy between naive and memory T cells during activation*. Immunology Today 12: 184–188, 1991.
- Akbar A.N., Terry L., Timms A., Beverley P.C., Janosy G. — *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells*. J. Immunol. 144: 1233–1240, 1990.
- Anderson D.C. Butcher E.C., Gallatin M., Rosen S., Kishimoto K., Lasky L., Miyasaka M., Scollay R., Smith C.W., Haskard D. — *Peripheral lymph node homing receptor (LECAM-1)*. Immunology Today 12: 216, 1991.
- Anderson D.C., Wible L.J., Hughes B.J., Smith C.W., Brinkley B.R. — *Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes: effects of chemotactic stimulation and colchicine*. Cell 31: 719–729, 1982.
- Applegate K.G., Balch C.M., Pellis N.R. — *In vitro migration of lymphocytes through collagen matrix: arrested locomotion in tumor-infiltrating lymphocytes*. Cancer Res. 50: 7153–7158, 1990.
- Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. — *Cytoskeleton*, Plenum Press., New York, London, 1988.
- Bessis M. — *Living Blood Cells and their Ultrastructure*, Springer — Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.
- Beverley P.C. — *Human T-cell memory*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 159: 111–122, 1990.
- Billingham M.D., Warnke R., Weissman I.L. — *The cellular infiltrate in cardiac allograft rejection in mice*. Transplantation 23: 171–176, 1977.
- Bourguignon G.J., Bourguignon L.Y.W. — *Isolation and initial characterization of a lymphocyte cap structure*. Biochimica et Biophysica Acta 646: 109–119, 1981.
- Bourguignon L.Y.W. — *Simultaneous localization of intracellular myosin and surface Con-A receptor clusters using immuno-electron microscopy*. Cell Biol. Int. Rep. 4: 541–547, 1980.
- Bourguignon L.Y.W., Bourguignon G.J. — *Capping and the Cytoskeleton*. Int. Rev. Cytol. 87: 195–224, 1984.
- Bourguignon L.Y.W., Hyman R., Trowbridge I., Singer S.J. — *Participation of histocompatibility antigens in capping of molecularly independent cell surface components by their specific antibodies*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2406–2410, 1978.
- Bourguignon L.Y.W., Rozek R.J. — *Capping of Con-A receptors and their association with microfilaments in monolayer grown human fibroblastoid cells*. Cell Tissue Res. 205: 77–84, 1980.
- Bourguignon L.Y.W., Singer S.J. — *Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5031–5035, 1977.
- Braaten B.A., Spangrude G.J., Daynes R.A. — *Molecular mechanism of lymphocyte extravasation II Studies of in vitro lymphocyte adherence to high endothelial venules*. J. Immunol. 133: 117–124, 1984.

- Burnet F.M. — *The clonal selection theory of acquired immunity*, Vanderbilt University Press, Nashville, 1959.
- Butman B.T., Bourguignon G.J., Bourguignon L.Y.W. — *Lymphocyte capping induced by polycationized ferritin*. J. Cell. Physiol. 165: 7–15, 1980.
- Cavender D., Saegusa Y., Ziff M. — *Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor*. J. Immunol. 139: 1855–1860, 1987.
- Cavender D.E. — *Lymphocyte adhesion to endothelial cells in vitro: models for the study of normal lymphocyte recirculation and lymphocyte emigration into chronic inflammatory lesions*. J. Invest. Dermatol. 93: 88–95, 1989.
- Cavender D.E., Edelbaum D. — *Inhibition by Il-1 of endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor or lymphotoxin*. J. Immunol. 141: 3111–3116, 1988.
- Cavender D.E., Haskard D.O., Joseph B., Ziff M. — *Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers*. J. Immunol. 136: 203–207, 1986.
- Clevers H., Alarcon B., Wileman T., Terhorst C. — *The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble*. Annu. Rev. Immunol. 6: 629–662, 1988.
- Damle N.K., Aruffo A. — *Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor dependent activation of CD4+ T lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6403–6407, 1991.
- Damle N.K., Doyle L.V. — *Ability of human T lymphocytes to adhere to vascular endothelial cells and to augment endothelial permeability to macromolecules is linked to their state of post-thymic maturation*. J. Immunol. 144: 1233–1240, 1990.
- de Sousa M., Tilney N.L., Kupiec-Weglinski J.W. — *Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix*. Immunology Today 12: 262–266, 1991.
- Del Buono B.J., Williamson P.L., Schlegel R.A. — *Relation between the organization of spectrin and of membrane lipids in lymphocytes*. J. Cell Biol. 106: 697–703, 1988.
- Dellagi K., Brouet J.C. — *Redistribution of intermediate filaments during capping of lymphocyte surface molecules*. Nature 298: 284–286, 1982.
- Doroszewski J., Kiwala A. — *Adhesion and locomotion of granulocytes under flow condition*. J. Cell Sci. 90: 335–340, 1988.
- Falkoff R.J.M., Muraguchi A., Hong J.X., Butler J.L., Dinarello C.A., Fauci A.S. — *The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation*. J. Immunol. 131: 801–805, 1983.
- Fechheimer M., Cebra J.J. — *Phosphorylation of lymphocyte myosin in vitro and in intact cells*. J. Cell Biol. 93: 261–268, 1982.
- Flanagan J., Koch G.L.E. — *Cross-linked surface Ig attaches to actin*. Nature 273: 278–281, 1978.
- Ford W.L. — *Lymphocyte migration and immune responses*. Progr. Allergy 19: 38–59, 1975.
- Foster C.A., Yokozeki H., Rappersberger K., Koning F., Volc Platzer B., Rieger A., Coligan J.E., Wolff K., Stingl G. — *Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor*. J. Exp. Med. 171: 997–1013, 1990.
- Gabbiani G., Chaponnier C., Zumber A., Vassalli P. — *Actin and tubulin co-cap with surface immunoglobulins in mouse B lymphocytes*. Nature 269: 697–698, 1977.
- Gallagher R.B., Osmond D.G. — *To B, or not to B: that is the question*. Immunology Today 12: 1–3, 1991.
- Gallatin M., John T.P.St., Siegelman M., Reichert R., Butcher E.C., Weissman I.L. — *Lymphocyte homing receptors*. Cell 44: 673–680, 1986.
- Gallatin W.M., Weissman I.L., Butcher E.C. — *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. Nature 304: 30–34, 1983.
- Geiger B., Rosen D., Berke G. — *Spatial relation of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells*. J. Cell Biol. 95: 137–143, 1982.

- Goldschneider I. — *Current Topics in Developmental Biology Immunological Approaches to Embryonic Development and Differentiation Part II*, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980.
- Gowans J.L., Knight E.J. — *The route of recirculation of lymphocytes in the rat*. Proc. Royal Soc. 159: 257–290, 1964.
- Grebecka L. — *Externally applied nucleus explantant orientates the locomotion of Amoeba proteus*. Eur. J. Protistol. 1992. (In Press)
- Gudima G.O., Vorobjev I.A., Chentsov Yu.S. — *Centriolar location during blood cell spreading and motion in vitro: an ultrastructural analysis*. J. Cell Sci. 89: 225–241, 1988.
- Hall J.G., Parry D.M., Smith M.E. — *The distribution and differentiation of lymphborne immunoblasts after intravenous injection into syngeneic recipients*. Cell Tissue Kinet. 5: 269–281, 1972.
- Harris H. — *The movement of lymphocytes*. Brit. J. exp. Pathol. 34: 554–560, 1953.
- Haston W.S., Shields J.M. — *Contraction waves in lymphocyte locomotion*. J. Cell Sci. 68: 227–241, 1984.
- Hoffman R.A., Ascher N.L., Hanto D.W., Simmons R.L. — *The migration of activated murine T lymphocytes in vitro. II. Evidence for differential locomotion of T cell subsets*. J. Immunol. 130: 1610–1615, 1983.
- Jalkanen S., Jalkanen M., Bargatze R., Tammi M., Butcher E.C. — *Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man*. J. Invest. Dermatol. 141: 1615–1623, 1988.
- Jalkanen S.T., Butcher E.C. — *In vitro analysis of the homing properties of human lymphocytes: developmental regulation of functional receptors for high endothelial venules*. Blood 66: 577–582, 1985.
- Jordan M.L., Vidgen D.F., Wright J., Odell M., Mills G.B. — *Sustained increases in cytosolic calcium during T lymphocyte allosensitization, proliferation and acquisition of locomotor function*. Transplantation 51: 464–468, 1991.
- Klausner R.D., Lippincott-Schwartz J., Bonifacino J.S. — *The T cell antigen receptor: insights into organelle biology*. Ann. Rev. Cell Biol. 6: 403–431, 1990.
- Konig F. — *Lymphocyte antigen receptors: a common design?* Immunology Today 12: 100–101, 1991.
- Korn E.D. — *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiol. Rev. 62: 117–124, 1988.
- Kurt-Jones E.A., Fiers W., Pober J.S. — *Membrane interleukin 1 on human endothelial cells and dermal fibroblasts*. J. Immunol. 139: 2317–2321, 1987.
- Lasky L.A. — *Lectin cell adhesion molecules (LECCAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation*. J. Cell. Biochem. 45: 139–146, 1991.
- Lee J.K., Black J.D., Repasky E.A., Kubo R.T., Bankert R.D. — *Activation induces a rapid reorganization of spectrin in lymphocytes*. Cell 55: 807–816, 1988.
- Lee J.K., Repasky E.A. — *Cytoskeletal polarity in mammalian lymphocyte in situ*. Cell Tissue Res. 247: 195–202, 1987.
- Lewis W.H. — *Locomotion of lymphocytes*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 49: 29–36, 1931.
- MacDonald H.R., Budd R.C., Cerottini J.C. — *Pgp-1 (Ly 24) as a marker of murine memory T lymphocytes*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 159: 97–109, 1990.
- Mackay Ch.R. — *T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways*. Immunology Today 12: 189–192, 1991.
- McFarland W. — *Microspikes on the lymphocyte uropod*. Science 163: 818–819, 1969.
- Miossec P., Yu C.-L., Ziff M. — *Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin 1*. J. Immunol. 133: 2007–2008, 1984.
- Mizel S.B. — *Interleukin 1 and T cell activation*. Immunol. Rew. 88, 1988.
- Nawroth P.P., Bank L., Handley D., Cassimeris J., Chess L., Stein D. — *Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1*. J. Exp. Med. 163: 1362–1365, 1986.

- Niggli V., Burger M.M. — *Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane*. J. Membrane Biol. 100: 97–121, 1987.
- Noble P.B., Bentley K.C. — *An in vitro study of lymphocyte migration in the presence of premalignant and malignant oral lesion*. Int. J. Oral Surg. 9: 148–153, 1980.
- Noble P.B., Bentley K.C. — *Locomotory characteristics of human lymphocytes undergoing negative chemotaxis to oral carcinomas*. Exp. Cell Res. 133: 457–461, 1981.
- Ooi B.S., MacCarthy E.P., Hui A.S., Ooi Y.M. — *Human mononuclear cell modulation of endothelial cell proliferation*. J. Clin. Lab. Med. 102: 428–451, 1985.
- Pals S.T., Kraal G., Horst E., de Groot A., Scheper R.J., Meijer C.J.L.M. — *Human lymphocyte-high endothelial venule interaction: organ-selective binding of T and B lymphocyte populations to high endothelium*. J. Immunol. 137: 760–763, 1986.
- Piasek A., Thyberg I. — *Effects of colchicine on endocytosis of horseradish peroxidase by rat peritoneal macrophages*. J. Cell Sci. 45: 59–71, 1980.
- Picker L.J., Kishimoto T.K., Smith C.W., Warnock R.A., Butcher E.C. — *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells (see comments)*. Nature 349: 796–799, 1991.
- Pinkston J.A., Finch S.C. — *Human T and B lymphocyte migration under agarose: differences in the characteristics of migrating cells and migration patterns*. Jpn. J. Exp. Med. 51: 261–270, 1981.
- Pitzalis C., Kingsley G., Haskard D., Panayi G. — *The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion*. Eur. J. Immunol. 18: 1397–1404, 1988.
- Poddana H., Baranska J. — *Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach*. Post. Bioch. 37: 2–5, 1991.
- Ramsey W.S., Harris A. — *Leukocyte locomotion and its inhibition by antimetabolic drugs*. Expl Cell Res. 82: 262–270, 1973.
- Robinson P.J. — *Phosphatidylinositol membrane anchore and T-cell activation*. Immunology Today 12: 35–41, 1991.
- Rogers A.W. — *Cells and Tissues An Introduction to Histology and Cell Biology*, Academic Press, London, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, 1983.
- Rosen S.D., Yednock T.A. — *Lymphocyte attachment to high endothelial venules during recirculation: A possible role for carbohydrates as recognition determinants*. Mol. Cell. Bioch. 72: 153–164, 1986.
- Ruoslahti E. — *Integrins*. J. Clin. Invest. 87: 1–5, 1991.
- Russell R.J., Wilkinson P.C., Sless F., Parrott D.M.V. — *Chemotaxis of lymphoblast*. Nature 256: 646–648, 1975.
- Saltini C., Kirby M., Trapnell B.C., Tamura N., Crystal R.G. — *Biased accumulation of T lymphocytes with "memory" — type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung*. J. Exp. Med. 171: 1123–1140, 1990.
- Sanders M.E., Makgoba M.W., Shaw S. — *Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets*. Immunol. Today 9: 195–199, 1988.
- Shields I.M., Haston W., Wilkinson P.C. — *Invasion of collagen gels by mouse lymphoid cells*. Immunology 51: 259–268, 1984.
- Shimizu Y., van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. — *Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation*. Immunol. Rev. 114: 109–143, 1990.
- Singer S.J., Ash J.F., Bourguignon L.Y.W., Heggeness M.H., Louvard D. — *Transmembrane interactions and the mechanisms of transport of proteins across membrane*. J. Supramol. Struct. 9: 373–389, 1978.
- Sprent J. — *Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts: I. Fate in lymphoid tissues and intestines traced with 3H-thymidine, 125I-deoxyuridine and 51 chromium*. Cell Immunol. 21: 278–302, 1976.

- Springer T.A. — *Adhesion receptors of the immune system*. Nature 346: 425–434, 1990.
- Springer T.A., Lasky L.A. — *Sticky sugars for selectins*. Nature 349: 196–197, 1991.
- Steel C.M., Hutchins D. — *Soluble factors and cell-surface molecules involved in human B lymphocyte activation, growth and differentiation*. Biochimica et Biophysica Acta 989: 133–151, 1989.
- Stevens S.K., Weissman I.L., Butcher E.C. — *Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition*. J. Immunol. 128: 844–851, 1982.
- Stoolman L.M., Tenforde T.S., Rosen S.D. — *Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules*. J. Cell Biol. 99: 1535–1540, 1984.
- Streeter P.R., Berg E.L., Rouse B.T.N., Bargatze R.F., Butcher E.C. — *A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing*. Nature 331: 41–46, 1988.
- Sundqvist K.G., Ehrnst A. — *Cytoskeletal control of surface membrane mobility*. Nature 264: 226–231, 1976.
- Taylor R.B., Duffus W.P.H., Raff M.C., De Petris S. — *Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin antibody*. Nature 233: 225–229, 1971.
- Tedder T.F., Matsuyama T., Rothstein D. — Eur. J. Immunol. 20: 1351–1355, 1990.
- Toh B.H., Hard G.C. — *Actin co-caps with Con-A receptors*. Nature 269: 695–697, 1977.
- van Maarsseveen T., Stam J., de Groot J. — *Lymphocyte-macrophage cooperation in human pulmonary inflammations*. Europ. J. Cell Biol. 53 Suppl. 31: 131, 1990. (Abstract)
- Verschueren H., Dewit J., de Braekeleer J., Dekegel D., de Baetselier P. — *Invasion and motility of T-cell lines in monolayer cultures*. Europ. J. Cell Biol. 53 Suppl. 31: 134, 1990. (Abstract)
- Wilkinson P.C. — *The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth*. Immunology 57: 281–289, 1986.
- Wilkinson P.C. — *Relation between locomotion chemotaxis and clustering of immune cells*. Immunology 69: 127–133, 1990.
- Wilkinson P.C., Watson E.A. — *FK 506 and pertussis toxin distinguish growth-induced locomotor activation from attractant-stimulated locomotion in human blood lymphocytes*. Immunology 71: 417–422, 1990.
- Yin H.L., Hartwig J.H. — *The structure of the macrophage actin skeleton. Macrophage plasma membrane receptors: structure and function*. J. Cell Sci. Suppl. 9: 169–185, 1988.

LUCYNA GRĘBECKA

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

MIGRACJA KOMÓREK TKANKOWYCH CZynniki OGRANICZAJĄCE I POBUDZAJĄCE

Pierwsze opisy ruchu ameboidalnego, pochodzące jeszcze z ubiegłego wieku, oparte były na obserwacjach dużych, swobodnie żyjących ameb, takich jak *Chaos chaos*, *Amoeba proteus*. Obecnie większość danych dotyczących tego ruchu, a przede wszystkim jego podstaw molekularnych pochodzi z badań prowadzonych nad ruchliwymi komórkami tkankowymi. Fakt ten staje się zrozumiały, gdy uświadomimy sobie, że są to między innymi:

- 1) istotne w morfogenezie i rozwoju embrionalnym komórki zarodka,
- 2) odpowiedzialne za swoiste i nieswoiste reakcje odpornościowe organizmu takie komórki jak: limfocyty, granulocyty czy makrofagi,
- 3) biorące udział w gojeniu ran fibroblasty i komórki epitelialne,
- 4) inwazyjne i metastatyczne komórki nowotworowe,

a także wiele innych komórek wędrujących w obrębie organizmu stale, bądź tylko w pewnych okresach swego cyklu życiowego, jak erytrocyty lub komórki nerwowe. Czy jednak ruch swobodnie żyjących ameb i migrujących w organizmie komórek tkankowych jest tym samym? Przy założeniu, że jest to sposób przemieszczania się drogą kolejnych deformacji ciała, odpowiedź będzie brzmiała — tak. Oba bowiem rodzaje komórek migrują wytwarzając nibynóżki — przejściowe struktury lokomotoryczne różnych kształtów, od wydłużonych filopodiów poczynając, a na szeroko rozlanych lammelipodiach kończąc. Uściślając definicję ruchu ameboidalnego możemy też powiedzieć, że komórka poruszająca się w ten sposób musi spełniać trzy warunki: 1 — przylegać do podłoża, 2 — być spolaryzowana i 3 — wytwarzać siłę motoryczną. Do zapewnienia efektywnej lokomocji konieczne są także odpowiednie ilościowe stosunki pomiędzy tymi parametrami. Od nich zależy czy komórka porusza się szybko i w określonym kierunku, czy też chaotycznie ślizga się po podłożu — lub przeciwnie, zbyt silnie z nim związana nie może poruszyć się z miejsca.

Okazało się, że obie grupy ruchliwych komórek — tkankowe i swobodnie żyjące spełniają trzy wymienione warunki. Stwierdzono jednak także, że mogą je realizować przy pomocy różnych mechanizmów molekularnych. Na przykład, polaryzacja jest w komórce podtrzymywana bądź przez układ mikrotubuli, w przypadku komórek tkankowych, bądź z pomocą jądra, co prawdopodobnie występuje u swobodnie żyjących *Amoeba proteus*. Musimy sobie jednak zdać

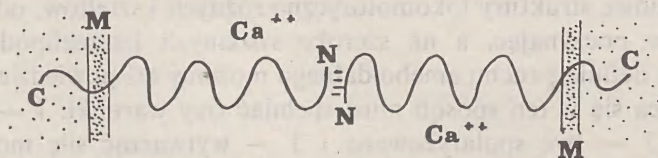
sprawę z tego, że podobnego rzędu różnice mogą wystąpić również w obrębie tej samej grupy komórek.

Wędrowka komórek w organizmie jest zjawiskiem złożonym. Kontrolują ją zarówno czynniki uruchamiające i zatrzymujące komórkę, jak i czynniki sterujące odpowiedzialne za wyznaczanie kierunku migracji. Ruchliwość komórek tkankowych mogą ograniczać połączenia międzykomórkowe. Połączenia te zespalają komórki, stanowią więc przeszkodę w ich swobodnej, indywidualnej migracji.

POŁĄCZENIA MIĘDZYKOMÓRKOWE

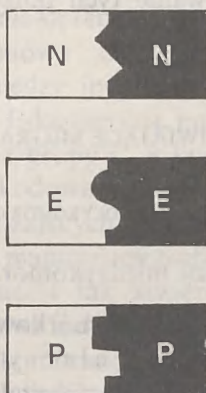
Najmniej skomplikowane połączenia międzykomórkowe polegają na tym, że łączą się ze sobą pojedyncze cząsteczki białek z powierzchni dwóch przylegających komórek. Cząsteczki takie noszą nazwę białek adhezji międzykomórkowej (Cell Adhesion Molecules, CAMs). Gdy cząsteczki wiążące sąsiednie komórki są takie same, wiązanie nosi nazwę homofilowego. Ten typ połączeń pojawia się bardzo wcześnie, np. w zarodku mysim już po pierwszym podziale, w stadium dwóch blastomerów (Fleming i Johnson 1988). Występuje tam uwomorulina, powszechnie identyfikowana z E-kadheryną. Grupa kadheryn należy do tych białek adhezji międzykomórkowej, których działanie związane jest z obecnością Ca^{2+} w środkowisku (Tingstrom i in. 1990).

E-kadheryna zbudowana jest z długiego łańcucha polipeptydowego przebijającego błonę komórki. Fragment zewnętrzny tego łańcucha składa się z 6 pętli; po usunięciu ze środowiska jonów wapniowych ulegają one zwinięciu, stając się wrażliwe na błonowe enzymy proteolityczne (rys. 1). Wtedy utworzone przez dwie cząsteczki E-kadheryny wiązanie homofilowe między sąsiadującymi komórkami (rys. 2) ulega rozerwaniu (Takeichi 1990).



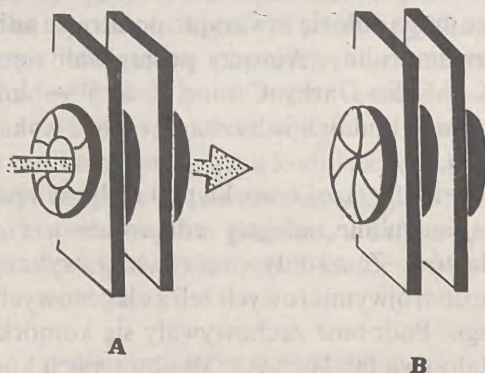
Rys. 1. Połączenie dwóch cząsteczek E-kadheryny. C i N — zakończenia cząsteczki, M — błona komórkowa, Ca^{2+} — jony wapnia w środowisku. Zakropkowano wewnątrz komórki

W następnej kolejności pojawiają się połączenia złożone, składające się z większej liczby cząsteczek. Należą do nich m.in. połączenia szczelinowe (gap junction); są to miejsca w których pomiędzy sąsiadującymi komórkami zachodzi wymiana metabolitów i jonów. Połączenia szczelinowe zbudowane są z kanałów (koneksonów), z których każdy utworzony jest z sześciu integralnych białek błonowych — koneksyn. Koneksyny mają bezpośredni wpływ na funkc-



Rys. 2. Schemat połączeń homofilowych: N-, E- i P-kadheryny

jonowanie połączeń szczelinowych. Zewnątrzkomórkowe i błonowe domeny białek z rodziny koneksyn są homologiczne. Różnice strukturalne między nimi obserwuje się w regionach cytoplazmatycznych. Średnica koneksonu wynosi 1,5 nm; przez te połączenia mogą więc przechodzić cząsteczki do 1500 daltonów — cukry, aminokwasy, nukleotydy i witaminy, ale już nie takie makrocząsteczki jak białka, cukry złożone czy kwasy nukleinowe. Zależnie od stanu komórki, kanały mogą być otwarte, lub przez spiralny obrót koneksyn mogą ulec zamknięciu (rys. 3).



Rys. 3. Schemat połączenia szczelinowego. A — konekson otwarty, B — konekson zamknięty

W kolejnych stadiach rozwoju zarodka pojawiają się następne złożone połączenia międzykomórkowe, jak połączenia zamykające (tight junction) i desmosomy. Nie zostaną one tu jednak dokładnie omówione, ponieważ nie wiążą się bezpośrednio z tematyką tego artykułu.

Przyzupuszczenie, że połączenia międzykomórkowe ograniczają migrację związanych nimi komórek wydaje się całkowicie uzasadnione. Można to jednak

udowodnić pokazując, że rozerwanie tych połączeń zapoczątkowuje migrację.

CZYNNIKI UMOŻLIWIAJĄCE MIGRACJĘ KOMÓREK

ZANIK POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

Zanik białek adhezji międzykomórkowej (CAMs)

Zjawisko zaniku połączeń międzykomórkowych, w związku z migracją komórek, było badane m.in. przez J.P. Thierry'ego (1984), który zajmował się wędrówkami komórek w zarodkach. Okazało się, że L-CAM i N-CAM (białka adhezji międzykomórkowej, występujące w komórkach grzebienia nerwowego zarodków kurzych) zanikały, gdy komórki te rozpoczynały migrację. Kiedy komórki zatrzymywały się i skupiały, stwierdzono w nich ponowne pojawienie się białek odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową.

W rozwijającym się zarodku myszy indukcja przejścia ruchliwych komórek mezenchymalnych w zwarty układ epitelialny towarzyszyła powstawaniu kanałków nefridialnych. Około 12 godzin po indukcji komórki zaczynały przylegać do siebie, a na ich powierzchni pojawiała się uwomorulina (Vestweber i in. 1985).

Dowody istnienia zależności pomiędzy ruchliwością a indywidualizacją komórek zawiera również praca Behrens i in. (1989) pokazująca, że prawidłowe komórki nabłonkowe mogą stać się inwazyjne po utracie adhezji międzykomórkowej zależnej od uwomoruliny. Autorzy posługiwali się w doświadczeniach komórkami MDCK (Madin-Darby Canine Kidney — komórki pochodzące z psiej nerki) rosnącymi w hodowli jednowarstwowo i wykazującymi wszystkie cechy epitelium *in vivo*.

Te ściśle do siebie przylegające komórki, pod wpływem przeciwciał skierowanych przeciwko uwomorulinie, ulegały rozproszeniu i przybierały kształt migrujących fibroblastów. Zaczynały one również wykazywać własności inwazyjne, przenikając do trójwymiarowych żeli kolagenowych oraz w głąb tkanki serca zarodka kurzego. Podobnie zachowywały się komórki MDCK transformowane wirusem Maloneya lub Harveya. W obu typach komórek następowała utrata uwomoruliny, wywołana bądź tylko przeciwciałem, bądź tylko transformacją wirusową. Czynnikiem decydującym o inwazyjności komórek wydaje się więc w tym przypadku zanik białka adhezji międzykomórkowej.

Badania Mareela i in. (1990) potwierdzają przypuszczenie o udziale białek adhezyjnych w inwazyjności. W roku 1990, na zjeździe w Antwerpii poświęconym ruchom komórkowym, Mareel przedstawił hipotezę, która mówi, że inwazyjność komórki wynika z równowagi pomiędzy ekspresją dwóch rodzajów genów: genów i^+ — kodujących białka odpowiedzialne za ujawnienie się

inwazyjnego fenotypu I^+ , oraz genów i^- odpowiedzialnych za nieinwazyjny fenotyp I^- , przy czym pojawienie się fenotypu I^- jest zjawiskiem oddzielnym, a nie prostym brakiem ekspresji genów i^+ w komórce. Według Mareela produktami genów i^+ i i^- mogą być między innymi białka wpływające na ruchliwość komórek. Przy tym założeniu E-kadheryna, powodująca ograniczenie ruchliwości byłaby produktem genu z grupy i^- , a białka stymulujące ruchliwość, jak motogenne cytokiny, byłyby kodowane przez geny i^+ . Mareel powoływał się na szereg doświadczeń potwierdzających słuszność jego hipotezy, przynajmniej w tej jej części, która dotyczy manipulacji białkami ograniczającymi ruchliwość komórki — jak E-kadheryna. I tak stwierdzono, że przeciwciała przeciw E-kadherynie dodane do hodowli indukują pojawienie się inwazyjnego fenotypu w nieinwazyjnych uprzednio komórkach MDCK. Co więcej, wprowadzenie do komórek nie mających E-kadheryny sekwencji DNA kodującej to białko prowadziło do pojawienia się go na błonie powierzchniowej komórek i powstanie populacji nieinwazyjnej. Doświadczenia odwrotne, wprowadzenie do komórek, w których E-kadheryna występuje, odwróconej sekwencji DNA kodującej to białko, wygaszało ekspresję E-kadheryny, a komórki zaczynały migrować.

Doświadczenia te pokazują, że istnieje *in vitro* możliwość manipulowania inwazyjnością fenotypu przez genetyczne manipulacje ekspresją E-kadheryny w komórce (Vleminckx 1991). Okazało się, że podobne wyniki można otrzymać *in vivo*. Homogenne pod względem występowania E-kadheryny populacje komórek wprowadzano iniekcyjnie do myszy pozbawionej grasicy. Tworzył się guz, dający przerzuty do węzłów chłonnych i płuc. Pojawieniu się inwazyjności towarzyszyło pojawienie się komórek bez E-kadheryny, mimo, że wszystkie wszczone uprzednio komórki miały tę glikoproteinę. Co więcej, pobrane z organizmu heterogenne populacje komórek metastatycznych, po kilku pasażach w hodowli stawały się znowu homogenne i każda komórka zawierała E-kadherynę. Prawdopodobnie więc inwazyjność może być wynikiem przejściowego tylko zaniku ekspresji genu kodującego w komórce E-kadherynę.

Przytoczone wyniki znalazły potwierdzenie w badaniach klinicznych pacjentów ze złośliwym nowotworem jelita grubego, u których stwierdzono w przerzutach obecność komórek pozbawionych E-kadheryny.

ZANIK POŁĄCZEŃ SZCELINOWYCH

Jedną z podstawowych różnic pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi jest to, że te ostatnie same kontrolują wiele swoich czynności życiowych. Zmniejsza się więc ich potrzeba kontaktu z innymi komórkami, które między innymi przekazują informacje regulujące różne procesy komórkowe. Można więc uważać, że połączenia szczelinowe, pełniące właśnie takie funkcje „transportowe”, są w komórkach nowotworowych zbędne. Okazało się jednak, że w niektórych nowotworach łagodnych pochodzenia epitelialnego połączenia te wciąż występują. Dopiero uzłośliwienie nowotworu wiąże się z ich utratą.

Nicolson (1988) badał występowanie połączeń szczelinowych w serii sklonowanych komórek adenocarcinoma o różnych zdolnościach tworzenia przerzutów do płuc i węzłów limfatycznych. Stosował w takich przypadkach powszechnie używaną metodę „dye-transfer”, w której rozchodzący się pomiędzy komórkami barwnik (lucifer yellow) wskazywał na obecność w nich połączeń szczelinowych. Nicolson stwierdził, że połączenia szczelinowe występowały w niemetastazujących komórkach adenocarcinoma, ale brak ich było wśród komórek o dużym stopniu uzłośliwienia.

Podobne wyniki znajdujemy w pracy Vanhamme i in. (1989). Autorzy transformowali komórki nabłonkowe onkogenem H-ras 1, powodując całkowitą utratę, lub przynajmniej znaczne zmniejszenie liczby połączeń szczelinowych. Otrzymany wynik wiązano ze zmianami w fosforylacji białek budujących te połączenia.

Interpretacja ta znalazła potwierdzenie w pracy Musil i in. (1990) badających komórki sarcoma S180, które nie mają połączeń szczelinowych, chociaż znajduje się w nich koneksyna — związek z grupy białek budujących te połączenia. Dopiero wprowadzenie do komórki sekwencji DNA kodującej białko adhezji międzykomórkowej (L-CAM) spowodowało pojawienie się połączeń szczelinowych. Obecność L-CAM umożliwiła fosforylację koneksyny 43, która przechodząc w formę 43 P₂ utworzyła połączenie. Autorzy przypuszczają więc, że nie mutacja w genie koneksyny, lecz brak adhezji międzykomórkowej jest odpowiedzialny za fenotyp komórek S 180. Wynika to również z ich poprzednich doświadczeń (Musil i in. 1990) prowadzonych nad prawidłowymi komórkami soczewki oka zarodka kurzego. Tkanka ta ma niezwykle dużo połączeń szczelinowych oraz białka adhezji międzykomórkowej. Okazało się, że komórki soczewki syntetyzują koneksynę 43, która posttranslacyjnie ulega fosforylacji i dopiero wtedy uczestniczy w tworzeniu połączeń szczelinowych.

Bardzo podobne wyniki uzyskali Jongen i in. (1991), badając połączenia szczelinowe w komórkach epidermalnych. Stwierdzili oni, że zależność występowania połączeń szczelinowych w tych komórkach od poziomu jonów Ca²⁺ w środowisku wynika z bezpośredniego wpływu białka adhezji międzykomórkowej — E-kadheryny. Prawdopodobnie i tutaj jest to związane z posttranslacyjną fosforylacją koneksyny 43.

Wyniki tych ostatnich prac wydają się szczególnie ciekawe. Pokazują one co może wyniknąć z krótkotrwałego nawet wygaśnięcia ekspresji genu kodującego tylko jedną cząsteczkę w komórce. Komórka tracąca białko adhezji międzykomórkowej traci połączenia szczelinowe. W rezultacie zyskuje ona zdolności inwazyjne a równocześnie wyzwala się spod kontroli innych komórek. Tego typu zmiany stanowić mogą poważne zagrożenie dla organizmu.

CZYNNIKI STYMULUJĄCE MIGRACJĘ

CZYNNIK ROZPRASZAJĄCY „SCATTER FACTOR” (SF)
PRODUKOWANY PRZEZ FIBROBLASTY

Efekt działania tego czynnika na komórki jest podobny do efektu działania czynników powodujących zanik białek adhezji międzykomórkowej. Czynniki rozpraszający zostały odkryte i opisane przez *Stoker* i in. (1985). Zauważyli oni, że środowisko modyfikowane przez hodowane w nim fibroblasty, dodane do hodowli komórek nabłonkowych powodowało ich rozproszenie. W testowanych koloniach obserwowano wzmoczenie aktywności ruchowej powierzchni przylegających do siebie komórek i stopniowe ich odsuwanie się, aż do całkowitego rozejścia. Dalsze badania prowadzone w tym kierunku pozwoliły na ustalenie, że działający czynnik jest białkiem, które produkuje i wydzielają niektóre fibroblasty, a wrażliwe na nie są komórki nabłonkowe (*Stoker* 1987) i endotelialne (*Rosen* 1990). Jest to więc czynnik działający parakrynnie.

W roku 1989 czynnik rozpraszający został oczyszczony, a jego masa określona na 62 kD (*Gherardi* i in. 1989). Dokonano porównania wpływu na komórki nabłonkowe (MDCK) tego czynnika oraz przeciwciała przeciw uwomorulinie. Do odseparowania komórek wystarczył czynnik rozpraszający o stężeniu 2–3 pmoli podczas gdy stężenie przeciwciała konieczne do uzyskania tego samego efektu było 10 000 razy większe. Ta duża biologiczna aktywność czynnika rozpraszającego wskazuje na obecność w epitelialnych komórkach receptorów powierzchniowych o bardzo wysokim powinowactwie do tego czynnika. Okazało się również, że heparyna (w stężeniu 5 mg/ml) blokowała aktywność czynnika rozpraszającego, co pozwala przypuszczać, że może on być modulowany *in vivo* przez niektóre składniki pozakomórkowej macierzy (ECM). Odkrycie to nabiera znaczenia w świetle faktu, że wszystkie migrujące komórki organizmu przechodzą przez pozakomórkową macierz.

W roku 1989 *Stoker* podjął próby zbadania wpływu czynnika rozpraszającego na ruchliwość komórek epitelialnych i fibroblastów. Chodziło o stwierdzenie, czy czynnik ten tylko rozprasza komórki, czy też stymuluje lokomocję pojedynczych komórek, a także sprawdzenie, czy nie wywiera on rzeczywiście żadnego wpływu na wydzielające go fibroblasty.

Testowane komórki (fibroblasty, keratynocyty, komórki MDCK) umieszczano w komorach Boydena. Komórki przechodziły przez otwory o średnicy 8 μm . Liczono komórki przechodzące w warunkach kontrolnych (środowisko hodowli po obu stronach otworu) i doświadczalnych, po podaniu badanego czynnika z jednej tylko strony.

Czynnik rozpraszający (pochodzący z fibroblastów MRC 5) powodował, w zależności od użytego stężenia, 5–15-krotny wzrost liczby przechodzących komórek. Przedostawały się również fragmenty bezjądrowe. Wzmoczona migracja komórek nabłonkowych w kierunku czynnika rozpraszającego udowodniła, że jest on nie tylko czynnikiem separującym komórki, ale także stymuluje ich lokomocję (*Stoker* i *Gherardi* 1991).

Fibroblasty wykazywały znikomą wrażliwość na czynnik rozpraszający. Maksymalne zwiększenie ich aktywności lokomotorycznej wynosiło 1,4 wartości migracji spontanicznej, podczas gdy PDGF (czynnik wzrostowy wydzielany przez płytki krwi) zwiększał liczbę migrujących fibroblastów aż siedmiokrotnie w porównaniu z kontrolą.

Fibroblasty produkujące czynnik rozpraszający są bardzo ruchliwe. Dopuszcza się więc możliwość, że reagują one na produkowany przez siebie „scatter factor”. Słaba odpowiedź fibroblastów na ten czynnik wprowadzony do środowiska tłumaczy się tym, że część powierzchniowych receptorów komórek jest permanentnie związana produkowanym przez nie czynnikiem rozpraszającym.

W przypadku tych fibroblastów, które — chociaż ruchliwe — nie wydzielają czynnika rozpraszającego, S t o k e r (1989) postuluje występowanie pętli autokrynej. Syntetyzowany przez komórkę „scatter factor” stymulowałby komórkę nie opuszczając jej.

CZYNNIK ROZPRASZAJĄCY PRODUKOWANY PRZEZ NIERÓŻNICUJĄCE SIĘ KERATYNOCYTY (KOMÓRKI NDK)

Nieróżnicujące się keratynocyty, choć pochodzenia epitelialnego, zarówno kształtem jak zachowaniem przypominają ruchliwe, swobodnie migrujące fibroblasty (A d a m s i W a t t 1988). Stanowią więc niezwykle ciekawy model do badań nad czynnikiem rozpraszającym — zwykle produkowanym przez fibroblasty, a działającym na epitelium. A d a m s i in. (1991) wykorzystali środowisko modyfikowane przez te keratynocyty do testowania kolonii komórek nabłonkowych MDCK. Okazało się, że pod jego wpływem komórki tych kolonii ulegały rozproszeniu, chociaż środowisko modyfikowane przez prawidłowe keratynocyty nie wywoływało takiego efektu. W badaniach biochemicznych wykazano, że nieróżnicujące się keratynocyty produkowały białko, którego biologiczna aktywność oraz charakterystyka immunologiczna były takie same jak czynnika rozpraszającego produkowanego przez fibroblasty.

Badano również wpływ na nieróżnicujące się keratynocyty i nabłonkowe komórki MDCK polyanionowego detergentu — suraminy. Cząsteczki tego związku blokują wiązania czynników wzrostowych do błony komórkowej (H o s a n g 1985; C o f f e y 1987). Suramina podana do środowiska, w którym rosły komórki MDCK nie wywoływała efektu. Ujawniał się on dopiero przy jednoczesnej obecności suraminy i czynnika rozpraszającego. Okazało się, że suramina blokowała działanie tego czynnika, podobnie jak w przypadku czynników wzrostowych.

Następnie poddano działaniu tego detergentu nieróżnicujące się keratynocyty. Inkubowanie w obecności suraminy powodowało skupianie się tych komórek. Przepłukane i pozostawione w normalnym środowisku hodowli, nieróżnicujące się keratynocyty powracały do swego właściwego stanu, tzn. roz-

proszone swobodnie migrowały. Wynika, z tego, że produkowany przez nieróżnicujące się keratynocyty czynnik rozpraszający jest czynnikiem autokrynnym dla tych komórek i parakrynnym dla typowych nabłonkowych komórek MDCK. Rozprasza on oraz pobudza do migracji produkujące go komórki.

W związku z tymi wynikami interesujące wydawało się poddanie działaniu suraminy fibroblastów produkujących czynnik rozpraszający. W przeciwieństwie do ruchliwych, ale pochodzenia epitelialnego nieróżnicujących się keratynocytów, fibroblasty (S t o k e r, dane nie publikowane) nie wykazywały wrażliwości na suraminę.

Suramina powoduje w komórkach ndk również pewne zmiany w cytoskielecie aktynowym — pojawiają się dodatkowe, krótkie włókna naprężeniowe w pobliżu kontaktów międzykomórkowych. Badano również rozmieszczenie białek wzajemnej adhezji międzykomórkowej w nieróżnicujących się keratynocytach znajdujących się pod wpływem suraminy. Mimo że suramina wywoływała skupianie się tych komórek, nie powodowała u nich podniesienia bardzo niskiego poziomu E- i P-kadheryny. Obserwuje się natomiast wyraźny wpływ tego detergentu na integryny. W nietkniętych komórkach ndk, integryna $\alpha_2\beta_1$ jest skoncentrowana w regionie falowań błony, zaś $\alpha_3\beta_1$ na powierzchni licznych w tych komórkach mikrowilli. Suramina powoduje częściowe przemieszczenie tych integryn do regionów kontaktów międzykomórkowych. Takie rozmieszczenie integryn zawierających podjednostkę β_1 jest typowe dla normalnych keratynocytów.

CZYNNIK STYMULUJĄCY MIGRACJĘ — MIGRATION STIMULATING FACTOR (MSF)

Badania przeprowadzone przez S c h o r r i i współpracowników (1988a i b) na fibroblastach pochodzących z płodów ludzkich oraz z osobników dorosłych (zdrowych i z nowotworem piersi) wykazały, że istnieje podobieństwo w sposobie migracji fibroblastów pochodzenia płodowego i pobieranych od chorych pacjentów. Hodowane w bardzo gęstych kulturach penetrują one żełe kolagenowe dużo szybciej i łatwiej niż fibroblasty pochodzące ze zdrowych, dorosłych osobników. Ze środowiska, w którym hodowano te ruchliwe fibroblasty, wyizolowano białko o masie rzędu 50-60 kD, które okazało się czynnikiem odpowiedzialnym za zwiększenie aktywności omawianych komórek. Nazwano je czynnikiem stymulującym migrację (MSF). Czynniki ten, odwrotnie niż czynnik rozpraszający (SF), działa przede wszystkim autokrynnie. Stwierdzono jednak, że środowisko modyfikowane przez produkujące ten czynnik fibroblasty może stymulować, w pewnych ściśle określonych warunkach, również fibroblasty pochodzące z osobników zdrowych i dorosłych. Dzieje się tak wtedy, gdy te ostatnie tworzą bardzo gęste kultury.

AUTOKRYNNY CZYNNIK RUCHLIWOŚCI — AUTOCRINE MOTILITY FACTOR (AMF)

Wiadomo, że komórki nowotworowe wymykające się spod kontroli organizmu same kontrolują większość własnych czynności życiowych. Nieograniczony rozrost tych komórek wynika między innymi z autokrynnego oddziaływania czynników wzrostu (growth factors). Czynniki wzrostowe należą do cytokin mitogennych, cytokiny mogą jednak wpływać stymulująco również na inne procesy zachodzące w komórce.

Stwierdzono, że inwazje i przerzuty nowotworów nie są prostą konsekwencją rozrostu kolonii zmienionych komórek, ale zjawiskiem odrębnym i złożonym z wielu etapów. Na preparatach tkanki zaatakowanej przez nowotwór widać często pojedyncze komórki lub ich niewielkie grupy wybiegające poza główną masę kolonii. Uważa się, że populacje komórek nowotworowych są heterogenne. Pewne komórki odznaczają się ruchliwością i migrują, podczas gdy inne ograniczają się tylko do wzmożonej proliferacji, pozostając na miejscu.

Biochemiczne mechanizmy regulujące inwazyjność komórek nowotworowych są przedmiotem wielu badań. Stwierdzono, że jednym z czynników stymulujących migrację takich komórek może być białko o masie około 55 kD, odkryte w roku 1985, a opisane w roku 1986 przez znanego badacza komórek nowotworowych — Lance Liott'ę i jego współpracowników. Wyszli oni z założenia, że podobnie jak istnieją autokrynnne czynniki wzrostowe, przy pomocy których komórka nowotworowa sama pobudza się do podziału, mogą istnieć również autokrynnne czynniki pobudzające ją do lokomocji. Autorzy ci zbadali wysoko metastatyczny klon (A 2058) komórek czerniaka (melanoma) jednego z najbardziej złośliwych nowotworów ludzkich. Badane komórki umieszczali w środowisku o ściśle określonym składzie chemicznym i po 18 godzinnej inkubacji sprawdzali działanie tego środowiska na komórki A2058. Stwierdzili, że w kierunku modyfikowanego środowiska migrowało 5-10 razy więcej komórek niż w kierunku środowiska kontrolnego. Następnym krokiem była izolacja i charakterystyka białka wydzielanego do hodowli przez komórki czerniaka, a będącego autokrynnym stymulatorem ruchliwości tych komórek. Dalsze badania można więc było prowadzić przy użyciu określonych stężeń AMF. Maksymalną efektywność osiągnięto przy stężeniu AMF 10 nmoli. Wykazano, że czynnik ten działa zarówno chemotaktycznie jak i chemokinetycznie, ale tylko na komórki melanoma. Granulocyty obojętnochłonne, które są komórkami ruchliwymi nie reagowały zupełnie na AMF, chociaż inhibitory ich lokomocji takie jak toksyna koklusu hamowały chemotaksję komórek melanoma.

Autorzy stwierdzili również, że komórki czerniaka wykazują wyraźniejszą reakcję chemokinetyczną niż chemotaktyczną na AMF. Wydaje się, że może to mieć znaczenie w procesie inwazyjnym *in vivo*. Wytworzone lokalnie wysokie stężenie AMF powoduje prawdopodobnie bezładną migrację komórek. W trakcie tego zachodzi selekcja komórek najbardziej agresywnych — tych które okazały się najbardziej wrażliwe na autokrynnny czynnik ruchliwości. Komórki te

wyruszają następnie, forsując błonę podstawną, przez pozakomórkową macierz oraz naczynia krwionośne i limfatyczne ku innym regionom organizmu, gdzie tworzą nowe kolonie.

Liotta i współpracownicy stwierdzili, że AMF produkowany jest także przez inne komórki carcinoma. Guirguis i inni (1987) uzupełnili te badania szczegółową analizą morfologii ruchu komórek nowotworowych stymulowanych AMF. Podając AMF w stężeniu 1 nM wywoływali beładne formowanie nibynózek, co poprzedzało przemieszczanie się komórek. Nibynózki wysuwane były również przez fragmenty bezjądrowe komórek. Podanie przeciwciał przeciw AMF hamowało zarówno tworzenie pseudopodiów, jak i lokomocję testowanych komórek. Dodatkowo, w indukowanych za pomocą AMF pseudopodiach autorzy obserwowali wyraźną sieć włókienek aktynowych. Stwierdzili też na powierzchni wysuwanych nibynózek 20-krotne zwiększenie receptorów lamininowych i innych integryn. Zwiększenie liczby tych receptorów wskazuje na przystosowanie badanych komórek nowotworowych do przemieszczania się przez błonę podstawną i pozakomórkową macierz. Obecność mikrofilamentów aktynowych w pseudopodiach lokomotorycznych wskazuje natomiast na tożsamość molekularnych podstaw ruchu komórek nowotworowych i innych, w tym również swobodnie żyjących komórek ameboidalnych.

TISSUE CELL MIGRATION — SOME FACTORS LIMITING AND STIMULATING MOTILITY

Summary

Amoeboid movement, the directed locomotion associated with the cell shape changes, occurs as well in free-living amoebae as in motile tissue cells. There are several factors limiting or stimulating this type of movement.

Among factors restricting motility of the tissue cells the intercellular connections are of the primary importance. Alterations of cell-cell and cell-substratum interactions take place during embryogenesis and tumorigenesis. That is particularly evident in tumorigenesis of the epithelial tissue, where the malignant cells loose their adhesion to the original neighbours. Among the molecular mechanisms underlying such alterations, changes in cell-cell interactions mediated by the cadherin family of molecules have received increasing interest in the last few years. A recent study on E-cadherin expression in several carcinomas and H-ras-transformed MDCK cells indicates, that acquisition of the invasiveness by these cells is often associated with the loss of E-cadherin expression. Similar interrelations were shown for the gap junctions.

Stoker with co-workers discovered in 1985 a specific factor produced by some fibroblasts. This paracrine Scatter Factor (SF) is capable of inducing the disruption and scattering of epithelial colonies and increasing the motility of individual epithelial or endothelial cells. An autocrine Motility Stimulating Factor (MSF) was described by Scorr et al. in 1988. It is produced by foetal fibroblasts and fibroblasts from patients with the breast cancer, and can also stimulate the migration of normal fibroblasts from high-density cultures. Liotta et al (1983, 1986) have shown that several highly metastatic cell lines produce and respond chemotactically to an Autocrine Motility Factor (AMF). This chemotactic factor has also been isolated by other workers from mouse and rat hepatoma lines, a rat mammary adenocarcinoma metastatic clone and human leukemia cells.

LITERATURA

- Adams J. C., Watt F. M. — *An unusual strain of human keratinocytes which do not stratify or undergo terminal differentiation in culture*. J. Cell. Biol. 107: 1927-1938, 1988.
- Adams J. C., Furlong R. A., Watt F. M. — *Production of scatter factor by ndk, a strain of epithelial cells, and inhibition of scatter factor activity by suramin*. J. Cell Sci. 98: 385-394, 1991.
- Behrens J., Mareel M. M., Van Roy F. M., Birchmeier W. — *Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of ovomorulin-mediated cell-cell adhesion*. J. Cell Biol. 108: 2435-2447, 1989.
- Coffey R. J. Jr., Leof L. B., Shipley G. D., Moses H. L. — *Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells*. J. Cell. Physiol. 132: 143-148, 1987.
- Fleming T. P., Johnson M. H. — *From egg to epithelium*. Ann. Rev. Cell Biol. 4: 459-485, 1988
- Gherardi E., Gray., Stoker M., Perryman M., Furlong R. — *Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5844-5848, 1989.
- Guirguis R., Margulies I., Taraboletti G., Schiffmann E., Liotta L. — *Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumour cell migration*. Nature 329: 261-263, 1987.
- Hosang M. — *Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity*. J. Cell. Biochem. 29: 265-273, 1985.
- Jongen W. M. F., Fitzgerald D. J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T. J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H. — *Regulation of connexin 43 — mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin*. J. Cell Biol. 114: 545-555, 1991.
- Liotta L. A., Mandler R., Murano G., Katz D. A., Gordon R. K., Chiang P. K., Schiffmann E. — *Tumor cell autocrine motility factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3302-3306, 1986.
- Mareel M. — *Cell-cell adhesion molecules in tumor invasion*. Eur. J. Cell Biol. 53 (Suppl. 31): 46, 1990.
- Musil L. S., Beyer E. C., Goodenough D. A. — *Expression of the gap junction protein connexin 43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation*. J. Membr. Biol. 116: 163-175, 1990.
- Musil L. S., Cunningham B. A., Edelman G. M., Goodenough D. A. — *Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines*. J. Cell Biol. 111: 2077-2088, 1990.
- Nicolson G. L., Dulski K. M., Trosko J. E. — *Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 473-476, 1988.
- Rosen E. M., Meromsky L., Setter E., Vinter D. W., Goldberg I. D. — *Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads*. Exp. Cell Res. 186: 22-31, 1990.
- Schor S. L., Schor A. M., Grey A. M., Rushton G. — *Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells*. J. Cell Sci 90: 391-399, 1988.
- Schor S. L., Schor A. M., Rushton G. — *Fibroblasts from cancer patients display a mixture of both foetal and adult-like phenotypic characteristics*. J. Cell Sci. 90: 401-407, 1988.
- Stoker M. — *Effects of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts*. J. Cell Physiol. 139: 565-569, 1989.
- Stoker M., Perryman M. — *An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts*. J. Cell Sci. 77: 209-233, 1985.
- Stoker M., Gherardi E., Perryman M., Gray J. — *Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility*. Nature, Lond. 327: 239-242, 1987.

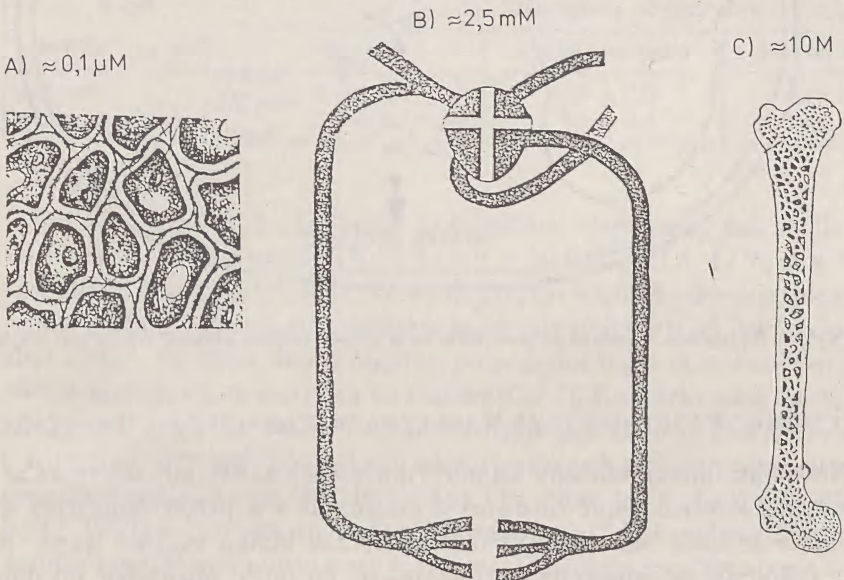
JACEK KUŹNICKI
JOLANTA KORDOWSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ JAKO MARKERY STANÓW PATOLOGICZNYCH

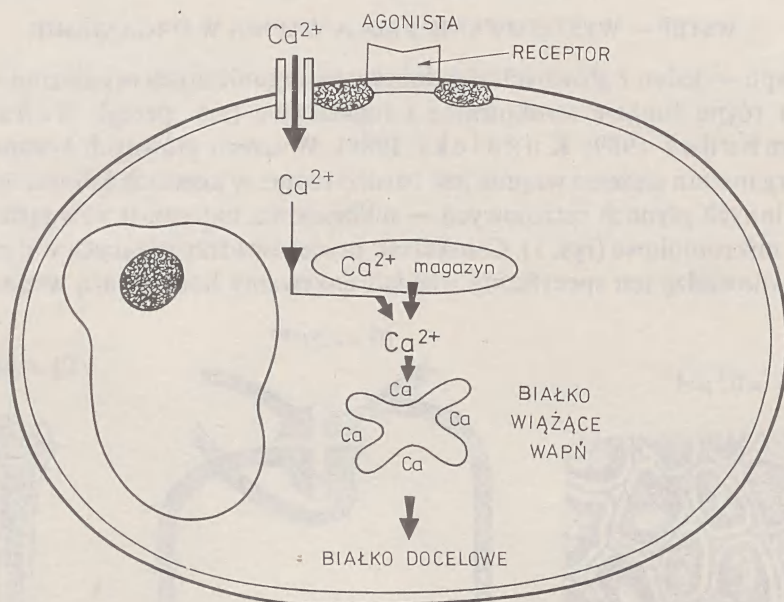
WSTĘP — WYSTĘPOWANIE I ROLA WAPNIA W ORGANIZMIE

Wapń — jeden z głównych składników nieorganicznych organizmu — pełni w nim różne funkcje strukturalne i regulacyjne (art. przegl. Schaffner i Dambader 1989; Kuźnicki 1988). W trzech głównych kompartmentach organizmu stężenie wapnia jest bardzo różne: w kościach kilkumolowe, we krwi i innych płynach ustrojowych — milimolowe, natomiast wewnątrz komórek — mikromolowe (rys. 1). Całokształt procesów utrzymujących w dynamicznej równowadze ten specyficzny rozkład nazywamy homeostazą wapniową.



Rys. 1. Występowanie wapnia w trzech głównych kompartmentach organizmu: w komórkach (A), we krwi (B) i w kościach (C)

Dzięki dużej różnicy stężeń między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym wapń może pełnić rolę w przekazywaniu sygnałów przez błonę komórkową oraz w regulacji procesów fizjologicznych, takich jak: skurcz mięśni, ruchliwość komórek niemięśniowych i tworzenie cytoszkieletu, wydzielanie, podział komórkowy, synteza białek i przepuszczalność przez błony (art. przegl. Rasmussen 1990; Berridge 1989). Wewnątrzkomórkową homeostazę wapniową można schematycznie przedstawić w postaci trzech kolejnych etapów. Pierwszy polega na aktywacji receptorów błonowych przez różnorodne czynniki (np. hormony lub zmiany potencjału), co prowadzi do wzrostu stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. W drugim etapie jony te są wiązane przez specyficzne białka wiążące wapń, które przenoszą sygnał na białka docelowe. W trzecim etapie enzymatyczne i strukturalne białka docelowe wywołują określoną odpowiedź fizjologiczną (rys. 2). Obniżenie stężenia wapnia powoduje jego oddysocjowanie od białek wiążących, co hamuje aktywność białek docelowych.



Rys. 2. Aktywacja komórki pośrednictwem jonów wapnia i białek wiążących wapń.

KOMÓRKOWA HOMEOSTAZA WAPNIOWA W STANACH PATOLOGICZNYCH

Normalne funkcjonowanie komórki ma miejsce wtedy, gdy stężenie Ca^{2+} jest precyzyjnie kontrolowane zarówno w czasie, jak i w przestrzeni przez współdziałające ze sobą błonowe i cytoplazmatyczne białka wiążące wapń. Różne stany patologiczne zmieniają tę równowagę, co może prowadzić do dalszego rozregulowania metabolizmu komórki. W momencie uszkodzenia komórki lub podczas jej starzenia obserwuje się zaburzenia procesów biorących udział

w wewnątrzkomórkowej homeostazie wapnia, co staje się powodem zwiększonego wpływu Ca^{2+} do komórki, uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów i hamowania jego wydalania. Prowadzi to do znacznego wzrostu stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} , które utrzymuje się na nienormalnie wysokim poziomie. Na przykład w komórkach mięśni hodowanych *in vitro* uzyskanych od pacjentów chorych na dystrofię miotoniczną, homeostaza Ca^{2+} jest nieprawidłowa (Jacobs i in. 1991). Gdy jony wapnia są obecne w pożywce, komórki te mają wyższy poziom $[\text{Ca}^{2+}]$ w cytoplazmie, niż komórki osób zdrowych, co jest spowodowane zwiększonym wpływem jonów poprzez kanał Ca^{2+} .

W wyniku starzenia zmienia się dystrybucja wapnia w głównych kompartmentach organizmu: zwiększa się jego ilość w komórkach, a zmniejsza w kościach. Poziom wapnia we krwi pozostaje taki sam, nawet niewielkie zmiany stężenia tego jonu mogą wywołać poważne zaburzenia w funkcjonowaniu różnych narządów, m.in. serca. Zawartość całkowitego $[\text{Ca}^{2+}]$ w komórce (tab. 1) zwiększa się w miarę starzenia o 52%, a u chorych na chorobę Alzheimera nawet o 197%, co stwierdzono w fibroblastach pobranych ze skóry (Peterson i Goldman, 1986). W komórkach krwi pacjentów z nadciśnieniem stwierdza się zaburzenia w transporcie jonów wapnia przez błony komórkowe oraz wzrost jego stężenia wewnątrz komórki (Oshima i in. 1988).

Tabela 1

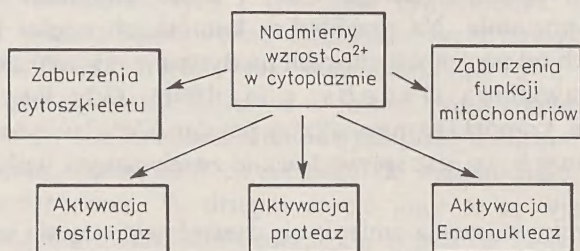
Poziom wapnia w fibroblastach (Peterson, Goldman 1986)

Wapń pmol Ca^{2+} /μg białka	Linia fibroblastów od pacjentów		
	młodych	w starszym wieku	z chorobą Alzheimera
całkowity	9,7 ± 0,5	14,6 ± 1,0	28,6 ± 1,3
wewnątrzkomórkowy	3,7 ± 0,2	7,6 ± 1,2	14,4 ± 0,4

Innym przykładem zaburzeń homeostazy wapniowej jest zachowanie się komórek nowotworowych (Boynton i Whitfield 1976; Swierenga i in. 1978). Komórki prawidłowe wymagają do wzrostu odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Ich podziały zatrzymują się, gdy stężenie $[\text{Ca}^{2+}]$ w środowisku jest zbyt niskie. Ta sama linia komórek po transformacji nowotworowej wirusem SV-40 okazuje się niewrażliwa na zmiany $[\text{Ca}^{2+}]$. Komórki takie dzielą się nawet wtedy, gdy stężenie wapnia w środowisku jest bardzo niskie (Hazelton i Tupper 1981). W komórkach nowotworowych wykazujących zjawisko tzw. oporności wielolekowej (MDR) (Nair i in. 1986; Grzelakowska-Sztaber 1989) poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest podwyższony w porównaniu z komórkami nowotworowymi wrażliwymi na leki (Tsuro i in. 1984).

Utrzymujące się wysokie stężenie jonów wapniowych może doprowadzić do śmierci komórki m.in. poprzez rozbicie cytoskieletu i nie kontrolowaną

aktywację enzymów katabolicznych, np. endonukleaz i proteaz. Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, odbywa się najprawdopodobniej m.in. poprzez zależne od Ca^{2+} endonukleazy (O r r e n i u s i in. 1989) (rys. 3)



Rys. 3. Prawdopodobne mechanizmy odpowiedzialne za zależną od wapnia programowaną śmierć komórki

KLASYFIKACJA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ (CaBP)

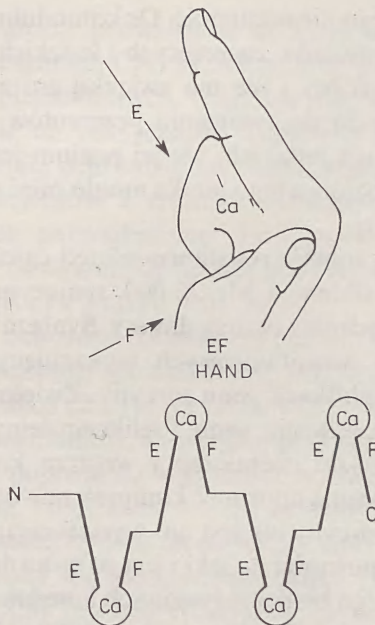
Na zmiany poziomu jonów wapnia w komórce reagują białka wiążące wapń, mające struktury wyspecjalizowane do wiązania tych jonów. Obecnie znanych jest ponad 200 takich białek. Część z nich scharakteryzowano, ale tylko dla nieznacznej części określono funkcję (Heizmann i Berchtold 1987; Heizmann i Hunziker 1990). Białka wiążące wapń można podzielić na cztery grupy:

1. Białka, które wiążą wapń dzięki tzw. domenom „EF-hand” — strukturom o charakterystycznej budowie, składającym się z dwóch odcinków α -helisy i pętli je łączącej. Zalicza się do nich kalbindyny D28k i kalretininy (mające 6 domen „EF-hand”), kalmodulinę i troponinę C (4 domeny), (rys. 4) parwalbuminy i onkomodulinę (2 + 1 nieaktywna) oraz białka z rodziny S-100 (2 domeny „EF-hand”);

2. Białka, które zawierają domeny funkcjonalne i domeny homologiczne do struktury „EF-hand”. Przykładami są: α -aktynina (białko siecujące filamenty aktynowe), dystrofina — produkt genu, którego mutacja powoduje dystrofię Duchenna i Beckera, kalpaina — proteaza zależna od Ca^{2+} ;

3. Białka wiążące wapń, które nie mają struktur „EF-hand”, a które wiążą fosfolipidy w sposób zależny od jonów wapnia. Do grupy tej należą lipokortyny, kalpaktyny, chromobindyny i kalcimedyny, ogólnie zwane aneksynami (Gerke 1989; Gerke i in. 1990). Niektóre z tych białek ulegają fosforylacji m.in. w resztach tyrozynowych w czasie aktywacji komórki przez czynniki wzrostowe;

4. Inne białka, których nie można zaklasyfikować do trzech powyższych grup.



Rys. 4. Budowa domeny EF-hand i schemat białka wiążącego wapń zawierającego cztery domeny.

WYSTĘPOWANIE BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ W STANACH PATOLOGICZNYCH

Badając zmiany patologiczne związane z metabolizmem wapniowym, zwraca się m.in. uwagę na obecność różnych białek wiążących wapń. Niektóre z nich mogą się stać markerami pewnych chorób (np. te, które występują tylko w ściśle określonych komórkach lub te, których poziom w komórce zmienia się). Białka wiążące wapń, których występowanie i ekspresja zmieniają się w stanach patologicznych można podzielić na dwie grupy:

1. Białka ulegające ekspresji w specyficznych warunkach i praktycznie nie występujące w zdrowej tkance (np. onkomodulina i sorcylna);
2. Białka występujące w normalnej tkance, ale mające zmienioną ekspresję w warunkach patologicznych, np. kalmodulina, kalbindyny, parwalbuminy, białka S-100 (Heizmann i Schafer 1990).

Niżej opisano właściwości niektórych białek wiążących wapń, które prawdopodobnie będą mogły być markerami określonych stanów patologicznych.

Onkomodulina ($M_r = 11\ 700$) jest to białko podobne do parwalbuminy (MacManus i Whitfield 1983; Gillen i in. 1987). Tworzy ono dimery (poprzez grupę SH), które wydają się być formą aktywną biologicznie. Onkomodulina jest nieobecna w normalnych fibroblastach, ale po transformacji nowotworowej pojawia się w tych komórkach w znacznej ilości. W czasie rozwoju prenatalnego pojawia się w łożysku, podczas gdy w normalnych

tkankach człowieka dorosłego nie występuje. Onkomodulina została znaleziona w 80% przebadanych nowotworów zwierzęcych i ludzkich. Jej poziom w tkankach nowotworowych jest różny i nie ma związku ani z szybkością wzrostu nowotworu, ani ze zdolnością do tworzenia przerzutów. Onkomodulina jest obecna w wielu nowotworach ludzkich, ale jej poziom jest niski i dlatego nie wydaje się, by oznaczanie poziomu tego białka mogło mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce onkologicznej.

Sorcyna (ang. sorcin — soluble resistance-related calcium binding protein) jest cytoplazmatycznym białkiem o Mr 22 000, mającym 4 miejsca wiązania Ca^{2+} . Podobnie jak onkomodulina tworzy dimery. Synteza sorcyny jest znacznie zwiększona w komórkach nowotworowych wykazujących oporność wielolekową, co jest efektem amplifikacji genu sorcyny. Zwielokrotnienie tego genu zachodzi równolegle z amplifikacją genu P-glikoproteiny, błonowego białka transportującego różne związki chemiczne z wnętrza komórki na zewnątrz, odpowiedzialnego za zwiększoną oporność komórek nowotworowych na działanie leków. Nadprodukcja sorcyny nie jest ani wystarczającym, ani niezbędnym warunkiem do uzyskania oporności na leki i jest najprawdopodobniej przypadkowa. Niemniej obecność tego białka w badanych komórkach jest wskaźnikiem nabycia wielolekowej oporności (R o b e r t s i in. 1989; H a m a d a i in. 1988; Meyers i in. 1987; art. przegl. G r z e l a k o w s k a - S z t a b e r t 1989).

W przeciwieństwie do innych białek wiążących wapń kalmodulina występuje powszechnie we wszystkich komórkach, chociaż jej stężenie nie wszędzie jest jednakowe. W kilku przypadkach stwierdzono, że poziom kalmoduliny wzrasta w wyniku transformacji nowotworowej wywołanej wirusami (art. przegl. H e i z m a n n i B e r c h t o l d 1987). Ponadto w komórkach mięśni gładkich u szczurów z naciśnięciem poziom prawidłowej kalmoduliny wzrasta i pojawia się jej zmutowana forma.

Inne białka wiążące wapń, takie jak parwalbuminy, kalbindyny i białka S-100 wykazują specyficzność tkankową i komórkową i dlatego mogą się okazać szczególnie dobrymi markerami niektórych chorób. Parwalbumina jest białkiem wiążącym wapń o Mr = 12 000, występującym w wysokim stężeniu w szybkich miofibrylach mięśni szkieletowych. Fibryle te w pierwszej kolejności ulegają dezintegracji w przebiegu miopatii i dlatego w surowicy myszy Mdx (odpowiednik ludzkiej dystrofii Duchenna) obserwuje się znacznie podwyższony poziom parwalbuminy, co jest konsekwencją zwiększonej martwicy mięśni szkieletowych (J o c k u s c h i in. 1990). Oznaczenie poziomu parwalbuminy w surowicy może być czułym markerem stopnia dezintegracji mięśni szkieletowych (parwalbuminy nie znajduje się w mięśniach gładkich i mięśniu sercowym).

Parwalbumina występuje w ośrodkowym układzie nerwowym — w niektórych GABA-ergicznych neuronach hipokampa (S k o t t i i N i t s c h 1991). U pacjentów cierpiących na epilepsję obserwowano ubytek komórek hipokampa, głównie w tzw. obszarach CA1 i CA3 (L e r n a t h i R i b a k 1991), natomiast komórki nerwowe z obszaru CA2 były mniej wrażliwe na uszkodze-

nie. Badania immunologiczne prowadzone na szczurach wykazały, że obszar CA2 ma wyższy niż w obszarach CA1 i CA3 poziom parwalbumin (i kalbindyn D28K) w komórkach piramidalnych. Sugeruje się, że komórki piramidalne obszaru CA2 są odporne na toksyczność wapniową wywołaną nadmiernym pobudzeniem właśnie dzięki ochronnej roli białek wiążących wapń (L e r n a t h i R i b a k 1991). U pacjentów z chorobą Alzheimera zmniejsza się liczba neuronów zawierających parwalbuminę (I c h i m i y a 1988). U pacjentów z syndromem DiGeorge obserwuje się delecję genu parwalbuminy, co może być markerem tej choroby (B e r c h t o l d i in. 1987).

W mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera poziom kalbindyny D28k obniża się, co jest najprawdopodobniej spowodowane zmniejszaniem się liczby neuronów zawierających to białko (B a i m b r i d g e i in. 1985). Zaobserwowano, że D28k, podobnie jak parwalbumina, chroni komórki nerwowe przed toksycznym wpływem wapnia, który pojawia się w komórce w zwiększonej ilości w wyniku nadmiernego pobudzenia. Hodowane *in vitro* neurony hipokampa zawierające kalbindynę D28k są bardziej odporne na niszczący wpływ elektrostymulujących aminokwasów, niż neurony nie mające tego białka (M a t t s o n i in. 1991). Neurony z kalbindyną D28k bardziej efektywnie niż neurony bez niej obniżają wysoki poziom wewnątrzkomórkowego wapnia pojawiający się po pobudzeniu. Ekspresja kalbindyn D28k występujących w komórkach nerwowych jest regulowana m.in. przez glukokortykoidy oraz przez neuronalne czynniki wzrostu. W przewlekłych chorobach neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera, Huntingтона czy Parkinsona, poziom kalbindyny D28k (oraz jej mRNA) jest zredukowany w objętych chorobą rejonach mózgu. Wymienione przykłady świadczą o tym, że zmniejszająca się w różnych stanach patologicznych (lub wraz z wiekiem) w różnych procesach patologicznych ekspresja kalbindyny D28k może prowadzić do zachwiania homeostazy wapniowej kierowanej przez układ neuronalny.

Białka z rodziny S-100 to co najmniej 10 różnych polipeptydów (Mr od 9000 do 14 000), występujących na ogół w określonym typie komórek. Białka S-100 zawierają dwie domeny „EF-hand”; monomer może zatem wiązać dwa jony wapnia, a dimer cztery. Niektóre białka z tej rodziny wiążą jony cynku. Białka S-100 mają dwie ważne cechy odróżniające je od innych białek zawierających domeny „EF-hand”. Pierwsza — to wydzielanie białek S-100 na zewnątrz komórki do płynów ustrojowych lub pożywki, co wskazuje, że mogą one działać pozakomórkowo. Druga cecha — geny kodujące białka S-100 są aktywowane w określonej fazie cyklu komórkowego lub w przebiegu procesu różnicowania. Nie są to więc białka stale syntetyzowane w komórce.

Mózgowe białka S-100 występują w postaci dimerów zbudowanych z dwóch rodzajów podjednostek: S-100 α i S-100 β . Polipeptydy te wykazują około 50% identyczności i mogą tworzyć homo- i heterodimery. Białko S-100 β zlokalizowano w największej ilości w komórkach gleju, ale występuje ono również w adipocytach. Białko S-100 α znajduje się przede wszystkim w neuro-

Tabela 2

Właściwości białek S-100

Nazwa białka (genu)	Występowanie Indukowanie*	Ekspresja zależna od cyklu komórkowego lub etapu różnicowania	Pozakomórkowe (E) i tworzące dimer (D)
S-100 α	neurony, mięśnie, nerka, skóra	+	D
S-100 β	komórki gleju, tkanki tłuszczowej, jądra	+	E/D
S-100L	komórki płuc		
MRP-14 CF-Ag L-1 Ag	*w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych	+	E/D
MRP-8 L-1 Ag	*w przewlekłych stanach zapalnych	+	E/D
Kalcyklina PRA	*surowicą w fibroblastach połączony z receptorem prolaktyny	+	E/D
18A2	*surowicą w fibroblastach	+	
P9Ka	w komórkach mioepitelialnych	+	
pEL68	w nowotworach	+	E/D
mts1	w przerzutach nowotworowych	+	
42A	*NGF w komórkach PC12	+	
ICaBP	*witaminą D w komórkach jelita	+	
p11 42C	podjednostka anneksyny II *NGF w komórkach PC12	+	D

nach centralnego i obwodowego układu nerwowego, a mniejsze jego ilości występują w komórkach mięśni, nerki i melanocytach. Dotychczas nie wyjaśniono jaką rolę pełnią białka S-100 α i S-100 β . Ostatnio stwierdzono jednak, że homodimer S-100 β wydłuża czas przeżycia neuronów w hodowli oraz stymuluje wydłużanie neurytów (K l i g m a n i M a r s h a k 1985). Wydzielanie S-100 β zachodzi pod wpływem hormonu kortykotropowego.

Synteza białka S-100 β w mózgu pacjentów z chorobą Downa i Alzheimerera jest podwyższona (Griffin i in. 1989). Zwiększenie ilości białka S-100 w trakcie rozwoju mózgu może być przyczyną neurologicznych zmian występujących w chorobie Downa, co sugeruje się m.in. na podstawie obserwacji myszy transgenicznych (z genem białka S-100). Dodatkową wskazówką sugerującą, że białko S-100 β jest związane z patogenezą syndromu Downa jest fakt, że fragment chromosomu 21 zawierający gen tego białka ulega triplikacji. Poziom białka S-100 β oznaczony w płynie mózgowo-rdzeniowym jest podwyższony również w innych chorobach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak

nowotwory, zmiany towarzyszące miażdżycy naczyń mózgowych, wylew krwi do mózgu. Użycie monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białku S-100 β umożliwia identyfikację różnych nowotworów układu nerwowego u ludzi. W tabeli 3 pokazano w jakich nowotworach znajduje się, a w jakich nie ma białka S-100 β . We wszystkich badanych przypadkach znaleziono to białko w nowotworach pochodzących z komórek wspomagających (gleju), a nie znaleziono w nowotworach wywodzących się z neuronów (Van Eldik i in. 1986).

Tabela 3

Immunologiczna lokalizacja białka S-100 β w ludzkich nowotworach układu nerwowego (Van Eldik i in. 1986)

Nowotwór	S-100 β
Astrocytoma (gwiazdziak)	23/23
Glioblastoma (glejak)	14/14
Schwannoma (osłoniak)	6/6
Ependymoma (komórki wyściółki)	3/3
Oligodendrogloma (skąpodrzewiak)	0/5
Memingioma (oponiak)	0/12
Medulloblastoma (rdzeniak)	0/7
Neuroblastoma (zwojak zarodkowy)	0/7

Białko S-100 α w komórkach mięśniowych jest obecne tylko w fibroblastach serca i fibrylach typu I mięśni szkieletowych (Haimoto i Kato 1987). W surowicy pacjentów z dystrofią miotoniczną typu 1 stwierdza się podwyższony poziom enzymów takich jak enolaza mięśniowa (dwukrotny), kinaza kreatyninowa i mioglobina (trzykrotny), anhydraza węglanowa (czterokrotny) oraz ponad sześciokrotny — białka S-100 α . Wydaje się, że białko to i jego poziom jest czułym i łatwym do oznaczania markerem tej dystrofii.

Białko S-100 β występuje w czerniakach i liniach komórkowych otrzymanych z tych nowotworów. Nie znaleziono białka S-100 β w normalnych melanocytach, w komórkach epitelialnych i w fibroblastach. Sugeruje się, że synteza tego białka zwiększa się po transformacji nowotworowej melanocytów w związku z progresją cyklu komórkowego.

Poziom kalbindyny D9k w jelicie cienkim zmienia się w różnych stanach patologicznych. Zaobserwowano korelację między poziomem kalbindyny D9k a zdolnością jelita do wchłaniania wapnia (tab. 4). Ponadto u szczurów z nadciśnieniem poziom kalbindyny D9k obniża się (Rao i in.).

Dwa białka z rodziny białek S-100 zwane MRP-8 i MRP-14 (to ostatnie jest identyczne z tzw. antygenem mukowiscydozy — patrz niżej) są białkami charakterystycznymi dla komórek pochodzących ze szpiku. W warunkach normalnych obserwuje się je w granulocytach i monocytach krwi, a nie ma ich

w płytkach krwi i limfocytach oraz w normalnych tkankowych makrofagach (tab. 5).

Tabela 4

Poziom kalbidyny D9k w jelicie (Staun, Jarnum 1988)

Pacjenci z ograniczonym wchłanianiem jelitowym	Liczba przypadków	Poziom kalbidyny D9k ug/mg (biopsje)
Short-bowel syndrom	5	2,5
Celiakia		
nietraktowana	4	0,3
remisja	7	1,8
Jelitowa bypass	5	13,7
Biegunka chroniczna	7	11,5
Kontrola		
(podrażnienie jelit)	12	6,9

Tabela 5

Ekspresja MRP-8 i MRP-14 w komórkach białaczki i w stanach zapalnych (Zwaldo i in. 1983)

Stan chorobowy	MRP-8 % komórek pozytywnych	MRP-14 % komórek pozytywnych
Ostra białaczka szpikowa	10-40	10-40
Ostra białaczka limfatyczna	0	0
Przewlekła białaczka szpikowa	50-80	50-80
Przewlekła białaczka limfatyczna	0	0
Ostre stany zapalne (np. zapalenie dziąseł)	0	15-78
Przewlekłe stany zapalne (np. reumatoidalne zapalenie stawów)	50-100	50-100

W ostrych stanach zapalnych (np. w zapaleniu dziąseł, łuszczycy, świerzbicze) w makrofagach pojawia się jedynie białko MRP-14. W przewlekłych stanach zapalnych, takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów, makrofagi syntetyzują oba białka: MRP-8 i MRP-14. Obecność makrofagów zawierających MRP-8 wskazuje na przewlekłą naturę stanu zapalnego (O'dink i in. 1987) Zwaldo i in. 1988).

W przewlekłych i ostrych białaczkach szpikowych obserwuje się obecność zarówno MRP-8 i MRP-14. W innych nowotworach układu białokrwinkowego nie stwierdzono obecności tych białek. Obecność MRP-14 w surowicy wynika albo ze zwiększonej lizy makrofagów i innych komórek, albo jest skutkiem wydzielania tego białka przez komórki w trakcie zapalenia. U pacjentów z mukowiscydozą obserwuje się podwyższony poziom białka „CF-antygen” identycznego z białkiem MRP-14. Mukowiscydoza związana jest z nienormalnie

niskim transportem jonów chlorkowych przez błonę. Gen odpowiedzialny za tę chorobę został zidentyfikowany, sklonowany, a defekt genu w postaci mutacji wykryty (art. przegl. K o s h l a n d 1989). CF-antygen (MRP-14) jest zawsze obecny w surowicy (u osób zdrowych 2–135 ng.ml⁻¹), ale u chorych na mukowiscydozę (B r ü g g e n i in. 1988) jest obecny w dużo wyższym stężeniu (250–2500 ng.ml⁻¹). Zwiększony poziom CF-antygen (MRP-14) obserwuje się u osobników heterozygotycznych, którzy nie wykazują objawów chorobowych (12–380 ng.ml⁻¹). Oznaczenie poziomu tego białka w surowicy jest czulszym testem niż oznaczenie innych białek, np. związanych z aktywacją granulocytów, i może być testem na nosicielstwo genu mukowiscydozy.

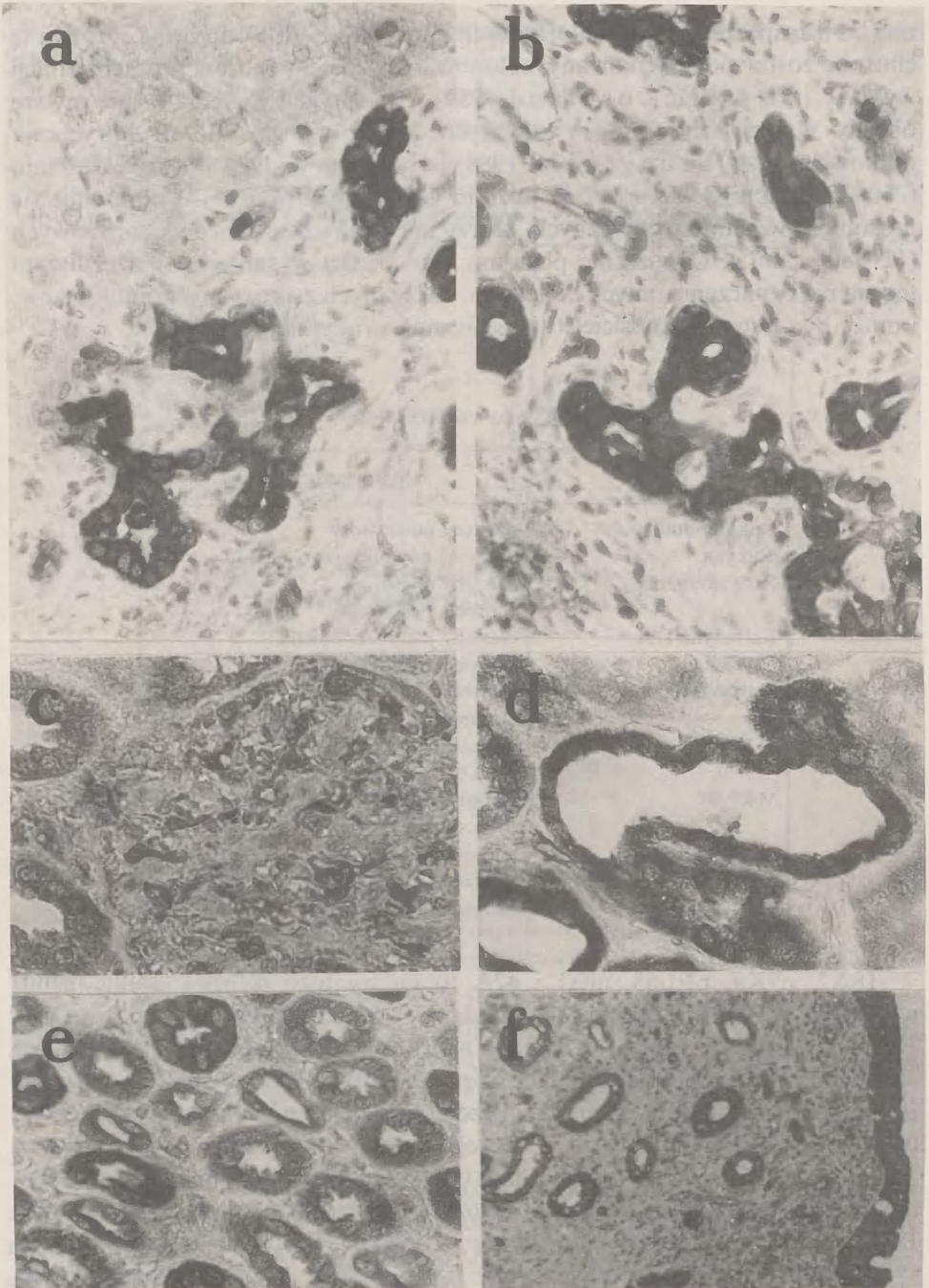
Tabela 6

CaBP jako markery chorób

Białko	Stan chorobowy
Onkomodulina	niektóre nowotwory
Sorcyna	komórki nowotworowe z MDR
Parwalbumina	choroby mięśni
	choroba Alzheimera
Kalbidyna D9k	choroby jelit, nadciśnienie
D 28k	choroba Alzheimera
Białko S-100	dystrofia
	czerniaki
	nowotwory nerki
	nowotwory mózgu
MRP-8	chroniczne stany zapalne,
	ostre stany zapalne
MRP-14/CF-Ag	mukowiscydoza
Kalcyklina	niektóre nowotwory
	marskość żółciowa

18A2, p9Ka, pEL68, mts1 i 42A to nazwy tego samego białka (genu) wykrytego w różnych komórkach i badanego przez różne grupy badaczy (zob. Tab. 2 i art. przegl. H i l t i K l i g m a n 1991). Białko kodowane przez ten gen wiąże wapń i jest indukowane przez różne czynniki. Niektóre z nich są związane ze stanami patologicznymi; np. zwiększoną syntezę tego białka obserwuje się po transformacji nowotworowej, a szczególnie w nowotworach wykazujących zdolność do przerzutów. Białko 18A2 występuje w różnych tkankach, ale jego największe stężenie jest w macicy i w łożysku ciężarnych myszy. Szczyt syntezy 18A2 obserwuje się w fazie S cyklu komórkowego (J a c k s o n - G r u s b y i n. 1987). Poliptyd p9Ka pojawia się w 10–15-krotnej ilości w mioepitelialnych komórkach ssaków po ich przekształceniu z macierzystych komórek epitelialnych (B a r r a c l o u g h i n. 1990).

Komórki pheochromocytoma PC12 wykazują właściwości chromafinowych komórek nadnerczy. Pod wpływem nerwowego czynnika wzrostu (NGF)



Rys. 5. Występowanie kalcykliny w wątrobie i nerce wyznaczane przy pomocy przeciwciał. (Komórki zawierające kalcyklinę mają ciemne zabarwienie). Oznaczenia: a i b — wątroba (marskość żółciowa); c-f — nerka (zdrowa), c — fragment kłębka; d — cewki w korze, e — cewki w rdzeniu, f — rdzeń i ściana miedniczki nerkowej

komórki te uzyskują właściwości sympatetycznych neuronów, czego wyrazem jest m.in. pojawienie się i wzrost neurytów (K l i g m a n i M a r s h a k 1985). Ten proces może być odzwierciedleniem indukowanego przez NGF procesu różnicowania embrionalnych neuroblastów. W czasie różnicowania się komórek PC12 pod wpływem NGF pojawiają się dwa białka wiążące Ca^{2+} , zwane 42A (mające 101 reszt aminokwasowych) i 42 C (identyczne z p11 podjednostką anneksyny II) mające 95 reszt aminokwasowych. Poziom mRNA 42C wzrasta 5-krotnie, a mRNA 42A — 25-krotnie (M a s i a k o w s k i i S h o o t e r 1988).

Kalcyklina to białko wiążące wapń (K u ź n i c k i i F i l i p e k 1987; K u ź n i c k i 1991), którego gen ulega ekspresji pod wpływem czynników wzrostowych (C a l a b r e t t a i i n. 1986). Normalnie występuje w fibroblastach i komórkach epithelialnych (K u ź n i c k i i i n. 1992). Zwiększony poziom mRNA kalcykliny (pojawiający się w fazie Go/S cyklu komórkowego) stwierdzono w ostrej białaczce szpikowej, w niektórych typach czerniaków (W e t e r m a n i i n. 1992), w neuroblastoma (T o n i n i i i n. 1991) i w nowotworze Hodgkina (G a b i u s i i n. 1989) (rys. 5). Ponadto kalcyklina okazała się identyczna z białkiem związanym z receptorem prolaktyny (M u r p h y i i n. 1989). Nie dziwi więc obserwacja T h o r d a r s o n a i i n. (1991), że kalcyklina jest wydzielana przez komórki doczesnej i stymuluje wydzielanie laktogenu II z trofoblastu. Jest to kolejny przykład białka z rodziny S-100, które występuje pozakomórkowo i wykazuje określoną aktywność biologiczną. Oznaczanie poziomu kalcykliny w tkankach lub w płynach ustrojowych może mieć znaczenie diagnostyczne. Ze względu na to, że kalcyklina występuje w fibroblastach, choroby związane z przerostem tkanki łącznej mogą być diagnozowane na podstawie wzrostu poziomu tego białka. Inne choroby, np. żółciowa marskość wątroby (którą cechuje zwiększona proliferacja komórek kanalików żółciowych), mogą być również w ten sposób diagnozowane (K u ź n i c k i i n. 1992).

ZAKOŃCZENIE

Oznaczanie występowania białek wiążących wapń oraz ich poziomu nie jest dotychczas stosowane rutynowo w celach diagnostycznych. Sytuacja ta może się niedługo zmienić, ponieważ coraz więcej danych wskazuje na to, że białka te mogą być markerami wielu stanów patologicznych.

Niektóre właściwości białek wiążących wapń czynią je szczególnie cennymi markerami: a) występują one tylko w pewnych tkankach i typach komórek i to w dużym stężeniu, b) ekspresja wielu z nich zależy od fazy cyklu komórkowego, c) występują głównie w cytoplazmie, d) niektóre są wydzielane na zewnątrz do płynów ustrojowych, e) nie ulegają szybkiej proteolizie. W najbliższych latach można oczekiwać nowych informacji na temat zastosowania białek wiążących wapń jako markerów stanów patologicznych.

CALCIUM BINDING PROTEINS AS MARKERS OF PATHOLOGICAL CONDITIONS

Summary

The distribution of calcium ion in eukaryota and its role in cellular functions are described in the introduction. Next chapter contains the information about calcium homeostasis under pathological conditions such as muscle dystrophy and tumorigenesis. Classification of calcium binding proteins and their general properties are summarized in the next chapter. Sorcin, oncomodulin, parvalbumin, calbindin and S-100 proteins are described in the relation to some pathological situations. Majority of information is focused on some members of S-100 proteins family such as S-100 alpha, S-100 beta, MRP-8 i MRP-14 (cystic fibrosis antigen), p9Ka and calyculin. These proteins seem to be potential markers of some diseases since they are: soluble, expressed in tissue- and cell-specific manner, excreted from cells, and resistant to proteolysis. It is suggested that some members of S-100 proteins family might become the clinically useful markers of some diseases.

LITERATURA

- Baimbridge K. G., Moody I., Miller J. J. — *Reduction of rat hippocampal calcium binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path and olfactory bulb kindling.* Epilepsia 26: 460–465, 1985.
- Barthe C., Carrere J. Figarella C., Guy-Crotte O. — *Isolation of the „Cystic Fibrosis Protein” from Serum.* Clin. Chem. 35: 1901–1905, 1989.
- Barracough R., Savin J., K., Rudland Ph. S. — *Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S-100, a calcium-binding protein.* J. Mol. Biol. 198: 13–20, 1987.
- Barracough R., Gibbs F., Smith J. A., Haynes G. A., Rudland Ph. S. — *Calcium-ion binding by the potential calcium-ion-binding protein, p9Ka.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 169: 660–666, 1990.
- Berchtold M. W., Epstein P., Beaudet A. L., Payne M. E., Heizmann C. W., Means A. R. — *Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene.* J. Biol. Chem. 262: 8696–8701, 1987.
- Berridge M. J. — *Cell signalling through cytoplasmic calcium oscillations. w „Experiments to Theoretical Models”,* Goldbeter A. (red.), Academic Press Limited, 449–459, 1989.
- Boynton A. L., Whitfield J. F. — *Different calcium requirements for proliferation of conditionally and unconditionally tumorigenic mouse cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1651–1654, 1986.
- Bruggen J., Tarcsay L., Cerletti N., Odink K., Rutishauser M., Hollander G., Sorg C. — *The molecular nature of cystic fibrosis antigen.* Nature 331: 570, 1988.
- Calabretta B., Venturelli D., Kaczmarek L., Narni F., Talpaz M., Anderson B., Beran M., Baserga R. — *Altered expression of G1-specific genes in human malignant myeloid cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1495–1498, 1986.
- Celis J. E. in. — *The MRC-5 human embryonal lung fibroblasts two-dimensional gel cellular protein database: Quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV40 transformed cells.* Electrophoresis 11: 1072–1113, 1990.
- Cittachini A., Bossi D., Dni A. M., Calviello G., Wolf F., Terranova T. — *Lack of effect of the Ca²⁺-ionophore A23187 on tumor cells.* Biochem. Biophys. Acta 645: 177–182, 1981.
- Clements M. R. Johnson L., Fraser D. R. — *A new mechanism for induced vitamin D deficiency in calcium deprivation.* Nature 324: 62–65, 1987.

- Fujita T. — *Aging and calcium metabolism*. [w] *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, Nishizuka Y. in., (red.), Raven Press, New York, 542–547, 1990.
- Gabius H. J., Bardosi A., Gabius S., Hellmann K. L., Karas M., Kratzin H. — *Identification of cell cycle-dependent gene product as a sialic acid-binding protein*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 506–512, 1989.
- Gerke V. — *Tyrosine protein kinase substrate p36: A member of the annexin family of Ca^{2+} (phospholipid-binding proteins)*. *Cell Motil. Cytoskel.* 14: 449–454, 1989.
- Gerke V., Johnson N., Weber K., — *Intestinal Ca^{2+} (lipid-binding proteins)*. [w] *Stimulus Response Coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins*, Smith V. L., Dedman J. R. (red.), CRS Press, Boston, 311–338, 1990.
- Gillen M. F., Banville D., Rutledge R. G., Narang S., Seligy V. L., Whitfield J. F., MacManus J. P. — *A complete complementary DNA for the oncodevelopmental calcium-binding protein, oncomodulin*. *J. Biol. Chem.* 262: 5308–5312, 1987.
- Grzelakowska-Sztabert B. — *Oporność wielolekowa komórek nowotworowych*. *Post. Bioch.* 35: 513–542, 1989.
- Haimoto H., Kato K. — *S100 (alfa-alfa) protein, a calcium binding protein is localized in the slow-twitch muscle fiber*. *J. Neurochem.* 48: 917–923, 1987.
- Hamada H., Okochi E., Oh-hara T., Tsuruo T. — *Purification of the Mr 22,000 Calcium-binding Protein (Sorcin) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies*. *Cancer Res.* 48: 3173–3178, 1988.
- Hazelton B. J., Tupper T. — *Intracellular ionic changes in normal and transformed human fibroblasts after extracellular Ca^{2+} deprivation*. *Biochem. J.* 194: 707–711, 1981
- Heizmann C. W. — *Molecular and functional aspects of some cytosolic calcium-binding protein*. NATO ASI 48, Calcium Transport and Intracellular, 1990.
- Heizmann C. W., Berchtold M. W. — *Expression of parvalbumin and other Ca^{2+} -binding proteins in normal and tumor cells: a topical review*. *Cell Calcium* 8: 1–41, 1987.
- Heizmann C. W., Braun K. — *Changes in Ca^{2+} binding in human neurodegenerative disorders*. *Trends in Neurosciences* (w druku).
- Heizmann C. W., Hunziker W. *Intracellular calcium-binding molecules*. [w] *Intracellular Calcium Regulation*, F. Bronner, (red.) Alan R. Liss, Inc., 211–247, 1990.
- Heizmann C. W., Schafer B. W. — *Internal calcium-binding proteins*. *Cell. Biol.* 1: 277–282, 1990.
- Hilt D. C., Kligman D. — *The S-100 protein family: a biochemical and functional overview* [w] *Novel Calcium Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications*, C. W. Heizmann (red.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1991, s. 65–104.
- Ichimiya Y., Emson P. C., Mountjoy C. Q., Lawson D. E. M., Heizmann C. W. — *Loss of calbindin immunoreactive neurons from the cortex in Alzheimer-type dementia*. *Brain Res.* 475: 156–159, 1988.
- Jackson-Grusby L. L., Swiergiel J., Linzer D. I. H. — *A growth-related mRNA in cultured mouse cells encodes a placental calcium binding protein*. *Nucl. Acid. Res.* 15: 6677–6690, 1987.
- Jakobs A. E. M., Benders A. D. A. G. M., Oosterhof A., Veerkamp J. H. van Mier P., Wevers R. A., Joosten E. M. G. — *The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy*. *Biochem. Biophys. Acta* 1096: 14–19, 1991.
- Jockusch H., Friedrich G., Zippel M. — *Serum parvalbumin, an indicator of muscle disease in murine dystrophy and myotonia*. *Muscle & Nerve* 13: 551–555, 1990.
- Kato K., Haimoto H., Ariyoshi Y., Horisawa M., Washida H., Kimura S. — *High levels of S-100 (alfa-alfa) protein in tumor tissues and in sera of patients with renal cell carcinoma*. *J. Canc. Res.* 78, 856–862, 1085.
- Kligman D., Marshak D. — *Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7136–7139.
- Koshland D. E., — *The cystic fibrosis gene story*. *Science* 245, 1029, 1989.
- Kuźnicki J. *Transport i funkeje jonów wapnia u Eukaryota*. *Kosmos* 37: 197–217, 1988.

- Kuźnicki J. — *Calcyclin — From gene to protein*. [w] *Novel Calcium Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications*. C. W. Heizmann (red.), Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 1991, s. 157–168.
- Kuźnicki J., Filipek A. — *Purification of a novel calcium-binding protein (10,5 kDa) from Ehrlich ascites tumour cells*. *Biochem. J.* 247: 663–667.
- Kuźnicki J., Kordowska J., Puzianowska M., Woźniewicz B.M. — *Calcyclin as a new marker of human epithelial cells and fibroblasts*. *Exp. Cell Res.* (w druku).
- Leranth C., Ribak C.E. — *Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: a possible key to this region's resistance to epileptic damage*. *Exp. Brain Res.* 85: 129–136, 1991.
- MacManus J.P., Whitfield J.F. — *Oncomodulin: A calcium-binding protein from Morris Hepatoma*. [w] "Calcium and cell function", IV Academic Press, Inc. 412–440, 1983.
- Masiakowski P., Shooter E.M. — *Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium-binding proteins in PC12 cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1277–1281, 1988.
- Mattson M.P., Rychlik B., Chu Ch., Christakos S. — *Evidence for calcium-reducing and excitotoxic roles for the calcium-binding protein calbindin-D28K in cultured hippocampal neurons*. *Neuron* 4: 41–51, 1991.
- Mayel-Afshar S., Lane S.M., Lawson D.E. — *Relationship between the levels of calbindin synthesis and calbindin mRNA in chick intestine*. *J. Biol. Chem.* 263: 4355–4361, 1988.
- Meyers M.B., Schneider K.A., Spengler B.A., Chang T.D., Biedler — *J.L. Sorcin (V19), a soluble acidic calcium-binding protein is overproduced in multidrug-resistant cells*. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2373–238, 1987.
- Morgan D.W., Welton A.F. — *Specific in vitro activation of Ca, Mg-ATPase by vitamin D-dependent rat renal calcium binding protein (calbindin D28K)*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 547–553, 1986.
- Moss S.E., Crumpton M.J. — *The lipocortins and the EF-hand evolution*. *TiBS* 15: 11–12, 1990.
- Murphy C.L., Murphy L.J., Tsuyuki D., Duckworth M.L., Shiu R.P.C. — *Cloning L. and characterization of a cDNA encoding a highly conserved, putative calcium binding protein, identified by an anti-prolactin receptor antiserum*. *J. Biol. Chem.* 263: 2397–2401, 1988.
- Nair S., Samy T.S.A., Krishan A. — *Calcium, calmodulin, and protein content of adriamycin-resistant and — sensitive murine leukemic cells*. *Cancer Res.* 46: 229–232, 1986.
- Odink K., Cerletti N., Bruggen J., Clerc R.G., Tarcsay L., Zwadlo G., Gerhards G., Schlegel R., Sorg C. — *Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis*. *Nature* 330: 80–82, 1987.
- Orrenius S., McConkey J.D., Bellomo G., Nicotera P. — *Role of Ca²⁺ in toxic cell killing*. *TiBS* 10: 281–284, 1989.
- Oshima T., Matsuura H., Matsumoto K., Kido K., Kajiyama G. — *Role of cellular calcium in salt sensitivity of patients with essential hypertension*. *Hypertension* 11: 703–707, 1988.
- Peterson C., Goldman J.E. — *Alternations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2758–2762, 1986.
- Rasmussen H. — *The complexities of intracellular Ca²⁺ signalling*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 191–204, 1990.
- Roberts De. W., Meyers M.B., Biedler J.L., Wiggins L.G. — *Association of sorcin with drug resistance in L1210 cells*. *Cancer Chemother. Pharm.* 23: 19–25, 1989.
- Schaffner W., Dambader M.A. — *Homeostaza wapnia*. *Sandoz Revue* 1: 41–48, 1989.
- Scotti A.L., Nitsch C. — *The perforant path in the seizure sensitive gerbil contains the Ca²⁺-binding protein parvalbumin*. *Exp. Brain. Res.* 85: 137–143, 1991.
- Shibuya S., Wakayama Y., Nakada H., Jimi T., Kato K. — *Serum S-100 protein level in myotonic dystrophy*. *Med. Sci. Res.* 15: 1055, 1987.

- Smith V., Kaetzel M.A., Dedman J.R. — Stimulus-response coupling: the search for intracellular calcium mediator proteins. *Cell regulation* 1: 165–172, 1990.
- Staun M., Jarnum S. — *Measurement of the 10 000 – Molecular weight calcium-binding protein in small-intestinal biopsy specimens from patients with malabsorption syndromes.*, 1988.
- Stuhlfauth I., Reininghaus J., Jockusch H., Heizmann C.W. — *Calcium-binding protein, parvalbumin, is reduced in mutant mammalian muscle with abnormal contractile properties.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4814–4818, 1984.
- Swierenga S.H., Whitfield J.F., Karasaki S. — *Loss of proliferative calcium dependence: Simple in vitro indicator of tumorigenicity.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6069–6072, 1978.
- Thordarson G., Southard J.N., Talamantes F. — *Purification and characterization of mouse decidua calyculin: a novel stimulator of mouse placental lactogen — II secretion.* *Endocrinology* 129: 1257–1265, 1991.
- Tonini G.P., Antonella C., Cara A., Di Martino D.Di. — *Inducible expression of calyculin, a gene with strong homology to S-100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell lines.* *Cancer Res.* 51: 1733–1737, 1991.
- Tsuruo T., Lida H., Kawabata H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. — *High calcium content of pleiotropic drug-resistant P388 and K562 leukemia and chinese hamster, ovary cells.* *Cancer Res.* 44: 5095–5099, 1984.
- Tupper T., Kaufman L., Bodine P.B. — *Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human WI 38 fibroblasts.* *J. Cell Physiol.* 104: 97–103, 1980.
- Van Eldik L.J., Jensen R.A., Ehrenfried B.A., Whetsell W.O. — *Immunohistochemical localization of S-100 in human nervous system tumors by using monoclonal antibodies with specificity for S-100 polypeptide.* *J. Histochem. Cytochem.* 8: 977–982, 1986.
- Walrers J.R.F., Howard A., Charpin M.V., Gniecko K.C. Brodin P., Thulin E., Forsen S. — *Stimulation of intestinal basolateral membrane calcium-pump activity by recombinant synthetic calbindin-D9K and specific mutants.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 603–608, 1990.
- Weterman M.A.J., Stoopen G.M., van Muijen G.N.P., Kuźnicki J., Ruiter D.J., Blomers H.P.J. — *Expression of calyculin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behaviour in nude mice.* *Cancer Res.* 52, 1291–1296, 1992.
- Zwadlo G., Bruggen J., Gerhards G., Schiegel R., Sorg C. — *Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues.* *Clin. Exp. Immunol.* 72: 510–515, 1988.

PAWEŁ POMORSKI

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

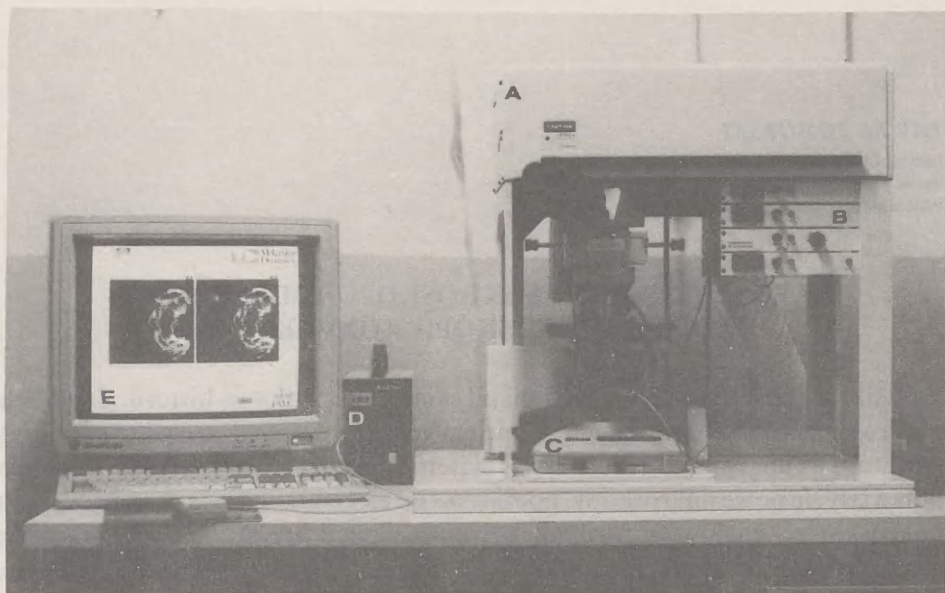
W POSZUKIWANIU MIKROSKOPU IDEALNEGO — RZECZ O MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

Mikroskopia towarzyszy biologii od samego początku jej historii. Znaczenie obserwacji mikroskopowej jest odbiciem nierozzerwalnego związku pomiędzy strukturą a funkcją elementów żywej materii. Wraz z rozwojem nauki i techniki pojawiały się nowe mikroskopy, począwszy od elektronowego, a skończywszy na mikroskopie tunelowym. Jednak dziś, po niemal trzystu latach, znaczenie mikroskopii optycznej nie tylko nie zmalało, ale w ostatnich piętnastu, dwudziestu latach przeżywa ona prawdziwy renesans.

Mikroskop pojawił się jako narzędzie do obserwacji niewidocznych gołym okiem struktur organizmu żywego. Jednak zarówno konstrukcja mikroskopu, jak i budowa większości organizmów, posiadały cechy czyniące z niego narzędzie niedoskonałe. Z jednej strony, mikroskop optyczny ma nieprzekraczalną zdolność rozdzielczą, nie jesteśmy więc w stanie dojrzeć obiektów mniejszych niż połowa długości fali światła oświetlającego preparat. Z drugiej strony, większość struktur biologicznych jest przezroczysta dla światła widzialnego i z tego powodu niewidoczna w mikroskopie. Z drugim problemem radzono sobie tworząc niezliczone procedury barwienia, ale wszystkie one były stosunkowo niespecyficzne, w jeszcze większym stopniu zmniejszały zdolność rozdzielczą obserwacji i w większości wymagały pracy z martwym, w znacznym stopniu zmienionym materiałem. Osiągnięcie granic ówczesnych możliwości, w połączeniu ze wzrostem znaczenia technik biochemicznych i pojawieniem się mikroskopu elektronowego, spowodowało, że mikroskop optyczny stawał się powoli przyrządem pomocniczym.

Dopiero na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych trend ten uległ gwałtownemu odwróceniu. Pojawienie się szeregu nowych metod, z immunocytochemią na czele, spowodowało powrót mikroskopii optycznej do dawnego znaczenia. Spowodowało również burzliwy rozwój nowych konstrukcji mikroskopów, którego ukoronowaniem jest laserowy skanujący mikroskop konfokalny — CLSM (ang. Confocal Laser Scanning Microscope) (rys. 1).

Zasada działania mikroskopu konfokalnego została zgłoszona do biura patentowego w 1957 roku przez Marviną Minsky'ego. Ale dopiero w 1987 roku pojawiły się na rynku jej pierwsze, w pełni zadowalające realizacje. Potrzebne

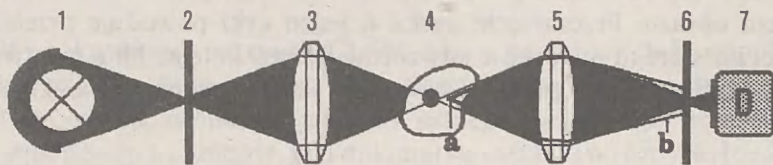


Rys. 1. Laserowy, skanujący mikroskop konfokalny Phoibos 100 firmy Molecular Dynamics wraz z konsolą sterującą nim komputera Personal Iris firmy Silicon Graphics. A — Moduł optyki konfokalnej, B — moduł sterowania detektorami i laserem, C — Mikroskop optyczny firmy Nikon, D — blok zasilający lampy rtęciowe do klasycznej mikroskopii epifluorescencyjnej i E — konsola komputera

było aż trzydzieści lat rozwoju technologii, aby to, najbardziej chyba zaawansowane technicznie urządzenie wykorzystywane w biologii, ujrzało światło dzienne. Jak pisze *Shinya Inoue* (1990), „niezwykle rzadko wprowadzenie nowego instrumentu wzbudza takie podniecenie wśród biologów jak w przypadku CLSM”. Niewiarygodnie czysty obraz, możliwość wykonywania skrawków optycznych przez grube preparaty, możliwość generowania obrazów będących pionowymi przekrojami przez obserwowany obiekt, tworzenie trójwymiarowych rekonstrukcji o nieosiągalnej dotąd rozdzielczości, czy wreszcie niespotykana dotąd dokładność pomiarów mikrofotometrycznych. To krótkie wyliczenie zalet CLSM tłumaczy dlaczego jest on często postrzegany jako nowy, idealny mikroskop (*Amos* 1988; *White* i in. 1987).

Niniejszy artykuł ma zapoznać czytelnika z możliwościami oferowanymi przez mikroskopię konfokalną, ale też przedstawić ograniczenia, które są nałożone na tę, tak jak na każdą inną, metodę badawczą. Celem moim jest takie pokazanie tej techniki, by ułatwić ewentualną decyzję o wykorzystaniu CLSM do konkretnych badań w szeroko pojętym zakresie biologii komórki, ze szczególnym zwróceniem uwagi na badania cytoszkieletu i zjawiska lokomocji komórek, co wynika z osobistych zainteresowań autora.

Konstrukcja mikroskopu Minsky'ego była bardzo prosta (Inoue 1990) (rys. 2). Tradycyjny kondensator został zastąpiony układem optycznym identycznym jak obiektyw. Pomiedzy źródłem światła a kondensorem, na osi optycznej przyrządu, umieszczono przesłonę o bardzo małym otworze (ang. pinhole). Zmniejszony obraz tej przesłony był rzutowany na preparat przez kondensator. Pole widzenia obiektywu było ograniczone przez drugą, bliźniaczą przesłonę umieszczoną symetrycznie do pierwszej i oddzielającą obiektyw do fotodetektora. Tak więc obie przesłony oraz punkt na obserwowanej płaszczyźnie obiektu były umieszczone w ogniskach dwóch układów optycznych, przy czym ognisko znajdujące się w polu obserwacji było wspólne dla obiektywu i kondensora. Przesłony były współogniskowe, czyli konfokalne, z płaszczyzną obserwacji i stąd pochodzi nazwa całego układu optycznego. Na skutek takiej konstrukcji, na detektor był rzutowany obraz jednego punktu z jednej płaszczyzny, tym precyzyjniej im mniejsze było światło przesłony. Obrazy punktów leżących poza poziomem ostrości nie były w płaszczyźnie przesłony punktami lecz miały charakter powierzchniowy. W związku z tym większość tworzącego je światła była odcinana i nie docierała do fotodetektora. Jeśli teraz obiekt przesuwano i rejestrowano kolejne stany detektora, możliwe było odtworzenie punkt po punkcie obrazu jednej, wyciętej spośród innych, warstwy preparatu z niespotykaną dotąd czystością obrazu.



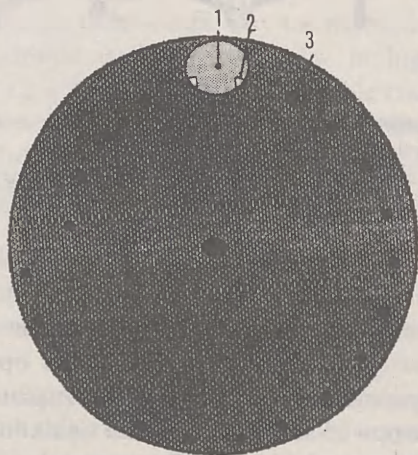
Rys. 2. Schemat najprostszego mikroskopu konfokalnego. 1 — źródło światła, 2 — przysłona tworząca plamkę oświetlającą, 3 — kondensator, 4 — obiekt obserwowany, 5 — obiektyw, 6 — przysłona odcinająca światło pochodzące spoza płaszczyzny ostrości, 7 — detektor, a — punkt w preparacie leżący poza płaszczyzną ostrości, b — wiązka światła wychodząca z punktu, a jest zatrzymywana przez przysłonę

Realizacja mikroskopu Minsky'ego napotkała na dwie trudności. Pierwszą była konieczność bardzo dokładnego zestawienia optyki, tak aby kondensator i obiektyw były współogniskowe. problem ten znacznie wzrastał, jeśli chciano zastosować zmienne powiększenie, co wiązało się z koniecznością jednoczesnego zmieniania kondensora i obiektywu. Druga trudność to przesuw preparatu. Dokładność ruchu stolika musiała być porównywalna ze zdolnością rozdzielczą mikroskopu, przy jednoczesnym dużym zasięgu ruchu i praktycznej, czyli niezbyt małej prędkości przesuwu.

Pierwszy problem rozwiązano dość szybko, rezygnując ze światła przecho-

dzącego przez preparat na rzecz konstrukcji mikroskopu z epiiluminacją. W tym systemie oświetlenia obiektyw jest jednocześnie kondensorem, co w sposób naturalny typuje go jako bazę konstrukcyjną dla mikroskopu konfokalnego. Decyzja ta ograniczyła jednak zastosowanie mikroskopii konfokalnej do metod, które wykorzystują epiiluminację, czyli, przede wszystkim do epifluorescencji oraz mikroskopii światła odbitego. Rezygnacja w mikroskopii konfokalnej ze światła przechodzącego nie była wbrew pozorom aż tak bolesna jakby się na pierwszy rzut oka wydawało. Głębina ostrości uzyskiwana w konwencjonalnym mikroskopie wyposażonym w kontrast DIC Nomarskiego jest porównywalna z tą, uzyskiwaną w mikroskopie konfokalnym (I n o u e 1988). Jeśli połączymy w jednym przyrządzie CLSM z kontrastem Nomarskiego, co można zrobić (H o o k i O d e y a l e 1989), to powinniśmy zaspokoić każde wymagania, nawet najwybredniejszego użytkownika.

Drugi problem okazał się dużo trudniejszy. Do dziś nie udało się skonstruować zadowolającego systemu przesuwu stolika, chociaż i tu obserwujemy ogromny postęp. W 1967 roku nastąpiła pierwsza próba obejścia trudności z poruszaniem obiektu przez wprowadzenie w ruch rzutowanej nań plamki światła. Próby tej dokonał Mojmir Petráň z Pragi konstruując konfokalny mikroskop tandemowy (K i n o 1990). Podstawą tego mikroskopu jest dysk Nipkowa (rys. 3), nazwany tak od nazwiska jego konstruktora Paula Nipkowa, niemieckiego studenta, który zbudował go w roku 1884 jako urządzenie do telegraficznego przekazu obrazu. Przesunięcie dysku o jeden cykl powoduje przejście przed detektorem szeregu otworków odwzorowujących kolejne linie przetwarzanego obrazu. Jeśli na dysku znajduje się jeden zestaw otworów, to cykl jest równy



Rys. 3. Zasada działania dysku Nipkowa. 1 — obraz rzutowany na powierzchnię dysku, 2 — otwór, przez który część światła pochodzącego z obrazu przechodzi w stronę obserwatora, 3 — następny otwór w dysku. Po przejściu otworu 2 przez obraz wejdzie nań otwór 3 i będzie odwzorowywał następną linię

obrotowi dysku, jeśli zestawów jest więcej, to na jeden obrót przypada wiele cykli. Na dysku stosowanym w tandemowym mikroskopie konfokalnym znajduje się parzysta liczba zestawów otworów. Połowa z nich służy jako przesłony dla wiązki oświetlającej, pozostałe — dla światła pochodzącego z preparatu. Przy odpowiednio dużych obrotach dysku uzyskujemy obraz charakterystyczny dla mikroskopu konfokalnego. Nadaje się on do bezpośredniej obserwacji, bez konieczności używania detektora i dalszego przetwarzania sygnału elektronicznego (Boyd i in. 1990; Sheppard i Wilson 1981). Pozwala to na dokonywanie obserwacji w czasie rzeczywistym. Ostatnio Gordon Kino (Kino 1990) z Uniwersytetu w Stanford zmodyfikował tę konstrukcję tak, że wystarczy jeden zestaw otworów, przez które światło przechodzi w obie strony (Wilson+ /1989). Podstawowe problemy, które powstają przy wykorzystaniu dysku Nipkowa w praktyce, to konieczność bardzo dokładnego wykonania samego dysku i jego bardzo precyzyjne ustawienie w wiązce światła, połączone ze znaczną szybkością wirowania. Dysk taki ma około 200 000 precyzyjnie umieszczonych otworów i kręci się z prędkością około 2000 obrotów na minutę. Tak precyzyjna mechanika bardzo podnosi koszty urządzenia. Drugim jeszcze większym problemem jest to, że dysk znacznie redukuje ilość światła, która najpierw pada na preparat, a potem dochodzi do obserwatora. Problemy te spowodowały, że tandemowe mikroskopy konfokalne, mimo swej dwudziestoletniej obecności na rynku, nigdy nie znalazły szerszego zastosowania.

W 1987 roku wszedł na rynek CLSM, który zyskał już dużą popularność i wszystko wskazuje, że jest konstrukcją, która wreszcie zadowolili użytkowników. Nie jest on wynikiem jakiegoś jednego, genialnego pomysłu, lecz wykorzystuje postęp techniczny, jaki dokonał się ostatnio w różnych dziedzinach od optyki po elektronikę (Inoue 1990; Wilson 1989).

Wyróżniającą cechą CLSM jest zastosowanie lasera jako źródła światła. Wykorzystanie spójnego światła laserowego pozwoliło na rezygnację z przesłony poprzedzającej kondensor. Wiązka światła laserowego może być odchylana i w ten sposób omiata ona pole widzenia tworząc obraz bez konieczności poruszania preparatu. W odróżnieniu od plamki oświetlającej otrzymywanej przy użyciu przesłony, która zatrzymuje znaczną część padającego na nią światła, wiązka lasera ma dużą jasność i daje czyste, jasne obrazy. Po przejściu przez układ odchylający wiązka laserowa trafia na okular, a potem na obiektyw, będący jednocześnie kondensorem. Obiektywy używane w CLSM mają aperturę numeryczną rzędu 1,4, co daje jednocześnie bardzo dużą rozdzielczość i duże pole widzenia (Keller 1990). Dopiero światło powracające z preparatu przez obiektyw jest rzutowane na przesłonę konfokalną i uwolnione przez nią od zakłóceń, pochodzących spoza obserwowanej płaszczyzny, dociera do detektora. Dostępne na rynku konstrukcje pozwalają na jednoczesne wykorzystanie dwóch detektorów rejestrujących świecenie dwóch barwników (Mossberg i Ericsson 1990).

Zdolność rozdzielcza mikroskopu, rozumiana jako najmniejsza odległość pomiędzy obserwowanymi obiektami, przy której w mikroskopie powstaną ich odrębne obrazy, zależy od dwóch czynników: długości światła i własności optycznych układu. Determinuje ona minimalny rozmiar piksela i wyraża się wzorem:

$$\text{Zdolność rozdzielcza} = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

gdzie λ — długość światła, n — współczynnik załamania światła substancji w której znajduje się oglądany obiekt, α — połowa kąta widzenia obiektywu.

W mikroskopie konfokalnym równie istotny jest najmniejszy odstęp między kolejnymi skrawkami optycznymi. Wielkość ta ma podobne własności co zdolność rozdzielcza mikroskopu i wyraża się wzorem:

$$\text{Minimalny odstęp} = \frac{1}{2} \times \frac{\lambda}{4 n \sin^2 \frac{\alpha}{2}}$$

W praktyce można wykorzystać wzory uproszczone:

$$\text{Zdolność rozdzielcza} = \frac{0,46 \lambda}{\text{N.A.}}$$

$$\text{Minimalny odstęp} = \frac{1,4 \eta \lambda}{\text{N.A.}^2}$$

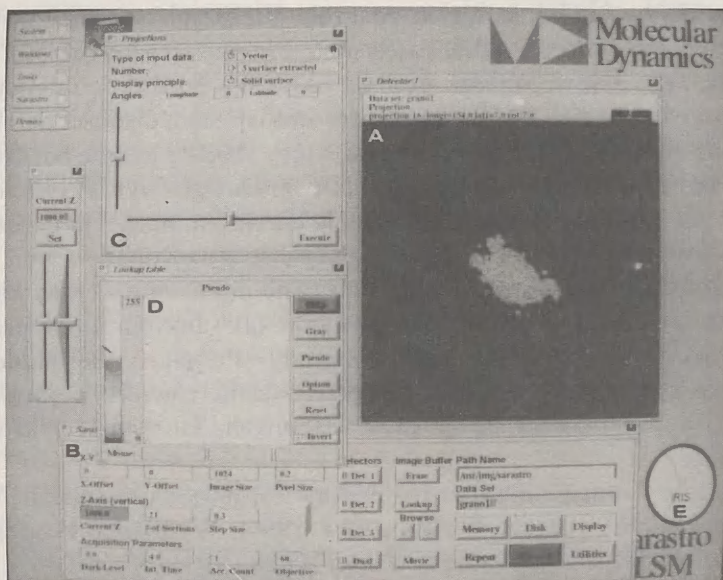
gdzie N.A. — liczba aperturowa obiektywu.

[Wzory uproszczone za Molecular Dynamics]

Integralną częścią takiego mikroskopu jest komputer (rys. 4), który z jednej strony steruje mechaniką odchylenia wiązki i pionową pozycją preparatu, z drugiej zaś zbiera obrazy z detektorów i wyświetla je na ekranie. Ten sam komputer pozwala na dalszą obróbkę otrzymanych obrazów, łącznie z tworzeniem rozmaitych projekcji i rekonstrukcji trójwymiarowych.

Wszystko to razem tworzy instrument dość skomplikowany i stosunkowo kosztowny (cena CLSM wynosi powyżej 200 000\$) jednak jego możliwości sprawiają, że staje się coraz powszechniejszy. (Obecnie wiele firm oferuje swoje rozwiązania CLSM. Wszystkie konkretne odniesienia do konstrukcji mikroskopu lub oprogramowania, które czytelnik napotka w dalszej części tego artykułu, będą dotyczyły mikroskopu Phoibos 1000 firmy Molecular Dynamics (dawniej Sarastro).

W praktyce CLSM najczęściej wykorzystuje się jako mikroskop fluorescencyjny. Od tego też zastosowania rozpoczniemy opis jego możliwości. Podstawową metodą mikroskopii fluorescencyjnej (Ploem 1989), stosowaną w biologii, jest immunofluorescencja. Polega ona na znakowaniu poszczególnych białek w komórkach i tkankach za pomocą specyficznych dla nich przeciwciał. Przeciwciała te są sprzęgnięte z barwnikami fluorescencyjnymi,



Rys. 4. Interfejs użytkownika CLSM Phoibos 1000. Widoczne okna tworzone są przez graficzny system operacyjny IRIX, zbliżony do systemu UNIX. Widoczne: A — okno z obrazem, B — okno sterowania mikroskopem, C — okno sterowania programem tworzącym projekcje obrazów trójwymiarowych. D — okno regulacji kontrastu oraz E — zegar

świecącymi światłem wzbudzonym, co pozwala na ich obserwację. Zastosowanie CLSM podnosi jakość otrzymywanych obrazów i pozwala obserwować rozkład barwionego epitopu w trzech wymiarach. W celu określenia tego rozkładu możemy posłużyć się serią przekrojów przez obserwowany preparat, jak również, o czym będzie mowa w dalszej części artykułu, stworzyć projekcję trójwymiarowej rekonstrukcji całego preparatu w zadanej perspektywie. Często użyteczna jest możliwość wykonania pionowego przekroju przez obiekt, wzdłuż płaszczyzny prostopadłej do płaszczyzny zazwyczaj obserwowanej. Przygotowanie preparatu dla potrzeb CLSM jest bardzo podobne do przygotowywania preparatów do tradycyjnej mikroskopii immunofluorescencyjnej. Występują jednak pewne drobne różnice. Najważniejszą jest rezygnacja z wszelkich praktyk mających na celu spłaszczenie preparatu. Są one nie tylko niepotrzebne, ale wręcz szkodliwe, gdyż uniemożliwiają zachowanie nie zmienionej, trójwymiarowej struktury obserwowanego obiektu. Korzystając z mikroskopu konfokalnego należy chronić preparat przed przypadkowym zgnieciem przez szkiełko przykrywkowe, na przykład używając odpowiedniej wielkości koralików szklanych lub ziaren sephadex'u wprowadzonych pomiędzy szkiełko przed zamknięciem preparatu. Następną różnicą jest wynikiem bardzo dobrego tłumie-

nia światła pochodzącego spoza płaszczyzny obserwacji mikroskopu konfokalnego. Pozwala ono na stosowanie znacznie większych stężeń barwnika niż w tradycyjnym mikroskopie, gdzie świecenie spoza płaszczyzny ostrości utrudnia rozróżnianie szczegółów. Wyższe stężenie barwnika powoduje intensywniejsze świecenie preparatu, a to z kolei umożliwia zmniejszenie czułości detektora, co powoduje zmniejszenie szumów w obrazie, który staje się jeszcze bardziej czysty i bardziej kontrastowy niż by to wynikało z samego wykorzystania efektu konfokalnego. Aby osiągnąć wyższe stężenie barwnika, należy podczas przygotowywania preparatu zastosować wyższe stężenie sprzężonego z nim przeciwciała. Na ogół stężenie to jest około czterdzieści do pięćdziesięciu razy większe niż w metodzie tradycyjnej. Niestety stosowanie tak dużych ilości przeciwciał w znacznym stopniu podnosi koszty metody. Preparaty barwione niskim stężeniem sprzężanego z barwnikiem przeciwciała również dają poprawne obrazy i doskonale nadają się do prac wstępnych, których wyniki nie będą publikowane.

Przy zastosowaniu CLSM bardzo istotny jest dobór używanego barwnika fluorescencyjnego (Tsien i Waggoner 1990). Wynika to z ograniczonej ilości pasm chromatycznych, jakie daje laser (Grattoni van de Ven 1990). W normalnym mikroskopie fluorescencyjnym źródłem światła jest lampa rtęciowa, produkująca światło o wszystkich długościach fali, jakie wykorzystuje się w mikroskopii fluorescencyjnej. Różne długości mają w jej widmie różne natężenia, ale w zasadzie wszystkie możemy wykorzystać do wzbudzenia barwnika. W przypadku lasera jest inaczej. Laser emituje światło tylko w określonych pasmach częstotliwościowych, czyli o wąskich przedziałach długości fali. Światło o pośrednich długościach fali nie jest emitowane. W mikroskopie Phoibos 1000 (podobnie jak w większości innych dostępnych na rynku) zastosowany jest laser gazowy (argonowy) o niskiej mocy w trzech pasmach: 457 nm, 488 nm i 514 nm. Odpowiadają one mniej więcej światłu: fioletowemu, niebieskiemu i zielonemu. Używane barwniki muszą być tak dobrane, by długości fali wzbudzającego je światła odpowiadały długościom dostępnym w pasmach lasera. Laser jest tak wybrany, aby pokrywać długość fali wzbudzającej najpopularniejszy barwnik fluorescencyjny, izotiocyjanian fluoresceiny, którego maksimum absorpcji znajduje się w pobliżu 488 nm (Tsien i Waggoner 1990). Powoduje to jednak bardzo słabe wzbudzenie drugiego bardzo popularnego barwnika, izotiocyjanianu tetrametylrodamin (TRITC), którego maksimum absorpcji, zlokalizowane koło 550 nm (Tsien, Waggoner 1990), jest tak odległe od długości fali wzbudzającej, że barwnik świeci z bardzo zredukowaną intensywnością. Nakłada się na to fakt, że linia 514 nm jest najslabszą linią lasera. W sumie świecenie rodamin jest słabe i jeśli istnieje taka możliwość, należy użyć innego barwnika. Najlepiej do tego nadaje się R- fokoerytryna, wzbudzana przy 488 nm (Tsien i Waggoner 1990). Jej użycie jest bardzo dogodne, jeśli chcemy obserwować preparat podwójnie barwiony przy użyciu dwóch detektorów. Sprzyja temu wspólna z fluoresceiną długość fali światła

wzbudzającego. Barwnik ten ma jednak znaczną wadę. Na rynku jest znacznie mniej sprzęganych z nim przeciwciał niż sprzęganych z TRITC. Ma to szczególne znaczenie przy wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych, gdzie przeciwciała wtórne, przeciw mysim immunoglobulinom, pochodzące od jednego producenta, mogą dawać bardzo słabą lub nie dawać wcale reakcji z pierwotnym, mysim, przeciwciałem pochodzącym od drugiego producenta. W takich sytuacjach użycie TRITC jest możliwe, choć uzyskane efekty mogą odbiegać od oczekiwań.

Oprócz immunocytochemicznego, możliwe jest też bezpośrednie barwienie struktur komórkowych barwnikami fluorescencyjnymi. W ostatnich latach stworzono cały zestaw sond chemicznych, specyficznych dla różnych organelli komórkowych. Barwniki te, przy stosunkowo niskiej szkodliwości omiatającego światła laserowego, pozwalają przyżyciowo barwić poszczególne struktury wewnątrz komórki. Do barwienia mitochondriów można wykorzystać rodaminę 123 wzbudzoną przy 505 nm pasmem zielonym (H a u g l a n d 1989). Mniej specyficznie, ale stosunkowo precyzyjnie, można barwić siateczkę śródplazmatyczną używając karbocyjaniny DiOD₆, wzbudzanej przy 484 nm pasmem niebieskim (H a u g l a n d 1989). Cała rodzina innych karbocyjanin (głównie DiOC₁₆ i DiOC₁₈) bardzo wydajnie barwi wszystkie struktury błoniaste w komórce. Spośród nich DiOC₁₈, wzbudzająca się przy 484 nm, dobrze nadaje się do użycia w CLSM (H a u g l a n d 1989). Specyficzną sondą dla aparatu Golgiego jest ceramid kwasu NBD dodekanowego, wzbudzany pasmem niebieskim przy 481 nm (C o o p e r i n. 1990). Trudniejsze jest znakowanie jądra komórkowego. Większość popularnych barwników znakujących DNA, takich jak oranż akrydyny, DAPI czy barwniki z grupy Hoechst, wymagają wzbudzenia w zakresie ultrafioletu i nie nadają się do wykorzystania w mikroskopii konfokalnej. Pozostaje tylko bromek etydyny, który barwi zarówno DNA, jak i RNA, co może zaciemniać obraz. Jego zaletą jest to, że wzbudzając się podobną długością fali co FITC (482 nm) może być również wykorzystany do wizualizacji jądra w obserwacji preparatów przygotowanych immunocytochemicznie (H a u g l a n d 1989). Coraz częściej pojawiają się prace wykorzystujące barwienie jądra metodami *in situ* hybrydyzacji z fluorescencyjnymi sondami (v a n D e k k e n i n. 1990).

Opisane dotąd barwniki służą do tworzenia statycznych obrazów struktury badanych obiektów. W ostatnich latach otrzymano również całą grupę barwników pozwalających określać fizjologiczny stan komórki. Najpowszechniej używane barwniki z tej grupy to sondy molekularne pozwalające określać wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapniowych. Najdoskonalsza z tych substancji, Fura 2, nie nadaje się do wykorzystania w CLSM, ponieważ wymaga wzbudzenia światłem ultrafioletowym. Do wykorzystania w tej metodzie nadaje się jednak inny barwnik, Fluo-3. Maksimum jego absorpcji przypada na 505 nm, zaś wydajność kwantowa waha się od 0,0051 przy niskim stężeniu jonów Ca²⁺ do 0,183 przy wysokim stężeniu Ca²⁺, pozwalając precyzyjnie określać względne różnice stężeń wapnia (H a u g l a n d 1989). Największą wadą Fluo-3 jest to, że

w odróżnieniu do Fura 2, zmianie indukowanej przez jony wapnia ulega tylko jeden parametr z charakterystyki barwnika. Niemożliwe jest więc określenie dokładnego stężenia Ca^{2+} , jeśli nie znamy stężenia samej sondy, a wyznaczenie stężenia barwnika wewnątrz komórki jest praktycznie niewykonalne. Teoretycznie istnieje możliwość, że jego rozkład w cytoplazmie jest nierównomierny, a to w sposób zasadniczy rzutowałoby na otrzymane wyniki. Mimo tych wad wykorzystuje się barwnik Fluo-3 i mikroskop konfokalny do określania zmian stężenia Ca^{2+} na niewielkich obszarach, a to z przyczyn, które szczegółowo omówimy przy okazji opisu parametrów czasowych pracy CLSM (Niggli i Lederer 1990). Podobnie jak z sondą określającą wewnątrzkomórkową pH, z użyciem fluoresceiny BCECF. Barwnik ten, podobnie jak Fura 2, należy do grupy pozwalającej na bezwzględne określenie stężenia badanej substancji na podstawie wyznaczania stosunku intensywności świecenia wzbudzanego dwoma długościami fali. Laser argonowy niskiej mocy, stanowiący źródło światła w CLSM, pozwala na wzbudzenie fluoresceiny BCECF tylko w jednej z tych długości, 490 nm. Istnieje więc tu ten sam problem co w przypadku oznaczania stężenia wapnia za pomocą Fluo-3 (Haugland 1989).

Wada oświetlenia laserowego, jaką jest dyskretny charakter jego widma, w jednym przypadku stanowi pewne ułatwienie. W tradycyjnej mikroskopii fluorescencyjnej preparaty podwójnie barwione wymagają osobnej obserwacji dla każdego barwnika. Z uwagi na ciągłość widma emisji lampy rtęciowej, za każdym razem musimy wycinać (za pomocą filtrów) wąski jego wycinek w celu wzbudzenia barwnika. W przeciwnym razie światło emitowane przez ten barwnik zostałoby całkowicie zagłuszone przez odbite od preparatu światło wzbudzające o tej samej długości fali. W przypadku lasera, jeśli tylko długości światła emitowanego przez barwniki nie pokrywają się z żadnym z jego pasm aktywnych, możemy oświetlić preparat wiązką niefiltrowaną. Emituje on wtedy światło pochodzące z obu barwników, które możemy skierować na dwa detektory i rozdzielić za pomocą odpowiednich filtrów barierowych. Pozwala to na jednoczesną obserwację obu barwników, co jest szczególnie istotne przy barwieniach przyżyciowych, gdzie obraz preparatu zmienia się w czasie (Mossberg i Ericsson 1990).

Oprócz wykorzystania technik fluorescencyjnych, CLSM pozwala na pracę z użyciem światła odbitego. Ten typ oświetlenia pozwala na oglądanie preparatów znakowanych złotem koloidalnym (White i in. 1989). Jest to użyteczna technika, jeśli chcemy połączyć mikroskopię świetlną z elektronową. Możemy wtedy obejrzeć przygotowany preparat w niskich powiększeniach mikroskopu optycznego i następnie, po zatopieniu w żywicy, badać jego ultrastrukturę w mikroskopie elektronowym. Powiązanie tych dwóch technik jest szczególnie obiecujące w badaniach morfologii cytoszkieletu.

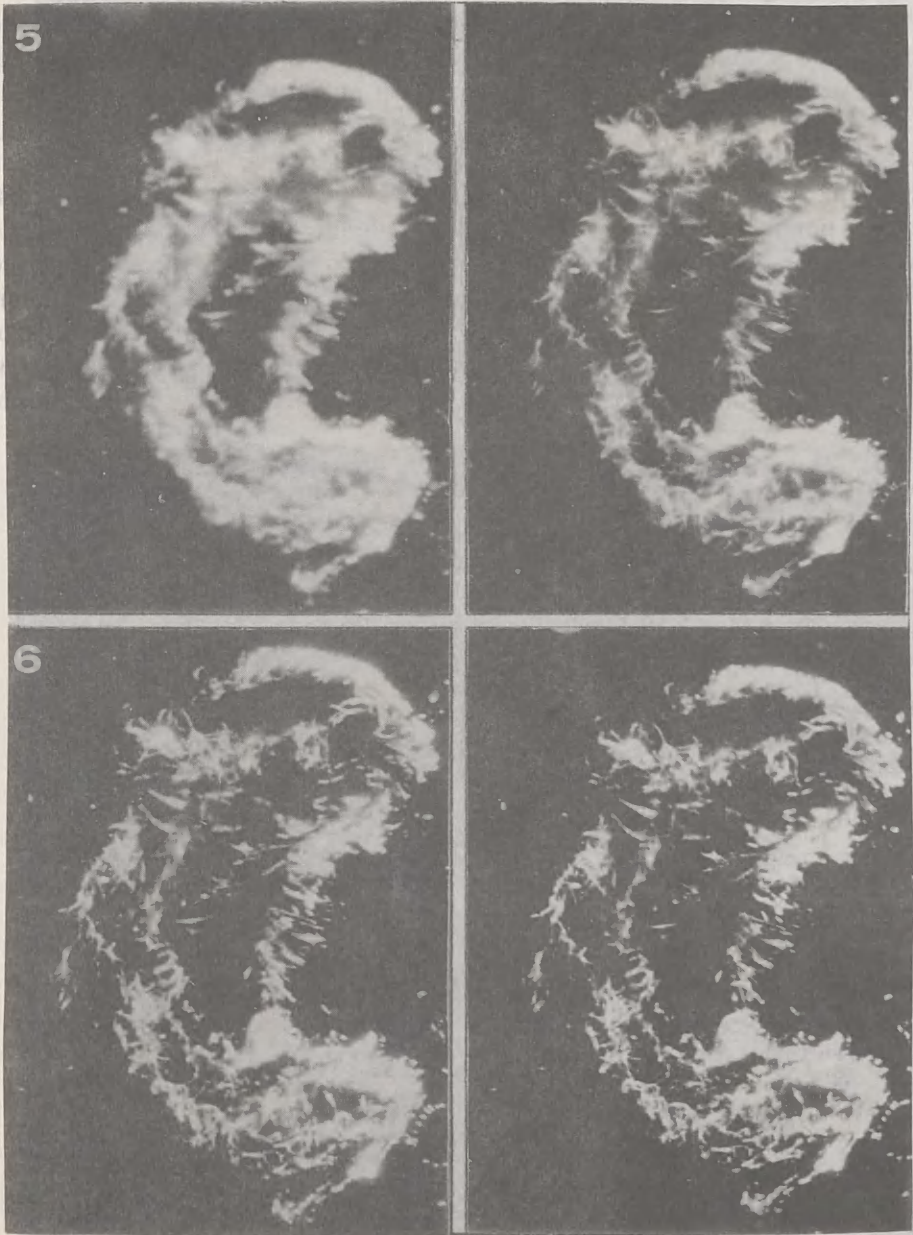
Wspomniano już, że CLSM jest szczególnie użyteczny do przyżyciowego badania układów dynamicznych. Jest to wynikiem małej, w porównaniu z pełnym oświetleniem przez tradycyjną lampą rtęciową, szkodliwości omiatają-

cej wiązki laserowej. Istnieje jednak poważne ograniczenie tej metody, jakie stanowi jej rozdzielczość czasowa. Często nie zdajemy sobie sprawy, że każda obserwacja w konwencjonalnym mikroskopie optycznym przebiega w czasie rzeczywistym, czyli cały czas możemy obserwować całą powierzchnię obiektu. W przypadku CLSM jest inaczej. Kolejne punkty obrazu są obserwowane po kolei. Mimo że prędkość omiatania wiązki jest stosunkowo duża, to jednak zebranie pojedynczego obrazu wymaga pewnego czasu. W zależności od wielkości obserwowanego pola czas ten jest zmienny i wynosi od około 1 sekundy dla pola 64 na 64 piksele do około 20 sekund dla pola 1024 na 1024 piksele. Obserwowany proces musi być na tyle powolny, by w ciągu czasu potrzebnego do zebrania jednego obrazu nie zaszły istotne zmiany. W przeciwnym razie w jednym obrazie będą reprezentowane w różnych miejscach różne etapy zjawiska. Uniemożliwia to rejestrację szybko poruszających się komórek, intensywnych strumieni cytoplazmatycznych i innych szybkich procesów. W tych przypadkach trzeba użyć tradycyjnych mikroskopów optycznych lub, jeśli musimy wykorzystać efekt konfokalny — mikroskopu tandemowego, z rejestracją obrazu techniką video. Uzyskiwana wtedy rozdzielczość czasowa jest 50 razy większa i wynosi około 20 ms. Od tej reguły jest jeden wyjątek. Konstrukcja CLSM umożliwia osiągnięcie rozdzielczości czasowej lepszej niż przy użyciu magnetowidu, jeśli zrezygnujemy z odtwarzania całego obrazu na rzecz obserwacji jednej linii biegnącej przez preparat. Wynika to z tego, że wiązka lasera w mikroskopie konfokalnym jest odchylana przez dwa lustra, tak zwane lustro szybkie, obracane galwanometrycznie, i lustro wolne, sterowane mechanicznie. Jeżeli zrezygnujemy z lustra wolnego i będziemy omiatać jedną linię za pomocą lustra szybkiego, możemy uzyskać czas rejestracji linii rzędu 8 ms, czyli znacznie lepszy niż w przypadku techniki video. Dalsze przyspieszenie rejestracji jest niemożliwe ze względu na konieczność zachowania pewnego, minimalnego czasu całkowania prądu z fotodetektora, by uzyskać odpowiedni odstęp sygnału od szumów. Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do badania szybkich zmian poziomu wapnia w komórkach mięśniowych (Niggli i Lederer 1990).

W tradycyjnej mikroskopii optycznej uzyskanie obrazu kończy pracę. W przypadku CLSM jest inaczej. Dalsza obróbka cyfrowa surowego obrazu stanowi integralną część procesu obserwacji. W odróżnieniu od obrazu uzyskanego inną metodą, na przykład fotograficznie, którego struktura jest ciągła, już pierwotny wynik pracy mikroskopu konfokalnego ma charakter cyfrowy. Obraz taki jest nieciągły, to znaczy składa się z określonej liczby punktów, zwanych pikselami, dla których określona jest jasność. Ich duża ilość zapewnia złudzenie płynności zmian szarości w obrazie (Webb i Dorey 1990). Obraz taki, zwany inaczej rastrowym, bardzo dobrze poddaje się różnym manipulacjom. Możemy swobodnie dobierać formę prezentacji, używając skali szarości, by obraz przypominał zdjęcie czarno-białe, decydować się na jego zabarwienie, tak by wyglądał jak naturalne świecenie danego barwnika (lub arbitralnie

wybranego jakiegokolwiek innego np. obraz uzyskany z preparatu barwionego fluoresceiną możemy przedstawić jako czerwone świecenie rodaminą), czy wreszcie zastosować kodowanie tak zwanym pseudokolorem. Ta ostatnia metoda polega na arbitralnym przypisaniu jakiegoś koloru do każdej wartości jasności obrazu czarno białego. Powstaje kolorowa mapa jasności, bardzo praktyczna gdy jasność ta odpowiada na przykład stężeniu wapnia w danym miejscu komórki. Taka obróbka może dotyczyć także większej liczby obrazów. Na przykład, znając siłę, z jaką fluoresceina świeci w pasmie rodaminą i odwrotnie, możemy dokonać ostatecznej separacji obrazów preparatu podwójnie barwionego. Możemy też oczywiście dwa takie obrazy zakodować właściwymi im kolorami i nałożyć na siebie. Jeśli obraz jest słaby, możemy dokonać cyfrowego wzmocnienia kontrastu, tak by był dobrze widoczny. Jeśli jest zaś zakłócony szumami na skutek konieczności używania bardzo czułego detektora, możemy dokonać jego liniowej filtracji zmniejszając ten niekorzystny efekt.

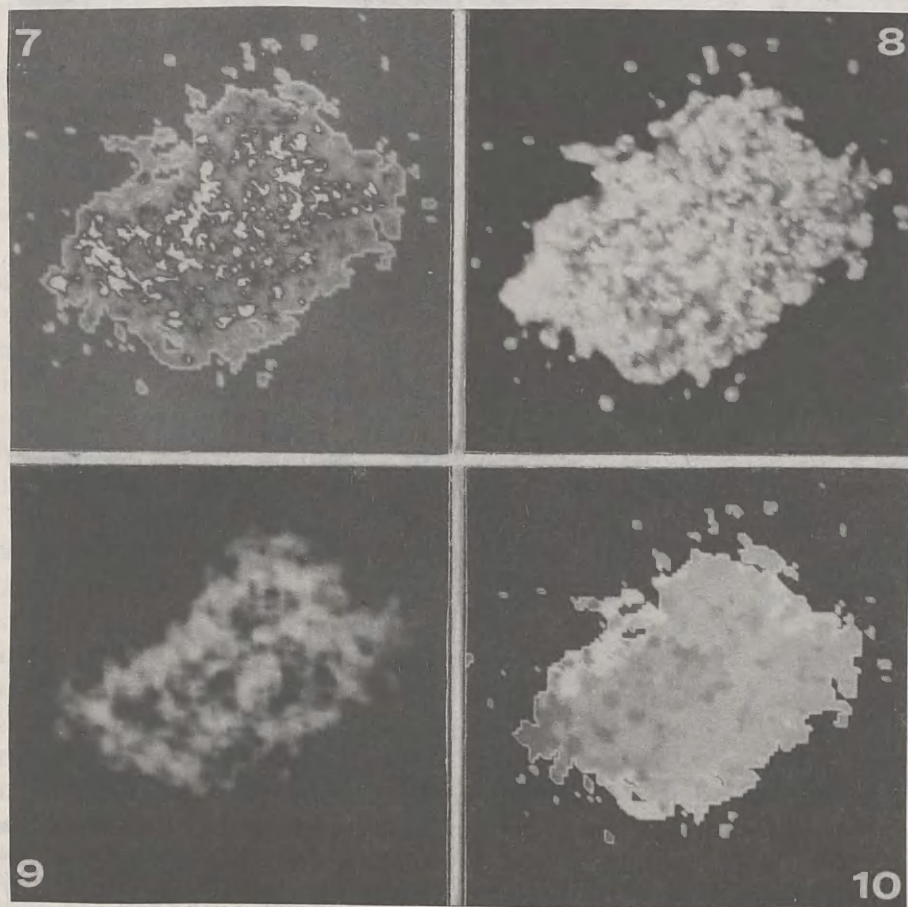
Oprócz indywidualnej obróbki każdego obrazu, CLSM, pozwala na rekonstrukcję przestrzenną obserwowanego obiektu. W tym celu wykorzystuje się serie skrawków optycznych. Serią skrawków jest grupa przekrojów optycznych dokonanych w równoległych do siebie płaszczyznach oddalonych od siebie o stałą odległość, równą lub większą od pionowej zdolności rozdzielczej mikroskopu. Każdy skrawek składa się z określonej liczby pikseli. Każdemu z tych pikseli nadajemy grubość równą odległości pomiędzy płaszczyznami przekrojów, tworząc w ten sposób woxel (od ang. volume pixel) (Gratton i vandeVen 1990). W ten sposób w pamięci komputera powstaje trójwymiarowa reprezentacja obserwowanego obiektu. Jest ona dla nas niedostępna bezpośrednio, gdyż naszą drogą komunikacji z komputerem jest dwuwymiarowy ekran monitora. Aby obejrzeć tak powstałą rekonstrukcję, musimy stworzyć jej dwuwymiarową projekcję. Istnieje wiele metod tworzenia tych projekcji. Dobór metody zależy od tego, jakie właściwości obiektu chcemy obrazować (Brakenhoff i in. 1988, 1989; Carlsson i in. 1989; Scheynius i Lundhal 1990; van der Voort 1989). Projekcje, z praktycznego punktu widzenia, dzielimy na szybkie i perspektywiczne. Projekcje szybkie są tworzone równoległe do rejestracji serii obrazów. Obiekt w takiej projekcji widoczny jest zawsze tak jak w konwencjonalnym mikroskopie. CLSM Phoibs 1000 pozwala na dwa typy takich rekonstrukcji: projekcje maksymalnej intensywności (rys. 5) i projekcje typu rentgenowskiego (rys. 6). W pierwszym przypadku jasność piksela ostatecznego obrazu jest równa jasności najjaśniejszego woxela z leżącej pod nim kolumny, w drugim jasność ta jest równa średniej z kolumny. Warto zdawać sobie sprawę, że w przypadku mikroskopii tradycyjnej widziany obraz jest tego samego typu rekonstrukcją i ostateczna jasność obrazu jest sumą jasności z wszystkich warstw obiektu. Większe możliwości daje zastosowanie projekcji perspektywicznych, wymagają one jednak znacznie więcej obliczeń i otrzymanie ich zajmuje więcej czasu. W projekcji perspektywicznej użytkownik dowolnie wybiera punkt w przestrzeni z którego obserwuje rekonstruowany obiekt. Po



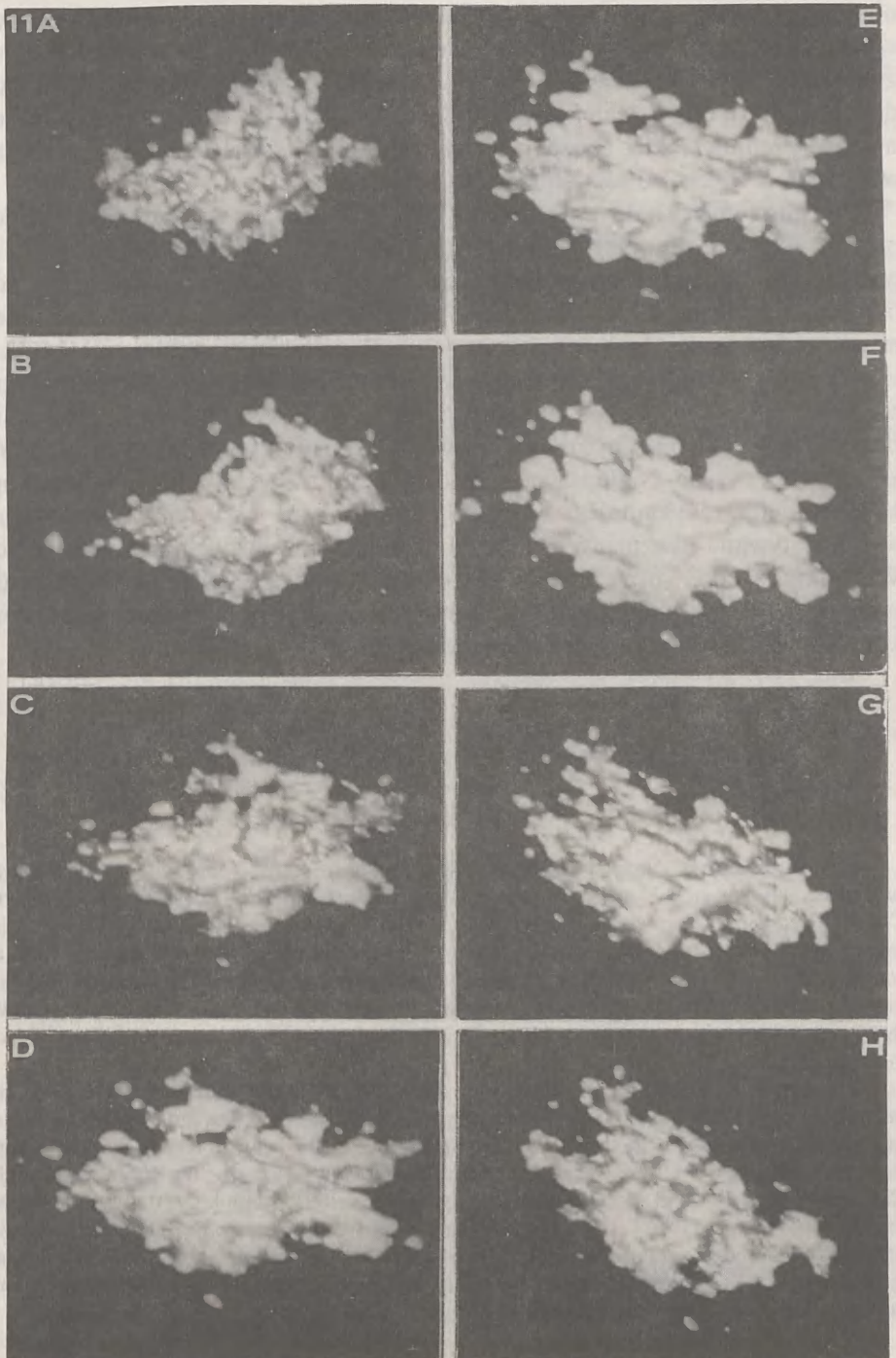
Rys. 5. Stereopara przedstawiająca projekcję typu maksymalnej intensywności. Obraz przedstawia komórkę orzęska *Paraurostyla weissei* barwioną fluoresceiną sprzęganą z przeciwciałem przeciw α -tubulinie. Aby uzyskać wrażenie trójwymiarowości przy oglądaniu stereopar, należy rozdzielić zdjęcia pionowo ustawioną kartką papieru i starać się patrzeć na jedno z nich lewym, a na drugie prawym okiem

Rys. 6. Stereopara przedstawiająca projekcję typu rentgenowskiego tej samej komórki. (Preparat widoczny na rys. 5–6 otrzymany dzięki uprzejmości p. mgr Małgorzaty Frontczak z Zakładu Biologii Komórki IBD im. M. Nenckiego PAN)

wybraniu kierunku patrzenia wybieramy zasadę rekonstrukcji. Szczególnie bogato oprogramowany Phoibos 1000 pozwala na użycie jednej z czterech takich metod. Pierwszą jest opisana już metoda maksymalnej intensywności (rys. 7). Różnica polega na tym, że najjaśniejszy woksel nie jest wybierany z kolumny, ale jest ustalany wzdłuż promieni rozchodzących się z punktu patrzenia. Drugą jest metoda rekonstrukcji powierzchniowej (rys. 8). W metodzie tej ustalamy graniczną wartość jasności pomiędzy wnętrzem obiektu a jego otoczeniem. Granica ta określa powierzchnię obiektu, która jest następnie cieniowana względem pozornego źródła światła i obserwowana z wybranego punktu. Metoda ta daje szczególnie efektowne obrazy, zbliżone do obrazów tworzonych przez skaningowy mikroskop elektronowy. Trzecia metoda, którą można nazwać metodą naturalną (rys. 9), polega na sumowaniu jasności wzdłuż promieni rozchodzących się z punktu



Rys. 7–10. Projekcje trójwymiarowej rekonstrukcji komórki granulocyту barwionego okradecyl-rodaminą. Zdjęcia przedstawiają projekcje: 7 — maksymalnej intensywności, 8 — powierzchniową, 9 — naturalną i 10 — kodowaną głębokość obrazu (komórki otrzymane dzięki uprzejmości prof. dr Jana Doroszewskiego z Centrum Med. Kształcenia Podyplomowego)



Rys. 11 A–H. Obrót rekonstrukcji przestrzennej typu powierzchniowego wokół osi pionowej. Kolejne projekcje sporządzano co 20° . Obraz przedstawia ten sam granulocyt co na poprzednich ilustracjach

obserwacji. Powstający obraz jest taki, jaki widzielibyśmy obserwując powiększony obiekt gołym okiem. Ostatnia metoda rekonstrukcji, zwana kodowaniem głębokości (rys. 10), służy do obróbki obiektów nieprzezroczystych. Jasność danego punktu obrazu zależy od odległości pomiędzy obserwatorem a punktem na powierzchni obiektu. Możemy też tworzyć serie projekcji pozwalających nam obserwować obiekt ze wszystkich stron (rys. 11).

Podsumowując, należy stwierdzić, że CLSM nie jest mikroskopem doskonałym, nie jest też ulepszoną wersją mikroskopu fluorescencyjnego. Jest przyrządem nowym, którego pole możliwości pokrywa się częściowo z możliwościami sprzętu tradycyjnego, ale w wielu zastosowaniach umożliwia całkiem nowe podejście do badanego materiału. Rozszerzenie możliwości badania komórek *in vivo* budzi nadzieję tam, gdzie ważna jest nie tylko badana struktura, ale i jej zmiany w czasie, jak przy analizie ruchów komórek i zjawisk im pokrewnych, takich jak cytokineza, endo- i egzocytoza, ruchy wewnątrzkomórkowe i wiele innych. Najlepszym dowodem na upowszechnianie się mikroskopii konfokalnej jest wykładniczy wzrost liczby publikacji w których metoda ta jest wykorzystywana ukazujących się w biomedycznych czasopismach naukowych. Wszystkie te fakty, oraz pojawienie się pierwszego CLSM w Polsce, skłoniło mnie do napisania tego artykułu, którego celem jest przybliżenie mikroskopii konfokalnej szerokiemu gronu biologów.

CONFOCAL MICROSCOPY — TOWARD THE IDEAL MICROSCOPE

Summary

Short and simple outline of a new method in optical microscopy — the confocal microscopy is presented. This new method gives quite new possibilities in visualisation of the biological material. Confocal Scanning Laser Microscope (CSLM) is one of the most recent constructions in optical microscopy. It offers improved rejection of out-of-focus noise and greater resolution than the conventional fluorescence imaging. In the CSLM condenser and objective lenses are identical and mounted confocally. The image plane is projected onto the pinhole aperture. The only light allowed through this diaphragm is light emitted from the objective focal plane. This cuts off any out-of-focus image blurring.

The short history of confocal microscopy, from Marvin Minsky patent to tandem scanning microscope and CSLM is presented. The second part of the article describes some particular features of confocal microscopy methods. The limitations of laser as the light source are discussed. Some fluorescence dyes are not fit for CSLM due to their excitation wavelengths. The most useful dyes for Ca^{2+} and H^{+} detection and selective membrane dyes are described. Multiple dye staining is described and the troubles with TRITC as the most popular second dye are stressed. The computer processing of signal from fotodetector is the last topic discussed. The background of two- and three-dimensional data presentation, simple methods of image contrast enhancement of projecting three-dimensional vectors onto such images are presented.

LITERATURA

1. Amos W. B. — *Results obtained with a sensitive confocal scanning system designed for epifluorescence*. Cell Motil. Cytoskeleton 10: 54–61, 1988.
2. Boyde A., Jones S. J., Taylor M. L., Wolfe L. A., Watson T. F. — *Fluorescence in the tandem scanning microscope*. J. Microsc. 157: 39–49, 1990.
3. Brakenhoff G. J., van der Voort H. T., Baarslag M. W., Mans B., Oud J. L., Zwart R., van Driel R. — *Visualization and analysis techniques for three dimensional information acquired by confocal microscopy*. Scanning. Microsc. 2: 1831–1838, 1988.
4. Brakenhoff G. J., van der Voort H. T. van Spronsen E. A., Nanninga N. — *Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy*. J. Microsc. 153: 151–159, 1989.
5. Carlsson K., Wallen P., Brodin L. — *Three-dimensional imaging of neurons by confocal fluorescence microscopy*. J. Microsc. 155: 15–26, 1989.
5. Cooper M. S., Cornell Bell A. H., Chernjavsky A., Dani J. W., Smith S. J. — *Tubulovesicular processes emerge from trans-Golgi cisternae, extend along microtubules, and interlink adjacent trans-golgi elements into a reticulum*. Cell 61: 135–145, 1990.
7. Gratton, E., vandeVen, M.J. — *Laser Sources for Confocal Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 53–67.
8. Haugland R.P. — *Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene, 1989.
9. Hook G. R., Odeyale C. O. — *Confocal scanning fluorescence microscopy: a new method for phagocytosis research*. J. Leukoc. Biol. 45: 277–282, 1989.
10. Inoue S. — *Progress in Video Microscopy*. Cell Motil. Cytoskeleton 10: 13–17, 1988.
11. Inoue, S. — *Fundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 1–14.
12. Keller, H.E. — *Objective Lenses for Confocal Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 77–86.
13. Kino, G.S. — *Intermediate Optics in Nipkow Disk Microscopes. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 105–111.
14. Mossberg K., Ericsson M. — *Detection of doubly stained fluorescent specimens using confocal microscopy*. J. Microsc. 158: 215–224, 1990.
15. Niggli E., Lederer W. J. — *Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution*. Cell Calcium 11: 121–130, 1990.
16. Ploem, J.S. — *Fluorescence Microscopy. W: Light Microscopy in Biology. A Practical Approach*, Pod red. Lacey, A.J. IRL Press, Oxford, 1989, s. 163–186.
17. Scheynius A., Lundahl P. — *Three-dimensional visualization of human Langerhans' cells using confocal scanning laser microscopy*. Arch. Dermatol. Res. 281: 521–525, 1990.
18. Sheppard C.J., Wilson T. — *The theory of the direct-view confocal microscope*. J. Microsc. 124: 107–117, 1981.
19. Tsien. R. Y., Waggoner, A. — *Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 169–178.
20. van Dekken H., van Rotterdam A., Jonker R., van der Voort H. T., Brakenhoff G. J., Bauman J. G. — *Confocal microscopy as a tool for the study of the intranuclear topography of chromosomes*. J. Microsc. 158: 207–214, 1990.

21. van der Voort H. T., Brakenhoff G. J., Baarslag M. W. — *Three-dimensional visualization methods for confocal microscopy*. J. Microsc. 153: 123–132, 1989.
22. Webb, R. H., Dorey, C. K. — *The Pixelated Image. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 41–51.
23. White J.G., Amos W.B., Fordham M. — *An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy*. J. Cell Biol. 105: 41–48, 1987.
24. White N.S., Lackie P.M., Shotton D.M. — *Imaging of immunogold labelled antigens on capping thymocytes by confocal reflection contrast scanning optical microscopy*. Cell Biol. Int. Rep. 13: 941–948, 1989.
25. Wilson T. — *Trends in confocal microscopy*. Trends. Neurosci. 12: 486–493, 1989.

SYMPOZJUM EUROPEJSKIEGO TOWARZYSTWA HODOWLI TKANEK PO RAZ PIERWSZY W POLSCE

W dniach 16–19 września 1991 roku odbył się w Krakowie 39 Zjazd Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkanek (ETCS — European Tissue Culture Society). Wzięło w nim udział ponad dwieście osób z czego znakomitą większość stanowili goście zagraniczni. Głównym organizatorem zjazdu ze strony polskiej była pani profesor Stanisława Stokłosa z Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Spotkania przebiegały w następujący sposób: przed południem odbywały się sympozja gromadzące wszystkich uczestników, natomiast po południu prowadzone były trzy równoległe sesje tematyczne do wyboru wedle zainteresowań. Jednocześnie przez cały czas trwania zjazdu uczestnicy mieli możliwość zapoznawania się z prezentowanymi posterami.

Zjazd zainaugurował profesor Giovanni Aastaldi z Włoch, który został honorowym członkiem ETCS. Jego wykład był przeglądem współczesnych osiągnięć hematologii doświadczalnej. Pierwsze sympozjum zatytułowane: „Komórkowe i molekularne aspekty hemopoezy” prowadzili profesor Sandro Eridani z Mediolanu i profesor Wiesław Jędrzejczak z CSK WAM w Warszawie. Sympozjum poświęcone było problematyce molekularnego podłoża chorób układu krwiotwórczego oraz tworzenia komórkowych modeli tych schorzeń. Pierwszym z zaproszonych gości był dr David Greaves z Oxfordu, który przedstawił badania nad regulacją ludzkiego genu β -globinowego przez element LCR (locus control region) i próby stworzenia komórkowego modelu anemii sierpowatej. Profesor R. Berger z Paryża mówił o fuzji genów BCR i ABL w wyniku translokacji chromosomowej (powstaje tzw. chromosom Philadelphia) oraz o ewentualnej roli produktu białkowego tego genu hybrydowego w wywoływaniu białaczek. Kolejnym mówcą był profesor Wiesław Jędrzejczak, zajmujący się badaniem efektów *in vivo* czynnika CSF-1 (colony stimulating factor 1). Na podstawie badań prowadzonych na mysim szczepie op/op posiadającym zmutowany gen na CSF-1 wysunął wniosek, że działanie tego czynnika prawdopodobnie nie ogranicza się do regulacji makrofagów, lecz raczej w swej kompleksowości zbliżone jest do wpływu hormonów na rozmaite funkcje życiowe organizmu. Ostatni wykład, wygłoszony przez dr Claudine Kieda z Orleanu, dotyczył badań charakteryzujących nowo wprowadzoną linię komórek endotelialnych z gruczolu limfatycznego myszy pod kątem oddziaływań międzykomórkowych.

Tematem drugiego sympozjum była „Transformacja nowotworowa i supresja procesu nowotworzenia”. Prowadzili je profesor Norbert Fusenig z Heidelbergu i profesor Włodzimierz Korohoda z Instytutu Biologii Molekularnej UJ. Na wstępie profesor Fusenig wygłosił wykład traktujący o różnicach w regulacji wzrostu i różnicowania linii ludzkich keratynocytów HaCaT w zależności od etapu transformacji (unieśmiertelnienie, postać łagodna, postać złośliwa nowotworu). Interesujący wykład przedstawiła dr A. Kimchi z Rehovot w Izraelu, w którym opisała pracę swojego zespołu nad identyfikacją genów supresorowych dla nowotworów, prowadzoną z użyciem trzech grup cytokin: interferonów, TGF- β i interleukiny 6. Wykryto istnienie dwóch niezależnych szlaków biochemicznych, na które działają cytokiny, wywierając swój supresyjny efekt: pierwszy, polegający między innymi na redukcji ekspresji genu c-myc i drugi, prowadzący do supresji kinazy RB (retinoblastoma). Trzeci z mówców, dr Eric Fearon z Baltimore przedstawił nowy gen należący do rodziny genów supresorowych — gen *DCC*, położony na chromosomie 18q, którego zmutowana forma wykrywana jest w wielu nowotworach. Inaktywacja tego genu przez podanie anti-sense RNA wywołuje transformację nowotworową komórek *in vitro* i *in vivo*. Z kolei wystąpił dr Christos Paraskeva z Bristolu. Jego zespół opracował ciekawy model progresji nowotworu *in vitro*, wychodzący z linii ludzkich komórek epitelialnych. Dr Paraskeva, za swoje osiągnięcia w biologii komórki, został

pierwszym laureatem nagrody ufundowanej przez firmę Becton Dickinson, która została mu wręczona na uroczystym obiedzie.

Trzecie, ostatnie sympozjum zjazdu poświęcone zagadnieniom adhezji komórkowej prowadzili: dr Fiona Watt z Londynu i profesor Jerzy Kawiak z Centrum Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Sympozjum rozpoczęła dr Watt wykładem na temat funkcji i ekspresji integryny podczas różnicowania keratynocytów w hodowli oraz ich roli w inicjacji różnicowania. Kolejnym lektorem był dr Rolf Kemler z Freiburga, którego wykład był poświęcony oddziaływaniom cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję komórkową z cytoszkieletem oraz ich molekularnej charakterystyce. Przedostatni wykład wygłosił dr Markku Jalkanen z Turku w Finlandii i wypełnił go całkowicie szczegółowym opisem syndekanu — proteoglikanu umieszczonego na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej, który reguluje wzrost i wpływa na morfologię komórek nabłonkowych. Jako ostatni wystąpił profesor Adam Curtis z Glasgow z nową interesującą metodą wykorzystania kulek magnetycznych do badania zjawiska adhezji komórkowej.

Ze zrozumiałych względów, tylko niektóre zagadnienia poruszone zostały podczas sympozjów. Rozszerzeniu tematyki służyć miały popołudniowe sesje (workshops). Tytuły niektórych z nich to: „Endokryne funkcje komórki”, „Zmiany cytoszkieletu w procesie ruchu, wydzielania i adhezji komórek do podłoża”, „Praktyczne zastosowanie hodowli komórek skóry”, „Onkogeny: regulacja wzrostu i transformacja komórek”, „Farmakologia *in vitro*”, „Hodowle komórkowe w biotechnologii”.

Przedstawiona wyżej bogata problematyka, jak i wynikająca z niej różnorodność stosowanych metod badawczych skłaniają do następujących wniosków:

1. Technika hodowli komórek *in vitro* dawno wyszła już z fazy eksperymentalnej i stała się pełnoprawnym narzędziem w badaniach zarówno fizjologicznych jak i genetycznych.

2. Obserwuje się wzrost znaczenia technik biologii molekularnej w badaniach wykorzystujących hodowle komórkowe np.: użycie anti-sense RNA do zahamowania ekspresji wybranych genów, badanie ekspresji genów metodą hybrydyzacji typu Northern, określanie translokacji chromosomowych metodą PCR i wiele innych.

3. Zarysowuje się silnie dążenie do tworzenia komórkowych modeli *in vitro* dla różnych schorzeń o podłożu genetycznym, wygodnych do badania i cennych m.in. ze względu na możliwość ograniczenia w przyszłości wykorzystania zwierząt laboratoryjnych.

Na zakończenie należy podkreślić doskonałą organizację i bogatą ofertę kulturalną dla gości z zagranicy. Krakowskie spotkanie zaowocuje z pewnością dalszą integracją środowiska oraz przepływem informacji naukowej.

Dorota Nowicka
Izabela Figiel

AGING AND CELLULAR DEFENSE MECHANISMS

Sprawozdanie ze zjazdu w Modenie

W dniach 22–26 września 1991 roku odbył się w Modenie (Włochy) zjazd poświęcony starzeniu i komórkowym mechanizmom obronnym. Spotkanie to, o jednorazowym charakterze, zorganizowane było przez Nowojorską Akademię Nauk oraz Uniwersytet w Modenie. Za organizację odpowiedzialni byli profesorowie Vincent J. Cristofalo z Medical College od Pensylwania oraz Claudio Franceschi z University of Modena Medical School.

Obrazy odbywały się w nowym, pięknym Grand Hotelu Raffaello. W ciągu czterech dni odbyło się 10 sesji poruszających bardzo wiele aspektów komórkowego starzenia i śmierci komórki oraz komórkowym mechanizmom przeciwdziałającym starzeniu. Były to: uszkodzenia i naprawa DNA, stres tlenowy i obrona antyoksydacyjna, białka stresu, transformacja i geny supresorowe, terminalne różnicowanie, śmierć komórki, rola wapnia, systemy immunologiczny i endokrynalny, perspektywy

ewolucyjne. Sesje, które odbywały się rano i po południu, przedzielone były prezentacją plakatów (kilkanaście dziennie) oraz wspólnym, eleganckim lunchem w restauracji hotelowej.

Zjazd w Modenie zgromadził bardzo wielu znakomitych naukowców ze Stanów Zjednoczonych i wielu krajów Europy, od lat zajmujących się badaniami dotyczącymi starzenia. 35 mówców zapoznało słuchaczy nie tylko z własnymi wynikami, ale także z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym starzenia.

Starzenie na poziomie komórkowym polega na utracie zdolności komórek do proliferacji. W odróżnieniu od komórek młodych będących w stanie spoczynkowym, komórki stare nie są zdolne wejść w cykl podziałowy po stymulacji jakimkolwiek z mitogenów. Wykazano, że wiąże się to z zahamowaniem ekspresji jednego z genów wczesnej odpowiedzi, mianowicie *c-fos*, a także z defektem fosforylacji białka będącego produktem genu supresorowego *Rb*. Komórki stare charakteryzują się ponadto zmniejszoną wydajnością mechanizmów obronnych (antyoksydacyjny, reperacja DNA, białka stresu). Do dzisiaj nie wiadomo, czy starzenie komórki jest końcowym etapem zaprogramowanego różnicowania, czy też polega na rozróżnicowaniu komórek niezdolnych do proliferacji.

Obrady w Modenie dostarczyły 160 uczestnikom wielu bardzo interesujących i stymulujących informacji o starzeniu, a dyskusje na bardzo wysokim poziomie mogły stanowić duże intelektualne przeżycie.

Świetna organizacja zjazdu, a także lokalizacja sesji w jednym miejscu, miła atmosfera stworzona przez organizatorów sprzyjały integracji uczestników i prowadzeniu twórczych dyskusji również w przerwach obrad.

Autorzy wykładów i plakatów, którzy opracowali wyniki swoich badań w postaci krótkich manuskryptów złożonych u wydawcy w czasie trwania zjazdu, mają szansę na ujrzanie ich w druku w „Proceedings of New York Academy of Sciences”, w 1992 roku.

Zainteresowanie problemem starzenia komórki organizmu, a także śmierci komórki wzrasta nie tylko wśród uczonych, ale również wśród sponsorów nauki na całym świecie, co pozwala mieć nadzieję na szybki postęp badań w tej dziedzinie.

Ewa Sikora

SPIS TREŚCI ROCZNIKA 1992

(Nr zeszytu, strona)

ARTYKUŁY

Berezowicz Paweł S. — Neuroimmunologia	4	463
Brzezicka-Szymczak Krystyna — Grzyby rdzawnikowe (<i>Uredinales</i>) — pasożyty roślin	2-3	223
Chmiela Magdalena, zob. W. Rudnicka, M. Chmiela — Perspektywy użycia szczepionek...		
Cierniewski Czesław S. — Zagadnienia współczesnej immunologii	4	303
Długońska Henryka, Rudnicka Wiesława — Przeciwciała monoklonalne	4	401
Dubas Adam — Biomanipulacja w ekosystemach jeziornych. O pewnym przykładzie działań praktycznych w biologii	2-3	235
Gorbaczewska Grażyna, zob. A. Rudzińska-Langwald, G. Garbaczewska — Lokalizacja komórkowa...		
Górski Andrzej — Aktualne poglądy na mechanizmy warunkujące krążenie komórek immunologicznie aktywnych i ich interakcje z tkanką łączną	4	341
Grębecka Lucyna — Migracja komórek tkankowych. Czynniki ograniczające i pobudzające	1	91
Grębecka Lucyna — Wprowadzenie (do zeszytu nt. „Funkcje ruchome komórki”)	1	3
Grębecki Andrzej — Ruchy błony i cytoskieletu w komórkach ameboidalnych ..	1	7
Jankowski Adam, Lewandowicz-Uszyńska Aleksandra — Wolne rodniki w patologii chorób człowieka	2-3	147
Janusz Maria — Strukturalne i funkcjonalne zróżnicowania immunoglobulin ...	4	383
Jędrzejczak Wiesław Wiktor — Cytokiny w regulacji zachowania się komórek układu odpornościowego	4	451
Kiliańska Zofia — Geny wirusa HIV. Charakterystyka i rola produktów ich ekspresji	2-3	159
Kłopotcka Wanda — Limfocyty — funkcje i ruch	1	63
Kordowska Jolanta, zob. J. Kuźnicki, J. Kordowska — Białka wiążące wapń...		
Kołodziejczyk Joanna — Makrofagi — migrujące i fagocytujące komórki układu obronnego	1	51
Korohoda Włodzimierz — Migracja komórek nabłonkowych	1	39
Kuśnierczyk Piotr — Antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej: budowa, genetyka i funkcja biologiczna	4	349
Kuta Elżbieta — Metody biologii molekularnej w biosystematyce roślin	2-3	179
Kuźnicki Jacek, Kordowska Jolanta — Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych	1	105
Lewandowicz-Uszyńska Aleksandra, zob. A. Jankowski, A. Lewandowicz-Uszyńska — Wolne rodniki...		
Lisowska Elwira — Białka jako antygeny: reakcje z przeciwciałami i analiza epitopów	4	309
Płonka Piotr — Odłowy zwójek w pułapki feromonowe w drzewostanach dębowych Puszczy Niepołomickiej	2-3	251
Pomorski Paweł — W poszukiwaniu mikroskopu idealnego — rzecz o mikroskopii konfokalnej	1	123
Ptak Włodzimierz — Mechanizmy prezentacji i rozpoznania antygeny	4	325

Rudek Zofia — Cytogenetyczna ocena skutków skażenia środowiska przez Kombinat Metalurgiczny w Krakowie	2-3	243
Rudnicka Wiesława — Budowa immunoglobulin	4	413
Rudnicka Wiesława, Chmiela Magdalena — Perspektywy użycia szczepionek idiotypowych w profilaktyce chorób zakaźnych	4	429
Rudnicka Wiesława, zob. H. Długońska, W. Rudnicka — Przeciwciała monoklonalne ...		
Rudzińska-Langwald, Garbaczewska Grażyna — Lokalizacja komórkowa cyklu życiowego wirusów roślinnych z jednoniciowym RNA	2-3	203
Salwa Jan — Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez przeciwciała anty-idiotypowe	4	371
Zimecki Michał — Cytokiny w regulacji odpowiedzi immunologicznej	4	439

DYSKUSJE

Michalak Paweł — Specjacja a dobór płucowy	2-3	257
Soroczan Wiesław — Poglądy na filogenezę i systematykę nicieni (<i>Nematoda</i> Rudolphi, 1808)	2-3	263

INSTYTUTY NAUKOWE

Jakubowski Krzysztof — Muzeum Ziemi — W poszukiwaniu nowego wyrazu popularyzacji wiedzy przyrodniczej	2-3	273
---	-----	-----

ZEBRANIA, ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

Figiel Izabela, zob. D. Nowicka, I. Figiel — Sympozjum Europejskiego Towarzystwa ...		
Janiszewski Tomasz, Markowski Janusz — Sympozjum „Ekologiczna genetyka ssaków — Badania współczesne i perspektywy” (Łódź 1992)	2-3	295
Kazubski Stanisław L. — Wrażenia przyrodnika z pobytu w Południowej Afryce	2-3	288
Markowski Janusz, zob. T. Janiszewski, J. Markowski — Sympozjum „Ekologiczna genetyka ssaków”...		
Mikulski Zdzisław — Sesja naukowa w 160. rocznicę urodzin Wiktora Godlewskiego (Boguty 1992)	2-3	287
Nowicka Dorota, Figiel Izabela — Sympozjum Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkanek po raz pierwszy w Polsce	1	141
Sikora Ewa — Aging and Cellular Defence Mechanisms. Sprawozdanie ze zjazdu w Modenie	1	142
Żurek Roman — VI Międzynarodowe Sympozjum Wrotkowe (Banyoles 1991) ..	2-3	292

WSPOMNIENIA

Jaczewski Zbigniew — Profesor dr Wirgiliusz Żurowski (1935–1992)	2-3	301
Małkowski Krzysztof, Sabath Karol — Doc. dr hab. Antoni Hoffman (1950–1992)	2-3	297

SPIS TREŚCI

<i>Lucyna Grębecka</i> — Wprowadzenie	3
<i>Andrzej Grębecki</i> — Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych	7
<i>Włodzimierz Korohoda</i> — Migracja komórek nabłonkowych	39
<i>Joanna Kolodziejczyk</i> — Makrofagi — migrujące i fagocytyzujące komórki układu obronnego	51
<i>Wanda Kłopocka</i> — Limfocyty — funkcje i ruch	63
<i>Lucyna Grębecka</i> — Migracja komórek tkankowych. Czynniki ograniczające i pobudzające.	91
<i>Jacek Kuźnicki, Jolanta Kordowska</i> — Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych	105
<i>Paweł Pomorski</i> — W poszukiwaniu mikroskopu idealnego — rzecz o mikroskopii konfokalnej	123

ZJAZDY I KONFERENCJE

<i>Dorota Nowicka</i> — Sympozjum Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkanek po raz pierwszy w Polsce	141
<i>Ewa Sikora</i> — Aging and Cellular Defense Mechanisms. Sprawozdanie ze zjazdu w Modenie	142

CONTENTS

<i>Lucyna Grębecka</i> — Introduction	4
<i>Andrzej Grębecki</i> — Membrane and cytoskeletal movements in amoeboid cells	7
<i>Włodzimierz Korohoda</i> — Migration of epithelial cells	39
<i>Joanna Kolodziejczyk</i> — Macrophages — migrating and phagocytizing cells of immune system	51
<i>Wanda Kłopocka</i> — Lymphocytes — functions and movement	63
<i>Lucyna Grębecka</i> — Tissue cell migration. Some factors limiting and stimulating motility	91
<i>Jacek Kuźnicki, Jolanda Kordowska</i> — Calcium binding proteins as markers of pathological conditions	105
<i>Paweł Pomorski</i> — Confocal microscopy-Toward the ideal microscope	123
Scientific Conferences	141

Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika

KOSMOS

Wpłaty na prenumeratę przyjmowane są na okresy kwartalne:

- na teren kraju — jednostki kolportażowe „Ruch” i urzędy pocztowe właściwe dla miejsca zamieszkania lub siedziby prenumeratora,
- na zagranicę — Zakład Kolportażu Prasy i Wydawnictw, 00-958 Warszawa, konto PBK XIII Oddział Warszawa: 370044-1195-139-11.

Prenumerata ze zleceniem dostawy za granicę jest o 100% wyższa od krajowej.

Dostawa zamówionej prasy następuje:

- przez jednostki kolportażowe „Ruch” — w sposób uzgodniony z zamawiającym,
- przez urzędy pocztowe — pocztą zwykłą na wskazany adres, w ramach opłaconej prenumeraty z wyjątkiem zlecenia dostawy za granicę pocztą lotniczą do odbiorcy zagranicznego, której koszt w pełni pokrywa prenumerator.

Terminy przyjmowania wpłat na prenumeratę:

- krajową i zagraniczną — do 20 XI na I kw. roku następnego
- do 20 II na II kw.
- do 20 V na III kw.
- do 20 VIII na IV kw.

Bieżące numery można nabyć w Księgarni Wydawnictwa Naukowego PWN sp. z o.o., ul. Miodowa 10, Warszawa. Również można je nabyć, a także zamówić (przesyłka za zaliczeniem pocztowym) 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 S.A. 201061-710-13100