

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 15-NR 2

1988 (117-232)

Postępy Biologii Komórki

PWN WARSZAWA – WROCŁAW
<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

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

Rada Redakcyjna

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

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 537 + 93. Ark. wyd. 9; ark. druk. 7,25. Papier druk sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania 2 II 1988 r. Podpisano do druku w czerwcu 1988 r. Druk ukończono w czerwcu 1988 r. Zam. 3089/88. K-7. Cena 160 zł.

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

ZJAWISKO ASYMETRII BOCZNEJ HETEROCHROMATYNY KONSTITUTYWNEJ CHROMOSOMÓW METAFAZOWYCH CZŁOWIEKA

LATERAL ASYMMETRY OF CONSTITUTIVE HETEROCHROMATIN OF HUMAN
METAPHASE CHROMOSOMES

J. LIMON, B. NEDOSZYTKO

- Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie. Zjawisko asymetrycznego wybarwienia się heterochromatyny konstytutywnej niektórych chromosomów człowieka pochodzących z komórek, które wbudowały 5-bromodezoksyurydynę (BrdU) podczas jednego cyklu podziałowego, ujawnia się po zabarwieniu metafaz M1 techniką FPG (Fluorescence plus Giemsa). Ta asymetryczna struktura okołowcentromerowej heterochromatyny jest konsekwencją nierównomiernego rozkładu tyminy między komplementarnymi łańcuchami satelitarnego DNA w siostrzanych chromatydach chromosomu. Badania asymetrii bocznej wnoszą nowe informacje na temat molekularnej budowy oraz funkcji heterochromatyny konstytutywnej, pozwalają na wyróżnienie wielu jej wariantów polimorficznych i dostarczają nowych informacji na temat jej ewolucji.

Summary. Some human chromosomes display the lateral asymmetry staining patterns of their constitutive heterochromatin. This phenomenon is observed after the incorporation of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) in the first division metaphases (M1) stained with FPG technique. The asymmetrical structure of constitutive heterochromatin is the effect of the difference in thymine content between complementary strands in satellite DNA in both sister chromatids. A study of lateral asymmetry may provide new insight into the organization and the function of constitutive heterochromatin and its new class of structure polymorphisms and evolution.

Pomimo iż termin „heterochromatyna” został użyty po raz pierwszy blisko 60. lat temu w celu określenia skondensowanej części chromatyny jądrowej, nadal istnieją trudności w precyzyjnym określeniu różnych rodzajów tej chromatyny [16, 42, 63, 65]. W niniejszej pracy terminem heterochromatyna konstytutywna będziemy określać tę chromatynę, która wybarwia się pozytywnie metodą prążkową C. Heterochromatyna

ta obejmuje około 20% ludzkiego genomu i zlokalizowana jest w okolicy centromerowej wszystkich chromosomów [63], z wyjątkiem chromosomu płciowego Y, który ma dosyć duży obszar heterochromatyny C-pozytywnej w ramionach długich. Stwierdzono ponadto, że heterochromatyna konstytutywna jest heterogenna molekularnie i zawiera oprócz frakcji satelitarnego DNA o dużym stopniu powtarzalności sekwencji nukleotydów również sekwencje niepowtarzalne [16, 17, 63].

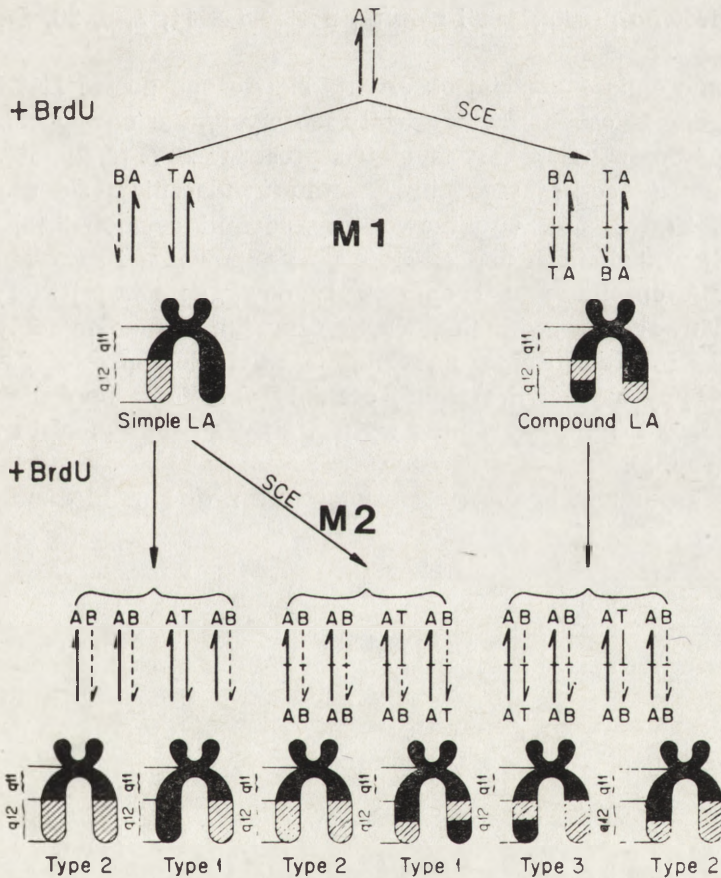
Wbudowanie analogu tyminy — 5-bromodezoksyurydyny (BrdU) do chromosomowego DNA powoduje w określonych warunkach modyfikację właściwości wybarwiania się podstawionej chromatydy. W chromosomach metafazowych, które dokonały dwóch podziałów mitotycznych w obecności BrdU, DNA jednej z chromatyd jest podwójnie podstawiony BrdU i cała ta chromatyda barwi się mniej intensywnie niż druga, podstawiona BrdU tylko w jednej nici DNA. Zjawisko to, nazywane zróżnicowanym wybarwieniem chromatyd siostrzanych (Sister chromatid differentiation — SCD), obserwuje się w chromosomach po wybarwieniu ich fluorochromami, np. Hoechst 33258 [50] lub dzięki połączeniu tej techniki z barwieniem roztworem barwnika Giemsa, nazywanym techniką FPG (Fluorescence plus Giemsa) [67].

Zjawisko asymetrii bocznej (Lateral asymmetry — LA), które jest ograniczone do regionu heterochromatyny konstytutywnej, zostało po raz pierwszy zaobserwowane w heterochromatynie centromerowej chromosomów myszy. Chromosomy te pochodziły z komórek, które dokonały tylko jednego cyklu podziałowego *in vitro* w środowisku zawierającym BrdU [54]. W heterochromatynie tej zlokalizowano satelitarny DNA [66], który wykazuje nieproporcjonalny rozkład tyminy (45 i 22 mol %) między komplementarnymi łańcuchami DNA [26]. Ten nierównomierny rozkład tyminy wywołuje nieproporcjonalną inkorporację BrdU w czasie replikacji DNA, a następujące później wygaszanie fluorescencji fluorochromu przez BrdU lub jaśniejsze wybarwienie Giemszą uwidacznia się jako regionalne, asymetryczne wybarwienie chromatyd siostrzanych chromosomu metafazowego. Dlatego też Lin i wsp. [54] wysunęli hipotezę, że asymetryczne wybarwienie się regionów centromerowych chromosomów myszy jest konsekwencją międzyłańcuchowej asymetrii w rozkładzie tyminy.

Asymetria boczna heterochromatyny konstytutywnej została zaobserwowana w chromosomach człowieka [1, 2, 8, 20, 23, 27, 29, 32, 47, 51, 52, 53, 55, 56], małpy *Rhesus* [30], skoczka *Dipodomys ordii* [5], *Drosophila hydei* i nasuta [4, 49], a spośród pięciu badanych gatunków roślin wykryto LA tylko w chromosomach bobu *Vicia faba* [21, 77].

U człowieka zjawisko asymetrii bocznej heterochromatyny konstytutywnej obserwowano najczęściej w chromosomach 1, 15, 16 i Y [1, 2, 27, 32, 47, 51, 55], rzadziej w chromosomach 9, 13, 14, 17, 20, 21 i 22

[1, 8, 27, 55] oraz bardzo rzadko w chromosomach 2, 3, 4, 7 i 19 [8]. Wyróżnia się dwa rodzaje asymetrii bocznej — prostą i złożoną. Asymetrię prostą obserwuje się wtedy, gdy pozytywnie wybarwiający się region występuje tylko w jednej chromatydzie chromosomu metafazowego, natomiast asymetria złożona występuje wtedy, gdy w obu chromatydach obserwuje się na przemian odcinki wybarwiający się pozytywnie i negatywnie techniką FPG (ryc. 1). Oba rodzaje LA wykazują stabilność w podziałach komórkowych i dziedziczą się jako prosta cecha mendlowska [2].



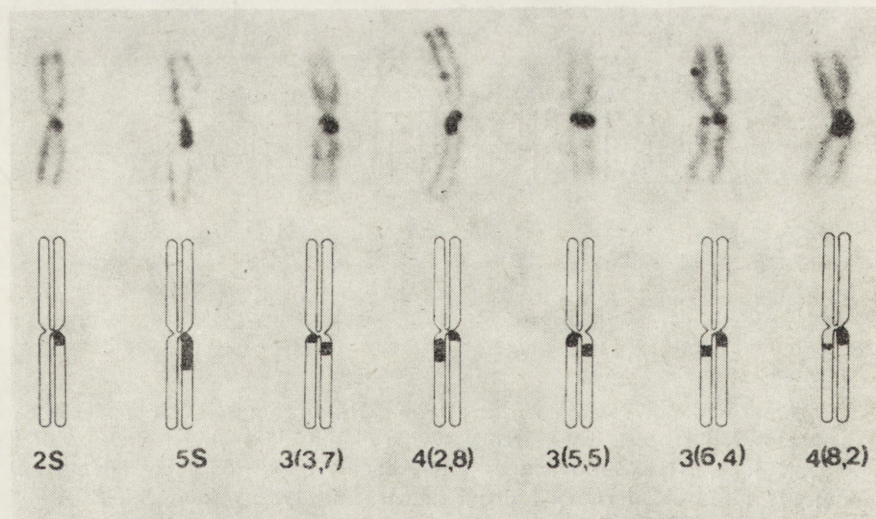
Ryc. 1 Schemat wbudowywania się BrdU do DNA chromosomu Y podczas dwóch cykli podziałowych i oczekiwane wzory wybarwienia się tych chromosomów techniką FPG [53]: A, B i T — łańcuchy DNA bogate odpowiednio w adeninę, BrdU i tyminę; M1 i M2 — pierwszy i drugi podział mitotyczny komórki, SCE — wymiany chromatyd siostrzanych; simple LA — prosta asymetria boczna; compound LA — złożona asymetria boczna; Type 1, 2, 3 — rodzaje wybarwienia się chromosomu Y

ASYMETRIA BOCZNA CHROMOSOMÓW AUTOSOMALNYCH

Spośród chromosomów autosomalnych człowieka asymetrię boczną obserwuje się prawie zawsze w chromosomach 1 i 16. Zjawisko to stwierdzano średnio w 87% chromosomów 16, 65% chromosomów 1 oraz tylko w mniej niż 5% chromosomów 9 badanych osobników [27]. Stosując różne techniki barwienia, w chromosomach 2, 3, 4, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21 i 22 obserwowano tylko prostą postać LA [1, 8, 27]. W heterochromatynowym prążku q12-q14 chromosomu 6 obserwowano tylko złożoną LA [23], natomiast w heterochromatynie chromosomów 1 i 9 obserwowano zarówno prostą, jak i złożoną postać LA [1, 2, 8, 20, 27, 29, 32, 56, 58].

W chromosomie 1 częściej obserwuje się złożoną postać LA. Badania nad populacją 44 osobników wykazały, że występuje ona w około 80% tych chromosomów, natomiast asymetria prosta w 20% [2, 29, 56]. W złożonej asymetrii bocznej tego chromosomu uwidaczniają się najczęściej dwa [1, 2, 27, 32, 56], wyjątkowo trzy odcinki asymetrii [8]. Angell i Jacobs [2] w badaniach nad częstością występowania i sposobami dziedziczenia LA chromosomu 1 opracowały nowy sposób jej klasyfikacji. Biorąc pod uwagę indywidualną wielkość prążka C (bardzo mały, mały, średni, duży i bardzo duży), wyróżniły 5 wariantów prostej LA — od 1S do 5S. Typy asymetrii złożonej oceniały określając oprócz wielkości prążka C także lokalizację ciemno wybarwiającego się materiału w chromatydach (ryc. 2).

Złożona asymetria boczna w chromosomie z dużym blokiem hetero-



Ryc. 2. Chromosomy nr 1 człowieka wykazujące różnego rodzaju asymetrie boczne heterochromatyny konstytutywnej [2]

chromatyny może się uwidocznic jako wariant np. 4 (8,2) — gdy większa porcja ciemno wybarwionego materiału występuje proksymalnie w jednej chromatydzie, a mniejsza dystalnie w drugiej, lub jako wariant 4 (2,8) — przy odwrotnym układzie asymetrii. Taki sposób klasyfikacji pozwala na teoretyczne wyróżnienie 45 wariantów złożonej LA chromosomu 1. W cytogenetycznych badaniach przeprowadzonych nad populacją 51 osobników zaobserwowano występowanie 4 wariantów prostej LA i spośród teoretycznie możliwych 36 wariantów — 21 wariantów złożonej LA chromosomu 1 [2].

ASYMETRIA BOCZNA CHROMOSOMU Y

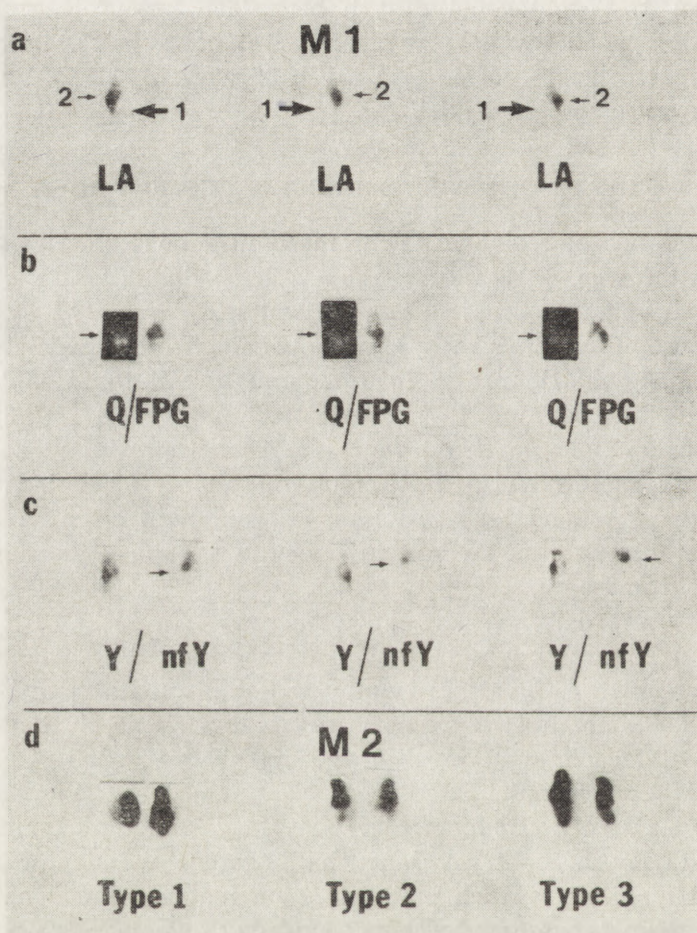
Asymetrię boczną regionu q 12 chromosomu Y po raz pierwszy zaobserwowali Latt i wsp. [51], którzy zauważyli spadek intensywności fluorescencji barwnika Hoechst 33258 w jednej z chromatyd siostrzanych tego chromosomu w komórkach, które dokonały jednego podziału w obecności BrdU. Asymetrię prostą tego regionu opisali także inni autorzy, stosując inne fluorochromy [55] bądź też technikę FPG [1, 27, 32, 52, 53]. Zaobserwowano ponadto drugi rodzaj asymetrii prostej zlokalizowanej na granicy regionów q11/q12 chromosomu Y [32, 52, 53]. Autorzy ci uważają, że przyczyną tego zjawiska jest nierównomierny rozkład tyminy w satelitarnym DNA, znajdującym się w obu regionach bocznej asymetrii chromosomu.

Rycina 1 przedstawia schemat wbudowywania się BrdU do DNA chromosomu Y, przy czym hipotetycznie założono, że cechą tego DNA jest nierównomierna zawartość tyminy w komplementarnych łańcuchach oraz przedstawiono przewidywane wzory wybarwiania się tego chromosomu w metafazach komórek, które podzieliły się jeden raz (M1) lub dwa razy (M2) w obecności BrdU.

M e t a f a z y M1. Podczas pierwszej fazy S komplementarny łańcuch powstający na matrycy łańcucha bogatego w adeninę przyłączy więcej BrdU aniżeli łańcuch powstający na matrycy łańcucha bogatego w tyminę. Różnica w zawartości BrdU między dwoma nowo powstałymi łańcuchami DNA będzie taka sama, jak różnica w zawartości tyminy między komplementarnymi łańcuchami wyjściowej cząsteczki DNA. Jeżeli różnica ta będzie dostatecznie duża, aby spowodować różnicę w powinowactwie do barwnika w trakcie barwienia techniką FPG, to należy oczekiwać, że uzyska się asymetrię boczną w wybarwianiu się tego regionu.

Uzyskane dane eksperymentalne potwierdzają przedstawione założenia teoretyczne (ryc. 3). W większości chromosomów Y stwierdza się występowanie dwóch odmiennie barwiących się regionów prostej asymetrii bocznej (ryc. 3a). Asymetria pierwsza — Y-1LA obejmuje dystalną

część ramion długich chromosomu (q12). W regionie tym jedna chromatyda pod względem intensywności wybarwienia jest podobna do regionów euchromatynowych, a druga jest słabo wybarwiona i niekiedy wprost niedostrzegalna. Asymetria druga — Y-2LA jest położona w środkowej części ramion długich i sąsiaduje bezpośrednio z Y-1LA. Region



Ryc. 3. Wzory wybarwienia się chromosomu Y człowieka w metafazach komórek, które podzieliły się jeden raz (M1) (a — c) lub dwa razy (M2) w obecności BrdU (d) [53]. a — strzałki duże wskazują asymetrię boczną Y-1LA, małe — asymetrię boczną Y-2LA. Chromosomy barwiono techniką FPG. b — chromosomy Y wybarwione techniką Q i następnie FPG. Strzałki wskazują asymetrię boczną Y-2LA, która jest zlokalizowana na granicy prążków q11/q12. c — porównanie normalnego chromosomu Y z niefluoryzującym chromosomem Y (nfY). Strzałki wskazują na obecność tylko jednego rodzaju asymetrii — Y-2LA. d — wzory wybarwienia się chromosomu Y (Type 1-3) w metafazach M2. Schemat wzorów wybarwienia znajduje się na ryc. 1

ten jest o wiele mniejszy od poprzedniego i występuje w postaci ciemnej kropki w jednej z chromatyd w środku ramienia długiego, natomiast druga chromatyda ma intensywność wybarwienia zbliżoną do euchromatyny.

Dokładną lokalizację obu regionów LA w stosunku do prążków QF w chromosomie Y umożliwia badanie, w którym chromosom ten barwi się fluorochromem C-15, fotografuje w mikroskopie fluorescencyjnym, odbarwia w alkoholu, a następnie barwi się metodą FPG i ponownie fotografuje [52]. Porównawcza analiza prążków QF i wzorów LA przedstawiona jest na rycinie 3b. Asymetria boczna Y-1LA ograniczona jest do regionu q12, natomiast Y-2LA jest zlokalizowana na granicy prążków q11/q12, częściowo zachodząc na słabo fluoryzującą część euchromatynową chromosomu. Biorąc pod uwagę najnowsze wzory prążkowe chromosomu Y, region Y-2LA znajduje się w prążku Yq1123. Obecność dwóch rodzajów asymetrii bocznej w chromosomie Y potwierdziły badania nad replikacją tego chromosomu [11, 43, 44, 72].

Niefluoryzujące chromosomy Y (nfY) wykazują tylko jeden rodzaj asymetrii bocznej który pod względem sposobu wybarwienia odpowiada Y-2LA [52]. Rycina 3c przedstawia chromosomy nfY po wybarwieniu techniką FPG.

Metafazy M2. Po drugiej fazie S komórki w obecności BrdU w połowie chromosomów Y każda z chromatyd siostrzanych będzie zawierała łańcuch bogaty w BrdU (ryc. 1). Łańcuchy komplementarne będą zawierały dużo adeniny, przy czym w jednej z chromatyd łańcuch bogaty w adeninę nie będzie zawierał BrdU (łańcuch „stary”). Założenie, że obecność jednego łańcucha bogatego w BrdU wystarczy do spowodowania jasnego wybarwienia się chromatyd sprawia, że obie chromatydy powinny wybarwić się jasno (izolabelling — typ 2, ryc. 3d). W pozostałych chromosomach jedna chromatyda będzie zawierała DNA składający się ze starego łańcucha, bogatego w tyminę, i komplementarnego łańcucha bogatego w adeninę oraz zawierającego BrdU. Ponieważ łańcuch ten będzie zawierał bardzo mało BrdU, należy więc oczekiwać, że rozpatrywana chromatyda wybarwi się najciemniej w całym kariotypie. Druga chromatyda będzie zawierała DNA składający się z łańcucha bogatego w BrdU i łańcucha bogatego w adeninę, nie zawierającego BrdU. Spowoduje to jasne wybarwienie się tej chromatyd i chromosom wykaże zróżnicowane wybarwienie chromatyd siostrzanych — SCD (typ 1 — ryc. 3d).

Analiza kilkuset chromosomów Y wykazała, że w metafazach M2 występują trzy typy wybarwienia się chromosomów Y [31, 32, 53]. Typ 1 — region q12 wykazuje typowe SCD, w którego obrębie rzadko zachodzi

wymiana chromatyd siostrzanych (ryc. 3d). Typ 2 — SCD pojawia się w obrębie ramion krótkich oraz w proksymalnej części ramion długich. Dystalna część ramion długich jest wybarwiona jasno, nie wykazując SCD i tworzy izolabelling (IL). Typ 3 — SCD pojawia się w obrębie ramion krótkich i w proksymalnej części ramion długich, podobnie jak w chromosomach typu 2, ale występuje także w dystalnej części ramion długich. Oba regiony SCD są oddzielone fragmentem IL, w którym obie chromatydki są jasno wybarwione. Wielkość fragmentu IL jest bardzo różna, a ciemno wybarwione fragmenty chromatyd w proksymalnym i dystalnym regionie SCD znajdują się w stosunku do siebie w pozycji cis lub trans.

W przedstawionych modelach heterochromatyny Y (ryc. 1) wymiany chromatyd siostrzanych (SCE) mogą zachodzić zarówno podczas pierwszego, jak i drugiego cyklu podziałowego w obecności BrdU w środowisku. Wymiana chromatyd, która zaszła w czasie pierwszego podziału, jest już zauważalna w metafazie M1, natomiast wymiany zachodzące w regionach euchromatynowych o równomiernym rozkładzie tyminy nie są wykrywalne w M1. Jeżeli SCE zajdzie podczas pierwszego podziału, to po drugim podziale komórki powinno się obserwować dwa rodzaje chromosomów Y — z interstycjalnym IL oraz ze skróconym IL w ramionach długich. Opisane typy 2 i 3 wybarwiania się chromosomów Y są zgodne z tymi założeniami. Jeśli natomiast SCE zajdzie podczas drugiego podziału komórki, to powinny pojawiać się chromosomy typu 2 i typu 1 z SCE w dystalnej części ramion długich (ryc. 1) i efekt ten został także zaobserwowany [31, 32]. Tak więc fakt wystąpienia różnych typów wybarwiania się chromosomu Y w metafazach M2 można tłumaczyć zjawiskiem nierównomiernego rozkładu tyminy w komplementarnych łańcuchach DNA tego chromosomu.

Należy zwrócić uwagę, że obecność IL może prowadzić do błędów w ocenie liczby SCE w tym regionie chromosomu Y. Ocena SCE w obszarze prążka q12 nie jest możliwa i należy sądzić, że brak obserwacji w tym chromosomie nie wynika z faktu, że jest on relatywnie mniejszy od pozostałych chromosomów, ale z faktu występowania IL w jego heterochromatynie w metafazach M2.

SATELITARNY DNA A ASYMETRIA BOCZNA HETEROCHROMATYNY KONSTYTUTYWNEJ

Uwidocznienie asymetrii bocznej w chromosomach eukariotycznych jest wywołane sztucznie asymetrią wybarwienia, która odzwierciedla różnice w zawartości tyminy między komplementarnymi łańcuchami DNA, a tym samym różnice we wbudowywaniu się BrdU do określo-

nych regionów chromosomów (w następstwie postępowania eksperymentalnego). Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem zjawiska LA heterochromatyny konstytutywnej jest lokalizacja w tych regionach różnych frakcji satelitarnego DNA. Frakcje te powinny wykazywać nierównomierny rozkład tyminy między komplementarnymi łańcuchami. Utrzymywanie się dużych, międzyłańcuchowych różnic w zawartości tyminy może łatwo zachodzić, gdy DNA składa się z krótkich, powtarzalnych sekwencji nukleotydów. Jeżeli odcinki takiego DNA składają się głównie z par A-T, to jeden z łańcuchów może mieć szczególnie wysoką zawartość tyminy [51].

Różnice w rozkładzie tyminy i adeniny wykryto w satelitarnym DNA myszy [26], skoczka (*Dipodomys ordii*) [38] oraz w dwóch spośród czterech satelitarnych frakcji DNA człowieka [25, 33]. Stwierdzono, że różnice w zawartości tyminy między komplementarnymi łańcuchami satelitarnego DNA człowieka wynoszą 10% w satelitarnym DNA I i około 4% w satelitarnym DNA II [25, 33]. Trudna jest do określenia zależność między wielkością różnicy w zawartości tyminy między komplementarnymi łańcuchami DNA w chromosomie a wystąpieniem wzoru wybarwiania się LA metodą FPG. Ponieważ satelitarny DNA II człowieka, w którym różnice te wynoszą tylko 4%, jest jedyną frakcją zlokalizowaną w heterochromatynie konstytutywnej chromosomu 16 [25, 27, 33], a region ten wykazuje z dużą częstością zjawisko LA [1, 2, 8, 25, 32], można więc przypuszczać, że już niewielka różnica w rozkładzie tyminy wystarczy do ujawnienia się LA w chromosomie. Jednakże obserwacje LA w regionach chromosomowych, gdzie nie zlokalizowano żadnej frakcji satelitarnego DNA [33] — w chromosomach 3 i 4 [8] oraz 6 [23], a także w chromosomie Y u *Drosophila hydei* [4], sugeruje, że średnio powtarzalny DNA może także tworzyć cytologicznie dostrzegalną asymetrię boczną [4, 16]. W chromosomach bobu wszystkie LA zlokalizowano w heterochromatynie interkalarnej [21, 77]. Bostock i Christie [5] sądzą ponadto, że niezależnie od nierównomiernego rozkładu tyminy w chromosomowym DNA, w procesie asymetrycznego wybarwiania się chromatyd siostrzanych pełnią rolę także inne czynniki, gdyż stwierdzili, że pomimo obecności takiego samego DNA w różnych chromosomach skoczka (*Dipodomys ordii*), tylko niektóre z nich ujawniły LA. Można przypuszczać, że izolowany DNA globalnie wykazuje asymetrię, ale rozmieszczenie jego w kariotypie danego organizmu, z którego go wyizolowano, może być różnorodne. Krótkie odcinki tego DNA mogą być tak rozproszone, że odpowiednie regiony chromosomów mogą być zbyt małe, aby wykazać ich obecność techniką FPG. Ponadto stan kondensacji heterochromatyny może mieć także wpływ na stopień uwidaczniania się LA [72].

Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* ^3H — cRNA, transkrybowanych na czterech frakcjach satelitarnego DNA człowieka, ujawniło rozkład tych frakcji w obrębie kariotypu człowieka. Wszystkie te frakcje zlokalizowano w dużych ilościach w chromosomie 9 oraz w chromosomie Y [33]. Ponadto frakcje te występują, ale w mniejszych ilościach, w regionach przycentromerowych chromosomów 15, 21 i 22 [33]. Centromerowe regiony chromosomów 1, 5, 7, 13, 14, 16, 17 i 20 były miejscami, gdzie stale hybrydyzowała co najmniej jedna frakcja satelitarnego DNA [33]. Największą korelację stwierdzono między wystąpieniem zjawiska LA heterochromatyny konstytutywnej a obecnością w niej satelitarnego DNA II, co szczególnie wyraźne jest w chromosomie 16, gdzie występuje wyłącznie frakcja II satelitarnego DNA i z wysoką częstością obserwuje się zjawisko LA [27, 33].

Ponieważ sposób wybarwiania się metodą FPG powinien przede wszystkim odzwierciedlać różnice we wbudowywaniu się BrdU do chromosomowego DNA, można więc sądzić, że przyczyną różnego barwienia się dwóch opisanych już tu regionów LA w chromosomie Y są różne właściwości DNA zlokalizowanego w tych regionach. Na odmiennosc obu tych frakcji DNA wskazują równoczesne obserwacje LA chromosomu Y oraz LA w innych chromosomach tej samej płytki metafazowej. W metafazach M1 region asymetrii Y-2LA oraz heterochromatyna konstytutywna chromosomów 1, 9, 15 i 16 są bardzo podobne pod względem wybarwiania się metodą FPG, natomiast Y-1LA, obejmujący obszar prążka q12, wybarwia się inaczej [32, 52, 53]. W metafazach M2 izolabelling wykryto tylko w Y-1LA, natomiast w Y-2LA oraz w chromosomach 1, 9, 15 i 16 nie wykryto tego zjawiska [31].

Dalszych dowodów na heterogenność DNA heterochromatyny konstytutywnej niektórych chromosomów autosomalnych oraz chromosomu Y dostarczyły złożone barwienia chromosomów z zastosowaniem AT-specyficznych oligopeptydowych antybiotyków (Distamycyny A — DA) oraz AT-specyficznych fluorochromów, jak np. DAPI — DA/DAPI bands [75, 76, 80]. Okazało się mianowicie, że chromosomy 1, 9, 15, 16 oraz Y (region Y-2LA), tj. te, które wybarwiają się podobnie w technice FPG, intensywnie fluoryzują po zabarwieniu techniką DA/DAPI. Fakt ten potwierdza wcześniejsze obserwacje, że w tych silnie fluoryzujących regionach występuje satelitarny DNA bogaty w pary AT.

Na obecność wielu różnych frakcji satelitarnego DNA w heterochromatynie konstytutywnej chromosomów 1, 9 i 16 wskazują wyniki badań, w których porównywano obraz cytologiczny tych samych chromosomów wybarwianych kolejno różnymi technikami [9, 10, 20, 34, 58, 74, 80]. Okazało się mianowicie, że jednolicie wybarwiający się w technice prążków C regiony heterochromatynowe tych chromosomów wykazywały po zastosowaniu innych technik bardziej złożoną strukturę.

Interesujący był efekt wybarwienia się chromosomu Y techniką DA/DAPI [75, 80]. Otóż wybarwiająca się dotychczas stosowanymi technikami w postaci jednolitego bloku heterochromatyna tego chromosomu ujawniła dwa odrębne prążki o silnej fluorescencji, zlokalizowane w proksymalnej i dystalnej części ramion długich. Fakt ten wskazuje na obecność w tym regionie, podobnie jak w chromosomach 1, 9 i 16, różnych klas satelitarnego DNA, a region proksymalny tej heterochromatyny (DA/DAPI-pozytywny i Echinomycin/DAPI-negatywny) uznano za miejsce lokalizacji „male specific DNA” [6]. Analiza DNA mężczyzn z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych wykazała, że ten specyficzny DNA tworzą dwie frakcje satelitarnego DNA III, jedna o 3 kb i druga 2,1 kb [6, 73]. Obie te frakcje tworzą polimorficzny blok heterochromatyny ramion długich chromosomu Y. Niestety, brak jest danych o rozkładzie tyminy w komplementarnych łańcuchach tych frakcji. Fakt występowania w tym regionie LA sugeruje, że DNA tego regionu powinien wykazywać niesymetryczny rozkład tyminy. Region ten wybarwia się również, aczkolwiek mniej specyficznie niż techniką FPG, techniką Giemsa-11, którą uważa się za specyficzną dla satelitarnego DNA III [20, 28, 58].

Dodanie AT-specyficznego antybiotyku distamycyny A lub DAPI do hodowli komórkowej powoduje, że w uzyskanych z tych hodowli chromosomach regiony bogate w satelitarny DNA ulegają despiralizacji. Dotyczy to najczęściej chromosomu Y oraz przewężeń wtórnych chromosomów 1, 9 i 16 [68, 71]. Chromosom Y bardzo często despiralizował tylko w proksymalnej części heterochromatynowego prążka q12, różniując go na dwa regiony. Jest to kolejne potwierdzenie wielu dowodów przedstawionych już tu na to, że satelitarny DNA chromosomu Y jest złożony z różnych frakcji satelitarnego DNA, które mogą być uwidaczniane cytologicznie.

Wykryte asymetrie boczne heterochromatyny konstytutywnej chromosomów 1, 9, 16 i Y człowieka stanowiącymi są niewątpliwie przez różne frakcje satelitarnego DNA, szczególnie II i III. Charakter wybarwienia się tych regionów techniką FPG sugeruje, że DNA tych regionów ma nieproporcjonalny rozkład tyminy w komplementarnych łańcuchach chromatyd siostrzanych tych chromosomów.

BIĄŁKA CHROMOSOMOWE A ASYMETRIA BOCZNA HETEROCHROMATYNY KONSTYTUTYWNEJ

Uwidocznienie niesymetrycznie wybarwiających się regionów w heterochromatynie konstytutywnej zależy może nie tylko od składu i rozmieszczenia nukleotydów we frakcjach satelitarnego DNA, ale również od białek znajdujących się w tych regionach. Już sama obecność sateli-

tarnego DNA może spowodować jego specyficzne oddziaływanie z białkami histonowymi [15]. Analiza składu chromatyny wykazuje, że w porównaniu z euchromatyną, w heterochromatynowej frakcji chromatyny białka niehistonowe występują w większej masie lub są dla niej swoiste [19]. Zjawisko to znalazło potwierdzenie w specyficznie wybarwionych chromosomach myszy, w których heterochromatynie centromerowej wykryto swoiste białka kwaśne [60]. Powyższe wyniki wskazują zatem, że regiony heterochromatynowe chromosomów wyróżniają się od pozostałych nie tylko składem DNA ale i składem wiążących się z nimi białek.

Zaburzenia w oddziaływaniach DNA-białka histonowe lub kwaśne mogą być wywoływane wbudowywaniem się BrdU do chromosomowego DNA [57, 61]. Analiza *in vitro* i *in situ* kompleksów histonów z DNA podstawionym i niepodstawionym BrdU wykazuje, że histony wiążą się silniej z DNA zawierającym BrdU [57, 61]. Stwierdzono ponadto, że w bakteryjnym DNA, podstawionym BrdU pod wpływem promieniowania UV, powstaje więcej wiązań krzyżowych DNA-białko niż w DNA bez wbudowanego BrdU [82]. Lin i wsp. [57] uważają, że wywołane przez BrdU zaburzenia w oddziaływaniach histonów z DNA zmieniają stan kondensacji chromatyny, co wpływa na właściwości wybarwiania się chromosomów metafazowych.

Przedmiotem barwienia techniką FPG jest chromosom metafazowy, którego większość białek histonowych zostaje usunięta w czasie jego utrwalania w mieszaninie kwasu octowego i metanolu [16, 42]. Ponadto chromosom taki mając w większości zdenaturowany DNA z wbudowanymi cząsteczkami BrdU i barwnika Hoechst 33258 jest poddawany w tej technice naświetlaniu promieniowaniem UV i inkubacji w temperaturze 60°C w SSC [31, 35, 53, 67]. Wszyscy autorzy zajmujący się badaniami nad mechanizmem wybarwiania się chromosomów techniką FPG są zgodni, że polega on na intensywnej fotolizie podstawionego BrdU DNA w obecności fotouczulających związków (barwnik Hoechsta) oraz na późniejszej ekstrakcji tego DNA z chromatydy podczas inkubacji w gorącym roztworze soli. Wybiórczość tej ekstrakcji zależy oczywiście od siły oddziaływań między chromosomowymi białkami a podstawionym BrdU DNA. W przypadku stosowania metod uzyskiwania SCD, w których nie stosowano naświetlania promieniowaniem UV, a więc bez etapu fotolizy DNA, decydującym mechanizmem jest zróżnicowana ekstrakcja DNA i białek głównie z chromatyd zawierających BrdU [84]. Jak ważne znaczenie dla uwidaczniania LA ma procedura barwienia świadczy praca, w której zaobserwowano LA w wielu chromosomach z wyjątkiem chromosomu Y [8]. Metoda barwienia zastosowana w tej pracy nie zawierała etapu naświetlania promieniowaniem UV, stosowanego przez innych badaczy opisujących LA tego chromosomu [27, 30, 32, 53].

Ponieważ w utrwalonym chromosomie nie ma wielu białek histonowych, należy więc sądzić, że znaczny wpływ na ujawnianie się LA mogą mieć białka kwaśne. Stwierdzono, że sole srebra reagują znacznie silniej z chromosomowymi białkami kwaśnymi niż z białkami histonowymi lub kwasami nukleinowymi [40, 79]. Stosując barwienie solami srebra Howell i Denton [40] zauważyli, że najbardziej charakterystyczną cechą tego barwienia jest brak wiązania się srebra w przewężeniach wtórnych chromosomów 1, 9 i 16 oraz w dystalnej części ramion długich chromosomu Y, a więc w regionach heterochromatynowych. Te różnice wybarwienia się, w porównaniu z pozostałymi chromosomami, mogą odzwierciedlać zarówno ilościowe, jak i jakościowe różnice składu białek kwaśnych tych regionów. Wskazuje to równocześnie na molekularne podobieństwo chromosomów 1, 9, 16 i Y. Wykazano jednak, że traktowanie chromosomów gorącymi płynami hipotonicznymi i następnie barwienie Giemśą ujawnia różnice w wybarwianiu się wymienionych regionów [45]. Przypuszcza się, że białka kwaśne, odpowiedzialne za efekt barwienia, są usuwane w czasie barwienia lub zmieniają swoją strukturę tracąc powinowactwo do soli srebrowych [40]. Wiadomo, że np. satelitarny DNA chromosomu Y denaturuje najszybciej spośród wszystkich chromosomów człowieka [14] i fakt ten może powodować utratę powinowactwa otaczających go białek do soli srebrowych. Nowych informacji o białkach, występujących w chromosomie Y człowieka, dostarczył Goyanes [36], który zastosował dwustopniową procedurę barwienia tego chromosomu srebrem. Zaobserwował on w nim dwa prążki „srebrowe”: jeden zlokalizowany blisko centromeru oraz drugi na granicy eu- i heterochromatyny (q11/q12), dokładnie w tym samym miejscu, gdzie opisano występowanie LA typu Y-2LA [52]. Technika srebrową nie wybarwiał się region drugiej LA (Y-1LA), co świadczy o różnicach w składzie białek obu regionów.

Na podstawie omówionych faktów należy sądzić, że podłożem molekularnego zjawiska asymetrii bocznej heterochromatyny konstytutywnej obserwowanego w chromosomach metafazalnych jest:

(a) obecność odmiennych frakcji satelitarnego DNA o nierównomiernym rozkładzie tyminy między komplementarnymi łańcuchami w siostrzanych chromatydach chromosomu;

(b) niesymetryczne wbudowywanie się BrdU do chromosomowego DNA, prowadzące do zaburzeń w oddziaływaniach białek z podstawionym BrdU DNA w siostrzanych chromatydach;

(c) działanie czynników fizykochemicznych, stosowanych w technice FPG, prowadzące do fotolizy określonych rejonów DNA i następnie preferencyjnej ekstrakcji części DNA z chromatydy, w której DNA zawiera BrdU w obu niciach, co powoduje po wybarwieniu roztworem

barwnika Giemsy ujawnienie się asymetrycznej struktury heterochromatyny konstytutywnej.

ZNACZENIE ASYMETRII BOCZNEJ HETEROCHROMATYNY KONSTYTUTYWNEJ CHROMOSOMÓW CZŁOWIEKA

Cytologiczne uwidocznienie zjawiska asymetrii bocznej heterochromatyny konstytutywnej w chromosomach człowieka ma znaczenie nie tylko w poznawaniu molekularnego zróżnicowania tych chromosomów, ale również wnosi nowe informacje dotyczące roli tych obszarów w funkcji chromosomów oraz ich ewolucyjnego pochodzenia.

Znajomość występowania dwóch LA chromosomu Y znalazła praktyczne zastosowanie w cytogenetyce klinicznej. Łączne użycie kilku technik barwienia pozwala na precyzyjniejszą lokalizację miejsc pęknięć tego chromosomu. Badania niefluoryzujących chromosomów Y (nfY), przeprowadzone techniką FPG, wykazują, że mają one jedynie jeden typ asymetrii — asymetrię Y-2LA (ryc. 3). Sugeruje to utratę regionu Yq12 z asymetrią typu Y-1LA [32, 44, 52, 53]. Na ogół przyjmuje się, że pierwotnym mechanizmem prowadzącym do powstania u człowieka nfY jest pęknięcie chromosomu, zachodzące między silnie fluoryzującą częścią heterochromatynową ramion długich, a słabo fluoryzującą euchromatynową tych ramion, albo w obrębie q12 [59]. Badania 15 przypadków nfY [44] wykazują jednoznacznie, że w 13 spośród nich doszło do pęknięcia między Y-1LA i Y-2LA. Utrata dystalnej części q12 chromosomu Y jest w mniejszym lub większym stopniu ograniczeniem wybarwiającego się regionu Y-2LA. Szczególna wrażliwość na pęknięcie tego regionu jest bardzo ważna, gdyż zlokalizowano w nim geny kontrolujące spermatogenezę [85] i wszelkie uszkodzenia tego miejsca mogą mieć implikacje kliniczne. Stwierdzono ponadto, że jeżeli pęknięcie nastąpi powyżej obu typów asymetrii, to u osobników tych wystąpi mozaicyzm komórkowy mos 46,XY/45,X [44]. Tak więc utrata satelitarnych frakcji DNA prowadzi do destabilizacji mitotycznej tego chromosomu. Przypuszcza się zatem, iż obecność powtarzalnych sekwencji DNA w chromosomie Y odgrywa ochronną rolę w zapobieganiu formowania się aberracji tego chromosomu [44].

Znajomość zjawiska LA rozszerza także informacje o polimorfizmie heterochromatyny konstytutywnej niektórych chromosomów i znajduje zastosowanie w badaniach populacyjnych i medycynie sądowej [2, 22, 69].

Najczęściej obserwowanym w populacjach ludzkich polimorfizmem heterochromatyny konstytutywnej jest powiększenie tego regionu w postaci 1qh⁺, 9qh⁺ i 16qh⁺. Rzadziej spotykanym wariantem polimor-

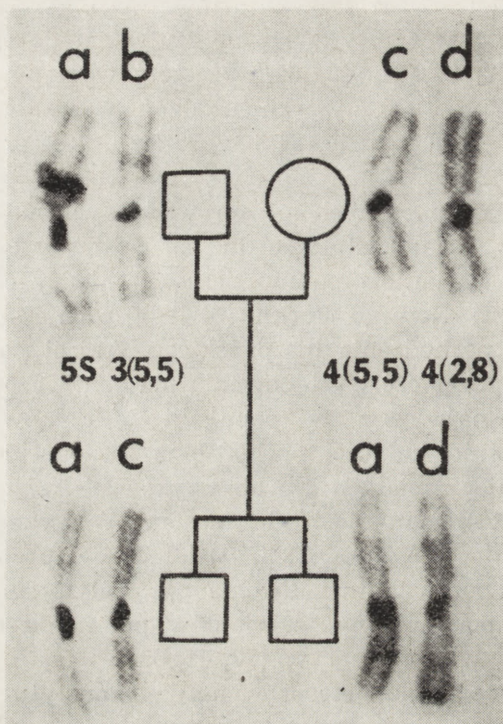
ficznym jest częściowa bądź całkowita inwersja heterochromatyny chromosomów 1 i 9 oraz warianty związane z utratą tego obszaru w postaci $Yq-$, $9q-$ i $1q-$ [22, 24, 41, 48, 69]. Częstość występowania wariantów chromosomowych na 1000 żywych urodzeń wynosiła 13,2 w ZSRR, 15,0 w Danii, 15,6 w Kanadzie, 21,3 w Szkocji, 73,4 w USA oraz 106,0 w Izraelu (cyt. [22]).

W badaniach populacyjnych przeprowadzonych u 6250 osób przez Hsu i wsp. [41] wykazano istnienie dużych różnic w częstości występowania niektórych wariantów polimorficznych między czterema grupami etnicznymi ludności Nowego Jorku (biali Europejczycy, amerykańscy Murzyni, ludność pochodzenia hiszpańskiego, Azjaci pochodzenia orientalnego, Indianie). Częstość występowania pericentrycznej inwersji chromosomu 9 jest najwyższa w populacji Murzynów amerykańskich (3,57%), niższa wśród ludności pochodzenia hiszpańskiego i relatywnie najniższa w populacji białych Europejczyków i Azjatów (odpowiednio 2,42, 0,73 i 0,26%), natomiast chromosom Y wykazywał najwyższą zmienność w populacji Azjatów (3,37%) i ludności pochodzenia hiszpańskiego (1,82%) w porównaniu z dwoma pozostałymi grupami. Nie udowodniono do tej pory wpływu wariantów polimorficznych heterochromatyny konstytutywnej na fenotyp [22, 41, 69].

Do oceny polimorfizmu heterochromatyny konstytutywnej chromosomów 1, 9 i 16 stosuje się najczęściej metodę prążków C. Jednak subiektywizm w ocenie wielkości tego regionu powoduje powstawanie ograniczeń przy porównywaniu wyników uzyskanych z zastosowaniem tej metody. Całkowicie nowe możliwości oceny polimorfizmu heterochromatyny tych chromosomów stwarza analiza zjawiska asymetrii bocznej.

Próbę zastosowania analizy tego zjawiska do oceny rodzinnego dziedziczenia wariantów polimorficznych chromosomu 1 podejmują Angell i Jacobs [2]. Ocena jedynie wielkości prążka C tego chromosomu pozwoliła na stwierdzenie heterozygotyczności tylko u 4 spośród 44 badanych osobników. Liczba wykrytych heterozygot wzrosła do 20 po użyciu techniki FPG i zastosowaniu analizy zjawiska asymetrii bocznej chromosomu 1. W przedstawionym na ryc. 4 przykładzie rodzinnego dziedziczenia wariantów LA heterochromatyny chromosomu 1, na podstawie wielkości prążka C nie można odróżnić od siebie chromosomów pochodzenia matczyngo (ryc. 4, chromosomy c i d). Stało się to możliwe po zabarwieniu ich techniką FPG. Uwidoczniła ona w ich heterochromatynie dwa odmienne warianty złożonej asymetrii bocznej, co pozwoliło określić chromosom c jako 4 (5,5), natomiast chromosom d jako 4 (2,8).

Prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa na podstawie cech polimorficznych heterochromatyny konstytutywnej jest duże. W badaniach przeprowadzonych na ludności populacji czeskiej oceniono je na 64% [3],



Ryc. 4. Rodzinne dziedziczenie wzorów asymetrii bocznej chromosomu 1 u człowieka [2]

duńskiej — na 84,4⁰% [64] i niemieckiej — na 86,7⁰% (cyt. [69]). Jego dokładność, po uwzględnieniu analizy zjawiska asymetrii bocznej, porównuje się z dokładnością badań układu antygenów zgodności tkankowej HLA [69].

Większość badaczy zajmujących się indukcją aberracji w chromosomach człowieka stwierdza, że regiony heterochromatyny konstytutywnej ulegają pęknięciom częściej niż należałoby to oczekiwać biorąc pod uwagę wielkość tych regionów (cyt. [18]). Pod wpływem mitomycyny C stwierdzano wysoką częstość aberracji chromosomów 1, 9, 16 i chromosomów akrocentrycznych oraz chromosomu Y [7, 39]. Uważa się, że obserwowane aberracje heterochromatyny konstytutywnej wynikają z nierównomiernego crossing-over zachodzącego po procesie naprawczym, czemu sprzyja repetytywność DNA w tych regionach [39]. W literaturze spotyka się różne opinie na temat lokalizacji pęknięć oraz wymian chromatyd siostrzanych w chromosomach eukariotycznych [78]. Wiele doniesień wskazuje jednoznacznie na fakt, że pęknięcia chromatyd pod wpływem mutagenów powstają głównie na granicy przejścia eu-

w heterochromatynę [78]. Ponadto wielu autorów uważa, że wysoka częstość SCE występuje także w miejscu przejścia eu- w heterochromatynę [5, 46]. Badania crossing-over u muchy owocowej wykazują, że regiony heterochromatynowe są odporne na międzychromosomowe rekombinacje, natomiast często zachodzą one w regionach granicznych [70]. Tak więc struktura chromatyny chromosomu w rejonach granicznych wydaje się podatna zarówno na pęknięcia pod wpływem mutagenów, jak i na wymiany chromatyd siostrzanych. Rejony przejściowe między obu typami chromatyny są przypuszczalnie zbudowane z satelitarnego DNA o powtarzalnych sekwencjach i konfiguracja kompleksów DNA — białka wydaje się w tych regionach przejściowo rozluźniona. Heterochromatyna o zbitej strukturze jest słabiej dostępna zarówno dla mutagenów jak i enzymów naprawczych, stąd wykazuje niską częstość SCE [5, 12, 13, 19, 46].

Zbyt mało jest jeszcze danych eksperymentalnych, aby wykazać zależność między nierównomiernym rozkładem tyminy w regionach bocznej asymetrii a wrażliwością tych miejsc na pęknięcie czy SCE. W chromosomach bobu stwierdzono, że część regionów LA występuje w miejscach tzw. hot spots, podatnych na działanie mutagenów [21]. Z kolei Bostock i Christie [5] wykazali wysoką częstość SCE między regionami LA w chromosomach skoczka (*Dipodomys ordii*). Jest to zgodne z obserwacjami chromosomu Y człowieka, w którym, jak już wykazano, w czasie formowania się aberracji strukturalnych miejsca pęknięć zlokalizowano na granicy między eu- i heterochromatyną, a więc na przejściu między Y-1LA a Y-2LA. W chromosomie 9 człowieka, który jest najbardziej zbliżony do chromosomu Y pod względem zawartości satelitarnego DNA [33, 37, 62], w czasie formowania się aberracji strukturalnych miejsca pęknięć zlokalizowane są w heterochromatynie lub ściśle na granicy przejścia eu- w heterochromatynę [37]. Zwraca również uwagę fakt, że częstość polimorfizmu heterochromatyny chromosomu Y jest wyższa aniżeli chromosomów 1, 9, 16 i chromosomów akrocentrycznych [18, 41]. Uważa się, że polimorfizm heterochromatyny konstytutywnej powstaje w wyniku nierównomiernego crossing-over, zachodzącego w satelitarnym DNA. Są dowody na to, że nierównomierny crossing-over może zachodzić zarówno w mejozie, jak i mitozie [18]. To odchylenie powinno częściej występować w regionach zawierających powtarzalny DNA. Niezależnie od delecji, duplikacja jest przyczyną powstawania polimorfizmu autosomów i chromosomu Y, a ten wzrost zawartości DNA powinien mieć źródło w nierównomiernym crossing-over, zachodzącym w komórkach somatycznych [28].

Przy założeniu, że powstanie wymiany chromatyd siostrzanych jest

również wynikiem nierównomiernego crossing-over, obserwowane wysokie częstości SCE na granicy eu- i heterochromatyny mogą być odpowiedzialne za stopniowy wzrost lub utratę powtarzalnych sekwencji z końców regionów heterochromatynowych [5]. Opisane jest tu zwiększenie częstości pęknięć pod wpływem mutagenów na granicy przejścia eu- i heterochromatyny w chromosomach 1, 9, 16 i Y zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia nierównomiernego crossing-over w tym regionie. To preferencyjne zlokalizowanie SCE i „hot spots” na granicy eu- i heterochromatyny może mieć znaczenie w proponowanym mechanizmie ewolucji i amplifikacji satelitarnego DNA [83].

Analiza porównawcza asymetrycznych regionów heterochromatynowych małp naczelnych i człowieka powinna dostarczyć nowych informacji o ewolucji kariotypowej na poziomie organizacji DNA w chromosomie. Pierwsze, zachęcające wyniki uzyskał Ghosh i wsp. [30], który zlokalizował jedną asymetrię boczną w chromosomie 13 małpy *Rhesus* i wyciągnął wniosek, że asymetryczny rozkład tyminy w DNA chromosomu 1 człowieka powstał później ewolucyjnie aniżeli taka sama asymetria w chromosomie 15 człowieka. Niestety, nie pojawiły się do tej pory dalsze prace nad lokalizacją LA w chromosomach małp naczelnych. Interesujące byłoby zwłaszcza wybarwienie techniką FPG chromosomu Y goryla, który wykazuje, podobnie jak u człowieka, intensywną fluorescencję i hybrydyzuje z wszystkimi frakcjami satelitarnego DNA człowieka [81]. Analiza zjawiska bocznej asymetrii chromosomów Y oraz innych nie znanych jeszcze regionów LA w chromosomach małp naczelnych pozwoliłaby na pogłębienie naszej wiedzy o ewolucyjnym pochodzeniu chromosomów człowieka.

LITERATURA

- [1] ANGELL R. R., JACOBS P. A., Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin, *Chromosoma*, **51**: 301-310, 1975.
- [2] — Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin: frequency and inheritance, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 144-152, 1978.
- [3] BALICEK P., ŽIŽKA J., SKALSKA H., Variability and familial transmission of constitutive heterochromatin of human chromosomes evaluated by the method of linear measurement, *Hum. Genet.*, **42**: 257-265, 1978.
- [4] BONACCORSI S., PIMPINELLI S., GATTI M., Cytological dissection of sex chromosome heterochromatin of *Drosophila hydei*, *Chromosoma*, **84**: 391-403, 1981.
- [5] BOSTOCK C. J., CHRISTIE S., Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosomes of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*), *Chromosoma*, **56**: 275-287, 1976.

- [6] BOSTOCK C. J., GOSDEN J. R., MITCHEL A. R., Localization of male specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome, *Nature*, **272**: 324-328, 1978.
- [7] BOURGEOIS C. A., Distribution of Mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA, *Chromosoma*, **48**: 203-211, 1974.
- [8] BRITO-BABAPULLE V., Lateral asymmetry in human chromosomes 1, 3, 4, 15 and 16, *Cytogenet. Cell Genet.*, **29**: 198-202, 1981.
- [9] BUYS C. H. C. M., ANDERS G. J. P. A., GOUW W. L., BORKANT-YPMA J. M. M., BLANKERS-PLATTER J. A. M., A comparison of constitutive heterochromatin staining methods in two cases of familial heterochromatin deficiencies, *Hum. Genet.*, **52**: 133-138, 1979.
- [10] BUYS C. H. C. M., GOUW W. L., BLANKERS J. A. M., DALEN C. H., Heterogeneity of human chromosome 9 constitutive heterochromatin as revealed by sequential Distamycin A/DAPI staining and C-banding, *Hum. Genet.*, **57**: 28-30, 1981.
- [11] CAMARGO M., CERVENKA J., Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model, *Am. J. Hum. Genet.*, **34**: 757-780, 1982.
- [12] CARRANO A. V., WOLFF S., Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac, *Chromosoma*, **53**: 361-369, 1975.
- [13] CARRANO A. V., JOHNSTON G. R., The distribution of Mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac, *Chromosoma*, **64**: 97-107, 1977.
- [14] CHAPELLE de la A., SCHRÖDER J., SELANDER R. K., STENSTRAND K., Differences in DNA composition along mammalian metaphase chromosomes, *Chromosoma*, **42**: 365-382, 1973.
- [15] CLARK R. J., FELSENFELD G., Association of arginine-rich histones with GC-rich regions of DNA in chromatin, *Nature*, **240**: 226-227, 1972.
- [16] COMINGS D. E., Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure, *Ann. Rev. Genet.*, **12**: 25-46, 1978.
- [17] — Lateral asymmetry of human chromosomes, Editorial, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 223-226, 1978.
- [18] CRAIG-HOLMES A. P., MOORE F. B., SHAW M. W., Polymorphism of human C-band heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence for sematic crossing-over, *Am. J. Hum. Genet.*, **27**: 178-189, 1975.
- [19] CROSSEN P. E., DRETS M. E., ARRIGHI F. E., JOHNSTON D. A., Analysis of the frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Hum. Genet.*, **35**: 345-352, 1977.
- [20] DONLON T. A., MAGENIS R. E., Structural organization of the heterochromatic region of human chromosome 9, *Chromosoma*, **84**: 353-363, 1981.
- [21] DÖBEL P., SCHUBERT I., Banding-Techniken und differentielle Markierung durch Basenanaloge-Beiträge zur Chromosomenstruktur, zum Zellzyklus und zur Entstehung chromosomaler Strukturumbauten pflanzlicher Chromosomen, Ph. D. Thesis, Gatersleben 1981.
- [22] DZIDA J., HÜBNER H., Wykorzystanie polimorfizmu chromosomów ludzkich w dochodzeniu ojcostwa, *Arch. Med. Sąd. i Krym.*, **32**: 25-31, 1982.
- [23] EMANUEL B. S., Compound lateral asymmetry in human chromosome 6: BrdU-dye studies of 6q12-6q14, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 153-159, 1978.

- [24] ERDTMANN B., Aspects of evaluation, significance and evolution of human CL-band heteromorphism, *Hum. Genet.*, **61**: 281-294, 1982.
- [25] EVANS H. J., Some facts and fancies relating to chromosome structure in man [w] *Advances in human genetics*, red. H. Harris, K. Hirschorn, Plenum Press, London, New York 1977, 347-438.
- [26] FLAMM W. G., McCALLUM M., WALKER P. M. B., The isolation of complementary strands from a mouse DNA fraction, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**: 1729-1734, 1967.
- [27] GALLOWAY S. M., EWANS H. J., Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man, *Exptl. Cell Res.*, **94**: 454-459, 1975.
- [28] GERAEDS J. P. M., PEARSON P. L., Van der PLOEG M., VOSSEPOEL A. M., Polymorphisms for human chromosomes 1 and Y, *Exptl. Cell Res.*, **95**: 9-14, 1975.
- [29] GHOSH P. K., RANI R., NAND R., Lateral asymmetry of constitutive heterochromatin in human chromosomes, *Hum. Genet.*, **52**: 79-84, 1979.
- [30] GHOSH P. K., NAND R., RANI R., Restrictive distribution of asymmetric C-bands in the chromosome complement of the Rhesus (*Macaca mulatta*), *Exptl. Cell Res.*, **135**: 424-427, 1981.
- [31] GIBAS Z., LIMON J., Isolabelling of the long arm of the human Y chromosome demonstrated by FPG technique, *Chromosoma*, **69**: 113-120, 1978.
- [32] GIBAS Z., Badanie heterochromatyny konstytutywnej chromosomów metafazalnych z zastosowaniem metody zróżnicowanego barwienia chromatyd siostrzanych, *Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku*, 1979.
- [33] GOSDEN J. R., MITCHEL A. R., BUCKLAND R. A., CLAYTON R. P., EVANS H. J., The location of four human satellite DNAs on human chromosomes, *Exptl. Cell Res.*, **92**: 148-158, 1975.
- [34] GOSDEN J. R., SPOWART G., LAWRIE S. S., Satellite DNA and cytological staining patterns in heterochromatic inversions of human chromosome 9, *Hum. Genet.*, **58**: 276-278, 1981.
- [35] GOTO K., AKEMATSU T., SHIMAZU H., SUGIJAMA T., Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining, *Chromosoma*, **53**: 223-230, 1975.
- [36] GOYANES V. J., Sequential staining of euchromatic and heterochromatic regions of the human Y chromosome, *J. Med. Genet.*, **17**: 468-471, 1980.
- [37] HANSMAN I., Structural variability of human chromosome 9 in relation to evolution, *Hum. Genet.*, **31**: 247-262, 1976.
- [38] HATCH F. T., MAZRIMAS J. A., Fractionation and characterization of satellite DNAs of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*), *Nucleic Acids Res.*, **1**: 559-563, 1974.
- [39] HOEHN H., MARTIN G. M., Clonal variants of constitutive heterochromatin of human fibroblasts after recovery from Mitomycin treatment, *Chromosoma*, **43**: 203-210, 1973.
- [40] HOWELL W. M., DENTON T. E., Negative silver staining in AT and satellite DNA-rich regions of human chromosomes, *Chromosoma*, **57**: 165-169, 1976.
- [41] HSU L., BENN P., TANNENBAUM H., PERLIS T., CARLSON A., Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16 and Y in 4 major ethnic groups: A large prenatal study, *Am. J. Med. Genet.*, **26**: 95-101, 1987.
- [42] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postępy w poznawaniu struktury materiału genetycznego u Eukariota. I. Struktura chromatyny, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 133-148, 1982.

- [43] KAŁUŻEWSKI B., BrdU-Hoechst-Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocytes cultures, *Chromosoma*, **85**: 553-569, 1982.
- [44] — Replication kinetics of the Y chromosome, [w] *The Y chromosome, część B. Basic characteristics of the Y chromosome*, red. A. A. Sandberg, wyd. Alan R. Liss, New York 1985, 327-356.
- [45] KANDA N., Differential staining in the secondary construction regions of human chromosomes A1, C9 and E16 by a heat-hypotonic treatment technique, *Hum. Genet.*, **45**: 19-24, 1978.
- [46] KATO H., Preferential occurrence of sister chromatid exchanges at heterochromatin-euchromatin junctions in the wallaby and hamster chromosomes, *Chromosoma*, **74**: 307-316, 1979.
- [47] KIM M. A., Fluorometrical detection of thymine base differences in complementary strands of satellite DNA in human metaphase chromosomes. *Human-genetik*, **28**: 57-63, 1975.
- [48] KLECZKOWSKA A., Warianty strukturalne chromosomów człowieka. I. Polimorfizm prążków C, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 259-270, 1982.
- [49] LAKHOTIA S. C., ROY J. K., KUMAR M., A study of heterochromatin in *Drosophila nasuta* by the 5-bromodeoxyuridine-Giemsa staining technique, *Chromosoma*, **72**: 249-265, 1979.
- [50] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3395-3399, 1973.
- [51] LATT S. A., DAVIDSON R. L., LIN M. S., GERALD P. S., Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33258 Hoechst, *Exptl. Cell Res.*, **87**: 427-429, 1974.
- [52] LIMON J., GIBAS Z., KAŁUŻEWSKI B., MORUZGAŁA T., Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosome, *Hum. Genet.*, **51**: 247-252, 1979.
- [53] LIMON J., GIBAS Z., Lateral asymmetry of the Y chromosome and its significance, [w] *The Y chromosome, część A Basic characteristics of Y chromosome*, red. A. A. Sandberg, wyd. Alan R. Liss, New York 1985, 317-326.
- [54] LIN M. S., LATT S. A., DAVIDSON R. L., Microfluorometric detection of asymmetry in the centromeric region of mouse chromosomes, *Exptl. Cell Res.*, **86**: 392-395, 1974.
- [55] LIN M. S., ALFI O. S., Detection of lateral asymmetry in C-band of human chromosomes by BrdU-DAPI fluorescence, *Somatic Cell Genet.*, **4**: 603-608, 1978.
- [56] — Variation on lateral asymmetry of human chromosome 1, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 243-250, 1978.
- [57] LIN S., LIN D., RIGGS A. D., Histone bind more tightly to bromodeoxyuridine-substituted DNA than to normal DNA, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 2183-2191, 1976.
- [58] MAGENIS R. E., DONLON T. A., WYANDT H. E., Giemsa-11 staining of chromosome 1. A newly described heteromorphism, *Science*, **202**: 64-65, 1978.
- [59] MAGENIS R. E., DONLON T. A., Nonfluorescent Y chromosomes. Cytological evidence of origin, *Hum. Genet.*, **60**: 133-138, 1982.
- [60] MATSUKUMA S., UTAKOJI T., Non-histone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome, *Exptl. Cell Res.*, **105**: 217-222, 1977.
- [61] MATTHES E., FENSKE H., EICHHORN I., LANGEN P., LINDIKEIT R., Altered histone-DNA interactions in rat liver chromatin containing 5-bromodeoxyuridine-substituted DNA, *Cell Diff.*, **6**: 241-251, 1977.

- [62] McKAY R. D. G., BOBROW M., COOKE H. J., The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 19-32, 1978.
- [63] MIKLOS G. L., JOHN B., Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 264-280, 1979.
- [64] NIEBUHR E., GÜRTLER H., Chromosome variants in Danish cases of disputed paternity, Referate on 7 Internationale Tagung der Gasellschaft für forenische Blutgruppenkunde, V Hamburg 1977.
- [65] OLSZEWSKA J., Heterochromatyna w genomie roślin, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 243-258, 1982.
- [66] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, **168**: 1356-1358, 1970.
- [67] PERRY P., WOLF S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid, *Nature*, **251**: 156-158, 1974.
- [68] PRANTERA G., PIMPINELLI S., ROCCHI A., Effects of Distamycin A on human leukocytes in vitro, *Cytogenet. Cell Genet.*, **23**: 103-107, 1979.
- [69] PRZYBYLSKI Z., MOGILNICKA H., Polimorficzne cechy chromosomów człowieka i ich znaczenie w dochodzeniu spornego ojcostwa, *Arch. Med. Sąd. i Krym.*, **32**: 111-124, 1982.
- [70] ROBERTS P. A., Difference in behaviour of eu- and heterochromatin: crossing over, *Nature*, **196**: 725-726, 1969.
- [71] ROCCHI A., Di CASTRO M., PRANTERA G., Effects of DAPI on human leukocytes in vitro, *Cytogenet. Cell Genet.*, **23**: 250-254, 1979.
- [72] SCHEMP W., MÜLLER U., High resolution replication patterns of the human Y chromosome, *Chromosoma*, **86**: 229-237, 1982.
- [73] SCHMIDTKE J., SCHMID M., Regional assignment of 2, 1-kb repetitive sequence to the distal part of the human Y heterochromatin, *Hum. Genet.*, **55**: 255-257, 1980.
- [74] SCHNEDL W., Structure and variability of human chromosomes analysed by recent techniques, *Hum. Genet.*, **41**: 1-9, 1978.
- [75] SCHNEDL W., DANN O., SCHWEIZER D., Effects of counterstaining with DNA binding drugs of fluorescent banding patterns of human and mammalian chromosomes, *Eur. J. Cell Biol.*, **20**: 290-296, 1980.
- [76] SCHNEDL W., ABRAHAM R., DANN O., GEBER G., SCHWEIZER D., Preferential fluorescent staining of heterochromatic regions in human chromosomes 9, 15 and Y by D287/170, *Hum. Genet.*, **59**: 10-13, 1981.
- [77] SCHUBERT I., RIEGER A., Asymmetric banding of *Vicia faba* chromosomes after BrdU incorporation, *Chromosoma*, **70**: 385-391, 1979.
- [78] — Sister chromatid exchanges and heterochromatin, *Hum. Genet.*, **57**: 119-130, 1981.
- [79] SCHWARZACHER H. G., MIKELSAAR A. U., SCHNEDL W., The nature of AG-staining of nucleolus organizer regions, *Cytogenet. Cell Genet.*, **20**: 24-39, 1978.
- [80] SCHWEIZER D., AMBROS P., ANDRLE M., Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A, *Exptl. Cell Res.*, **111**: 327-332, 1978.
- [81] SEUANEZ H. N., The phylogeny of human chromosomes, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979, 42 i 140.
- [82] SMETH L. A., CORNELIS J. J., Repairable and irreparable damage in

- 5-bromodeoxyuridine-substituted DNA exposed to ultra-violet radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **19**: 445-457, 1971.
- [83] SMITH G. P., Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover, *Science*, **191**: 528-535, 1976.
- [84] TAKAYAMA S., SAKANISHI S., Differential Giemsa staining of sister chromatids after extractions with acids, *Chromosoma*, **64**: 109-115, 1977.
- [85] TIEPOLO L., ZUFFARDI O., Localization factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm, *Hum. Genet.*, **34**: 119-124, 1976.

Otrzymano: 23 lipca 1987.

Przyjęto: 2 października 1987.

Adres autorów: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.

PODSTAWY GENETYCZNE INDUKCJI NOWOTWORÓW KOMÓREK PLAZMATYCZNYCH

GENETIC BASIS OF PLASMACYTOMAS INDUCTION

Jan SALWA

Zakład Immunologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
PAN

Streszczenie. W pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczącego genetycznych uwarunkowań związanych z indukcją nowotworów komórek plazmatycznych. Jedynie w szczepach myszy BALB/c i NZB można indukować te nowotwory poprzez dootrzewnową iniekcję oleju mineralnego. Wrażliwość tych szczepów na indukcję jest cechą recesywną i uwarunkowana jest prawdopodobnie obecnością genu czy genów wrażliwości zlokalizowanych na chromosomie dziewiątym. Częste występowanie translokacji chromosomowych t12:15 i t6:15 w plazmocytomie, w których wyniku następuje aktywacja onkogenu c-myc, sugerować mogą przyczynowy związek tego onkogenu w indukcji nowotworu.

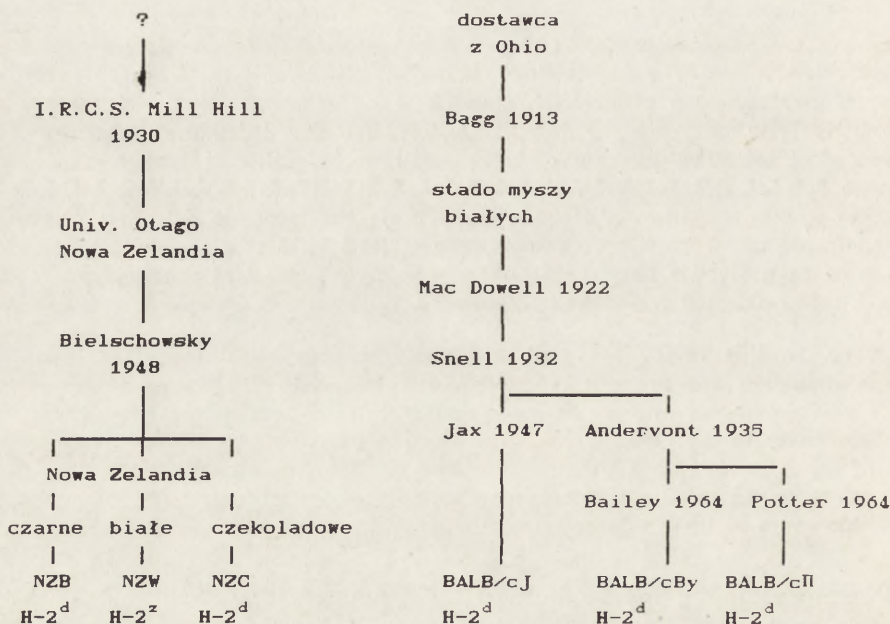
Summary. In this review the problems concerning genetical aspects of plasmacytoma induction are presented. The BALB/c and NZB are unique mice strains where plasmacytomas may be developed after intraperitoneal injection of mineral oils. Sensitivity to the plasmacytoma induction is probably conditioned by recessive gene or genes located on 9 chromosome. Also chromosome translocations t12:15 and t6:15, often found in plasmacytoma can activate c-myc oncogene are discussed as a possible cause in these tumors induction.

Plazmocytoza u myszy indukuje się poprzez dootrzewnowe wszczepienie niektórych tworzyw sztucznych albo przez iniekcję olejów mineralnych, wśród których najlepiej poznanym i najczęściej stosowanym jest pristan [23, 28, 33, 34]. Dootrzewnowa iniekcja pristanu powoduje powstawanie odczynu zapalnego w jamie otrzewnej myszy oraz napływ komórek żernych pochłaniających krople oleju. Komórki obładowane olejem mają tendencję do gromadzenia się w postaci ziarniaków olejowych. Zbiory komórek w formie agregatów mogą krążyć swobodnie w jamie otrzewnej lub mogą przylegać do powierzchni jamy otrzewnej,

gdzie tworzą unaczynione ziarniniaki. Badania histopatologiczne ziarniniaków olejowych ujawniają w nich obecność oprócz makrofagów różnych rodzajów komórek pochodzenia limfoidalnego. Obecność nowotworowych komórek plazmatycznych można obserwować po 120 dniach od iniekcji przistanu, a zaawansowaną chorobę nowotworową stwierdza się między 180 a 280 dniem od podania przistanu [23, 33].

POSZUKIWANIA GENU WRAŻLIWOŚCI NA INDUKCJĘ PLAZMOCYTOMA U MYSZY BALB/c I NZB

Plazmocytoza można indukować wyłącznie w dwóch wrażliwych, wsobnych szczepach myszy, które zostały otrzymane niezależnie od siebie (ryc. 1), mianowicie w szczepach BALB/c i NZB. Myszy szczepu BALB/c wychodował H. Bagg w 1913 r. w Ohio i z tego szczepu otrzy-



Ryc. 1. Rodzowód myszy szczepów BALB/c i NZB (wg Morse) [19]

mano różne podszczepy myszy wsobnych BALB/c, oznaczone symbolem zależnie od ośrodka, w którym były hodowane [19]. Myszy NZB otrzymano w hodowli Mill Hill, skąd wysłane zostały do Nowej Zelandii i utrzymywane w hodowli wsobnej przez Bielschowsky'go [19]. Jest mało prawdopodobne, żeby wrażliwość na indukcję plazmocytozy była na-

stępstwem nieumyślnej kontaminacji genetycznej jednego szczepu drugim. Oba te szczepy mają wprawdzie taki sam haplotyp antygenów zgodności tkankowej (H-2^d), lecz różnią się innymi cechami [19]. Myszy BALB/c charakteryzują się niską zapadalnością na nowotwory gruczołu mlekowego, płuc i na białaczki, natomiast myszy NZB wykazują w starszym wieku wysoką zapadalność na anemię hemolityczną o podłożu autoimmunologicznym [19, 42].

Wrażliwość myszy szczepów BALB/c i NZB na indukcję plazmocyto- ma sugerowała istnienie u tych myszy genu czy też genów wrażliwości na indukcję tego nowotworu. Tabela 1 przedstawia wyniki badań nad próbą indukcji plazmocyto- ma w jedenastu szczepach myszy. Myszy BALB/c i NZB charakteryzują się wysoką wrażliwością na indukcję tego nowotworu, podczas gdy inne szczepy niską wrażliwością lub są

TABELA 1

Wrażliwość szczepów myszy na indukcję plazmocyto- ma [20]

Szczep	Myszy z nowo- tworem (myszy w doświadcz.)	% plazmocyto- ma	Czynnik indukujący
BALB/c	59/89	71	MO
BALB/c	73/120	61	P
BALB/cWehi	21/56	38	PO
BALB/cAnN	11/20	55	LU
NZB/Wehi	5/15	35	PO
C57B1/6N	3/108	3	B
C57B1/KaN	0/56	0	B
C57B1/KaWehi	0/85	0	PO
NZC/Wehi	0/81	0	PO
NZW/B.IN	0/50	0	P
B.10.D2/SnJ	0/32	0	MO
DBA/2N	0/36	0	MO
AL/N	1/59	1	MO
SWR/J	0/30	0	MO
C3H/HeN	4/80	5	LU
C58/LwN	0/67	0	P

MO — olej mineralny, P — pristan, PO — olej parafinowy,
LU — plastik, B — Bayol F

niewrażliwe. Cecha wrażliwości ma charakter recesywny. Pierwsze pokolenie szczepów wrażliwych i szczepów opornych jest odporne na indukcję plazmocyto- ma (tab. 2). Potwierdzono to badaniami nad wrażliwością na indukcję plazmocyto- ma w krzyżówkach wstecznych między szczepem wrażliwym i opornym (BALB/c × C57B1) F₁ × BALB/c, w któ-

TABELA 2

Wrażliwość na indukcję plazmocytoza myszy mieszańców F_1 szczepów BALB/c i NZB ze szczepami opornymi [26, 42]

Szczep wrażliwy	Szczep oporny	Myszy z nowotworem (myszy w doświadczeniu)	% plazmocytoza
BALB/c	AL/N	4/32	12
	DBA/2	0/81	0
	C57B1/KaN	4/25	16
	C57B1/KaWehi	4/40	10
	NH	2/42	5
	C57B1/6N	16/227	8
	CBA	1/76	1
	C3H	1/28	4
	SJL	2/53	4
	NZC/Wehi	0/56	0
	NZB/Wehi	79/163	49
	NZB/B1N	226/860	30
	NZB	C57B1/KaWehi	1/38
NZC/Wehi		5/67	7
(BALB/c × C57B1/Ka) F_1		5/88	6
(BALB/c × C57B1/Ka) F_1 × BALB/c		17/75	20
(NZB × C57B1/Ka) F_1 × BALB/c		30/160	29

rym 20% myszy okazało się wrażliwych. Także potomstwo myszy pierwszego pokolenia F_1 mieszańców szczepów NZB × C57B1 ze szczepem BALB/c jest wrażliwe na indukcję plazmocytoza (29%), co również su-

TABELA 3

Wrażliwość na indukcję plazmocytoza myszy linii rekombinacyjnych (IR), otrzymanych ze skrzyżowania między szczepami BALB/c i C57B1/6N [26]

Szczep lub linia IR	Liczba myszy z nowotworem (liczba myszy w doświadczeniu)	% plazmocytoza	
		wysoki	niski
BALB/cAnN	219/373	58	—
C57B1/6N	3/108	—	3
C × BD	15/53	28	—
C × BE	11/63	17	—
C × BG	31/85	36	—
C × BH	0/56	—	0
C × BI	2/69	—	3
C × BJ	33/69	48	—
C × BK	2/46	—	4

geruje, że gen wrażliwości u myszy BALB/c jest alleliczny w stosunku do genu wrażliwości u myszy NZB [20].

W badaniach rekombinantów wsobnych (RI) (tab. 3), wywodzących się ze skrzyżowania szczepów myszy BALB/c i C57Bl, otrzymano cztery z siedmiu linii RI z podwyższoną wrażliwością na indukcję plazmocytoza w porównaniu z mieszańcami pierwszego pokolenia (BALB/c × C57Bl)_{F1}, z czego autorzy wnioskuje, że u myszy BALB/c jeden gen determinuje fenotyp wrażliwości [20, 26].

Podsumowując, z badań tych wynika, że myszy BALB/c i NZB mają gen wrażliwości na indukcję plazmocytoza. Gen ten wykazuje cechy genu recesywnego i według Pottera jest zlokalizowany na chromosomie dziewiątym [26].

Sanford i współpr. [35] wiążą cechę wrażliwości na indukcję plazmocytoza z genetycznie uwarunkowanymi różnicami występującymi w chromatynie szczepów opornych i wrażliwych. Stwierdzili, że DNA w fazie G₂ cyklu komórkowego limfocytów B, pochodzących od myszy wrażliwych na indukcję plazmocytoza, ulega uszkodzeniu w większym stopniu podczas naświetlania promieniami X niż DNA z limfocytów B otrzymanych od myszy szczepu DBA/2 opornego na indukcję plazmocytoza. Różnice takie występowały również między szczepem BALB/cAnPt (szczep wrażliwy na indukcję plazmocytoza) [25] a szczepem opornym, mianowicie BALB/cJ. Podlinia BALB/cJ różni się tylko opornością na indukcję plazmocytoza w porównaniu z innymi podliniami szczepu BALB/c. Cecha wrażliwości DNA w G₂ cyklu komórkowego na naświetlanie promieniami X jest cechą recesywną.

TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE I ZWIĄZANA Z NIMI AKTYWACJA ONKOGENU C-MYC A INDUKCJA PLAZMOCYTOMA

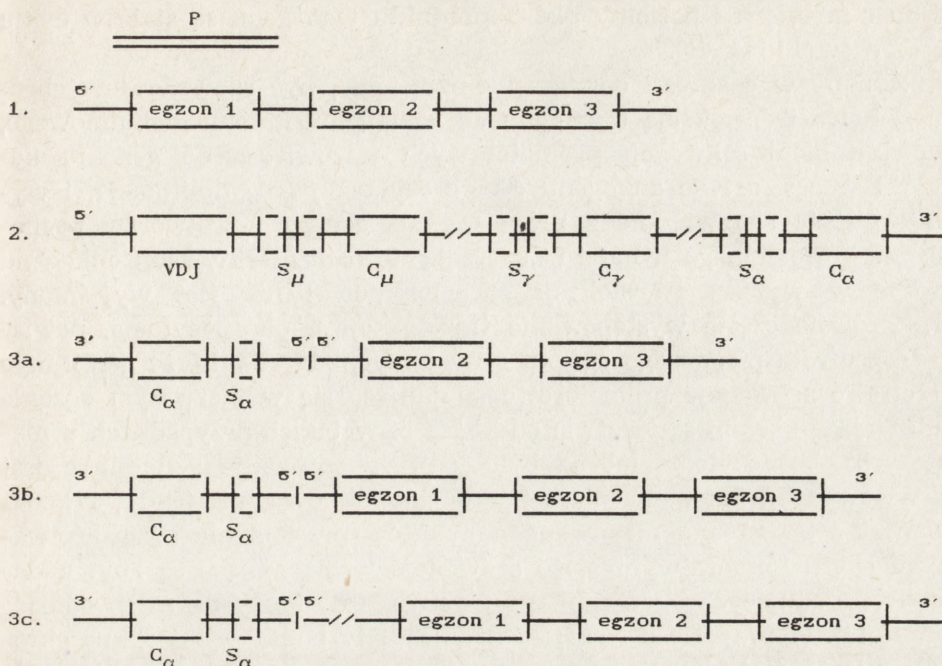
Badania kariotypów mysich komórek plazmocytoza wykazały w większości pierwotnych i przeszczepialnych nowotworów zmienną liczbę chromosomów, bliską tetraploidalnej. Wprowadzenie techniki prążkowania chromosomów umożliwiło ich identyfikację. Niezależnie od siebie, dwie grupy badaczy, mianowicie Shepard i współpr. [37] oraz Yosida [43] stwierdziły translokacje chromosomowe w komórkach przeszczepialnych plazmocytoza sugerując, że te translokacje są wymienne i nieprzypadkowe. Ohno i współpr. [21] badali 7 pierwotnych nowotworów lub ich wczesne generacje przeszczepialne. Stwierdzili we wszystkich komórkach tych linii translokacje dotyczące chromosomów 6, 12 i 15. Translokacje te były monosomiczne, tj. tylko jedną translokację stwierdzano w diploidalnej komórce i dwie w komórce blisko tetraploidalnej.

Punkty pęknięcia na chromosomie 15 występowały między prążkami D3/E. Udział chromosomów 6 i 12 w tym procesie jest znaczący, gdyż na tych chromosomach zlokalizowane są sekwencje kodujące łańcuchy ciężkie immunoglobulin (chromosom 12) i łańcuch lekki kappa (chromosom 6). Okazało się, że w różnych nowotworach punkty pęknięć na chromosomach 6 i 12 są w tych samych charakterystycznych miejscach. Punkt przełamania na chromosomie 6 jest zgodny z lokalizacją locus dla łańcucha kappa, a punkt pęknięcia na chromosomie 12 jest w locus dla łańcucha ciężkiego.

Translokacje chromosomowe występują w 95% plazmocytomata. Stwierdzono trzy rodzaje nieprawidłowości chromosomalnych; pierwsza, najliczniejsza, dotyczyła chromosomów 12 i 15 (69%); druga — 6 i 15 (21%), a trzecia to delecja chromosomu 15, obejmująca prążek D/E [9, 10, 24, 25]. Najczęściej występująca translokacja t12:15 przyczyniła się do wykrycia genu na chromosomie 15, którym okazał się onkogen *c-myc* i w niej też zostały dokładnie scharakteryzowane punkty pęknięć na obu chromosomach. Okazało się, że na chromosomie 12 punkt pęknięcia znajduje się w miejscach przełącznikowych S_{α} i to zarówno w nowotworach wydzielających i niewydzielających IgA [9]. Ta obserwacja sugeruje, że miejsca te są wrażliwe na pęknięcia, a komórki mogły już ulec procesowi przełączenia klas $S_{\mu} \rightarrow S_{\alpha}$. Translokacje zachodziłyby więc w limfocytach B w fazie, kiedy miał miejsce proces przełączenia klas immunoglobulin w wyniku stymulacji przez antygen [9, 24]. Punkty pęknięć na chromosomie 15 występują w pierwszym egzonie lub intronie genu *c-myc*. Rycina 2 obrazuje trzy możliwe konfiguracje chromosomów po ich translokacji. Najczęściej, bo w 23 z 24 badanych plazmocytomata stwierdzono konfigurację pierwszą [9].

Podobne translokacje chromosomowe, jak u plazmocytoma myszy, stwierdzono w ludzkim chłoniaku Burkitta. Translokacje dotyczyły chromosomów noszących locus dla łańcucha ciężkiego (chromosom 14) i lekkiego (chromosom 22) z chromosomem 8. Na chromosomie 8 zlokalizowany jest onkogen *c-myc* [9, 17, 32, 40].

Mysi onkogen *c-myc* jest homologiczny do ptasiego onkogeny *v-myc* występującego w retrowirusie MC29, a indukującego ptasie myelocytomatoses. Mysi onkogen *c-myc* zbudowany jest z trzech egzonów i dwóch intronów. Homologia z ptasim onkogenem *v-myc* dotyczy egzonów drugiego i trzeciego, gdyż w ptasim onkogenie egzon pierwszy nie występuje [3]. Egzon pierwszy mysiego onkogeny *c-myc* jest egzonom nie kodującym białka prawdopodobnie dlatego, gdyż zawiera liczne przerywające kodony „stop codons” [39]. W przeciwieństwie do mysiego stwierdzono, że pierwszy egzon ludzkiego onkogeny *c-myc* koduje białko o 188 aminokwasach o jeszcze nie znanej funkcji [12]. Drugi i trzeci



Ryc. 2. Wzajemne położenie chromosomów 12 i 15 po translokacji chromosomowej: 1. Budowa onkogenu c-myc. Poziome linie wskazują obszar pęknięć w obrębie egzona 1 genu c-myc. 2. Schemat sekwencji kodującej łańcuch ciężki immunoglobuliny na chromosomie 12. 3. Możliwe wzajemne pozycje chromosomu 12 i onkogenu c-myc po translokacji chromosomowej: a) najczęściej występujące połączenie między onkogenem c-myc w obszarze egzonu lub intronu pierwszego i miejsca przełącznikowego S α dla łańcucha ciężkiego; b) punkt pęknięcia występuje blisko genu c-myc (2 kb) od końca 5' i; c) więcej niż 18 kb od końca 5' genu c-myc (wg Cory [9])

egzon mysiego onkogenu koduje białko o ciężarze 67 000 daltonów. Białko to charakteryzuje się wysoką zawartością proliny, krótkim okresem półtrwania (20-30 min), jest zlokalizowane w jądrze komórkowym i *in vitro* wiąże się do DNA [9, 24, 25]. Ekspresję onkogenu c-myc stwierdza się w komórkach normalnych i nowotworowych [13, 24]. Gdy komórki normalne znajdują się w stanie spoczynkowym, ekspresja tego genu jest niska. Gdy fibroblasty w stanie G₀ potraktować mitogenem, np. LPS, to w odpowiedzi na mitogen wzrasta kilkakrotnie (20-30) w ciągu 2-3 godz. ilość onkogenowego mRNA. Indukcja genu c-myc związana jest z wejściem komórki do cyklu komórkowego, a w szczególności z przejściem ze stanu G₀ do G₁. Na podstawie wcześniejszych badań sądzono, że poziom mRNA onkogenu c-myc zmienia się podczas cyklu komórkowego [24], lecz ostatnio wykazano, że poziom zarówno mRNA

genu c-myc, jak i poziomy białka produktu tego genu są stałe w cyklu komórkowym [14, 41].

Zmiany w ekspresji onkogenu c-myc mogą być spowodowane chromosomową translokacją tego genu do locus genu immunoglobulinowego, wbudowaniem sekwencji promotorowych retrowirusa do genomu komórki w sąsiedztwie onkogenu c-myc czy też jego amplifikacją, i wydaje się, że są związane z procesem onkogenezy nowotworów pochodzenia limfoidalnego u ludzi i zwierząt. Mechanizm aktywacji onkogenu c-myc w wyniku translokacji chromosomowej nie jest wyjaśniony. Stwierdzone częste występowanie translokacji u plazmocytoza, powiązane z utratą pierwszego egzonu genu c-myc, sugerowało, że gen c-myc traci swe sekwencje promotorowe znajdujące się w pierwszym egzonie lub w jego bliskim sąsiedztwie od końca 5. W takich przypadkach u niektórych plazmocytoza można byłoby przypuszczać, że gen c-myc jest aktywowany przez wzmacniacz immunoglobulinowy IgH [5, 11, 17], natomiast z badań nad mapowaniem punktów przełamania stranslokowanych chromosomów wynika, że sekwencje wzmacniające są zbyt oddalone od kodujących sekwencji genu c-myc, aby mogły na niego oddziaływać [9]. W przypadku translokacji t6:15, gdy punkt pęknięcia na chromosomie 15 jest zlokalizowany poza genem c-myc, miejsce przełamania na chromosomie 15 zlokalizowano w odległości 72 kb od genu c-myc [8] i od końca 3 [4]. Punkt ten oznaczono pvt (plasmocytomas variant translocation). Bez odpowiedzi pozostają pytania, czy pvt reprezentuje jakiś nieznaną onkogen i czy efekt działania pvt może być przeniesiony na onkogen c-myc [8, 9]. O wpływie sekwencji wzmacniających IgH na proces aktywacji onkogenu c-myc świadczą doświadczenia Adamsa i współpr. [1, 2]. W badaniach tych u myszy transgenicznym transdukcjonowanym genem c-myc związanym z sekwencjami wzmacniającymi E_μ, wystąpiły liczne samoistne nowotwory limfocytów B.

Badania nad ekspresją genu c-myc sugerują, że gen ten może być aktywowany przez zmiany stabilności mRNA genu c-myc [6, 7, 22], utratę zahamowania zwrotnego ekspresji genu c-myc [38] lub zmiany w strukturze chromatyny spowodowane translokacją, w której wyniku udostępnione są sekwencje genu c-myc do transkrypcji [15, 16, 36].

AKTYWACJA INNYCH ONKOGENÓW W PLAZMOCYTOMA

W mysich plazmocytoza opisywano aktywację innych onkogenów niż c-myc. Jeśli myszy traktowane pristanem zainfekowano wirusem Abelsona, to średnio po 100 dniach pojawiały się plazmocytomata. Wirus Abelsona, to średnio po 100 dniach pojawiały się plazmocytomata. Wirus

wiera on dwa elementy: komponent replikujący, którym jest wirus Moloneja (MuLV), i defektywny element transformujący, który pochodzi od mysiego onkogenu c-abl. Wirus Abelsona indukuje u myszy chłoniaki komórek pre-B. Plazmocytoza indukowana wirusem Abelsona produkowały cząstki wirusowe. Podobnie jak w nowotworach indukowanych pristanem, stwierdzono u nich translokacje chromosomowe i zaburzenia regulacji genu c-myc [18, 27].

Opisywano również aktywację genu c-mos w mysich plazmocytozach. Według autorów, aktywacja onkogenu c-mos była wynikiem przegrupowań DNA w obrębie onkogenu c-mos, skutkiem czego aktywność biologiczna onkogenu wzrastała 50-70-krotnie [31].

W literaturze utrzymywany jest pogląd, że onkogen c-myc odgrywa istotną rolę w procesie proliferacji i różnicowania komórki. Komórki plazmatyczne reprezentują końcowy etap różnicowania, w którym onkogen c-myc nie jest aktywny i wydaje się prawdopodobne, że uaktywnienie tego onkogenu w tych komórkach przyczynia się do utrzymania ich w ciągłej proliferacji. To jednak nie wystarcza do przemienienia komórki normalnej w nowotworową. W przypadku mysich nowotworów komórek plazmatycznych, indukowanych olejem mineralnym, gdzie indukcja nowotworów ograniczona jest do nielicznych szczepów myszy, rozważane są, oprócz genetycznych, inne czynniki biorące udział w powstawaniu tego nowotworu [29, 30]. Zachowanie się guzów olejowych po dootrzewnowej iniekcji oleju mineralnego u myszy opornych i wrażliwych na indukcję plazmocytozy jest odmienne. U szczepów opornych powstałe guzy olejowe ulegają martwicy i zwapnieniu, natomiast u myszy wrażliwych komórki plazmatyczne znajdujące się w guzach olejowych zaczynają proliferować i formować różnego kształtu skupiska. Uważa się, że stanowią one stan przednowotworowy komórki plazmatycznej [30]. Warunkiem rozwoju plazmocytozy na tym etapie jest obecność guzów olejowych. Podanie hydrokortyzonu, który hamuje powstawanie odczynu zapalnego przez eliminację komórek biorących w nim udział, powoduje zatrzymanie powstawania nowotworu. U takich myszy stwierdza się w jamie otrzewnej zmniejszoną liczbę lub brak guzów olejowych, natomiast gdy poda się zwierzętom indometacynę (niesterydowy czynnik o działaniu przeciwzapalnym), stwierdza się zahamowanie powstawania nowotworu, lecz nie guzów olejowych. Stąd przypuszczenie, że indometacyna hamuje powstawanie wolnych rodników wytwarzanych w następstwie fagocytowania oleju mineralnego. Wolne rodniki w procesie powstawania plazmocytozy mogą działać mutagenicznie na komórki plazmatyczne powodując np. pęknięcie chromosomów, co może ułatwiać ich translokację [24].

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję prof. drowi Czesławowi Radzikowskiemu za krytyczne uwagi dotyczące tekstu niniejszej pracy.

PIŚMIENICTWO

- [1] ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., PALMITER R. L., The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature*, **318**: 533-538, 1985.
- [2] ADAMS J. M., HARRIS A. W., LONGDON W. Y., PINKERT C. A., BRINSTER R. L., PALMITER R. D., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., GRAHAM M. W., CORY S., C-myc-induced lymphomagenesis in transgenic mice and the role of the Pvt-1 locus in lymphoid neoplasia, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **132**: 1-8, 1986.
- [3] ALITALO K., BISHOP J. M., SMITH D. H., CHEN E. Y., COLBY W. N., LEVINSON A. D., Nucleotide sequence of the v-myc oncogene on avian retrovirus MC29, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 100-104, 1983.
- [4] BENERJEE M., WILLER F., SPIRA J., BABONITS M., NILSSON M. G., SUMEGI J., KLEIN G., Mapping of the c-myc, pvt-1 and immunoglobulin K genes in relation to the plasmocytoma-associated variant (6:15) translocation breakpoint, *E.M.B.O. J.*, **4**: 3183-3188, 1985.
- [5] CALAME K., KIM G., LALLEY P., HILL R., DAVIS M., HOOD L., Molecular cloning of translocations involving chromosome 15 and immunoglobulin C gene from chromosome 12 in two murine plasmacytomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6994-6998, 1982.
- [6] COLE M. D., Regulation and activation of c-myc, *Nature*, **318**: 510-511, 1985.
- [7] — The c-myc oncogene: Its role in transformation and differentiation, *Ann. Rev. Genet.*, **20**: 361-384, 1986.
- [8] CORY S., GRAHAM M., WEBB E., CORCORAN L., ADAMS J. M., Variant (6:15) translocations in murine plasmocytomas involve a chromosome 15 at least 72 kb from c-myc oncogene, *E.M.B.O. J.*, **4**: 675-681, 1985.
- [9] CORY S., LYNN H., CORCORAN L., GERONDATIS S., BERNARD O., WEBB E., GRAHAM M., ADAMS J. M., Modes of activation of the c-myc oncogene in B and T lymphoid tumors, *Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation*, Anderson L. C., Gahmberg C. C., Ekblom P. (eds), London, Academic Press Inc, 221-236, 1985.
- [10] CREWS S., BARTH R., HOOD L., PREHN J., CALAME K., Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmocytomas, *Science*, **218**: 1318-1321, 1982.
- [11] FEO S., HARVEY R., SHOWE L., CROCE C. M., Regulation of translocated c-myc genes transfected into plasmocytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 706-709, 1986.
- [12] GAZIN C., RIGOLET M., BRAIND J. P., Van REGENMORTEL H. M. V., GALIBERT F., Immunochemical detection of proteins related the human c-myc exon 1, *E.M.B.O. J.*, **5**: 2241-2250, 1986.

- [13] HANN S. R., RISENMAN R. N., Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells, *Mol. Cell Biol.*, **4**: 2486-2497, 1984.
- [14] HANN S. R., THOMPSON C. B., EISENMAN R. N., C-myc oncogene synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells, *Nature*, **314**: 366-369, 1985.
- [15] HARRIS L. J., D'EUSTACHIS P., RUDDLE F. H., MARCU K. B., Nonimmunoglobulin associated DNA rearrangements in mouse plasmacytomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 4175-4181, 1982.
- [16] — DNA sequence associated with chromosome translocations in mouse plasmacytomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6622-7727, 1982.
- [17] KLEIN G., KLEIN E., Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations: some new insights, puzzles and paradoxes, *Immunol. Today*, **6**: 208-215, 1985.
- [18] LANE M. A., NEARY D., COOPER G. M., Activation of cellular transforming gene in tumours by Abelson murine leukaemia virus, *Nature*, **300**: 659-661, 1982.
- [19] MORSE H. C. III., Historical perspective on the development of inbred mice — Introduction, *Origins of inbred mice*, Morse H. C. III. (ed), *Acad. Pres.*, 1-23, 1978.
- [20] MORSE H. C. III., HARTLEY J. W., POTTER M., Genetic considerations in plasmacytomas of BALB/c, NZB, and [BALB/c × NZB]F₁ mice, in *Progres in Myeloma, Biology of Myeloma*, Potter M. (ed), New York, Elsevier North Holland, Inc., 263-279, 1980.
- [21] OHNO S., BABONITS M., WIENER F., SPINE J., POTTER M., Non-random chromosome changes involving the Ig gene-carrying chromosomes 12 and 6 in pristane induced mouse plasmacytomas, *Cell*, **18**: 1001-1007, 1979.
- [22] PIECHACZEK M., YANG Y.-Q., BLANCHARD J. M., JEANTEUR P., MARCU K. B., Posttranscriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-myc RNAs in murine plasmacytoma cell tumors, *Cell*, **42**: 589-597, 1985.
- [23] POTTER M., Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins in mice, *Physiol. Rec.*, **52**: 631-719, 1972.
- [24] — The myc-oncogene in mouse plasmacytomagenesis, *Surv. Synth. Path. Res.*, **3**: 499-509, 1984.
- [25] — Plasmacytomas in mice, *Semin. Oncol.*, **13**: 275-281, 1986.
- [26] POTTER M., PUMPHREY J. C., BAILEY D. W., Genetics of susceptibility of plasmacytoma induction. I. BALB/c, (C), C57Bl/6N, (B6), C57Bl/La, (BK), [C × B6]F₁, [C × BK]F₁ and C × B recombinant-inbred strains, *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**: 1412-1417, 1975.
- [27] POTTER M., SKALAT M. D., ROWE W. P., Rapid viral induction of plasmacytomas in pristane primed BALB/c mice, *Science*, **182**: 592-594, 1973.
- [28] POTTER M., WAX J. S., Peritoneal plasmacytomagenesis in mice. A comparison of three pristane dose regimens, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**: 391-395, 1983.
- [29] POTTER M., WAX J., MUSHINSKI E., BUERST S., BABONITS M., WIENER F., MUSHINSKI J. F., MEZEBISH D., SKURLA R., RAPP U., MORSE H. C. III., Rapid induction of plasmacytomas in mice by pristane and a murine recombinant retrovirus containing an avian v-myc and a defective raf oncogene, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **132**: 48-53, 1986.

- [30] POTTER M., WAX J. S., Inbred strain differences influence the focal proliferation of plasma cell in pristane induced oil granuloma, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **132**: 227-230, 1986.
- [31] RECHAVI G., GIVOL D., CANAANI E., Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element, *Nature*, **300**: 607-611, 1982.
- [32] RUPNIEWSKA Z. H., Przypuszczalne mechanizmy aktywacji komórkowego genu *myc* w chłoniaku Burkitta, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **40**: 96-110, 1986.
- [33] SALWA J., Indukowane nowotwory komórek plazmatycznych, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **31**: 793-806, 1977.
- [34] — Experimental plasmacytoma in mice. I. Induction, morphological and biological characteristics, *Arch. Imm. Ther. Exp.*, **28**: 167-172, 1980.
- [35] SANFORD K. K., PARSHAD R., POTTER M., JONES G. H., NORDEN R. P., BURST S. E., PRICE F. M., Chromosomal radiosensitivity during G₂ phase and susceptibility to plasmacytoma induction in mice, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **132**: 202-209, 1986.
- [36] SHEN-ONG G. L. L., KEATH E. J., PICCOLI S. P., COLE M. D., Novel *myc* oncogene RNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytoma, *Cell*, **31**: 443-452, 1982.
- [37] SHEPARD J. S., PETTENGILL J. S., WURSTER-HILL D. H., SORENSON G. D., A specific chromosome breakpoint associated with mouse plasmacytomas, *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 225-258, 1978.
- [38] SIEBENLIST U., HENNIGHAUSEN L., BATTEY J., LEDER P., Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory regions of the *c-myc* gene in Burkitt lymphoma, *Cell*, **37**: 381-391, 1984.
- [39] STANTON L. W., FAKRLANDER P. M., TESSER P., MARCU K. B., Nucleotide sequence comparison of normal and translocated murine *c-myc* genes, *Nature*, **310**: 423-425, 1984.
- [40] TAUB R., KIRSCH I., MORTON C., LENOIR G., SWAN D., TRONICK T., AARONSON S., LEDER P., Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7837-7841, 1982.
- [41] THOMPSON C. B., CHALLONER P. B., NEIMAN P. E., GROUDINE M., Levels of *c-myc* oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle, *Nature*, **314**: 363-366, 1985.
- [42] WARNER N. L., Autoimmunity and the pathogenesis of plasma cell tumor induction in NZB and hybrid mice, *Immunogen.*, **21**: 1-20, 1975.
- [43] YOSIDA M. D., MORIWAKI K., Specific marker chromosomes involving a translocation (12:15) in a mouse myeloma, *Proc. Japan, Acad.*, **52**: 588-592, 1975.

Otrzymano: 15 czerwca 1987.

Przyjęto: 5 października 1987.

Adres autora: ul. Czerna 12, 53-114 Wrocław.

CZY MOŻNA REGULOWAĆ TEMPO FAGOCYTOZY U ORZEŚKÓW?

CAN THE RATE OF PHAGOCYTOSIS IN CILIATES BE REGULATED?

Anna WASIK

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

Streszczenie. Orzęski są dogodnym modelem do badania poszczególnych etapów procesu pobierania pokarmu przez komórki. Zarówno fagocytoza, jak i pełen cykl przemian wodniczek pokarmowych są regulowane przez czynniki endogenne. Procesy te mogą być jednak istotnie modyfikowane przez niektóre czynniki egzogenne. Wśród czynników endogennych, regulujących tempo fagocytozy, najistotniejszą rolę odgrywa ilość dostępnych pęcherzyków błonowych, stanowiących materiał do budowy nowych wodniczek pokarmowych. Ze względu na charakter oddziaływań można wyróżnić dwie grupy czynników egzogennych: działające na zasadzie fizycznej i chemicznej. W wyniku działania pierwszych, tempo fagocytozy modyfikowane jest przez mechaniczne pobudzenie błony przez cząstki obecne w środowisku, a także jest zależne od temperatury środowiska zewnętrznego. Wśród czynników egzogennych w sposób istotny na przebieg i tempo fagocytozy wpływają właściwości chemiczne pobranego pokarmu, czyli stopień jego atrakcyjności dla komórki. Okazało się ponadto, że na proces ten wpływa także stopień wygłodzenia komórek. Można więc przyjąć, że nie tylko cechy środowiska zewnętrznego i obecność w nim pokarmu, jako mechanicznego stymulatora, wpływają na przebieg i tempo fagocytozy, ale także modyfikowana jest ona przez rodzaj pobranych cząstek. Informacja ze środowiska zewnętrznego, dzięki receptorom powierzchniowym, przekazywana jest do wnętrza komórki, powodując zmiany nie tylko tempa fagocytozy, ale całego cyklu wodniczkowego. Mechanizm przekazywania tych sygnałów pozostaje nadal nieznanym.

Summary. Ciliates are the useful models for studying the phagocytosis and the subsequent stages of food uptake by the cells. Phagocytosis and the whole vacuole cycle are regulated by the endogenous factors. These processes can be also essentially modified by some exogenous factors. The most important, among the endogenous factors, regulating the fagocytosis, seems to be the number of available disc-shaped vesicles, as a source of membrane of the newly formed food vacuoles.

Praca finansowana z CPBP nr 04.01.

Regarding the mode of action, the exogenous factors can be divided into two groups: the factors of physical and chemical nature. The physical stimuli affect mainly the rate of phagocytosis due to the presence of the particles in the medium as well as the medium temperature. The chemical properties of the particulate food being more or less attractive to the cell, influence the rate of phagocytosis. It appeared that the process of the food uptake in ciliates depends on the degree of the cell starvation. We can assume that not only the attributes of the medium and the presence of the particles influence the rate of phagocytosis but also this process is modified by the nature of the particles. The signal from the external medium, thanks to the surface receptors, is transmitted to the cell interior and changes not only the rate of the phagocytosis but the whole vacuole cycle. The mechanism of this transmission remains unknown so far.

WSTĘP

Orzęski stanowią dogodny model do badania fizjologii pierwotniaków, a szczególnie niektórych aspektów związanych z ich odżywianiem. W grupie tej najlepiej poznanym sposobem pobierania pokarmu jest fagocytoza [51]. Dowody na istnienie innego sposobu pobierania pokarmu, a mianowicie pinocytozy [44], która zapewne jest odpowiednikiem endocytozy receptorowej (receptore-mediated endocytosis), wykryto dotychczas jedynie w komórkach *Tetrahymena pyriformis* [62]. U innych orzęsków zjawisko to nie zostało jeszcze stwierdzone, aczkolwiek należy spodziewać się jego istnienia.

Pobieranie pokarmu jest pierwszym etapem rozbudowanego ciągu wewnątrzkomórkowych przemian, wchodzącego w skład szeroko pojętego procesu transportu przez błonę komórkową, określanego jako cytoza [85]. Strukturą odgrywającą decydującą rolę w przebiegu cytozy jest błona komórkowa, która stanowi barierę izolującą cytoplazmę od środowiska zewnętrznego, a zarazem za jej pośrednictwem odbywa się wprowadzanie pokarmu w postaci płynnej lub stałej do wnętrza komórki, na drodze transportu biernego, czynnego, jak i objętościowego [34]. Stockem [85, 86] zaproponował, aby transport różnych substancji, z jednej strony błony komórkowej na drugą, a także transport między dwiema wewnątrzkomórkowymi domenami oddzielonymi błoną traktować jako proces pozytywny lub negatywny, w zależności od tego, czy mamy do czynienia z lokalną stratą, czy zyskiem błony. W tym kontekście fagocytoza i pinocytoza traktowane są jako endocytoza negatywna.

Choć fagocytoza u orzęsków jest procesem badanym od wielu lat, ma jednak jeszcze wiele nie wyjaśnionych szczegółów. Podjęte próby

doświadczalnej modyfikacji tego zjawiska powinny pomóc w wyjaśnieniu dróg i mechanizmów pobierania pokarmu oraz jego dalszego transportu wewnątrz komórki. Dotychczas nie wiemy, który z czynników odgrywa decydującą rolę w procesie fagocytozy.

Wielu autorów próbowało rozwikłać to zagadnienie, jednak w różnych publikacjach spotyka się wiele sprzeczności. Celową wydała się więc próba usystematyzowania podawanych w literaturze informacji dotyczących roli czynników endogennych i egzogennych we wzbudzeniu i przebiegu fagocytozy w komórkach orzęsków, a także przedstawienie wyników własnych badań dotyczących tych zagadnień w odniesieniu do komórek *Paramecium bursaria*.

FAGOCYTOZA I CYKL WODNICZKOWY

Proces tworzenia wodniczek pokarmowych, zawierających pobrane ze środowiska cząstki o średnicy przekraczającej $0,5 \mu\text{m}$, nazywany jest fagocytozą [51]. Jest to pierwszy etap szeroko pojętego procesu odżywiania. Fagocytoza to rozpowszechniona forma pobierania pokarmu nie tylko wśród pierwotniaków, ale również wśród komórek organizmów tkankowych. Orzęski stanowią jednak wyjątkowo dogodny model do badania jej przebiegu. Można ponadto stosunkowo łatwo ocenić i analizować wpływ różnego rodzaju czynników na ten proces. Sama fagocytoza składa się z czterech zasadniczych, powtarzających się etapów. Są to: dostarczanie cząstek, które mają być pobrane w okolicę cytostomu, wytwarzanie w dnie cytostomu wodniczki pokarmowej, oddzielenie się wodniczki od dna cytostomu i jej aktywny transport do wnętrza komórki. Różnorodne cząstki pokarmowe są dostarczane w okolicę cytostomu przez rzęski lokomotoryczne [12, 35] oraz przez rzęski cytostomalne [33, 49]. W komórkach *Paramecium*, w chwilach intensywnego żerowania w strefie bogatej w pokarm, część rzęsek lokomotorycznych zatrzymuje się i orzęski, na zasadzie tigmotaksji, przywierają na krótko do podłoża [38]. Pozostałe rzęski lokomotoryczne pracując nadal, biorą aktywny udział w napędzaniu cząstek zawiesiny w okolicę cytostomu. Zadanie dalszego przesuwania ich w głąb przejmuje na siebie zespół rzęsek oralno-cytostomalnych. Po nagromadzeniu materiału pokarmowego, a przede wszystkim po osiągnięciu przez wodniczkę odpowiedniej wielkości, oddziela się ona od dna cytostomu i przesuwana jest gwałtownie wzdłuż włókien postezofagalnych [95].

Podczas badania cyklu wodniczkowego u orzęsków stwierdzono ko-

lejne zmiany: wielkości samych wodniczek, struktury ich błony oraz wewnątrzkomórkowego pH [2-4, 7, 26, 30, 59, 69]. Prace prowadzone przez grupę Allena na orzęskach z rodzaju *Paramecium* pozwoliły na wyróżnienie kilku etapów tego procesu [7, 26]. Są to: tworzenie wodniczek, zakwaszanie i kondensacja zawartości, trawienie oraz wydalanie. W komórkach *Paramecium*, gdzie kolejne zmiany odbywają się w trakcie przemieszczania się wodniczki unoszonej wewnątrzkomórkowym strumieniem cytoplazmatycznym [82], czas trwania trzech pierwszych etapów waha się od 20 do 60 min [26], podczas gdy w komórkach *Tetrahymena*, gdzie nie występuje strumień cytoplazmatyczny, jest on około dwa razy dłuższy [25].

Rejestrowane w czasie kolejnych etapów cyklu wodniczkowego zmiany wielkości związane są z dołączaniem dyskowatych pęcherzyków (tworzenie wodniczek), acidosomów (zakwaszanie), a następnie lizosomów (trawienie). Ponadto obserwuje się odsznurowywanie długich, tubularnych pęcherzyków z powierzchni wodniczek pokarmowych prawie we wszystkich etapach cyklu [5].

Po zakończeniu procesu trawienia następuje wydalanie pozostałości pokarmu poza obręb komórki. Błona wodniczki, ulegając rozpadowi na dyskowate pęcherzyki i pozostając wewnątrz komórki, stanowi pulę błonową, wykorzystywaną do budowy nowych wodniczek pokarmowych [7].

CZYNNIKI ENDOGENNE

Tempo tworzenia wodniczek pokarmowych podlega wielostronnej regulacji. Czynniki wpływające na ten proces podzielić można na dwie zasadnicze grupy: endogenne i egzogenne.

Wśród czynników endogennych, warunkujących tworzenie nowej wodniczki, wymienić należy odpowiednią ilość materiału błonowego, konieczną do jej budowy.

Pierwotnie Bozler [10], Dembowski [20] i Mast [49] sądzili, że fagocytoza jest procesem rytmicznym. Bozler [9] sugerował nawet istnienie lokalnego prądu cytoplazmatycznego, którego zadaniem jest odrywanie od dna cytostomu wodniczek tworzonych z częstotliwością 30-60 s. Mast [49], będąc przekonany o rytmiczności fagocytozy, negował jednak istnienie prądu, przypisując włóknom postezofagalnym decydującą rolę w procesie odrywania świeżo utworzonych wodniczek pokarmowych. Według Wichtermanna [95], dno cytostomu utworzone jest z błony o dużej elastyczności, która wypełniając się cząstkami może ulegać znacznemu rozciąganiu, prowadząc w konsekwencji do wzrostu objętości wodniczki

i oderwania się jej. Zgodnie z sugestią Nilsson i Williamsa [63] oraz Nilsson i wsp. [64], w dnie cytostomu komórek *Tetrahymena pyriformis* znajduje się struktura określana przez nich jako „oral lips”, która miałaby odgrywać decydującą rolę w procesie odrywania wodniczek pokarmowych.

Rozwój badań spowodował wyraźny zwrot w poglądach dotyczących warunków, których spełnienie jest niezbędne do utworzenia nowej wodniczki pokarmowej, a następnie oddzielenia się jej od dna cytostomu. Schneider [77] przedstawił hipotezę postulującą wzrost objętości wodniczki dzięki wbudowywaniu w dno cytostomu makrocząstek. Późniejsze badania pozwoliły na udowodnienie, że powiększanie wodniczek odbywa się dzięki włączaniu w dno cytostomu fragmentów błony [1, 7]. Allen [1] badając zmiany zachodzące w wodniczkach pokarmowych w trakcie całego cyklu wodniczkowego w komórkach *Paramecium* doszedł do przekonania, że orzęski te dysponują stałą pulą błonową. Okazało się bowiem, że w czasie defekacji jedynie nie strawione resztki zawartości wodniczek są wydalane poza obręb komórki, natomiast błona pozostaje w niej w postaci dyskowatych pęcherzyków i stanowi materiał budulcowy do utworzenia w dnie cytostomu nowych wodniczek. Podobne wnioski spotykamy w pracach Chapman-Andresen, Nilsson [14] i Rickettsa [70, 71, 73], dotyczących *Tetrahymena pyriformis*. Ricketts [73] sugeruje, że nawet przy zachowaniu dosyć stałych warunków zewnętrznych tempo fagocytozy w komórkach tych może ulegać zmianie. Obserwowane przez niego periodyczne zahamowanie tworzenia wodniczek pokarmowych jest, jak twierdzi, wynikiem wyczerpania się zapasów błony lub lizosomów niezbędnych do rozpoczęcia procesu trawienia. Dowody potwierdzające zmienność tempa fagocytozy w komórkach *Tetrahymena pyriformis* przedstawiła również Nilsson [58, 59]. Z jej badań wynika, że pierwsza wodniczka powstaje najszybciej, osiągając jednocześnie największe rozmiary, natomiast tempo tworzenia kolejnych jest coraz wolniejsze. Autorka wykazuje także, że 30% wodniczek powstających w ciągu 10-minutowej inkubacji w zawieszynie cząstek karminu tworzonych jest w pierwszej minucie, 60% po upływie 5 min., a następnie szybkość procesu wyraźnie spada. Podobną zmienność tempa fagocytozy, uwarunkowaną wyczerpywaniem się zapasów błony, stwierdzono u *Euplotes* [39] i u *Blepharisma* [16].

Stwierdzono ponadto, że pojawienie się i przebieg fagocytozy w znacznym stopniu zależy od etapu w cyklu życiowym orzęsków. Na krótko przed rozpoczęciem oraz w trakcie podziału proces ten zanika całkowicie [41, 57, 95], aby pojawić się ponownie w siostrzanych komórkach popodziałowych. Podobne zjawisko czasowego zahamowania tworzenia wodniczek pokarmowych zaobserwowano podczas koniugacji [81, 84].

CZYNNIKI EGZOGENNE NATURY FIZYCZNEJ

MECHANICZNE POBUDZENIE

Mechaniczne pobudzenie błony przez cząstki obecne w środowisku zewnętrznym oraz temperatura otoczenia są czynnikami egzogennymi natury fizycznej, w sposób istotny wpływającymi na tempo fagocytozy orzęsków.

Zwolennicy koncepcji mechanicznej stymulacji fagocytozy podkreślają decydującą rolę podrażnienia błony w czasie kontaktu z cząstkami zawiesiny, uważając, że czynnik ten inicjuje tworzenie wodniczek pokarmowych. Tempo procesu jest ściśle związane ze stężeniem cząstek w środowisku [14, 49, 60, 66-68, 90, 93, 95]. Ricketts [72] zauważył, że w komórkach *Tetrahymena pyriformis* tempo tworzenia wodniczek pokarmowych zmienia się proporcjonalnie do stężenia zawiesiny cząstek, czyli że odpowiedź komórki nie ma charakteru „wszystko albo nic”, ale zależna jest zapewne od stopnia pobudzenia błony komórkowej. Moje badania potwierdziły słuszność tych wniosków również w stosunku do komórek *Paramecium* [90, 93].

Efekt działania cząstek w dużym stopniu zależy od ich właściwości, tj. geometrii, wielkości, ciężaru właściwego, a także właściwości chemicznych cząstek stymulujących.

W warunkach naturalnych wiele gatunków orzęsków odżywia się bakteriami. Istnieje jednak prawdopodobieństwo kontaktu pierwotniaka z cząstkami, które nie stanowią pokarmu, a więc takimi, które nie będą trawione. W celu dokładnego poznania przebiegu procesu pobierania pokarmu, w badaniach laboratoryjnych stosuje się modele cząstek pokarmowych, które ze względu na swoją geometrię, ciężar właściwy oraz atrakcyjność przypominają bakterie. Modele te pozwalają precyzyjnie opisać zarówno sam przebieg formowania się wodniczek, jak również drogę przebytą przez nie w komórce. Najczęściej stosowanymi modelami cząstek pokarmowych są: nierozpuszczalne w wodzie, sproszkowane barwniki [14, 26, 49, 58, 59, 90], kulki lateksowe [26, 70, 71, 93, 94], sproszkowane diamenty [67] oraz złoto [23]. Wymienione cząstki modelowe są bardzo chętnie pobierane przez orzęski, a wszystkie powstające wodniczki są nimi wypełnione w mniejszym lub większym stopniu [17-19, 59], tak więc możemy prześledzić kolejne etapy fagocytozy, a także oznaczać jej tempo.

Nilsson [58] przedstawiła dowody, że nawet kilka cząstek jest w stanie wywołać fagocytozę u *Tetrahymena*, a Bozler [9] już przed wielu laty wykazał, że *Paramecium* w środowisku nie zawierającym cząstek nie tworzy wodniczek. Identyczne wyniki uzyskałam w doświadczeniach

z komórkami *Paramecium bursaria* [91], inkubowanymi w środowisku pozbawionym zawieszin. W badaniach tych stosowane były rozpuszczalne w wodzie barwniki: oranż G i czerwień obojętna, które według Grębeczkiego i Kuźnickiego [37] indukują fagocytozę. Okazało się, że wyeliminowanie cząstek z roztworów rozpuszczalnych barwników prowadzi do zahamowania fagocytozy. Podobne wyniki w pracach z komórkami *Tetrahymena* uzyskał Rasmussen [68].

Potwierdzeniem koncepcji mechanicznej stymulacji fagocytozy może być także obserwacja Masta [49] wskazująca na wyraźny ruch cząstek wewnątrz cytostomu. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że miejscem mechanicznej stymulacji jest dno cytostomu, błona przylegająca bezpośrednio do tej strefy lub też końce rzęsek gębowych [76].

TEMPERATURA

Czynnikiem egzogennym w sposób istotny wpływającym na stan fizjologiczny orzęsków jest temperatura otoczenia. Pamiętać należy, że dla komórek tych, jak i dla wszystkich żywych organizmów, istnieje pewien zakres temperatur, w którego obrębie są one w stanie przeżyć, a także pewna wartość optymalna, najkorzystniejsza do ich rozwoju. Jest oczywiste, że gwałtowne zmiany mogą doprowadzić nawet do śmierci komórki, natomiast łagodne, w zakresie temperatur optymalnych, pozwalają na badanie przebiegu i mechanizmów wielu wewnątrzkomórkowych procesów.

Szczególnie wyraźny wpływ temperatury na poszczególne etapy cyklu wodniczkowego w komórkach *Paramecium* został stwierdzony przez Leunga i Fok [43]. U orzęsków hodowanych w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) cykl ten, do momentu rozpoczęcia wydalania, trwa co najmniej 20 min. Autorzy ci wykazali, że po adaptacji komórek przez 24 h do temperatury 24, 27 i 30°C czas całego cyklu ulega skróceniu. Jest to szczególnie wyraźne w trzecim etapie cyklu (trawienie), którego czas trwania jest odwrotnie proporcjonalny do temperatury. Podobne obserwacje przeprowadziła także Fok i wsp. [27] badając optymalne temperatury dla przebiegu poszczególnych etapów cyklu wodniczkowego w hodowlach *Paramecium caudatum*. Okazało się, że najkorzystniejszą temperaturą dla tworzenia wodniczek jest 28-30°C, a dla zakwaszania i kondensacji 26°C. Trawienie, aczkolwiek rzeczywiście ulega skróceniu wraz ze wzrostem temperatury, jednak przebiega jakby dwuetapowo: poniżej 22°C jest to proces powolny, podczas gdy powyżej tej temperatury jego tempo gwałtownie wzrasta. Etap czwarty cyklu, czyli defekacja, w ogóle nie był obserwowany poniżej 15°C, natomiast powyżej tej temperatury tempo defekacji rosło wraz ze wzrostem temperatury. Można

więc przypuszczać, że cykl wodniczkowy składa się z czterech odrębnych procesów, z których każdy odmiennie reaguje na zmiany temperatury środowiska.

Przedstawione badania nad wpływem temperatury na proces odżywiania się orzęsków wskazują na możliwości regulacji nie tylko fagocytozy, ale także pełnego cyklu wodniczkowego. Obieg wodniczek pokarmowych w komórkach *Paramecium* jest związany z wewnątrzkomórkowym ruchem cytoplazmy [92], który w sposób istotny zależy nie tylko od wartości, ale także od tempa zmian temperatury środowiska [42, 82]. Koenuma [40] wykazał, że szybkość strumienia cytoplazmatycznego rośnie liniowo wraz ze wzrostem temperatury od 5 do 30°C.

Jest bardzo prawdopodobne, że jedną z przyczyn przyspieszenia tempa fagocytozy jest wzrost szybkości przepływu wewnątrzkomórkowej cytoplazmy, dzięki której dostarczane są w okolice dna cytostomu dyskowate pęcherzyki, niezbędne do budowy nowych wodniczek pokarmowych.

CZYNNIKI EGZOGENNE NATURY CHEMICZNEJ

Przeciwnicy koncepcji fizycznej stymulacji fagocytozy szczególną rolę przypisywali czynnikom egzogennym natury chemicznej, twierdząc jednocześnie, że częstotliwość tworzenia wodniczek pokarmowych nie zależy od gęstości zawiesiny w środowisku [20, 50]. Według nich istotne znaczenie mają właściwości chemiczne pobieranych cząstek, które przede wszystkim muszą być atrakcyjne dla komórek jako pokarm lub też jego substytut. Uwzględnić należy ponadto różnicę w wartości pokarmowej cząstek, a więc czy mogą one być strawione, czy też nie.

Badania prowadzone na orzęskach z rodzaju *Paramecium* wykazały, że pierwotniaki te mogą pobierać zarówno cząstki stanowiące pokarm, jak i takie, które są tylko jego modelami. Sugerowano ponadto, że tempo tworzenia wodniczek zawierających zawiesinę, która może być strawiona, jest znacznie większe, niż tempo tworzenia wodniczek wypełnionych cząstkami niepokarmowymi [11, 17-20], a więc stopień atrakcyjności jest czynnikiem determinującym szybkość pobierania zawiesiny. Badania te potwierdzili Seaman [78, 79] oraz Seaman i Mancilla [80] dla komórek *Tetrahymena pyriformis*. Okazało się, że orzęski te hodowane w pożywce syntetycznej w ogóle nie pobierają błękitu trypanowego, jeżeli środowisko nie zostanie wzbogacone niewielką ilością proteozoptonu.

Informacje dotyczące różnic tempa pobierania cząstek pokarmowych oraz substytutów pokarmu znajdujemy także w pracy Müllera i wsp. [52], dotyczącej komórek *Paramecium* i *Tetrahymena*. Dowodzili oni, że pojawienie się kwaśnej fosfatazy, niezbędnej do rozpoczęcia procesu trawienia, jest zależne od utworzenia wodniczek, a nie od ich zawartości. Przeciwnie wnioski wysunęli Rosenbaum i Wittner [75], którzy prowadzili pomiary aktywności enzymów związanych z pobieraniem pokarmu oraz wydalaniem nie strawionych resztek przez orzęski *Paramecium caudatum*. Ocena aktywności kwaśnej fosfatazy wykazała wyraźną różnicę między komórkami karmionymi tuszem i bakteriami. Wysoką aktywność enzymatyczną rejestrowano wokół wodniczek, gdy orzęskom podawano cząstki pokarmowe, natomiast gdy karmiono je tuszem, wysoką aktywność obserwowano wyłącznie w peryferycznych warstwach cytoplazmy. Szczegółowe badania [28] wykazały, że kwaśna fosfataza pojawia się w ściśle określonym etapie cyklu wodniczki. Syntetyzowana jest w endoplazmatycznym retikulum, magazynowana w aparacie Golgiego, z którego odsznurowywane są lizosomy I rzędu. Zlewają się one z błoną tylko wtedy, gdy nastąpiło zakwaszenie zawartości wodniczek. Proces ten rozpoczyna się bezpośrednio po utworzeniu nowej wodniczki, a kończy po upływie 7 min [29]. Autorzy tej pracy sugerują, że lizosomy mogą łączyć się wyłącznie z błoną acidosomów, które zlały się z wodniczką w stadium zakwaszania, jednak nie wcześniej niż po upływie 3 min. Uzyskane przez grupę Allena wyniki całkowicie zaprzeczają sugestiom Rickettsa [73], iż lizosomy są czynnikiem endogennym, regulującym tempo tworzenia wodniczek pokarmowych.

Poza badaniem wpływu różnego rodzaju pokarmu na tempo fagocytozy w komórkach orzęsków, przeprowadzono także wiele obserwacji dotyczących działania enzymów i innych związków chemicznych na błonę komórkową [6, 87-89, 96]. Kilka prac na ten temat opublikowała Tołłoczko [87-89]. Stosując dwa enzymy: trypsynę i pronazę, trawiła ona zewnętrzną część korteksu komórki *Paramecium*. W wyniku uszkodzenia błony w cytostomie następowało zahamowanie akumulacji cząstek w zagłębieniu cytostomalnym oraz przerwanie tworzenia wodniczek pokarmowych. Wyniki te sugerują, że miejscem kontaktu cząstek stymulujących proces fagocytozy jest błona cytostomu orzęsków. Potwierdziły to także wyniki prac Wyroby i Brutkowskiej [96] z zastosowaniem hamującej fagocytozę pronazy. Podobny efekt zahamowania tworzenia wodniczek wywołuje mukopolisacharyd lizozym. Związek ten redukuje liczbę miejsc anionowych na powierzchni komórki, a co za tym idzie, uniemożliwia zapewne przekazywanie informacji o obecności zawiesiny w środowisku [87].

Inny związek chemiczny — cytochalazyna B, zgodnie z wynikami

prac Tołłoczko [89], blokuje oddzielenie się powstających wodniczek od dna cytostomu, co według autorki sugeruje kierunkowe działanie związku na błonę komórkową. Badania prowadzone przez grupę Allena [6, 31, 43] wykazały natomiast wpływ cytochalazyny B na wszystkie etapy cyklu wodniczkowego, z tym że intensywność działania zależy od zastosowanego stężenia. Sugerują oni ponadto, że wszystkie obserwowane zmiany są wynikiem rozpadu siateczki aktynowej, związanej z błoną. Tak więc struktury wrażliwe na działanie CB odgrywałyby istotną rolę w przebiegu całego cyklu wodniczkowego, choć Cohen i wsp. [15] stosując metodę znakowania przeciwciał fluoresceiną, uwidocznili aktyne jedynie w świeżo utworzonych wodniczkach pokarmowych.

Podobny efekt działania CB na przebieg fagocytozy stwierdzono w komórkach *Tetrahymena* [64, 74].

Badając wpływ kolchicyny na cytoskielet komórkowy u *Paramecium caudatum* Tołłoczko [89] wykazała wyraźny efekt hamujący tego związku na przebieg fagocytozy. Przedstawiła ponadto dowody, iż nie wywołuje on ultrastrukturalnych zmian w obrazie mikrotubul gębowych. Leung i Fok [43] oraz Fok i wsp. [31] stwierdzili natomiast brak wpływu kolchicyny na trzeci i czwarty etap cyklu wodniczkowego, przy jednoczesnym, zależnym od zastosowanego stężenia, zahamowaniu efektu tworzenia wodniczek pokarmowych oraz ich zakwaszania.

Przedstawione wyniki sugerują, że zarówno cytochalazyna B, jak i kolchicyna, w zależności od użytego stężenia, modyfikują przebieg fagocytozy w wyniku interakcji z błoną komórkową orzęsków.

WPLYW GŁODZENIA NA TEMPO TWORZENIA WODNICZEK POKARMOWYCH

Sądzić należy, że zarówno czynniki endogenne, jak i egzogenne odgrywają istotną rolę w stymulacji procesu tworzenia wodniczek pokarmowych. Trzeba jednak odpowiedzieć na kolejne pytanie: czy stopień wygłodzenia komórek może mieć wpływ na tempo fagocytozy? Jest to tym bardziej istotne, ponieważ, jak wykazano w badaniach nad komórkami *Paramecium*, głodzenie prowadzi do wielu zmian patologicznych, z których najważniejszymi są: wyraźna wakuolizacja cytoplazmy, utrata rzęsek, a nawet degeneracja wewnątrzkomórkowych struktur [95]. Barbarin [8] sugerował ponadto, że orzęski takie wykazują znacznie wyższą wrażliwość na lokalne stężenia różnych związków chemicznych. Nilsson [61] głodzeniem indukowała w komórkach *Tetrahymena pyriformis* odwracalną autofagię. Po 1 h orzęski zmniejszały objętość do 80%, a po 48 h inkubacji w środowisku soli nieorganicznych — do 25%.

Głodzenie jest także metodą synchronizacji dzielących się komórek

Tetrahymena pyriformis [13]. Orzęski te są ponadto zdolne do modyfikacji syntezy białek pod wpływem głodzenia, regulując ekspresję genów na poziomie zarówno transkrypcji, jak i translacji [32].

Różni autorzy mają przeciwstawne opinie na temat wpływu głodzenia orzęsków na ich zdolność do fagocytozy. Müller i wsp. [52] badając komórki *Paramecium multimicronucleatum* i *Tetrahymena pyriformis* nie stwierdzili różnic w tempie pobierania cząstek pokarmowych i modeli pokarmu w zależności od uprzedniego głodzenia orzęsków. Również Chapman-Andresen i Nilsson [14] nie obserwowały zmian tempa fagocytozy zawiesiny karminu w komórkach *Tetrahymena* głodzonych przez 53 h, w stosunku do komórek kontrolnych. Okresowe zahamowanie procesu było, zgodnie z sugestią autorek, związane wyłącznie ze stanem komórki w cyklu życiowym [14, 59]. Natomiast m.in. Ricketts [71, 72] wykazał istotny wpływ głodzenia na zdolność do pobierania pokarmu. Komórki *Tetrahymena* są, według niego, w stanie rozróżnić cząstki pokarmowe od niepokarmowych, a istotnym czynnikiem wpływającym na ich fagocytowanie jest stopień wygłodzenia orzęsków. Wyniki te wyraźnie wskazują, że najedzone komórki *Tetrahymena pyriformis* pobierają szybko zarówno cząstki pokarmowe, jak i nie będące pokarmem, natomiast wygłodzone zdecydowanie preferują cząstki pokarmowe. Podobnie zachowuje się *Tetrahymena* w kontakcie z błękitem trypanowym [78]. Dopiero po połączeniu barwnika z białkiem rozpoczyna się jego fagocytoza. Głodna *Tetrahymena* może nawet selekcjonować cząstki w mieszaninie pod względem ich przydatności pokarmowej [23]. Gdy komórki karmiono zawiesiną złota, obserwowano powstawanie licznych wodniczek pokarmowych, natomiast gdy złoto pomieszano z bakteriami, w wodniczkach znalazły się wyłącznie bakterie. Zdolność do tak daleko posuniętej selekcji stwierdzono tylko w przypadku mieszaniny złota i bakterii, gdyż w doświadczeniach z mieszaniną barwników i bakterii wodniczki zawierały oba składniki. Nasze ostatnie badania sugerują [94] występowanie podobnej zależności również w aposymbiontycznych komórkach *Paramecium bursaria*. Okazało się, że wydłużenie czasu głodzenia prowadzi do obniżenia tempa tworzenia wodniczek pokarmowych.

Istotną rolę w procesie fagocytozy odgrywa także rodzaj stosowanych w doświadczeniach cząstek różnych zawiesin. Sproszkowany karmin i kulki lateksowe, użyte jako modele cząstek pokarmowych, pobierane są przez orzęski mniej chętnie niż te same cząstki zawieszony w roztworze białka. Procent komórek, które po długotrwałym głodzeniu w ogóle nie tworzą wodniczek w obecności modeli pokarmowych, wzrasta wyraźnie, natomiast cząstki pokarmowe nadal pobierane są chętnie. Wyniki badań [94] pozwalają stwierdzić, że tempo tworzenia wodniczek pokarmowych jest ściśle związane nie tylko z obecnością i stężeniem

zawiesiny w środowisku, ale także z rodzajem użytych cząstek oraz stopniem wygłodzenia komórek. Pozwala to przypuszczać, że gdy cząstki modelowe zostaną pomieszane z substancjami określanymi jako induktory fagocytozy [14, 70, 78, 79, 80], takimi jak np. białko, zmieniają się prawdopodobnie ich właściwości powierzchniowe. Induktory prowadzą do zmian właściwości chemicznych i/lub elektrycznych cząstek, z którymi wchodzi w kontakt. Giese [34] dowodził nawet, że „*Tetrahymena* chętnie pobiera cząstki niestrawialne, o ile pokryte są one strawialną powłoką”.

ROLA POWIERZCHNIOWYCH RECEPTORÓW W FAGOCYTOZIE

Sattler i Staehelin [76], stosując technikę kriorytowania, stwierdzili w komórkach *Tetrahymena*, na zewnętrznych rzęskach membranelli pierwszej, obecność szczecinek, którym przypisywali nie tylko udział w napędzaniu i kierowaniu pokarmu do wnętrza cytostomu, ale także funkcję powierzchniowych receptorów. Jest prawdopodobne, że analogiczne miejsca wrażliwe znajdują się w komórkach *Paramecium*, gdyż pogląd o obecności receptorów na powierzchni ciała orzęsków jest powszechny [22, 24, 45, 54]. Przypuszcza się, że miejscem lokalizacji receptorów wrażliwych na kontakt z cząstkami ze środowiska przed ich pobraniem przez komórkę *Paramecium* są rzęski [83], błona cytostomu lub sam cytostom [96]. Konsekwencją mechanicznego pobudzenia przez zawiesinę obecną w środowisku jest proporcjonalne przyspieszenie nie tylko tempa fagocytozy, ale także prędkości przepływu cytoplazmy [90, 93], co zostało potwierdzone przy użyciu błękitu alcjanowego [91]. Barwnik ten blokuje w sposób mechaniczny możliwość tworzenia wodniczek pokarmowych. Pomimo zahamowania fagocytozy sama obecność zawiesiny w środowisku nadal przyspiesza ruch cytoplazmy. Zapewnia to obfitość materiału błonowego, niezbędnego do utworzenia nowych wodniczek pokarmowych. Na tej podstawie przypuszcza się, że oba procesy: fagocytoza i ruch cytoplazmy są regulowane m.in. przez sygnały pochodzące od powierzchniowych mechanoreceptorów.

Wielu autorów sugerowało, że strefa cytostomu u orzęsków jest wysoce wrażliwa na bodźce zarówno chemiczne, jak i mechaniczne [20, 21, 36, 53, 55, 75]. Okazało się jednak, że jest ona w porównaniu z przodem i tyłem komórki [45, 65], mało wrażliwa na mechaniczne pobudzenie.

Mechanoreceptory odbierające sygnały ze środowiska zewnętrznego zlokalizowane są na błonie somatycznej komórek *Paramecium* [46-48]. Po przeprowadzeniu doświadczeń z komórkami odrzęsionymi stwierdzono,

że błona rzęskowa, aksonemy i ciała podstawowe spełniają raczej bierną rolę w przekazywaniu mechanicznego pobudzenia ze środowiska zewnętrznego do komórki. Sugeruje to, że miejscem kontaktu cząstek stymulujących fagocytozę jest zapewne błona cytostomu [87, 96], choć trudno wykluczyć inne partie błony somatycznej.

Jest prawdopodobne, że fagocytoza u orzęsków jest procesem regulowanym przez wiele różnych receptorów. Są wśród nich, być może, także chemoreceptory. Potwierdzeniem tego jest zdolność do rozróżniania przez orzęski rodzaju pobieranych cząstek. Ponadto na podstawie ostatnich badań okazało się, że wrażliwość komórek *Paramecium* na bodźce termiczne ma podłoże jonowe [56]. Podobnie jak w przypadku mechanorecepcji, występuje zróżnicowanie wrażliwości przodu i tyłu komórki. Według Nakaoki i wsp. [56], termoreceptory te są jednak różne od mechanoreceptorów.

PODSUMOWANIE

Informacje przedstawione w tej pracy wskazują na wielostronną regulację procesu pobierania pokarmu przez komórki orzęsków. Tempo i przebieg fagocytozy uzależnione są od stanu fizjologicznego komórki, a także od fazy w cyklu życiowym, w której się ona znajduje. Okazało się ponadto, że zmiany warunków fizycznych i chemicznych środowiska zewnętrznego w sposób istotny wpływają na tworzenie wodniczek pokarmowych.

Różnorodność bodźców ze środowiska zewnętrznego, z jakimi spotykają się wolnożyjące orzęski, jest przez nie odbierana dzięki wyspecjalizowanym receptorom powierzchniowym, zlokalizowanym w błonie somatycznej. Miejscami o szczególnej wrażliwości okazały się przód i tył komórki. Tam właśnie znajduje się większość kanałów jonowych (Ca^{++} , K^+) biorących udział w odbieraniu informacji ze środowiska zewnętrznego. Obserwowaną doświadczalnie konsekwencją pobudzenia jest zmiana przebiegu i tempa różnych wewnątrzkomórkowych procesów. Mechanizm i droga przekazu informacji do wnętrza komórki pozostaje nadal nie wyjaśniona.

Fagocytoza, jej dynamika i przebieg u orzęsków uzależniona jest od różnorodnych czynników. Ponieważ niektóre z nich wywołują dominujący w danych okolicznościach efekt, daje to więc możliwość kierowania procesem pobierania pokarmu.

LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., Food vacuole membrane growth with microtubule-associated membrane transport in *Paramecium*, *J. Cell Biol.*, **63**: 904-922, 1974.
- [2] ALLEN R. D., FOK A. K., Phagosome fusion vesicles of *Paramecium*. I. Thin-section morphology, *Eur. J. Cell Biol.*, **29**: 150-158, 1983.
- [3] — Phagosome fusion vesicles of *Paramecium*. II. Freeze-fracture evidence for membrane replacement, *Eur. J. Cell Biol.*, **29**: 159-165, 1983.
- [4] — Stages of digestive vacuoles in *Paramecium*: membrane surface differences and location, *Eur. J. Cell Biol.*, **35**: 149-155, 1984.
- [5] — Retrieval of lysosomal membrane and acid phosphatase from phagolysosomes of *Paramecium caudatum*, *J. Cell Biol.*, **99**: 1955-1959, 1984.
- [6] — Modulation of the digestive lysosomal system in *Paramecium caudatum*. III. Morphological effects of cytochalasin B, *Eur. J. Cell Biol.*, **37**: 35-43, 1985.
- [7] ALLEN R. D., STAEHELIN L. A., Digestive system membranes: freeze-fracture evidence for differentiation and flow in *Paramecium*, *J. Cell Biol.*, **89**: 9-20, 1981.
- [8] BARBARIN V. V., Alternation of eansibility in *Paramecium caudatum* during starvation, *Leningradskii Gosudarstviennyj Pedagogicheskii. Uchenye Zapiski*, **30**: 51-64, 1940.
- [9] BOZLER E., Über die Morphologie der Ernährungsorganelle und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum* Ehrenberg, *Arch. Protistenk.*, **49**: 163-215, 1924.
- [10] BOZLER E., Über die physikalische Erklärung der Schlundfadenströmungen, ein Beitrag zur Theorie der Protoplasmaströmungen, *Z. vergleich. Physiol.*, **2**: 82-90, 1924.
- [11] BRAGG A. N., Selection of food by Protozoa, *Turttox News*, **17**: 41-44, 1939.
- [12] BRUTKOWSKA M., The effect of certain salt solutions and osmotic stimuli on ciliary movement and food intake in *Paramecium caudatum*, *Acta Protozool.*, **4**: 353-364, 1967.
- [13] CAMERON I. I., JETER J. R., Synchronization of the cell cycle of *Tetrahymena* by starvation and refeeding, *J. Protozool.*, **17**: 429-431, 1970.
- [14] CHAPMAN-ANDRESEN C., NILSSON J. R., On vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **36**: 405-432, 1968.
- [15] COHAN J., de LOUBRESSE N., BEISSON J., Actin mobilization during phagocytosis in *Paramecium*, *J. Submicr. Cytol.*, **16**: 103-104, 1984.
- [16] DASS C. M., SAPRA G. R., KUMER R., Food vacuole formation and membrane turnover in *Blepharisma musculus* v. *seshachari* Bhandary, *Indian J. Exp. Biol.*, **14**: 535-543, 1976.
- [17] DEMBOWSKI J., Dalsze studia nad wyborem pokarmu u *Paramecium caudatum*, *Prace Zakł. Biol. Og. Inst. Nenckiego*, **1**: 1-16, 1922.
- [18] — O wyborze pokarmu i tak zwanych zjawiskach pamięciowych u *Paramecium caudatum*, *Prace Zakł. Biol. Og. Inst. Nenckiego*, **1**: 1-37, 1922.
- [19] — Wpływ koncentracji zawiesiny na liczbę utworzonych wodniczek pokarmowych u *Paramecium caudatum*, *Prace Zakł. Biol. Og. Inst. Nenckiego*, **1**: 1-16, 1922.
- [20] — Historia naturalna jednego pierwotniaka, *Inst. Wyd. „Biblioteka Polska”*, Warszawa 1924.
- [21] DOROSZEWSKI M., Reception areas and polarization of ciliary movement

- in ciliate *Dileptus*, *Acta Biol. Exp., Vars.*, **21**: 15-34, 1961.
- [22] DOUGHTY M., DRYL S., Control of ciliary activity in *Paramecium*: An analysis of chemosensory transduction in a eucaryotic unicellular-organism, *Progress Neurobiol.*, **61**: 1-115, 1981.
- [23] ELLIOT A. M., CLEMMONS G. L., An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Protozool.*, **13**: 311-323, 1966.
- [24] FABCZAK S., MIKOŁAJCZYK E., Bioelektryczne podstawy aktywności ruchowej w organizmach pierwotniaczych, *Post. Biol. Kom.*, **5**: 191-209, 1978.
- [25] FOK A. K., SHOCKLEY B. U., Processing of digestive vacuoles in *Tetrahymena* and the effects of dichloroisoproterenol, *J. Protozool.*, **32**, 6-9, 1985.
- [26] FOK A. K., LEE Y., ALLEN R. D., The correlation of digestive vacuole, pH and size with the digestive cycle in *Paramecium caudatum*, *J. Protozool.*, **29**: 409-414, 1982.
- [27] FOK A. K., LEUNG S. S., ALLEN R. D., Modulation of the digestive-lysosomal system in *Paramecium caudatum*. I. Effect of temperature, *Eur. J. Cell Biol.*, **34**: 265-270, 1984.
- [28] FOK A. K., MURAOKA J. H., ALLEN R. D., Acid phosphatase in the digestive vacuoles and lysosomes of *Paramecium caudatum*: a timed study, *J. Protozool.*, **31**: 216-220, 1984.
- [29] FOK A. K., UENO M., AZADA E., Rapid and sensitive assays for phagosomal acidification in *Paramecium* and *Tetrahymena*, *Eur. J. Cell Biol.*, **38**: 306-311, 1985.
- [30] FOK A. K., UENO M., ALLEN R. D., Differentiation of *Paramecium* phagosome membrane and stages using monoclonal antibodies, *Eur. J. Cell Biol.*, **40**: 1-8, 1986.
- [31] FOK A. K., LEUNG S. S., CHUN D., ALLEN R. D., Modulation of the digestive lysosomal system in *Paramecium caudatum*. II. Physiological effects of cytochalasin B, colchicine and trifluoroperazine, *Eur. J. Cell Biol.*, **37**: 27-34, 1985.
- [32] GALEGO L., BARAHONA I., RODRIGUES-POUSADA C., Response of *Tetrahymena pyriformis* to stress induced by starvation, *Eur. J. Biochem.*, **139**: 163-171, 1984.
- [33] GELEI J., Ni-Infusorien im Dienste der Forschung und des Unterrichtetes, *Biol. Zbl.*, **55**: 57-74, 1935.
- [34] GIESE A. C., Fizjologia komórki, PWN, Warszawa 1985.
- [35] GRĘBECKI A., Gradient stomato-caudal d'excitabilités cilliés, *Acta Protozool.*, **3**: 79-100, 1965.
- [36] — Role of Ca^{2+} ions in the excitability of protozoan cell. Decalcification, recalcification and the ciliary reversal in *Paramecium caudatum*, *Acta Protozool.*, **3**: 275-290, 1965.
- [37] GRĘBECKI A., KUŹNICKI L., Badania nad reakcjami obronnymi wymoczków pojedynczych i skupionych w roztworach niektórych substancji organicznych, *Folia Biol.*, **3**: 159-182, 1955.
- [38] JENNINGS H. S., Studies in reactions to stimuli in unicellular organisms. II. The mechanism of the motor reactions of *Paramecium*, *Am. J. Physiol.*, **2**: 311-341, 1899.
- [39] KLOETZEL J. A., Feeding in ciliated protozoa. I. Pharyngeal discs in *Euplotes*: a source of membrane for food vacuole formation? *J. Cell Sci.*, **15**: 379-401, 1974.
- [40] KOENUMA A., The velocity distribution of the cyclosis in *Paramecium caudatum*, *Ann. Zool. Jap.*, **36**: 66-71, 1963.

- [41] KRUCIŃSKA M., SIKORA J., Zmiany ruchliwości cytoplazmy i fagocytoza w dzielących się komórkach *Paramecium bursaria*, w druku.
- [42] KUŹNICKI L., SIKORA J., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. III. The effect of temperature on flow velocity, *Acta Protozool.*, **12**: 59-66, 1973.
- [43] LEUNG S. K., FOK A. K., Effects of drugs and temperature on the processing of digestive vacuoles in *Paramecium*, *J. Cell Biol.*, **95**: 432a, 1982.
- [44] LEWIS W. H., Pinocytosis, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **49**: 17-20, 1931.
- [45] MACHEMER H., DEITMER J., Mechanoreception in Ciliates, [w:] *Progress in Sensory Physiology 5*, red. D. Otton, Spring Verlag, 81-118, 1985.
- [46] MACHEMER H., MACHEMER-RÖHNISCH S., Mechanical and electric correlates of mechanoreceptor activation of the ciliated tail in *Paramecium*, *J. Comp. Physiol. A*, **154**: 273-278, 1984.
- [47] MACHEMER H., OGURA A., Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*, *J. Physiol.*, **296**: 49-60, 1979.
- [48] MACHEMER-RÖHNISCH S., MACHEMER H., Receptor current following controlled stimulation of immobile tail cilia in *Paramecium caudatum*. *J. Comp. Physiol. A*, **154**: 263-271, 1984.
- [49] MAST S. O., The food vacuole in *Paramecium*, *Biol. Bull.*, **92**: 31-72, 1947.
- [50] METALNIKOV S. I., Les infusories peuvent-ils appredre a choisir leur nourriture? *Arch. Protistenk.*, **35**: 60-78, 1914.
- [51] MIETCHNIKOFF E., Untersuchungen über die mesodermalen Phagocyten einige Wirbeltiere, *Biol. Zentr.*, **3**: 500-505, 1883.
- [52] MÜLLER M., RÖHLICH P., TÖRÖ I., Studies on feeding and digestion in Protozoa. VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its early effect on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*, *J. Protozool.*, **12**: 27-34, 1965.
- [53] NAITOH Y., Direct current stimulation of *Opalina* with intracellular micro-electrode, *Ann. Zool. Jap.*, **31**: 59-73, 1958.
- [54] — Mechanosensory transduction in *Protozoa*, [w] *Membranes and sensory transduction*, red. G. Colombetti, F. Lenci, Plenum, New York, 113-135, 1984.
- [55] NAITOH Y., ECKERT R., Sensory mechanisms in *Paramecium*. II. Ionic basis of the hyperpolarizing mechanoreceptor potential, *J. Exp. Biol.*, **59**: 53-65, 1973.
- [56] NAKAOKA Y., KURATANI T., ITOH H., Ionic mechanism of thermoreception in *Paramecium*, *J. Exp. Biol.*, **127**: 95-103, 1987.
- [57] NANNEY D. L., *Experimental Ciliatology*, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto 1980.
- [58] NILSSON J. R., Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **39**: 83-110, 1972.
- [59] — Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis*. GL, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **40**: 215-355, 1976.
- [60] — On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL, *J. Protozool.*, **24**: 502-507, 1977.
- [61] — On starvation-induced autophagy in *Tetrahymena*, *Carlsberg Res. Com.*, **49**: 323-340, 1984.
- [62] NILSSON J. R., DEURS B., Coated pits and pinocytosis in *Tetrahymena*, *J. Cell Sci.*, **63**: 209-222, 1983.
- [63] NILSSON J. R., WILLIAMS N. E., An electron microscope study of the oral

- apparatus of *Tetrahymena pyriformis* GL, Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 35: 119-141, 1966.
- [64] NILSSON J. R., RICKETS T. R., ZEUTHEN E., Effects of cytochalasin B on cell division and vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL, Exp. Cell Res., 79: 456-459, 1973.
- [65] OGURA A., MACHEMER H., Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane, J. Comp. Physiol., 135: 233-242, 1980.
- [66] PAVLOVSKAJA T. V., Vlijanje uslovij pitanija na skorost' potreblenija pisci i vremena generaciji infusorij, Zool. Žurn., 52: 1451-1457, 1973.
- [67] RAILKIN A. I., Koliczestwiennyj analiz fagocytoza *Paramecium caudatum* Ehrbg. i *Spirostomum ambiguum* Ehrbg., Acta Protozool., 20: 255-280, 1981.
- [68] RASMUSSEN L., On the role of food vacuole formation in the uptake of dissolved nutrients by *Tetrahymena*, Exp. Cell Res., 82: 192-196, 1973.
- [69] RASMUSSEN L., RICKETTS T. R., Endocytosis, exocytosis and lysosomes, [w] Post-congress Publication, Summary of the Proceedings of the 5th International Congress of Protozoology, New York, 140-146, 1977.
- [70] RICKETTS R. T., Periodicity of endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*, Protoplasma, 73: 387-396, 1971.
- [71] — Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. Selectivity of uptake of particles and the adaptive increase in cellular acid phosphatase activity, Exp. Cell Res., 66: 49-58, 1971.
- [72] — The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*, J. Protozool., 19: 373-375, 1972.
- [73] — The relationship between endocytosis and digestive enzymes in *Tetrahymena*, [w:] Progress in Protozoology, 4th Intern. Congr. Protozool., Clermont-Ferrand, 344, 1973.
- [74] RICKETTS T. R., RAPPITT A. F., A radioisotopic and morphological study of the uptake of materials into food vacuoles by *Tetrahymena pyriformis* GL-9, Protoplasma, 86: 321-337, 1975.
- [75] ROSENBAUM R. M., WITTNER H., The activity of intracytoplasmic enzymes associated with feeding and digestion in *Paramecium caudatum*. The possible relationship to neutral red granules, Arch. Protistenk., 106: 223-240, 1962.
- [76] SATTLER C. A., STAEHELIN L. A., Ciliary membrane differentiations in *Tetrahymena pyriformis*, J. Cell Biol., 62: 473-490, 1974.
- [77] SCHNEIDER L., Elektronenmikroskopische Untersuchungen and der Ernährungsorganellen von *Paramecium*. I. Der Cytopharynx, Z. Zellforsch. mikr. Anat., 62: 198-224, 1964.
- [78] SEAMAN G. R., Some aspects of phagotrophy in *Tetrahymena*, J. Protozool., 8: 204-212, 1961.
- [79] — Acid phosphatase activity associated with phagotrophy in ciliate *Tetrahymena*, J. Biophys. Biochem. Cytopl., 9: 243-244, 1961.
- [80] SEAMAN G. R., MANCILLA R., Properties of a factor proteoseptone which stimulate phagotrophy, [w] Progress in Protozoology, Proc. Ist Intern. Congr. Protozool., Praha, 165, 1963.
- [81] SIKORA J., Cytoplasmic streaming in *Paramecium*, J. Cell Biol., 70: 399a, 1976.
- [82] — Cytoplasmic streaming in *Paramecium*, Protoplasma, 109: 57-77, 1981.
- [83] SIKORA J., JURAND A., Control of cytoplasmic streaming in *Paramecium* by papaverine hydrochloride and ionophore A 23187, Eur. J. Cell Biol., 22: 356, 1980.

- [84] SIKORA J., KUŹNICKI L., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. IV. Cyclosis during binary fission and conjugation, *Acta Protozool.*, **15**: 173-178, 1976.
- [85] STOCKEM W., Endocytosis, [w] *Mammalian Cell Membranes*, 5, red. G. A. Jamieson, D. M. Robinson, Butterworths, London, 151-195, 1977.
- [86] STOCKEM W., WOLFARTH-BOTTERMANN K. E., Pinocytosis (endocytosis), [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland, Publ. Comp., Amsterdam, London, 1373-1400, 1969.
- [87] TOŁŁOCZKO B., Endocytosis in *Paramecium*. I. Effect of tripsine and pronase, *Acta Protozool.*, **14**: 313-320, 1975.
- [88] — Endocytosis in *Paramecium*. II. Effect of lysosome and neuraminidase, *Acta Protozool.*, **15**: 359-366, 1976.
- [89] — Endocytosis in *Paramecium*. III. Effect of cytochalasin B and colchicine, *Acta Protozool.*, **16**: 185-193, 1977.
- [90] WASIK A., Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*. I. Influence of carmine suspension, *Acta Protozool.*, **22**: 183-189, 1983.
- [91] WASIK A., SIKORA J., Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*. II. Influence of media free of suspension, *Acta Protozool.*, **23**: 107-113, 1984.
- [92] — Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*. III. Influence of endocytosis cessation, *Acta Protozool.*, **23**: 115-121, 1984.
- [93] WASIK A., SIKORA J., KUŹNICKI L., Effect of different suspensions on phagocytosis and cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*, *Post. Biol. Kom.*, **2**: 529-532, 1984.
- [94] WASIK A., SIKORA J., KRUCIŃSKA M., Endocytotic ability of starved *Paramecium bursaria*, *Acta Protozool.*, **26**, 119-128, 1987.
- [95] WICHTERMAN R., *The Biology of Paramecium*, Blakiston comp., INC, New York, Toronto 1953.
- [96] WYROBA E., BRUTKOWSKA M., Restoration of phagocytic activity of *Paramecium tetraurelia* supported by previous digestion of surface coat, *Acta Protozool.*, **17**: 515-524, 1978.

Otrzymano: 25 maja 1987.

Przyjęto: 9 października 1987.

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

BIAŁKOWA KOMPONENTA BŁONY KOMÓRKOWEJ W BADANIACH METODĄ KRIORYTOWNICTWA

CELL MEMBRANE PROTEINS IN FREEZE-FRACTURING

Leszek KORDYLEWSKI

Zakład Cytologii i Histologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie. Przedyskutowano zagadnienia morfologii, sposobu rozmieszczenia i zagęszczenia cząstek białkowych widocznych w błonie komórkowej w obserwacjach mikroskopowo-elektronowych replik powstałych w wyniku zastosowania techniki kriorytownictwa (freeze-fracturing). Obszernie omówiono obecne poglądy na charakter cząstek z uwzględnieniem ograniczeń techniki FF i jej artefaktów.

Summary. The morphology, distribution and surface density of the protein particles seen in the electron micrographs of the replicas obtained through freeze-fracturing are discussed. Present views on the character of the particles are reviewed, with particular reference to the limitations and artifacts of the FF technique.

Wykaz stosowanych terminów i skrótów

kriorytownictwo (FF)

rozłupywanie mrozeniowe — freeze fracturing (FF)

rytowanie mrozeniowe — freeze etching (FE)

głębokie rytownictwo — deep etching

krioprotektant — cryoprotectant

prefiksacja = utrwalanie wstępne — prefixation

rozłupywanie zamrożonej próbki — fracturing

rozszczepianie się błon — membrane splitting

napyłanie próbki platyną i węglem — Pt-C coating

replika platynowo-węglowa — Pt-C replica

repliki komplementarne — complementary replicas

replikacja rotacyjna — rotary replication

cieniowanie rotacyjne — rotary shadowing

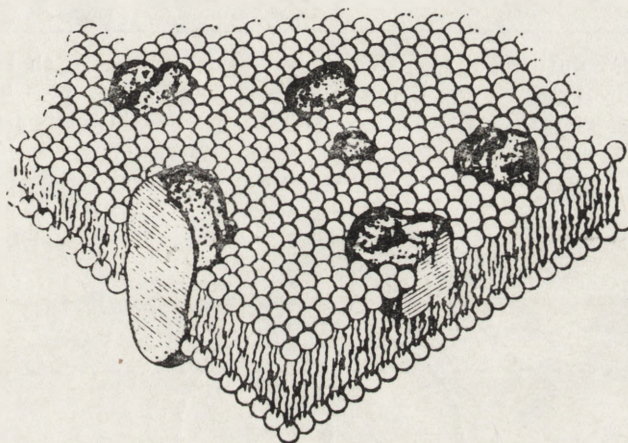
cieniowanie bez rotacji — non-rotary shadowing
autoradiografia w kriorytownictwie — freeze fracture autoradiography (FARG)
dwuwarstwowa błona lipidowa — lipid bilayer
białka integralne błony — integral proteins
białka peryferyczne — peripheral proteins
cząstki białkowe — protein particles
 cząstki wewnątrz błonowe (śródbłonowe) — intramembrane particles (IMP)
 cząstki przez błonowe — transmembrane particles (TMP)
cząstki lipidowe — lipidic particles
odwrócone micelle — inverted micelles
dekoracja cząstek białkowych — particle decoration
płaszczyzna przełomu — fracture plane
płaszczyzna środkowa błony — central plane
liposomy — liposomes
złącze szczelinowe — gap junction (GJ)
agregacja cząstek — particle aggregation
dołeczek — pit
szerokość cienia cząstki — particle shadow width (PSW)
szerokość platynowo-węglowej czapeczki na cząstce — particle cap width (PCW)
powierzchnie błony komórkowej — surfaces
 powierzchnia zewnętrzna — external surface (ES)
 powierzchnia wewnętrzna (zwrócona do cytoplazmy) — protoplasmic surface (PS)
części natywnej błony (przed rozszczepieniem)
 listek zewnętrzny (przylegający do przestrzeni pozakomórkowej)
 listek wewnętrzny (przylegający do cytoplazmy)
strony rozłupanej błony — faces
 strona P (protoplazmatyczna) — protoplasmic face (PF)
 strona E (zewnętrzna) — external face (EF)
mikroskop elektronowy (ME)

STRUKTURA BŁONY KOMÓRKOWEJ

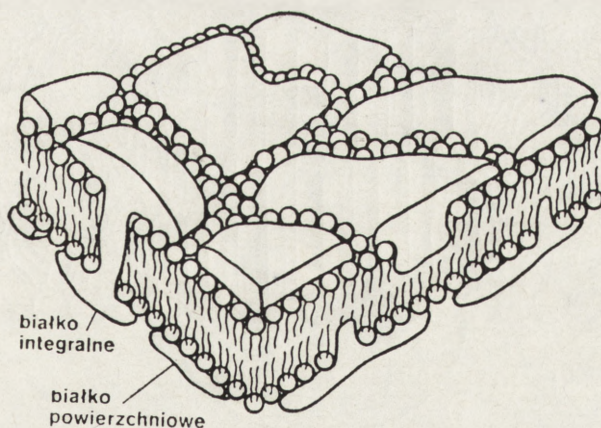
Budowę błony komórkowej uważa się obecnie za dobrze poznaną, a obowiązujący model jej organizacji jest szeroko rozpowszechniany w podręcznikach biologii komórki. Nie oznacza to jednak, że wszystko w dziedzinie struktury błon biologicznych zostało wyjaśnione. Wręcz przeciwnie, intensywne badania prowadzone w licznych ośrodkach na

świecie dostarczają wciąż nowych szczegółów, ujawniają różnorodność błon, wskazują na nie rozwiązane problemy i na niejasności interpretacyjne. Poprzez intensywne rozwijanie rozmaitych metodycznie form badań atakowane są przede wszystkim czynniki ograniczające możliwości lepszego poznania struktury błony [167].

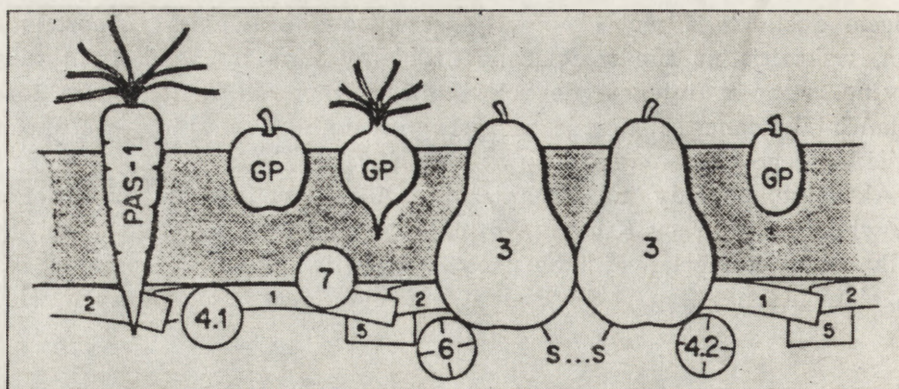
Aktualne poglądy na organizację molekularną błony biologicznej omówione są w pracy Kilarskiego [61]. Obecnie uważa się, że integralne białka błony komórkowej zanurzone są w dwuwarstwowej lipidowej błonie elementarnej (rys. 1-5). Białka te decydują o fizjologicznych włas-



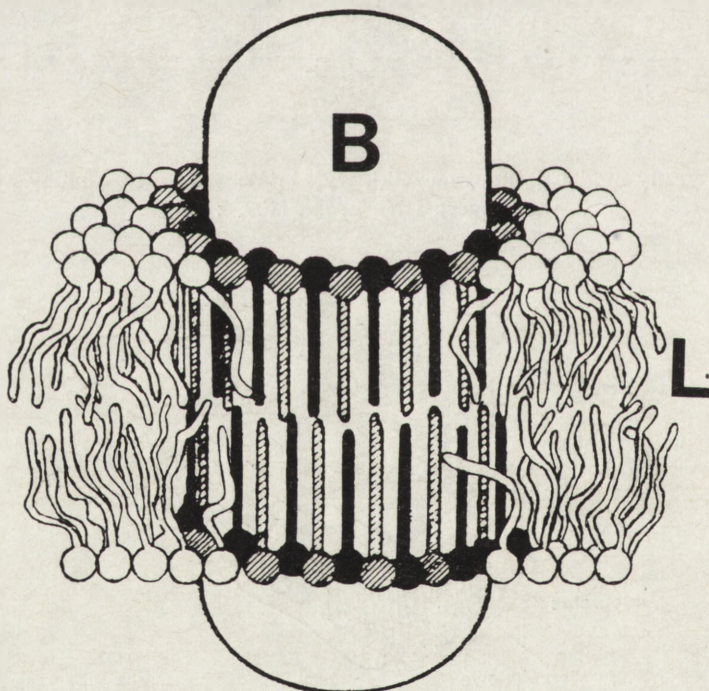
Ryc. 1. Klasyczny model płynnej mozaiki, wyjaśniający strukturę błony komórkowej wg Singera i Nicolsona [138, z 121]



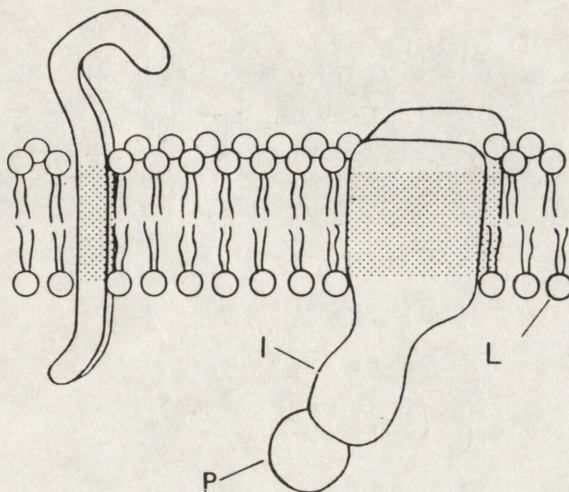
Ryc. 2. Aktualniejszy niż na ryc. 1 schemat struktury błony biologicznej, uwzględniający obudowanie warstwy dwulipidowej białkami powierzchniowymi [112]



Ryc. 3. Schemat ilustrujący rozmaity stopień zagłębienia różnych białek przedstawionych jako warzywa i owoce (np. GP — glikofosforyna, 3 — białko trzeciego szczytu elektroforetycznego) tkwiące w szarym tle gleby (warstwa lipidowa). Niektóre z białek przechodzą przez błonę (białka przezbłonowe — transmembrane proteins TMP), podczas gdy inne zanurzone są w niej jedynie częściowo. Niektóre wykazują związek z elementami cytoszkieletowymi wewnątrz komórki (u dołu), podczas gdy od strony zewnętrznej (u góry) mają w różnym stopniu rozbudowane łańcuchy glikoproteinowe [179]



Ryc. 4. Schemat osadzenia pojedynczej cząstki białkowej (B) w dwulipidowej warstwie (L) błony biologicznej [31]

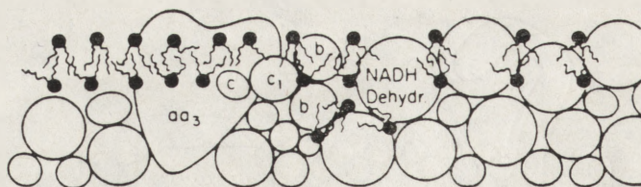


Ryc. 5. Schemat struktury błony biologicznej, ukazujący warstwę dwulipidową (L) oraz przenikające przez nią białka integralne (I) i towarzyszące im białka peryferyczne (P) (wg Amersham Research News, 1981)

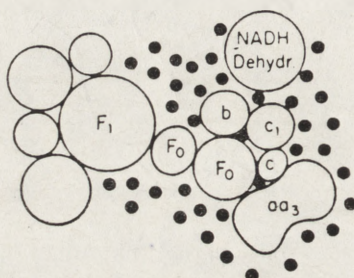
nościach błony komórkowej. Kompleksy białkowe błony są odpowiedzialne za zespół zjawisk elektrofizjologicznych komórki i transport substancji przez błonę. Stanowią one m.in. kanały selektywne jonowo, nośniki specyficznych substratów oraz specyficzne receptory [79, 121]. Cząstki białkowe błony są również miejscami zakotwiczenia elementów cytoszkieletowych oraz tworzą regionalne specjalizacje błony [79]. Przy użyciu konwencjonalnych technik transmisyjnego mikroskopu elektronowego cząstki białkowe nie są jednak bezpośrednio widoczne na preparatach skrawanych. Ich obecność w błonie można stwierdzić w mikroskopie elektronowym jedynie przy zastosowaniu techniki kriorytownictwa (freeze-fracturing).

KRIORYTOWNICTWO

W technice tej, po zamrożeniu tkanki w ciekłym azocie (-196°C) i po przyłożeniu do próbki sił rozrywających, zawarte w niej błony biologiczne rozszczepiają się w płaszczyźnie między obu warstwami lipidowymi (ryc. 7-9). Jest to więc unikatowa metoda ukazania wnętrza błony, niedostępnego na drodze innych metod [16]. Wyeksponowane w ten sposób kompleksy białkowe, wystające z lipidowego tła błony, dają znać o swej obecności po wycieniowaniu platyną i węglem. Po roz-

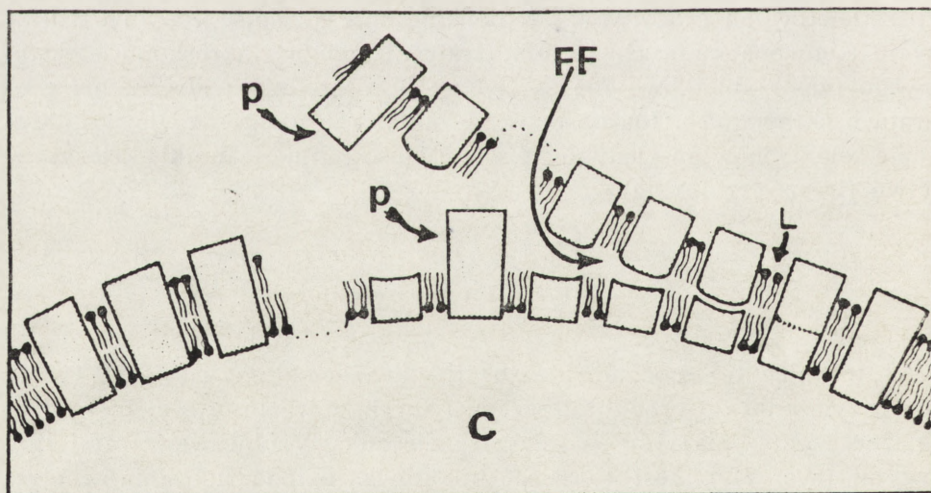


(a)

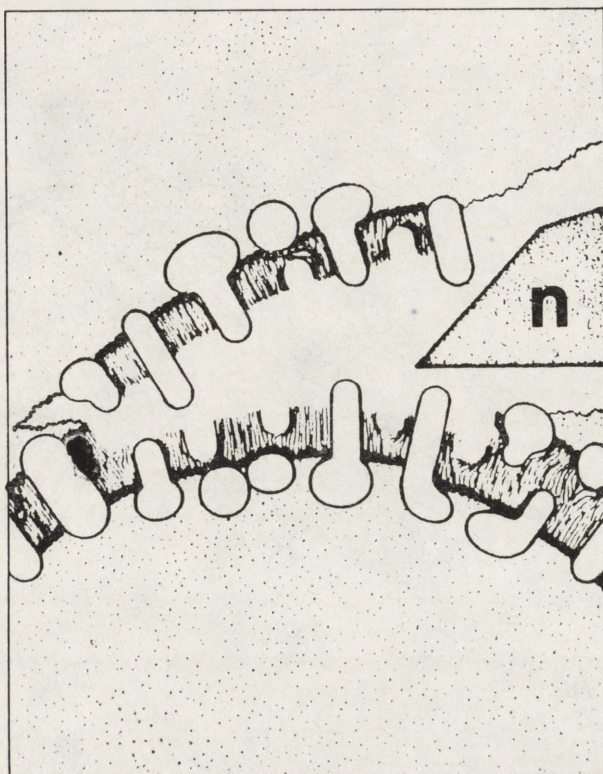


(b)

Ryc. 6. Schemat struktury wewnętrznej błony mitochondrialnej proponowany przez Sjöstranda [143]. Duże puste kręgi reprezentują białka, małe ciemne punkty przedstawiają hydrofobowe grupy fosfolipidów; a — przekrój modelu w płaszczyźnie prostopadłej do błony, b — widok z góry analogicznego obszaru błony. Błona mitochondrialna jest bogatsza w cząstki białkowe niż błona komórkowa; nieliczne fosfolipidy zgrupowane są wyspowo i nie tworzą wyraźnej podwójnej warstwy. Trudno więc mówić o centralnym rozszczepieniu takiej błony w procesie rozluźniania [143]



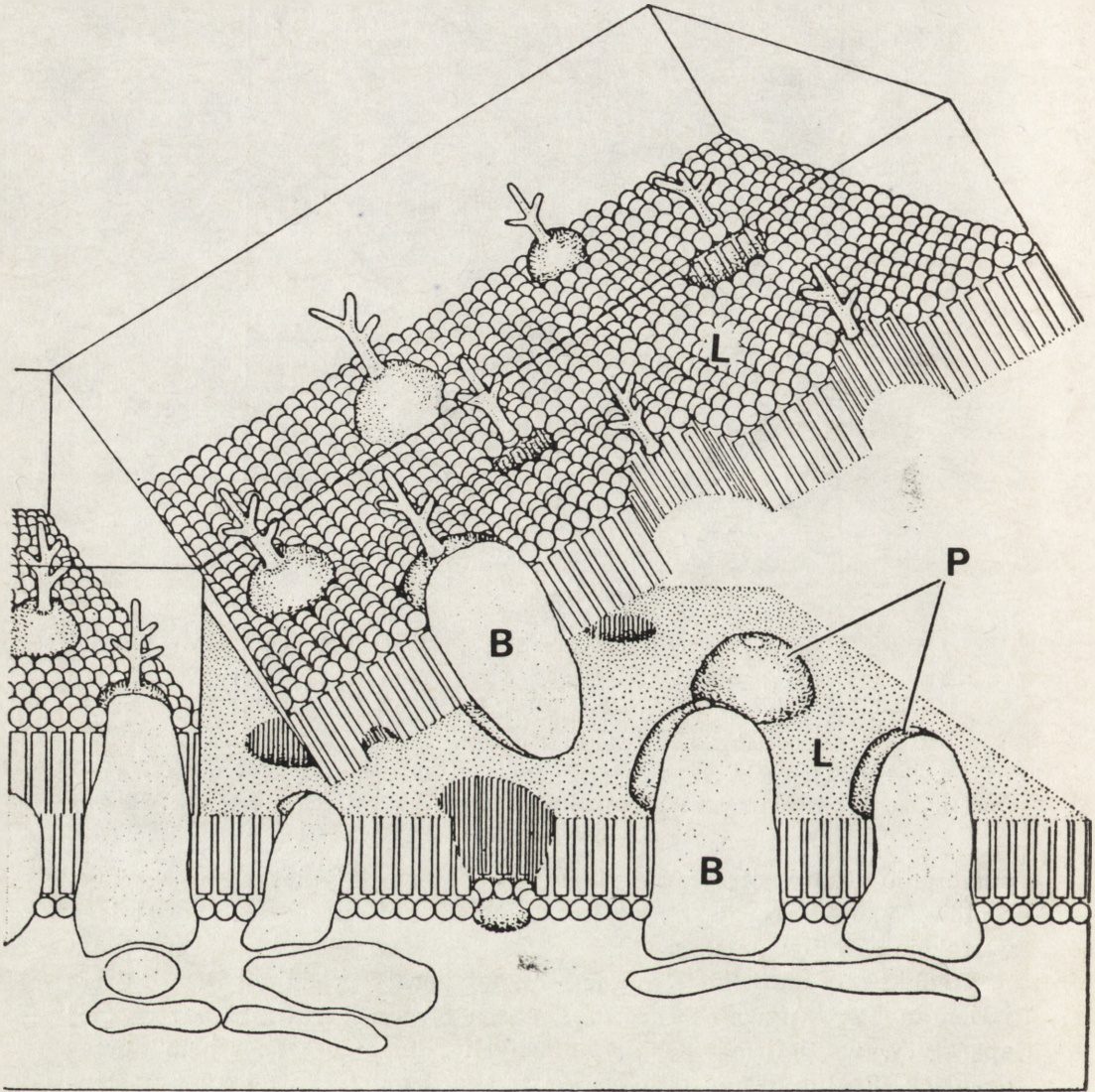
Ryc. 7. Schemat rozluźniania błony komórkowej, zakładający, że część cząstek białkowych zostaje wysunięta z warstwy lipidowej L, podczas gdy inne cząstki pękają centralnie w procesie rozluźniania FF. C — cytoplazma komórki ([70], wg [53])



Ryc. 8. Schemat sposobu pęknięcia zamrożonej błony pod wpływem uderzenia nożem (n), zakładający wysuwanie się całych cząstek białkowych z połówek warstwy lipidowej [31]

puszczeniu tkanki otrzymuje się w ten sposób jej platynowo-węglową replikę, stanowiącą jakby odlew powierzchni przełomu powstałego w trakcie rozłupywania.

Repliki otrzymuje się stosując seryjne aparaty produkcji firm Balzers i Denton. Porównywalne rezultaty można otrzymać również bez drogiej aparatury, w niefirmowych, wykonanych „domowym sposobem” urządzeniach. Rozłupywanie odbywa się tam pod ciekłym azotem, a następnie w próżni przeprowadza się napyłanie zamrożonej próbki platyną i węglem [12, 16, 181]. Zaletę stosowania firmowych aparatów stanowi fakt, że rozłupywanie i napyłanie próbki przeprowadza się w jednym urządzeniu w wysokiej próżni (10^{-9} milibara). Ponadto istnieje możliwość precyzyjnego kontrolowania grubości napyłonego metalu. Tkanekę zwykle wstępnie zamraża się w ciekłym freonie, a następnie przechowuje w ciekłym azocie. Bezpośrednio przed rozłupywaniem próbkę umieszcza się pod próżnią na stoliku aparatu chłodzonym przepływem ciekłego azotu (ryc. 10a), a następnie uderza się w nią nożem (również ochładzanym ciekłym azotem) (ryc. 10b). Używany nóż to po prostu

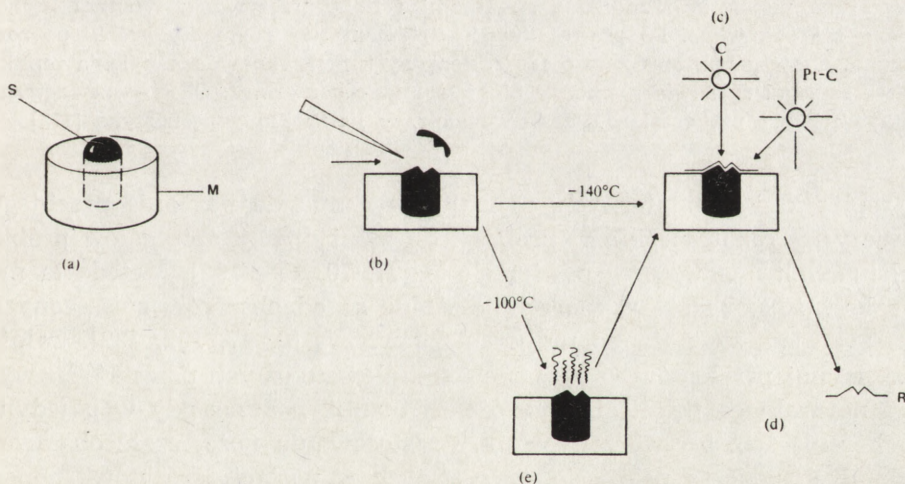


Ryc. 9. Przestrzenny schemat rozszczepienia błony, zakładający wysuwanie się cząstek białkowych B z warstw lipidowych L, co w efekcie prowadzi do powstawania dołeczków i komplementarnych do nich cząstek P [153]

ostrze stalowej żyłki lub skalpela; nie jest to nóż diamentowy, jak mylnie podaje Przystalski [112, s. 78]. Niektóre schematy sugerują, że sam nóż przechodzi między warstwami lipidowymi (ryc. 8). Niestety nie jest tak, gdyż nie pozwala na to rozbieżność rozmiarów noża i grubości błony. Nóż wywołuje jedynie siłę nacisku na tkankę, która pęka (kruszy się) wzdłuż najsłabszych miejsc w płaszczyźnie przesuwania się noża, tuż przed nim. Następnie rozłamany preparat wystawia się w próżni na działanie par rozżarzonej elektrody platynowo-węglowej (ryc. 10c).

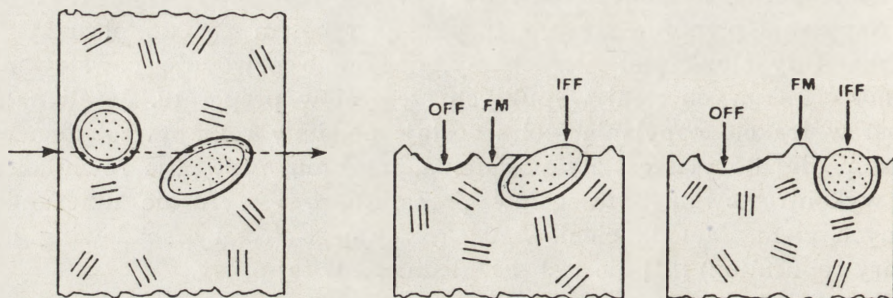
Napylenie przeprowadza się zwykle pod kątem 45° do płaszczyzny stolika. Gdy stolik jest nieruchomy, napylenie powoduje powstawanie jednokierunkowych cieni wypukłych szczegółów preparatu. Jeżeli natomiast w trakcie napylenia stolik zostaje poddany rotacji względem osi prostopadłej do płaszczyzny powstania przełomu, następuje równomierne wykontrastowanie szczegółów preparatu, bez wyraźnie ukierunkowanych cieni. Metoda cieniowania rotacyjnego (rotary shadowing lub rotary replication) [81] nie jest uwzględniona w tej pracy.

Zazwyczaj górna część próbki, zerwana nożem, zostaje stracona, a replikacji i obserwacjom podlega jedynie dolna, pozostająca na stoliku część preparatu (ryc. 10). Zamiast uderzania nożem stosować można tak-



Ryc. 10. Schemat postępowania w technice kriorytownictwa: a) zamrażanie — próbkę S zamraża się na metalowej podstawie M; b) rozłupywanie — uderzeniem noża (strzałka) odrywa się górną część próbki od dolnej; c) replikacja — pod próżnią (poniżej temp. -140°C) próbkę napyła się bocznie parami platyny i węgla (Pt — C) oraz wzmacnia napyleniem odgórnym parami węgla C; d) uzyskiwanie repliki (R) — po rozmrożeniu i rozpuszczeniu próbki pozostaje cienka warstwa platyny i węgla odzwierciedlająca szczegóły powierzchni przełomu; e) rytowanie — między rozłupywaniem (b) a replikacją (c) można próbkę ogrzać do ok. -100°C i z jej powierzchni odparować zamrożoną wodę [181]

ze siły rozrywania. Zamrożoną próbkę umieszcza się wtedy w specjalnych podwójnych podstawkach zmontowanych na stoliku wyposażonym w blat otwierany jak książka. Otwierając blat stolika uzyskuje się repliki z obu powierzchni powstałych w wyniku rozerwania próbki: dolnej i zerwanej z niej górnej, która następnie zostaje odwrócona dla wyeksponowania i napylenia powierzchni przełomu (ryc. 11). Jest to tzw. meto-



Ryc. 11. Schemat ilustrujący powstawanie replik komplementarnych. Po lewej fragment próbki przed rozłupaniem, zawierający dwa błoniste pęcherzyki. Płaszczyzna pęknięcia zaznaczona strzałkami i linią przerywaną. Wnętrze pęcherzyków zakropkowane. Po prawej dwa komplementarne fragmenty próbki po rozłamaniu. Część górną obrócono o 180° celem wyeksponowania do napylenia repliki. FM — szczegół środowiska między błonistymi pęcherzykami, OFF — zewnętrzny listek błony pęcherzyka, IFF — wewnętrzny listek błony pęcherzyka [175]

da replik komplementarnych, niezmiernie cenna do poznania przebiegu płaszczyzny rozłupywania w próbce i do identyfikacji szczegółów próbki rozłamanych między obie powierzchnie [37, 70, 155, 182]. Metoda ta ma tę zaletę, że powstałe powierzchnie wolne są od obszarów zniszczonych przesuwaniem się noża po preparacie, tzw. rys [6, 97, 152, 182]. Całość powierzchni przełomów w replikach komplementarnych powstaje w wyniku naturalnego pęknięcia zamrożonej tkanki, podczas gdy w pojedynczych replikach, wytworzonych przy zastosowaniu noża, część obszarów powstałych podczas pęknięcia, wystających w postaci „szczytów” ponad płaszczyznę, w której porusza się nóż, zostaje nim następnie zdarta. Jedynie szczegóły leżące niżej, w „dolinach” przełomu, zostają zachowane. Metoda replik komplementarnych, mimo swych zalet, jest jednak niezmiernie kapryśna i czasochłonna, a uzyskanie zadowalających wyników nie jest łatwe. Stąd też nie jest ona szeroko stosowana.

Przełomy przez cytoplazmę komórki są trudne do interpretacji. Jedynie elementy włókniste (filamenty) dają obiecujące obrazy po zastosowaniu techniki kriorytownictwa [15]. W ognisku zainteresowania ba-

daczy stosujących tę technikę są przede wszystkim odwzorowania wewnętrznych powierzchni błon [23]. Jak wierne jest odwzorowanie, jakie powstają przy zastosowaniu tej techniki artefakty oraz jak je interpretować, jest obecnie przedmiotem licznych dyskusji i badań.

W technice „kriorytownictwa” wyróżnia się dwie odmiany procedury. Pierwsza to proces freeze-fracturing (FF) (nazywany też czasem freeze-cleaving), który polega na natychmiastowym napyleniu platyny i węgla, tuż po uzyskaniu przełomu przez próbkę (ryc. 10a-d). Druga odmiana, tzw. freeze-etching (FE), pozwala na odparowanie wody (a właściwie na sublimację lodu) z powierzchni zamrożonej próbki wystawionej na działanie próżni przez pewien czas po przełamaniu tkanki i podgrzaniu jej do temperatury ok. -100°C (ryc. 10e). Daje to w rezultacie odsłonięcie głębiej leżących struktur, zamaskowanych w płaszczyźnie przełomu drobinami wody. Na tym polega właściwe rytowanie (etching). Sublimujące z próbki cząsteczki wody wylapywane są przez chłodzony nóż lub inną osłonę preparatu, na których następuje ich kondensacja [157]. Stopień zagłębienia się poniżej poziomu przełomu jest proporcjonalny do czasu, jaki upływa między wytworzeniem pęknięcia a momentem rozpoczęcia napylenia warstwy platyny i węgla [16]. Dostyć często stosuje się jeszcze inną modyfikację rytowania, tzw. deep-etching (głębokie rytownictwo), gdzie czas odparowywania próbki pod chłodzonym nożem (na którym następuje kondensacja ulatniającej się wody) dochodzi do kilku minut [53, 54, 56, 135, 181]. Problematyka niniejszego artykułu ograniczać się będzie w zasadzie wyłącznie do techniki FF.

Terminy freeze-etching i freeze-fracturing są często używane nieślusnie jako synonimy. Dotyczy to nie tylko źródeł polskich, lecz przede wszystkim anglosaskich. W polskim nazewnictwie również przyjęła się myląca nazwa kriorytownictwa, stosowana do obu odmian procedury. Należy więc podkreślić, że fracturing (rozłupywanie) jest tu procesem podstawowym, w którego wyniku powstaje przełom przez badany materiał, podczas gdy „etching” (rytowanie) jest nie zawsze stosowanym procesem uzupełniającym, w którego wyniku uzyskać można informacje o przestrzennej organizacji struktur w warstwach leżących poniżej płaszczyzny przełomu [9].

Stosowana nomenklatura polska nie jest też ani konsekwentna ani trafna. Na przykład w przetłumaczonej na język polski „Fizjologii komórki” Giesego [44] na freeze-etching i freeze-fracture proponowane są mało praktyczne terminy: metoda wytrawiania zamrożeniowego i metoda rozłupywania zamrożeniowego. Przestalski natomiast [112] używa innego określenia FE: metoda wytrawiania sublimacyjnego. Ciecziura [23] stosuje termin mrożenie-rytowanie bez rozróżnienia obu rodzajów technik (FF i FE). Wydaje się, że żartobliwy termin „metoda mrozołupu”

[112] zasługuje na większą popularyzację. Ze względu na swą zwięzłość powinien on się przyjąć w polskim nazewnictwie, szczególnie na oznaczanie techniki FF. Termin kriorytownictwo (rytowanie) powinien wyłącznie odnosić się do techniki freeze-etching (FE).

Obrazy uzyskiwane w każdej z metod (FF i FE) są bardzo różne, a odmienność ich charakteru jest dla wprawnego obserwatora oczywista. Repliki uzyskane po wyłącznym zastosowaniu procesu rozłupywania (FF) są strukturami bardzo przestrzennymi, ale repliki pochodzące z rytowania (FE) są o wiele bogatsze w struktury trójwymiarowe i mają znaczną głębię. Stąd też oznaczanie ich jednym terminem jest dużym uproszczeniem.

Technika kriorytownictwa (FF i FE) ma ważną zaletę, która stanowi o jej wyższości nad innymi technikami mikroskopii elektronowej. Ukazuje ona mianowicie morfologię struktur komórkowych nie zmienioną chemicznym utrwalaniem, odwodnieniem, przepajaniem, skrawaniem oraz barwieniem metalami ciężkimi [16]. Pozwala na wgląd w te struktury niezależnie od ich własności chemicznego powinowactwa od odczynników kontrastujących, a uzyskane obrazy charakteryzują się wysoką zdolnością rozdzielczą [181]. Jedyne poważne zmiany, jakich można się spodziewać, to możliwe artefakty związane z zamrażaniem tkanki. Wyeliminować je można (niezależnie od stosowania krioprotektantów mogących być źródłem innych artefaktów) odpowiednio obniżając temperaturę i skracając czas procedury zamrażania do niezbędnego minimum [110, 136]. Ponadto na małych powiększeniach technika ta daje rozeznanie w trójwymiarowej organizacji badanych struktur. Na dużych powiększeniach pozwala poznać makromolekularną organizację badanego obiektu, np. błony organeli, plazmolemy, struktury włókniste [119].

JAK PĘKA ZAMROŻONA BŁONA?

Pogląd, iż błony biologiczne po zamrożeniu i przyłożeniu do próbki siły (nacisku noża lub rozrywania) pękają wzdłuż ich płaszczyzny środkowej (między dwiema warstwami lipidowymi), jest zgodny z rozważaniami teoretycznymi, które mówią, że istniejące tam niekowalენტne wiązania między sąsiadującymi ze sobą grupami hydrofobowymi obu warstw lipidowych są słabsze niż siły spójności występujące w otaczających je obszarach wypełnionych zamrożoną wodą [7-9, 16, 62]. Stąd też powszechnie uważa się, że procedura FF ujawnia wewnątrz apolarne podwójnej warstwy lipidowej [169].

Inny przebieg pęknięcia w rozłupywanej próbce jest o wiele mniej prawdopodobny. Oczywiście zdarza się, że płaszczyzna przełomu opuszcza błonę i przechodzi przez pozbawiony błon obszar cytoplazmy lub przestrzeni międzykomórkowych. Uważa się jednak, że przebieg przełomu wzdłuż błony, po jej stronie powierzchniowej, zewnętrznej lub protoplazmatycznej, zdarza się rzadko, jedynie w przypadku występowania błon ciasno upakowanych obok siebie, jak np. w granach chloroplastów [8] lub w osłonkach mielinowych włókien nerwowych [7, 84, 105, 154].

Pogląd, że płaszczyzna przełomu z reguły biegnie wzdłuż zewnętrznej lub wewnętrznej (protoplazmatycznej) powierzchni błony, miał swych zwolenników w początkach zastosowania techniki kriorytownictwa (FF) [64, 91, 121, 161, 176]. Obecnie tylko nieliczni badacze obstają przy takiej interpretacji [139-143]. Choć większość przyznaje racje koncepcji Brantona [9], że błona pęka w płaszczyźnie środkowej, to jednak pogląd ten nie wydaje się niezachwiany. Problem ten będzie poruszony jeszcze w dalszej części niniejszego artykułu. Być może w przyszłości znajdą się też inne fakty, które zmienią nasze obecne przekonanie o sposobie, w jaki rozłupuje się zamrożona błona.

CZĄSTKI OBECNE W BŁONIE

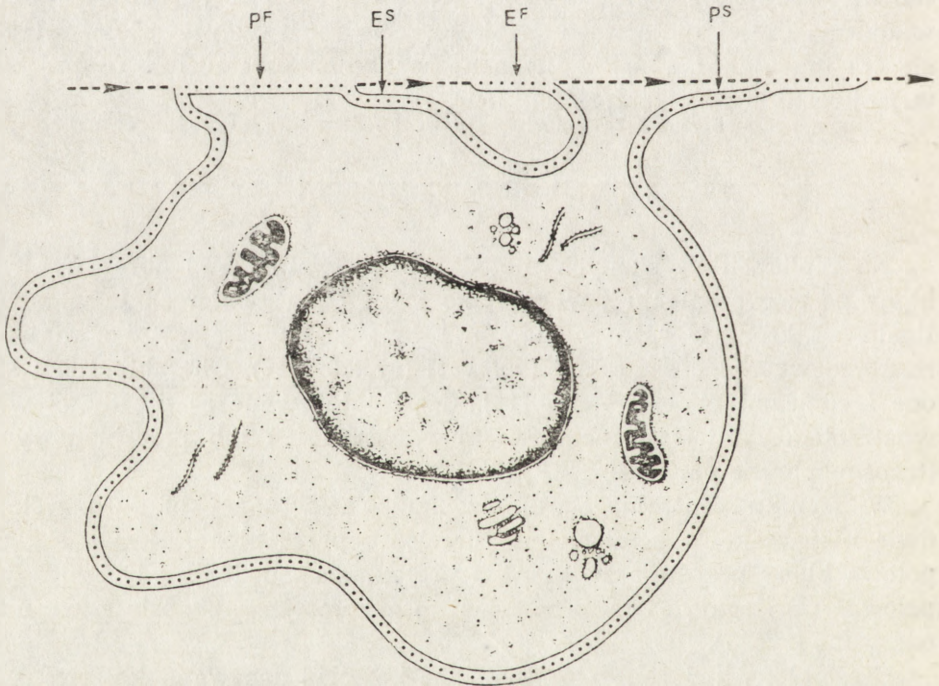
Na replikach uzyskanych metodą rozłupywania (FF) obraz wnętrza błony po rozszczepieniu jawi się jako jednorodna powierzchnia warstwy lipidowej, która w różnym stopniu usiana jest wystającymi z niej na różną wysokość cząstkami [79, 121] (ryc. 9 i 16). Charakteryzują się one średnicami około 8,5 nm [16]. Cząstki te zwane są cząstkami wewnątrz błonowymi (intramembrane particles, IMP) lub przez błonowymi (transmembrane particles, TMP) [23].

W wyniku centralnego rozszczepienia zamrożonej błony powstają dwie niejednakowe powierzchnie przełomu przez błonę. Uważa się, że połowa błony pozostaje związana z protoplazmą, podczas gdy druga jej połowa, przylegająca do przestrzeni pozakomórkowej, zostaje od niej oderwana (ryc. 7).

Część błony związana z protoplazmą komórki nazywana jest stroną P (protoplasmic — P face), natomiast część zewnętrzna — stroną E (external — E face) (ryc. 12-15). Zgodnie z obecnie powszechnie przyjętymi poglądami, w replice oglądane są zawsze powierzchnie wewnętrzne rozszczepionej błony (faces), pierwotnie skierowane do jej wnętrza. Faktyczne powierzchnie błony (surfaces): zewnętrzna (stanowiąca powierzchnie komórki) i wewnętrzna (na granicy cytoplazmy i błony)

(ryc. 15) nie są widoczne w replikach, gdyż płaszczyzna przełomu w zasadzie nigdy nie przebiega wzdłuż tych powierzchni (ryc. 12-14). O obecności tych powierzchni wnioskować można jedynie wtedy, gdy przełom w pewnych miejscach opuszcza centralną płaszczyznę błony i kieruje się w głąb cytoplazmy lub w kierunku na zewnątrz komórki. Wtedy krawędzie przełomu przebiegają w poprzek błony dając w replice wyraźne uskoki stanowiące granicę obszarów błoniastych (ryc. 14 i 27).

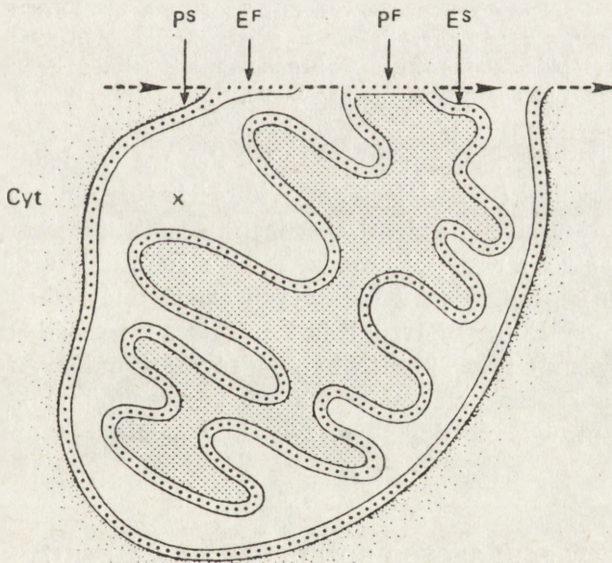
Należy wyjaśnić, że przebieg płaszczyzny przełomu w tkance jest sprawą przypadku i daje ograniczone możliwości sterowania nim przez osobę dokonującą rozłupywania. W uzyskanej replice wyszukuje się dopiero obszary błon (lub innych struktur), w których rozłupywanie przebiegło w sposób interesujący badacza lub nadający się do interpretacji, np. ukazujący duże obszary błon wolne od uskoków, albo powierzchnie poszczególnych organeli komórkowych. W jednej replice występują często na przemian oba rodzaje powierzchni (P i E), w zależności od tego,



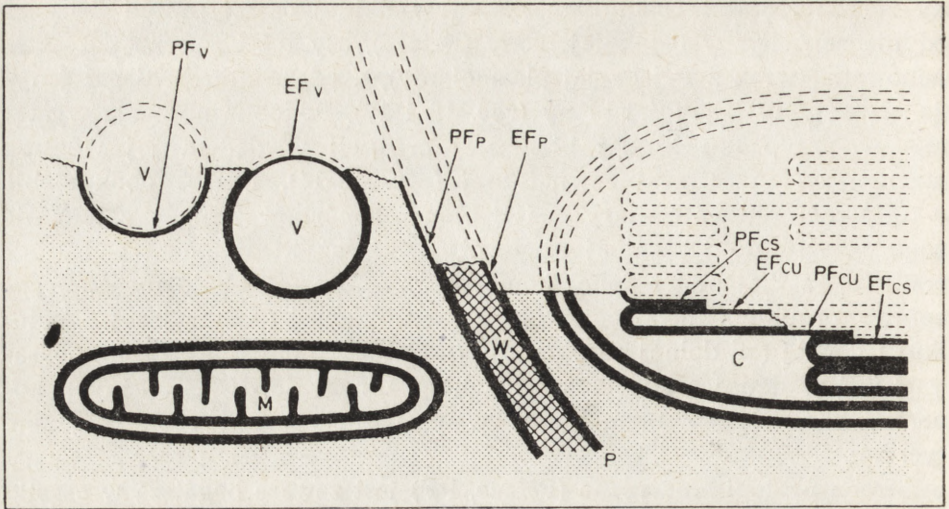
Ryc. 12. Schemat komórki z zaznaczoną strzałkami płaszczyzną rozłupywania. Oznaczono rodzaje powstających powierzchni przełomów błony komórkowej, możliwe do identyfikacji w płaszczyźnie oznaczonej linią przerywaną (fracture plane). PF — strona docytoplazmatyczna (P-face), ES — powierzchnia zewnętrzna błony (external surface), dostępna jedynie na drodze rytowania (etching), EF — strona wewnętrzna (E-face), PS — powierzchnia cytoplazmatyczna błony, dostępna jedynie na drodze rytowania (etching) [93]

czy zerwana została cała komórka, a w dolnej części próbki pozostał jedynie zewnętrzny listek jej błony (E-face), czy też komórka pozostała zachowana (wraz z P-face jej plazmolemy), a oderwaniu podlegał jedynie wewnętrzny listek jej błony (ryc. 12 i 14). Podobna sytuacja występuje w przypadku każdej błoniastej organeli względem jej wnętrza (macierzy) i przestrzeni zewnętrznej (ryc. 13-14). Leżące obok siebie w tej samej replice obszary P i E błony komórkowej nigdy zatem nie mogą należeć do tej samej komórki, ponieważ komplementarne fragmenty tej samej błony danej komórki rozszczepiane są do dwóch fragmentów próbki podlegającej rozłupywaniu: dolnej (pozostającej na stoliku) i górnej (od dolnej odrywanej). Stąd też sąsiadujące ze sobą obszary P i E w danej repli zawsze należeć muszą do dwóch różnych komórek, które leżały obok siebie w preparacie przed rozłupywaniem (ryc. 14).

Strona protoplazmatyczna (P-face, PF) jest zawsze bogatsza w cząstki białkowe niż komplementarna do niej strona zewnętrzna (ryc. 15), przylegająca do przestrzeni pozakomórkowej (E-face, EF) [7-9, 121]. Na ogół przechodzi się nad tym do porządku dziennego i mało jest prób inter-



Ryc. 13. Analogiczny do ryc. 12 schemat ukazujący powierzchnie przełomu i rytowania powstające po rozłupywaniu (i ewentualnym rytowaniu) błoniastej organeli — mitochondrionu. Oznaczenia jak w ryc. 12. Cyt — cytoplazma, x — przestrzeń międzybłonowa [93]

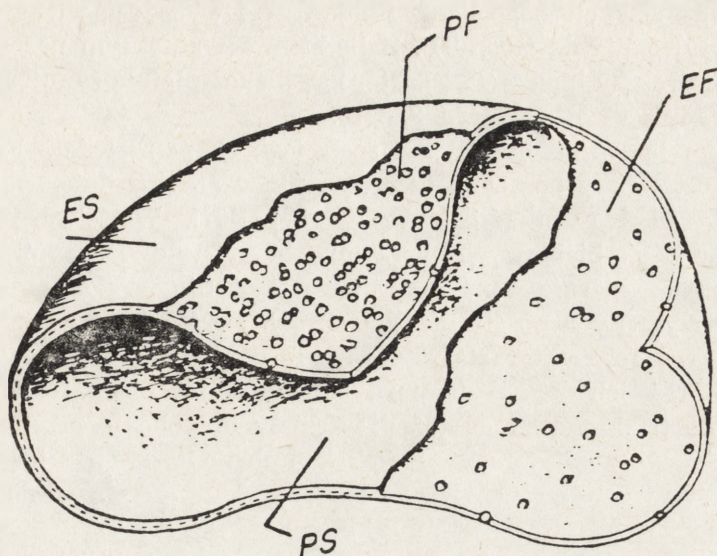


Ryc. 14. Schemat powstawania różnych rodzajów powierzchni w błonach rozluptywanych po zamrożeniu. W — przestrzeń międzykomórkowa, P — błona komórkowa (plazmolema), V — światło błoniastych pęcherzyków, M — matriks mitochondrionu, C — matriks chloroplastu, PFv — listek plazmatyczny błony budującej pęcherzyk, EFv — listek wewnętrzny błony budującej pęcherzyk, PFp — strona plazmatyczna (P-face) błony komórkowej, EFp — strona zewnętrzna (E-face) błony komórkowej, PFcs, EFcs, EFcu, PFcu — powierzchnie błon budujących lamele chloroplastu. Protoplazmę komórek wykropkowano (według Präparationsmethoden in der Elektronmikroskopie, Springer 1986)

pretacji tego zjawiska. Przyjęło się, że różnica we względnym zagęszczeniu obu powierzchni (P i E) jest kryterium ich rozpoznawania, bez wnikania, czy istotnie strona gęściej obsadzona cząstkami jest stroną bliższą cytoplazmy, a strona rzadziej obsadzona — stroną dalszą od cytoplazmy. Jest to bardzo istotne, gdyż u niektórych organizmów zachodzi zjawisko odwrotne: strona E (zewnętrzna) jest bogatsza w cząstki niż strona P (protoplazmatyczna) [77, 83]. Podkreślić również należy, że w próbach interpretacji obrazów przełomów FF rozpowszechnione są różne inne, nie zupełnie sprawdzone dogmaty, zwykle powielane z opracowania na opracowanie.

W JAKI SPOSÓB ROZŁUPUJĄ SIĘ CZĄSTKI?

Jeżeli założy się, że przed rozszczepieniem każda cząstka obecna w nie tkniętej błonie stanowi jeden kompleks białkowy, będący np. kanałem, nośnikiem lub receptorem, to nierówne obsadzenie obu stron błony po rozszczepieniu tłumaczyć można dwojako. Po pierwsze, przy



Ryc. 15. Schemat powierzchni błony komórkowej (zewnętrznej — Surface ES i wewnętrznej — Surface PS) oraz jej powierzchni wewnętrznych odsłoniętych przez rozłupywanie (protoplazmatycznej — Face PF i zewnętrznej — Face EF) na przykładzie krwinki czerwonej [181]

założeniu, że błona pęka symetrycznie, nasuwa się wniosek, że błona zbudowana jest asymetrycznie, tzn. że w natywnej błonie przed rozszczepieniem cząstki białkowe zlokalizowane są bardziej po stronie cytoplazmatycznej (ryc. 19Aa). Taka interpretacja zakłada, że asymetryczny rozdział cząstek między stronę P (silniej obsadzoną) i stronę E (słabiej obsadzoną) pozostaje w związku z wyższą zawartością białek w wewnętrznym liście błony [10, 84]. Można też założyć, że błona zbudowana jest symetrycznie, tzn. że ilość białek błony skierowanych od jej płaszczyzny centralnej w kierunku do cytoplazmy i na zewnątrz jest jednakowa, za to pęknięcie błony lipidowej przebiega asymetrycznie, bliżej przestrzeni pozakomórkowej niż cytoplazmy (ryc. 19Ba) i w konsekwencji większość cząstek widoczna jest po stronie P (ryc. 19Bb). W tym modelu interpretacyjnym większość z nich wykazuje silniejsze powinowactwo do cytoplazmy niż do przestrzeni pozakomórkowej, tzn. że w czasie rozszczepiania błony segregacja białkowych drobin między zewnętrzny (E) i wewnętrzny (P) liść lipidowy następuje nierównomiernie, z większą tendencją przylegania struktur białkowych do strony cytoplazmatycznej (P) [60]. Na stronę P przechodzą te cząstki (IMP), które zanurzone są w błonie częściowo, od strony plazmy, oraz te, które przenikają błonę na wskroś (TMP), lecz w procesie rozłupywania wy-

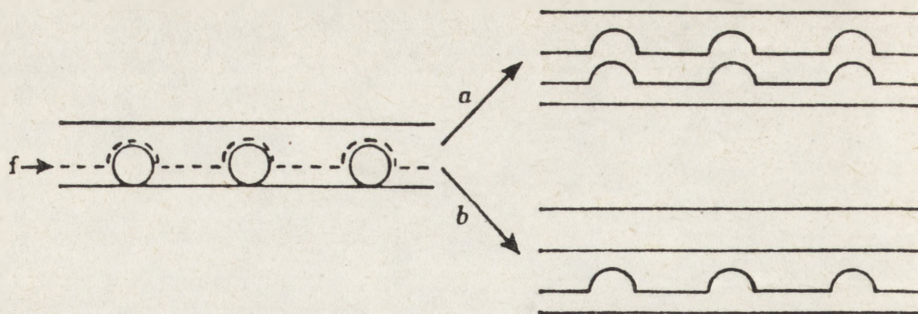
ciągane są z zewnętrznego listka lipidowego i wykazują większą tendencję do przylegania do strony P. Z listkiem zewnętrznym pozostawałyby jedynie te drobiny białka (IMP), które są niekompletnie zanurzone w błonie od strony zewnętrznej (ryc. 3, 8, 9).

Problem interpretacji zjawisk zachodzących w metodzie FF zarysowuje się ostro przy opracowywaniu wyników analizy ilościowej gęstości obsadzenia błon cząstkami białkowymi [65-67]. Właściwe rozumienie rozłupywania się białkowych elementów błony na dwie komplementarne części jest niezmiernie ważne przy porównywaniu wartości zagęszczenia cząstek otrzymanych po stronie P i E [69]. Porównania takie mają, jak dotąd, jedynie charakter statystyczny. Identyfikacja obszarów komplementarnych i ich komplementarnych szczegółów strukturalnych jest niezmiernie trudna. Dlatego też nie zostały dotychczas przeprowadzone żadne ilościowe analizy na replikach komplementarnych z identyfikacją komplementarnych szczegółów w obu przylegających do siebie przed rozszczepieniem obszarach tej samej błony.

Porównania takie zostały dokonane jedynie na sąsiadujących ze sobą w jednej replice obszarach P i E (ze względu na czasochłonność i złożoność procedury identyfikacji obszarów komplementarnych). Nie jest więc wcale oczywisty, ani tym bardziej udowodniony potoczny pogląd, iż cząstce białkowej na jednej stronie, np. P, odpowiada dołeczek (pit) w warstwie lipidowej po stronie drugiej (E) [184], choć często sytuacja taka przedstawiana jest na niektórych schematach, np. ryc. 7-9, 17a, 18A, 20a. Dołeczki po jednej stronie błony, które daje się zidentyfikować z wysuniętymi z nich cząstkami po stronie drugiej, są bardzo nieliczne [182]. Brak komplementarności tych struktur tłumaczy się czasem możliwością wypełniania faktycznych dołeczków platyną w procesie replikacji [184]. Wydaje się jednak, że równie dobrze w trakcie rozszczepiania błony cząstka może nie zostawiać żadnego śladu po stronie komplementarnej, jak i że cząstce może odpowiadać komplementarna cząstka (ryc. 20b i c). W tym ostatnim przypadku dochodziłoby do poprzecznego pęknięcia kompleksu białkowego, którego obie części występowałyby w przeciwnych połówkach błony. Zagadnienie to w dużej mierze wiąże się z omówioną już tu problematyką symetrii bądź asymetrii organizacji błony i symetryczności bądź asymetryczności jej pęknięcia po zamrożeniu. Obraz powierzchni wewnętrznej rozszczepionej błony zależny byłby od stopnia, w jakim w natywnej błonie zagłębione są kompleksy białkowe, widoczne na replikach w postaci cząstek. Z punktu widzenia zaś sił oddziałujących w czasie rozłupywania na natywne cząstki w błonie, nie jest jasne, czy cząstki białkowe są odporne na pęknięcie w poprzek ich rdzenia [35, 95], czy też raczej z reguły podlegają poprzecznemu pęknięciu w płaszczyźnie błony [28, 95].



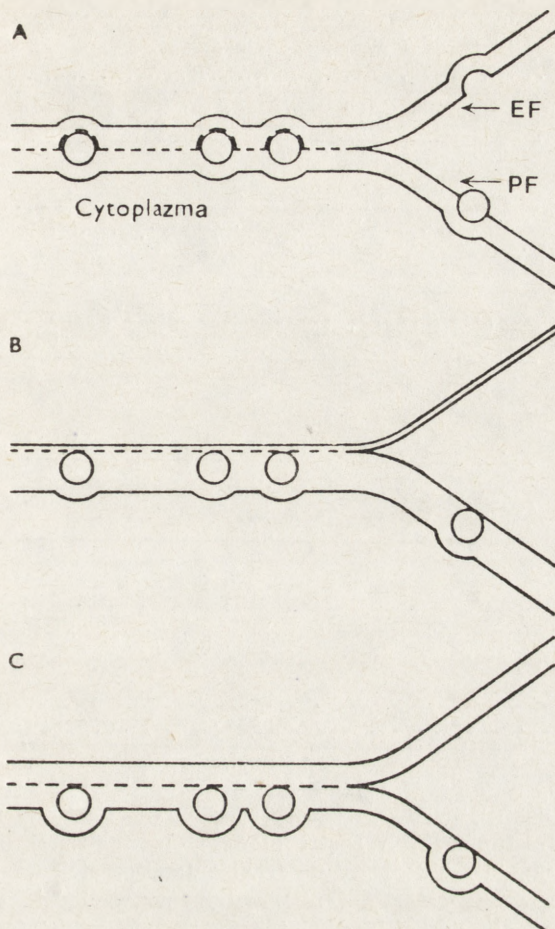
Ryc. 16. Fragment repliki błony komórkowej (strona P) miocyty serca 19-dniowego zarodka kury. Na szarym tle lipidów widoczne liczne cząstki białkowe, które rzucają cienie o różnej długości, zależnie od stopnia wystawiania cząstki z podłoża i lokalnego nachylenia powierzchni. Zagęszczenia tła świadczą o pofalowanym przebiegu błony. Powiększenie 150 000 ×



Ryc. 17. Schemat ilustrujący rozbieżność między teoretycznym sposobem rozłupywania błony, gdzie każdej cząstce odpowiada komplementarny dołeczek (a) i stanem faktycznym, gdy najczęściej dołeczki nie występują na powierzchni komplementarnej z powierzchnią obsadzoną cząstkami (b). Linia przerywaną f zaznaczono teoretyczny przebieg pęknięcia [16]

Istnieją zatem trzy możliwości wzajemnych relacji elementów strukturalnych w replikach komplementarnych (ryc. 20): (a) cząstka występuje naprzeciw zagłębienia, z którego została wysunięta, (b) naprzeciw cząstki brak jest zagłębienia, (c) cząstka występuje naprzeciw cząstki. Sytuacja (c) może oznaczać, że natywna cząstka IMP została rozfragmentowana na dwie części, które rozeszły się do dwu komplementarnych listków rozłupanej błony. W takim przypadku jeden z powstałych fragmentów może być za mały, aby uwidocznić się w postaci cząstki, co w efekcie dałoby sytuację (b). Sytuację (b) najczęściej spotyka się w replikach komplementarnych [16] (ryc. 17b, 18B i C, 20b, 27).

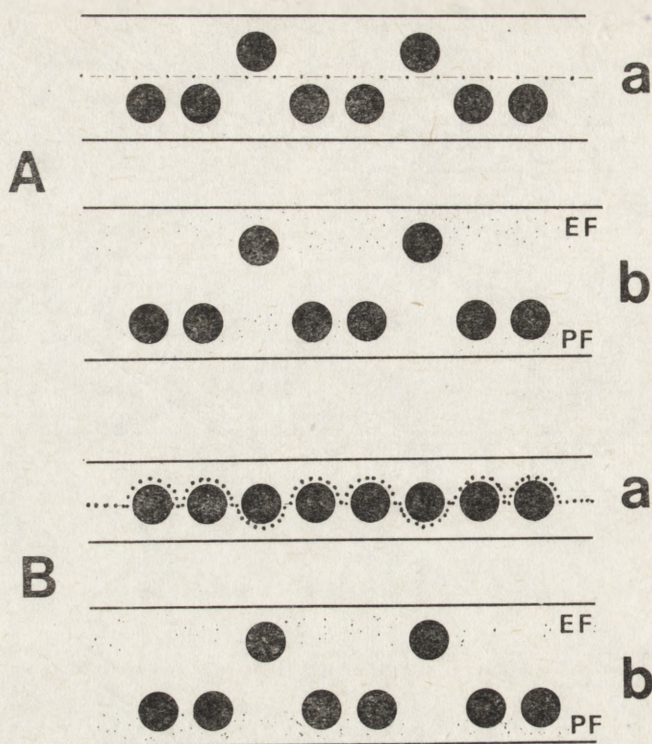
Analizując zagęszczenie cząstek na powierzchniach błon w replikach zainteresowani jesteśmy nie tyle odpowiedzią na pytanie, ile cząstek znajduje się na powierzchni przełomu przez błonę, lecz chcielibyśmy się dowiedzieć, jaka jest całkowita liczba cząstek białkowych w natywnej błonie komórkowej oraz czy rozmaite błony różnią się pod względem tej cechy. Niejasność co do sposobu rozłupywania cząstek białkowych zaburza nam prostą interpretację naszych wyników pomiarów. Nie wiadomo, czy cząstki po stronie P reprezentują całość populacji cząstek białkowych błony, a cząstki strony E są jedynie odłamkami niektórych z nich; a może też całość populacji cząstek białkowych błony oszacować można z zsumowania ich po obu stronach P i E? Tak należałoby uczynić przyjmując za prawdziwy ten wariant interpretacyjny, w którym cząstki śród- lub przezbłonowe nie pękałyby poprzecznie w płaszczyźnie błony,



Ryc. 18. Schemat ilustrujący trzy możliwe sposoby rozłupywania błony: A — cząstki po stronie cytoplazmatycznej (PF) wykazują komplementarność do dołczków po stronie zewnętrznej (EF), gdy błona w zasadzie rozszczepia się symetrycznie. Obserwowany faktycznie brak komplementarności mógłby być tłumaczony w tym modelu rozszczepienia jedynie przez możliwość zamaskowywania dołczków napylaną platyną; B — brak komplementarności powstały w wyniku asymetrycznego rozszczepienia błony; C — brak komplementarności wynikły z asymetryczności rozmieszczenia cząstek, przy symetrycznym sposobie rozszczepienia błony [37]

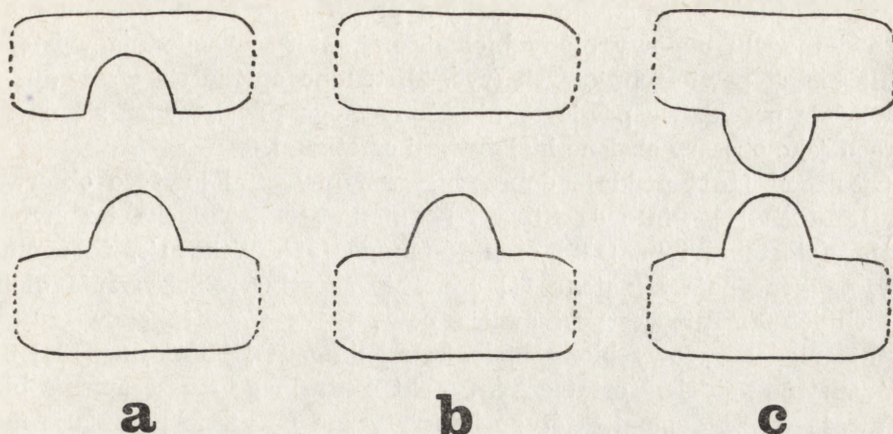
a jedynie dochodziłoby do ich wysuwania z komplementarnej warstwy lipidowej w procesie rozłupywania błony.

Należy podkreślić, stosując terminologię przyjętą przez Cieczurę [23], że w związku z tymi niejasnościami w literaturze światowej terminy



Ryc. 19. Schemat ilustrujący dwa możliwe sposoby powstawania nierównego obsadzenia cząstkami rozluptywanych części błony — zewnętrznej (EF) i wewnętrznej (PF) w założeniu, że nie dochodzi do fragmentacji cząstek (czarne kręgi). Aa — natywna błona obsadzona cząstkami niesymetrycznie względem płaszczyzny środkowej, Ba — błona obsadzona cząstkami symetrycznie pękła niesymetrycznie, zostawiając selektywnie większą liczbę cząstek przy stronie plazmatycznej (PF). W obu hipotetycznych sposobach rozszczepienia błony efekt końcowy (Ab i Bb) jest ten sam, mimo że uwarunkowany różnymi przyczynami

TMP i IMP często używane są zamiennie. Rozważając stosunki białko-lipidowe w błonie przed jej rozłupaniem, tradycyjnie uważa się, że TMP są cząstkami przebiegającymi przez błonę na wskroś, podczas gdy IMP całkowicie zawarte są w obrębie podwójnej warstwy lipidowej. Nie jest natomiast całkiem jasne, czy w ogóle cząstki białkowe pękają poprzecznie w trakcie rozluptywania (w płaszczyźnie równoległej do powierzchni błony, przebiegającej między warstwami lipidowymi), czy też jedynie wysuwają się spośród lipidów komplementarnej połówki błony, bez podziału na fragmenty. Stąd też podział na IMP i TMP ([23], s. 27) trudno opierać na spekulatywnym sposobie ich rozluptywania.



Ryc. 20. Schemat przedstawiający trzy możliwości wzajemnych relacji struktur w replikach komplementarnych: a — cząstce odpowiada dołeczek, b — cząstce nie odpowiada dołeczek ani cząstka, c — cząstce odpowiada cząstka (prawdopodobnie zachodzi fragmentacja natywnej cząstki)

CZY BŁONA ISTOTNIE ULEGA ROZSZCZEPIENIU?

Okazuje się, że koncepcja rozszczepiania błony w płaszczyźnie środkowej, mimo iż powszechnie przyjęta, nie jest nie do podważenia. Z obserwacji Sjöstranda [141-143] nad błonami mitochondriów wynika, że (zapewne ze względu na niską zawartość lipidów w tych błonach, a wysoki stopień zawartości białkowych cząstek) nie ma tam wyraźnej warstwy dwulipidowej, a więc płaszczyzna przełomu wydaje się przebiegać wzdłuż faktycznych powierzchni błon (lub czasem poprzecznie poprzez błonę), nie zaś wzdłuż jej płaszczyzny środkowej. Opierając się na obserwacjach poprzecznych i skośnych przełomów przez błony mitochondrialne Sjöstrand [143] stwierdził w grzebieniach, że błony składają się głównie z globularnych białek widocznych w postaci cząstek. Są one ciasno upakowane, a lipidy występują wśród nich wyspowo, zgrupowane głównie po stronie macierzy (matrix) mitochondrialnej (ryc. 6).

Sjöstrand [141] twierdzi, że to, co uważa się za wewnętrzne powierzchnie błony P i E jest w istocie obrazem faktycznych powierzchni błon (surfaces): zewnętrznej i protoplazmatycznej, zwróconej do cytoplazmy. Błona, zdaniem Sjöstranda, nie pęka w płaszczyźnie centralnej, lecz płaszczyzna pęknięcia w zamrożonym materiale przebiega na zewnątrz błony, wzdłuż niej, odsłaniając bądź podbłonową powierzchnię cytoplazmy, bądź prawdziwe powierzchnie nie tkniętej błony, które wy-

kazują obecność cząstek. Po uważnym przyjrzeniu się nowszemu schematowi modelu budowy błony biologicznej, który uwzględnia występowanie białek powierzchniowych (ryc. 2), trudno oprzeć się wrażeniu, że to właśnie prawdziwe powierzchnie błony mogą przedstawiać się na replikach jako obszary obsiane białkowymi cząstkami.

Sjöstrand [141] poddaje dobrze uargumentowanej krytyce obserwacje Brantona [7], Pinto da Silva i Brantona [103], Tillacka i Marchesi [161], Weinsteina i in. [177] oraz Nanninga [92]. Wskazuje, że ogólnie przyjęta koncepcja Brantona [7] odnośnie sposobu rozłupywania błony w technice FF nie jest całkowicie pewna, jak również obowiązujący obecnie model budowy błony biologicznej Singera i Nicolsona [138] nie jest zapewne modelem ostatecznym. Fakt centralnego rozszczepienia błony uważa on za dogmat, którego bezkrytyczne przyjęcie paraliżuje możliwość właściwego zrozumienia nie wyjaśnionych spraw, takich jak np. brak pełnej komplementarności struktur w replikach komplementarnych. Obserwacje Sjöstranda [143] nie znajdują jednak powszechnego uznania, choć mogłyby stanowić podstawę do wniesienia poprawki do ogólnie przyjętego modelu struktury błony biologicznej. Obserwacje nad rozłupywaniem błon w połączeniach międzykomórkowych typu złącza szczelinowego (gap junction) [68] mogą również wskazywać, że powszechnie przyjęty schemat modelu błony komórkowej i jej rozłupywanie w procesie kriorytownictwa nie zawsze daje się bez zastrzeżeń pogodzić z wynikami obserwacji.

Obsadzenie zewnętrznej powierzchni błony znanym wyznacznikiem (markerem), rozpoznawalnym w mikroskopie elektronowym, a następnie rozłupywanie jej i replikacja miały bezspornie wyjaśnić miejsce powstawania przełomu w błonie [109, 133]. Branton [9] np. użył ziarn ferrytyny, a Tillack i Marchesi [161] obłożyli zewnętrzną powierzchnię erytrocytów włóknami aktyny. W replikach obecność wyznacznika (markera) wykluczała się z obszarami obsadzonymi przez cząstki śródbłonowe, co w efekcie pozwoliło stwierdzić, że nie są to te same powierzchnie błony. Wyznacznik obecny był zawsze w obszarach uznanych za faktycznie zewnętrzną powierzchnię błony, podczas gdy cząstki widoczne były w wolnych od wyznacznika obszarach uznanych za wewnętrzne strony rozszczepionej błony [161].

Dla rozstrzygnięcia problemu, którydy przebiega pęknięcie w błonie, Bullivant i Weinstein [13] przeprowadzili oryginalny eksperyment, w którym po rozłupaniu, zamiast replikacji, materiał zatopiono do ultracienkiego skrawania prostopadle do płaszczyzny pęknięcia FF i obserwowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Okazało się, że wzdłuż rozłupanej krawędzi tkanki były albo całe, nietknięte błony, albo też same rybosomy oddzielone w procesie FF od zerwanej z nich błony

szorstkiej siateczki. Obserwacje te przemawiałyby za tym, że pęknięcie przebiega wzdłuż faktycznej powierzchni błony, bez naruszania jej wnętrza. Wniosku takiego nie wyciągnięto jednak, a niektóre obrazy, które można zinterpretować jako połówki błon, były dowodem tego, że płaszczyzna pęknięcia FF przebiega w centrum błony. Problem nie został więc rozstrzygnięty, natomiast obserwacje niezgodne z powszechnie a bezkrytycznie akceptowaną koncepcją Brantona [9] zostały odrzucone. Wydaje się, że wczesny eksperyment Bullivanta i Weinsteina [13] należałoby obecnie zweryfikować i powtórzyć, uwzględniając osiągnięcia w technice mikroskopii elektronowej.

CZYM SĄ CZĄSTKI SRÓDBŁONOWE?

Model struktury błony komórkowej Singera i Nicolsona [138], tzw. płynnej mozaiki (ryc. 1), zyskał znaczną popularność, gdyż oprócz tego, że tłumaczył fakt płynności błony, zgadzał się z obserwowanym obrazem licznych cząstek białkowych IMP, związanych z podwójną warstwą lipidową. Słabą jego stroną było jednak założenie, że między pływającymi jak góry lodowe kompleksami białek zanurzonych w lipidach zakłada istnienie dużych obszarów nieosłoniętych lipidów (ryc. 1), co nie było w zgodzie z obserwowanymi mechanochemicznymi własnościami błon [121]. W miarę postępu naszej wiedzy o białkach błony, szczególnie strukturalne białkowej komponenty błony rozwijały nasz dotychczasowy model błony z obu stron: cytoplazmatycznej i zewnętrznej. W naszym pojęciu błona staje się obecnie jakby coraz bardziej białkowa. Nastąpił pewien nawrót do pierwotnej koncepcji, że białka (tzw. białka peryferyczne) obudowują obustronnie warstwę lipidową (ryc. 2). Różnica zasadnicza z dawniejszymi modelami (typu białko-lipid-białko) polega na tym, że część białek (białka integralne) występuje także we wnętrzu błony (ryc. 5), natomiast frakcja lipidowa, stanowiąca zapewne mniej aktywne, a zarazem mniej ciekawe strukturalnie i funkcjonalnie tło, schodzi na plan dalszy zainteresowań badaczy.

Integralne białka błony uważa się za związane z występowaniem cząstek śródbłonowych (IMP). Choć sugerują to niektóre schematy, np. ryc. 21, to jest jednak znacznym uproszczeniem założenie, że w replikach w postaci cząstek oglądać można bezpośrednio drobiny białek, pokryte warstwą platyny i węgla [121]. Na przykład liczba i rozmiary cząstek IMP wskazują na o wiele wyższą zawartość białek budujących błonę, niż ma to miejsce w rzeczywistości. W istocie więc natura cząstek IMP, a przynajmniej znacznej ich liczby, nie jest wyjaśniona [34].

Trudności w rozszyfrowaniu natury cząstek IMP, widocznych w błonie po FF, wynikają z tego, że kryteria morfologiczne tych cząstek są niejednoznaczne, tzn. nie da się przypisać konkretnej formy cząstki specyficznemu białku, receptorowi lub innej makrocząsteczce [84]. Wszystkie cząstki w zreplikowanej błonie wyglądają podobnie, a odmienności ich morfologii są niespecyficzne. Ze względu jednak na wielofunkcyjność błon, a także złożoność zadań każdej pojedynczej błony, spodziewać się należy występowania wielu rodzajów cząstek [16]. Porównanie danych biochemicznych o składnikach ekstrahowanych z błon z danymi dotyczącymi morfologii błony po FF jest dosyć trudne [84].

Populacja cząstek IMP może przedstawiać homogeną populację białek lub wiele rozmaitych białek może jawić się jako populacja podobnych cząstek, co więcej, wiele rozmaitych białek może wchodzić w skład jednej cząstki [84]. Widoczne w replice cząstki są zbyt duże, aby przedstawiać miały pojedynczy polipeptyd [137]. Uważa się, że mogą składać się one z wielu, zapewne rozmaitych polipeptydów, tworzących funkcjonalne jednostki. Fisher i Stockenius [33] wykazali, że jedna cząstka może zawierać od 9 do 12 drobin białka. Gerritsen i in. [43], McDonnell i Staehelin [86] oraz Steinback i in. [158] dostarczyli dowodu, że przynajmniej niektóre cząstki mają charakter białkowy. Poddanie procesowi FF i replikacji preparatu stanowiącego roztwór białka daje w efekcie obrazy cząstek podobne do IMP obecnych w błonach [73]. Dowodu na białkowy charakter cząstek IMP dostarczają eksperymenty ze sztucznie utworzonymi pęcherzykami lipidowymi, tzw. liposomami [16, 24, 62, 150]. Rozłupywane liposomy wykazują gładkie powierzchnie, natomiast po dodaniu polipeptydów ujawniają obecność cząstek podobnych do cząstek w błonach biologicznych [84, 90]. Tego typu eksperymenty nazywane są rekonstytucyjnymi [169].

Enzymatyczne wytrawianie białek z błon nie daje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy cząstki IMP mają charakter białkowy [16]. Po wytrawieniu pronazą [9, 16] liczba cząstek w zreplikowanych błonach nie zmniejsza się, lecz wykazują one zaburzenia w rozmieszczeniu (agregacje). Tłumaczy się to oddziaływaniem enzymu na związki cząstek z elementami cytoszkieletowymi, które mają być odpowiedzialne za utrzymywanie białek w odpowiednim układzie rozmieszczenia w błonie. Sądzi się natomiast, że białka integralne są zbyt obudowane hydrofobową frakcją lipidową w błonie, by mogły podlegać bezpośredniemu działaniu enzymu. Zdziałanie dwujodosalicylanem litu, który zaburza strukturę kompleksów lipidowo-białkowych, powodowało zanik cząstek w rozłupywanej błonie [16, 162]. Samo zaś trawienie enzymatyczne dawało nieznaczne obniżenie liczby cząstek w błonach dopiero po długotrwałej inkubacji [9].

Za białkowym charakterem cząstek przemawia również asymetryczny rozdział cząstek IMP między stroną P (silniej obsadzoną) i stroną E (słabiej obsadzoną), co pozostaje w związku z wykazaną wyższą zawartością białek w wewnętrznym listku błony [10, 84]. W błonach, w których udział białek jest znikomy, np. w mielinie, obserwuje się minimalną liczbę cząstek IMP [84, 154]. Przemawia to wyraźnie za białkowym charakterem tych cząstek, a równocześnie świadczy o tym, że gładkie tło w rozłupanych błonach ma bezspornie charakter lipidowy.

Choć licznie występujące cząstki w replikach błon prawie powszechnie uznaje się za białkowe, to jednak tylko nieliczne ze znanych integralnych białek błony zostały zidentyfikowane jako związane z występowaniem cząstek IMP. Niektóre znane białka błony występują jako cząstki IMP po wbudowaniu ich do liposomów (w eksperymentach rekonstruktacyjnych) [169]. Można je zidentyfikować przez specyficzne znakowanie [116, 137], zwłaszcza immunocytochemiczne [95, 108]. Autoradiografia w kriorytownictwie (freeze-fracture autoradiography — FARG) nie przyniosła jak dotąd obiecujących rezultatów, ze względu na trudności interpretacyjne. W tej metodzie nie jest bowiem pewne, czy źródło promieniowania leży w płaszczyźnie rozłupywania, czy też nie pochodzi z warstw tuż pod nią, które nie są widoczne w replice [32, 95, 120, 127]. Wśród oznaczonych białek błon najlepiej zbadane są: białko trzeciego szczytu elektroforetycznego (3SE; band 3 protein) błon erytrocytów [43, 183], ATP-aza aktywowana przez sód i potas [25, 114, 144], ATP-aza aktywowana wapniem w siateczce sarkoplazmatycznej [126] oraz rodopsyna zewnętrznych segmentów w pręcikach siatkówki oka [57].

Białko trzeciego szczytu elektroforetycznego (3 SE) jest glikoproteina, która przebiega na wskroś przez błonę od przestrzeni pozakomórkowej po cytoplazmatyczne wnętrze komórki. Każda 9300-daltonowa drobina może być rozszczepiona na 3 fragmenty: zewnętrzny, przezbłonowy i cytoplazmatyczny (ryc. 5). Od strony cytoplazmatycznej wykazano związek tego białka z aktyną i spektryną [29, 84], podczas gdy na powierzchni błony erytrocytów drobinę tego białka zidentyfikowano jako lektyny, receptory wirusów oraz determinanty grup krwi [80, 84, 104, 106, 107, 163]. Całość drobin 3 SE (band 3) uważa się za cząstkę [178-180]. Stwierdzono, że glikoproteina 3 SE (band 3) i inne białko — glikofosforyna, stanowią większość licznej populacji cząstek w błonach erytrocytów [84, 180].

W wielu przypadkach identyfikacji cząstek z określonymi białkami sprzyja fakt, że ciasne zgrupowanie cząstek IMP w zreplikowanych błonach odpowiada znanym ogniskom aktywności, np. w złączach szczelinowych (gap junction) [48] lub w błonach purpurowych u *Holobacterium* [5, 79]. Z takich obszarów udawało się wyizolować pojedyncze białka,

np. bakteriorodopsynę z błon purpurowych *Holobacterium* [167]. Poprzez połączenie techniki FF z metodą dyfrakcji, cząstki IMP w błonach purpurowych zostały zidentyfikowane z drobinami bakteriorodopsyny. Porównano wzory dyfrakcji elektronów z odpowiednimi obrazami przełomów przez błonę, w której IMP wykazywały ciasne, regularne upakowanie [33].

W narządach elektrycznych *Torpedo* liczne cząstki IMP uważa się za wyznaczniki receptorów acetylocholinyl [19, 53, 63]. Również w błonie postsynaptycznej zakończeń nerwowych udało się zidentyfikować IMP jako receptory [30, 79, 170, 171, 173]. Furcht i Wendelschafer-Crabb [42] ustosunkowują się jednak krytycznie do założenia, że w miotubach kury receptory konkawaliny A miałyby mieć funkcjonalny związek z cząstkami IMP. Dopatrują się oni raczej funkcjonalnego związku między receptorami i elementami cytoszkieletowymi komórki.

W miejscach o znanych funkcjach, jak np. w przewężeniach Ranviera aksonów, liczne cząstki IMP zidentyfikowano jako kanały sodowe [122]. Heuser i in. [52] oraz Pumplin i in. [113] zidentyfikowali kanały sodowe w cząstkach IMP w zakończeniach nerwowych.

Większość niezgrupowanych cząstek IMP, występujących powszechnie we wszystkich błonach, nie została jednak zidentyfikowana i natura ich pozostaje nieznana. Trudno się nawet domyślać, czy wszystkie one pełnią jakąś czynnościową rolę, czy są tylko składnikiem budulcowym błony. Przy użyciu monoklonalnych przeciwciał z zastosowaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej przed rozłupywaniem tych samych znakowanych komórek stwierdzono w miotubach mięśni szkieletowych kury hodowanych *in vitro*, że (Na, K) ATP-aza daje się skorelować jedynie z 50% ilości obserwowanych cząstek IMP [114].

Nie brak i całkiem odmiennych poglądów na naturę cząstek IMP. Bullivant [16] uważa, że całkowicie niesłuszne jest utożsamianie cząstek śródbłonowych (IMP), uwidocznionych metodą FF, z występującymi w błonie białkami integralnymi. Według niego cząstki są jedynie wyznacznikami (markerami) miejsc, w których w błonie przed replikacją obecne było białko, a powstanie cząstki miałoby być wynikiem interakcji białek z otaczającymi je lipidami. Tonosaki i in. [164] skłaniają się ku pogładowi, że cząstka IMP nie jest specyficzną drobiną białka, lecz molekularnym „kompartementem” lub „wyspą” składającą się z rdzenia białkowego, obudowywanego lipidami w czasie procedury utrwalania i zamrażania. Cząstka według nich nie istnieje w natywnej błonie, lecz powstaje w wyniku procesu tzw. dekoracji białek inną komponentą (w tym wypadku lipidową) w toku obróbki preparatu. Ververgaert i Verkelij [174] uważają, że przynajmniej część cząstek obserwowanych w zreplikowanej błonie może być zbudowana wyłącznie z lipidów. Nazywa się

je wtedy cząstkami lipidowymi (lipidic particles). Pochodzą one z odwróconych miceli (inverted micelles) [168, 169]. Być może powstawanie cząstek jest też wynikiem dekoracji białek innym czynnikiem, np. zamrożoną wodą. Gross i Moor [47] zwracają uwagę, że w niektórych przypadkach może dochodzić do kondensacji wody w rozłupywanej błonie w taki sposób, że powstałe kryształy lodu mogą przypominać cząstki IMP.

ROZMIARY I KSZTAŁTY CZĄSTEK

W związku z wielofunkcyjnością błon występowanie wielu rodzajów cząstek wydaje się oczywiste [16]. Istotnie, w tkankach zwierzęcych rozmiary i kształty cząstek są bardzo rozmaite [84] i to zarówno w różnych błonach, jak i w sąsiadujących ze sobą obszarach tej samej błony. Odnośnie zróżnicowania kształtów cząstek brakuje systematycznych opra-

TABELA 1

Zagęszczenie cząstek błonowych strony P sarkolemy rozmaitych komórek serca owcy (por. ryc. 24) [66]

Rodzaj komórek	Średnia gęstość cząstek na 1 μm^2 błony
miocyty komory serca	4680
miocyty przedsionka serca	3340
włókna Purkiniego	4096

cowania. Przy szacowaniu ich rozmiarów przyjmuje się zwykle teoretyczny kształt kulisty cząstek i podaje się wartości ich średnic, mimo że właściwie obserwowane cząstki nigdy regularnymi kulami nie są. Pomiaru tzw. średnic dokonywane są zwykle w kierunku prostopadłym do kierunku cienia rzucanego przez cząstkę. Zamiast terminu średnica powinno się zatem używać terminu szerokość. Choć najczęściej w opracowaniach

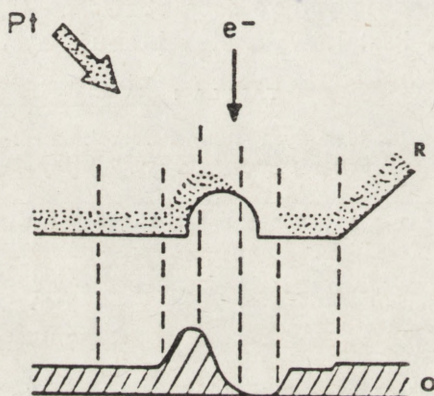
TABELA 2

Średnice [66] i zagęszczenie [65] cząstek błonowych strony P sarkolemy miocytów komory serca różnych kręgowców (por. ryc. 22 i 23)

Gatunek	Średnia gęstość cząstek na 1 μm^2 błony \pm SE	Średnia średnica cząstek [nm]
szczur	4525 \pm 231	7,09
królik	4799 \pm 235	6,94
kura	4281 \pm 218	6,71
żaba	5848 \pm 300	7,65

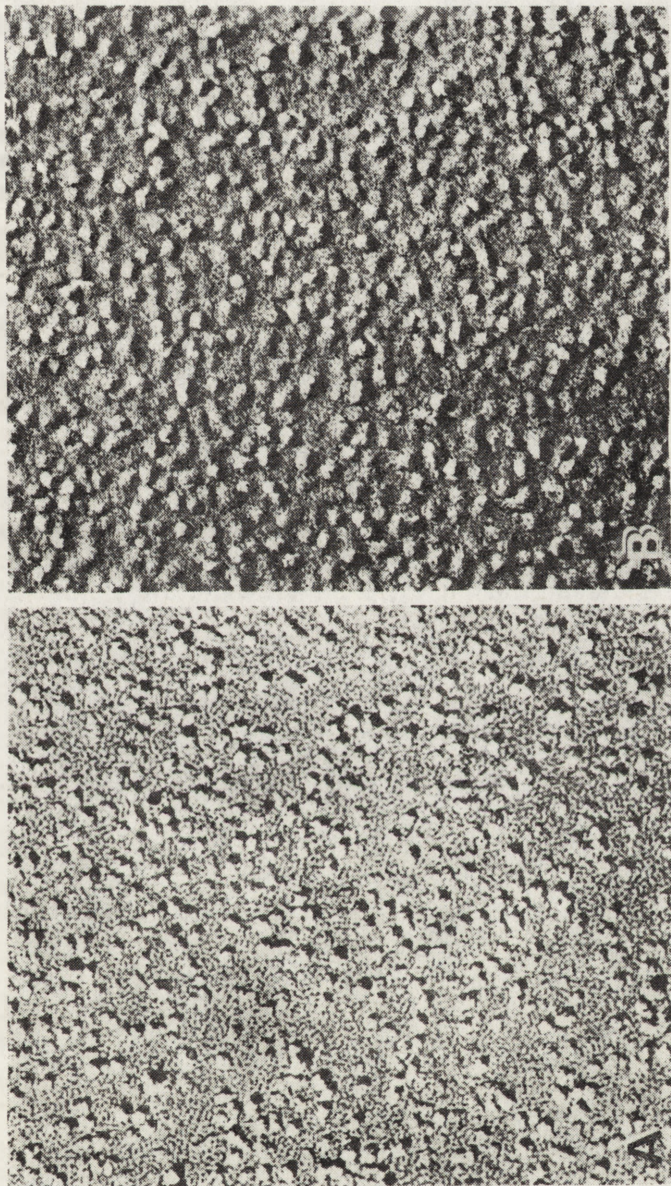
podaje się jedną średnią wartość średnicy IMP (7-10 nm); wiadomo, że w badanym materiale istnieje zawsze szerokie spektrum rozmiarów tych cząstek.

W tubulach systemu T komórek mięśniowych oraz w siateczce sarkoplazmatycznej cząstki przyjmują rozmiary ok. 9 nm [119]. W przypadku pierwotniaków po stronie P średnia wartość średnic cząstek wynosi $9,96 \pm 0,64$ nm, a po stronie E — $9,68 \pm 0,54$ nm, podczas gdy rozrzut wynosi 5,2 do 16,1 nm [84]. Obszary specjalizacji błon, np. złącza szczelinowe, charakteryzują się występowaniem cząstek większych niż w innych rejonach [88, 153]. Również zostało wykazane, że rozmiary cząstek w homologicznych błonach różnych gatunków są rozmaite [65] (tab. 2). W błonach komórek serca żaby stwierdzono występowanie statystycznie istotnie większych cząstek niż u innych kręgowców (ryc. 22 i 23).

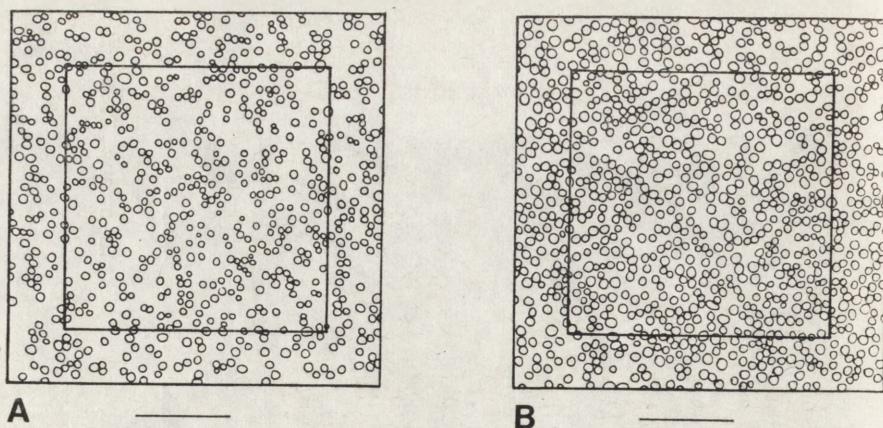


Ryc. 21. Schemat ilustrujący powstawanie obrazu cząstki i jej cienia w replice obserwowanej w mikroskopie elektronowym. Pt — kierunek napylania platyną (45°), e^- — kierunek strumienia elektronów tworzących obraz (O) w mikroskopie elektronowym. Górna linia ciągła wyznacza przekrój przez napyloną powierzchnię z widoczną centralnie cząstką. Warstwa wykropkowana oznacza platynę napyloną w postaci repliki (R). Obszar ukośnie zakreskowany ilustruje stopień gęstości elektronicznej w poszczególnych miejscach repliki i jej obrazu (punkty odpowiadające sobie połączone liniami pionowymi). Obraz napylonej cząstki daje wysoki pik (spowodowany akumulacją metalu na cząstce), podczas gdy cień (w którym brak depozytu metalu) oznaczony jest depresją w wykresie gęstości obrazu (por. ryc. 28) [156]

Najmniejsze cząstki mogą zostać pominięte w analizie, gdyż rozmiary ich zbliżają się do granicy rozdzielczości wyznaczonej wielkością platynowych ziarn samej repliki (ok. 2 nm) [93, 145]. Równocześnie cząstki duże mogą być produktem fuzji cząstek mniejszych [84]. Roz-



Ryc. 22. Porównanie topografii błony komórkowej miocytu serca kury (A) i żaby (B) na replikach strony P. Cząstki u żaby wykazują większe zagęszczenie i większe rozmiary. Pow. 250 000 \times [65]



Ryc. 23. Porównanie zagęszczenia, sposobu rozmieszczenia i rozmiarów cząstek strony P w obszarach $0,16 \mu\text{m}^2$ błon miocytów serca kury (A) i żaby (B). Diagramy sporządzone z ryc. 22. Kreski podziałek oznaczają $0,1 \mu\text{m}$. Widoczne różnice w zagęszczeniu cząstek ($4443 \text{ cząstki}/\mu\text{m}^2$ — kura, $5781 \text{ cząstki}/\mu\text{m}^2$ — żaba) oraz w średnicach cząstek [65]

miary cząstek w dużej mierze podlegają też deformacji związanej z procesem rozłupywania i napyłania [123], dlatego też należy bardzo ostrożnie interpretować wyniki pomiarów. Zreferowane tu wątpliwości niektórych autorów (odnośnie tego, czym są cząstki obserwowane w replikach, i czy powstają one w procesie rozłupywania i/lub replikacji oraz jakim podlegają artefaktom) poddają w wątpliwość wnioski dotyczące oceny kształtów i rozmiarów cząstek IMP.

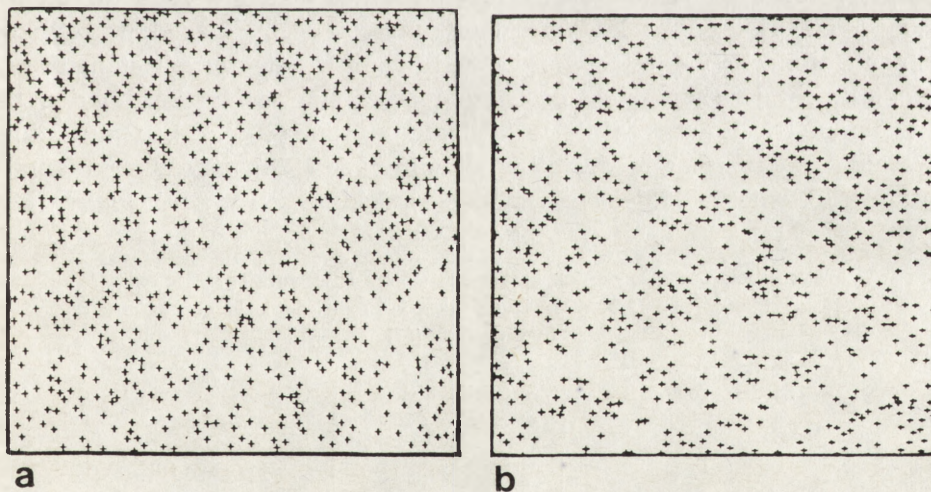
ANALIZA ILOŚCIOWA ZAGĘSZCZENIA CZĄSTEK W BŁONIE

Występowanie rozmaitej liczby cząstek w błonach obserwowane było wielokrotnie. Krańcowymi przypadkami są np. błona osłonki mielinowej, praktycznie pozbawiona cząstek [7, 84, 105, 154] oraz błony lameli chloroplastów, bardzo bogate w cząstki [8]. (Mielina jest metabolicznie nieaktywna i służy jako warstwa izolująca dla włókien nerwowych, podczas gdy lamele chloroplastów wykazują wysoki stopień aktywności w procesach fotosyntezy [7].)

W literaturze nie brak danych liczbowych zagęszczenia cząstek podawanych dla rozmaitych błon biologicznych. W limfocytach szczura obserwowano $860 \pm 27 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie P i $362 \pm 17 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie E, w komórkach leukemicznych zaś $2692 \pm 82 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie P i $799 \pm 29 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie E [84]. W miocytach komory serca

myszy po stronie P obserwowano średnio $1373 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ [46]. W miocytach przegrody międzykomorowej serca królika obserwowano około $2300 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ [38, 39]. W komórkach węzła zatokowo-przedsionkowego królika stwierdzono $1339 \pm 69 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ [85]. Po stronie E w węzłach Ranviera aksonów obserwowano $1200\text{-}1500 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ [160]. W mioblach serca szczura *in vitro* wykazano $1756 \pm 95 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ [65]. Berry i wsp. [3] obserwowali około $2200 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie P i około $700 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie E w sarkolemie miocytów serca chomika syryjskiego. Rayns i in. [118] stwierdzili $400\text{-}700$ cząstek/ μm^2 po stronie P i $80\text{-}120$ cząstek/ μm^2 po stronie E w sarkolemie miocytów komory serca świnki morskiej. Baker i Baldwin [2] dla komórek mięśnia szkieletowego szczura podają $1508 \pm 236 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie P i $169 \pm 159 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$ po stronie E. Nie u wszystkich organizmów strona P charakteryzuje się wyższym zagęszczeniem niż strona E; np. u pierwotniaków strona E wykazuje wyższe zagęszczenie cząstek ($1875 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$) niż strona P ($1866 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$) [77, 83].

Systematyczne porównania zagęszczenia cząstek w błonach poparte analizą statystyczną nie są jednak liczne. Z przytoczonych poniżej wyników analiz ilościowych wynika, że nawet ograniczając się jedynie do bogatszej w cząstki strony P, uzyskuje się statystycznie istotne różnice mierzonego parametru gęstości cząstek błonowych w błonach komórkowych rozmaitych tkanek. Podobnie różnice występują w błonach komórkowych w tych samych tkankach u rozmaitych gatunków zwierząt.



Ryc. 24. Porównanie zagęszczenia i sposobu rozmieszczenia cząstek strony P w obszarach $0,16 \mu\text{m}^2$ błon różnych komórek serca owcy: miocytu komory (a) $5143 \text{ cząstek}/\mu\text{m}^2$ i komórki układu przewodzącego serca (b) $4343 \text{ cząstki}/\mu\text{m}^2$. W wyniku analizy komputerowej środki obrysów cząstek zaznaczono krzyżykami [66]

Wykazane zostały różnice zagęszczenia cząstek błonowych strony P sarkolemy miocytów serca u owcy między komórkami w przedsionkach oraz komorach i komórkami układu przewodzącego serca (włóknami Purkiniego) [66] (tab. 1, ryc. 24). Sarkolema w rozmaitych typach włókien mięśni szkieletowych (wolnych i szybkich) płazów różni się liczbą IMP po stronie P, jak również układem cząstek [171]. Wykazano również statystycznie istotne różnice między sarkolemą miocytów serca rozmaitych gromad kręgowców (ssaki, ptaki i płazy) [65] (tab. 2, ryc. 22 i 23). Przypuszcza się, że błony w odmiennych regionach tej samej komórki mogą różnić się strukturą, a stosunkowo łatwo mierzalna cecha gęstości cząstek błonowych jest wyraźnie zależna od rozmaitych stanów fizjologicznych komórki [59, 84, 169]. Jest ona także zmienna w czasie, w szczególności podlega zmianom rozwojowym w ontogenezie.

RÓŻNICOWANIE SIĘ BŁON POLEGA NA ZWIĘKSZANIU SIĘ ZAGĘSZCZENIA CZĄSTEK

Wzrost zagęszczenia cząstek z wiekiem był obserwowany w błonach pręcików siatkówki oka myszy [99, 165]. W procesie mielinizacji obserwowano wzrost zagęszczenia cząstek w węzłach Ranviera od 600-14 500 IMP/ μm^2 do 1200-1500 IMP/ μm^2 po stronie E [160]. W miocytach komory serca mysich embrionów stwierdzono nieznaczny wzrost zagęszczenia cząstek błony komorowej po stronie P między 10 a 18 dniem ciąży (od 1404 do 1493 IMP/ μm^2 [46]). Wzrost liczby cząstek w replikowanych błonach (P-face) stwierdzono również w niektórych stanach patologicznych, jak nowotwór pęcherza moczowego [101] i kardiomiopatia u chomika [3]. Równocześnie w dystrofii mięśniowej [129], u mutantów *Drosophila* oraz przy niedostatku witaminy A [128], w eksperymentalnym niedotlenieniu [38] i we włóknach mięśniowych szczura unierucho-

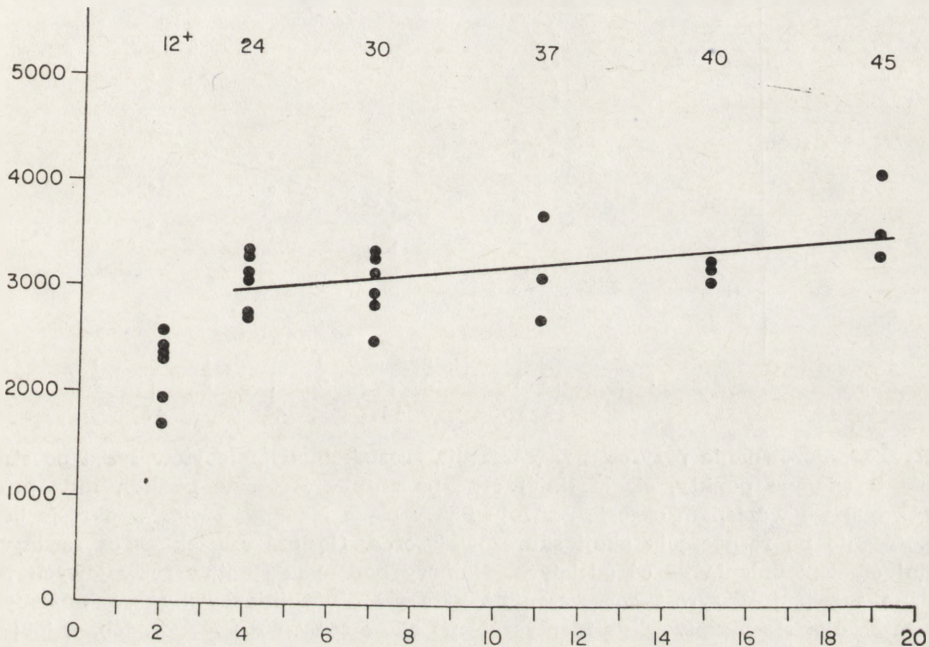
TABELA 3

Wzrost zagęszczenia cząstek błonowych strony P w embriogenezie serca kurczęcia (por. ryc. 25). Wartości średnie z 3-6 replik dla każdego stadium rozwojowego [67]

Stadium rozwojowe wg [49]	Czas inkubacji w dobach (37°C)	Gęstość cząstek na 1 μm^2 błony
12+	2	2228 ± 139
24	4	3064 ± 109
30	7	3048 ± 138
37	11	3234 ± 285
40	15	3274 ± 69
45	19	3762 ± 234

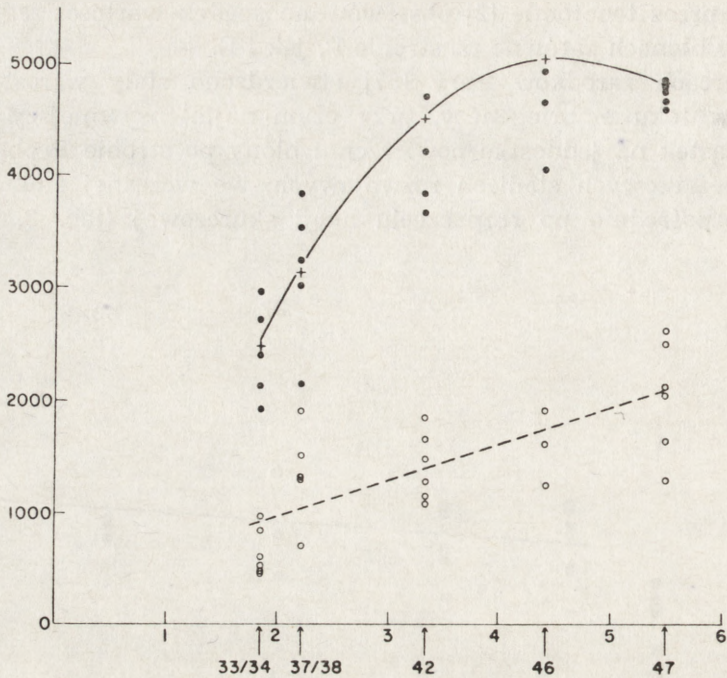
mionych przez tenotomię [2] obserwowano spadek wartości zagęszczenia cząstek w błonach zarówno po stronie P, jak i E.

W sercach zarodków kury [67] stwierdzono stały wzrost gęstości cząstek w toku embriogenezy, przy czym najintensywniejszy przyrost liczby cząstek na jednostkę powierzchni błony po stronie P obserwowano w początkowych stadiach rozwojowych, we wczesnej embriogenezie serca bezpośrednio po rozpoczęciu akcji skurczowej (tab. 3, ryc. 25).



Ryc. 25. Wykres ilustrujący wzrost wartości zagęszczenia cząstek strony P w miocytach embrionów kurczęcia (oś rzędnych — liczba cząstek/μm² powierzchni błony) z wiekiem embrionalnym (oś odciętych — dni inkubacji). Odpowiednie numery badanych stadiów rozwojowych wg [49] podano na górze wykresu. Najwcześniejsze stadium badano tuż po rozpoczęciu akcji skurczowej serca. W pierwszych dniach rozwoju obserwowano najintensywniejszy przyrost wartości zagęszczenia cząstek błony (por. tab. 3) [67]

Podobnie u płaza *Xenopus laevis* [69], najintensywniejszy przyrost gęstości obsadzenia błon miocytów serca występuje w rozwoju najmłodszych larw, tuż po rozpoczęciu akcji skurczowej serca (tab. 4, ryc. 26); dalszy rozwój kijanek *Xenopus* charakteryzuje się stałym, choć nieco słabszym wzrostem gęstości cząstek. W końcu jednak gęstość cząstek w błonie miocytów serca po stronie P u dorosłych płazów osiąga o wiele wyższe wartości niż u stałocieplnych kręgowców (ptaków i ssaków)



Ryc. 26. Porównanie przyrostu zagęszczenia cząstek błony miocytów serca po stronie P (ciemne punkty, ciągła linia) oraz po stronie E (jasne punkty, linia przerywana) we wczesnym okresie rozwoju larwy płaza *Xenopus laevis* w okresie bezpośrednio po rozpoczęciu akcji skurczowej serca. Gęstość cząstek — oś rzędnych, dni od zapłodnienia — oś odciętych. Numery badanych stadiów rozwojowych podano wg [98]. Przyrost zagęszczenia jest szczególnie intensywny we wczesnym rozwoju, ale nie przebiega identycznie po obu stronach P i E (por. tab. 4) [69]

TABELA 4

Wzrost zagęszczenia cząstek błonowych po stronie P i po stronie E w embriogenezie serca płaza *Xenopus laevis* (por. ryc. 26). Wartości średnie z 3–6 replik dla każdego stadium rozwojowego [69]

Stadium rozwojowe wg [98]	Dni od zapłodnienia	Gęstość cząstek na 1 μm^2 błony po stronie P \pm SE	Gęstość cząstek na 1 μm^2 błony po stronie E \pm SE
33/34	1 3/4	2444 \pm 158	653 \pm 90
37/38	2 1/4	3167 \pm 286	1361 \pm 194
42	3 1/3	4702 \pm 394	1446 \pm 122
46	4 3/4	4564 \pm 265	1616 \pm 193
47	5 1/2	4898 \pm 143	2061 \pm 208
50	15	5009 \pm 206	2053 \pm 191
56	38	5499 \pm 244	2144 \pm 135
66	58	6116 \pm 232	1996 \pm 209

[65-67, 69]. Przyrost gęstości cząstek jest więc większy w rozwoju płaza (*X. laevis*) niż ptaka (kura) i ustala się na wysokim poziomie, jeśli porównać wartości dla dorosłych osobników (4281 — kura, 6116 — *Xenopus*). Jest rzeczą zmienną, iż u gatunku zimnokrwistego (*Xenopus*) liczba cząstek jest znacznie wyższa niż u innych badanych stałocieplnych, które nie różnią się między sobą gęstością cząstek błonowych [65] (tab. 2).

Ze względu na większą niż u innych kręgowców liczebność cząstek białkowych w błonach miocytów serca płazów [65], podjęte zostały porównawcze badania tempa wzrostu gęstości cząstek w obu częściach błony (po stronie P i po stronie E) w ontogenezie *Xenopus* [69]. Kłopotliwość techniki replik komplementarnych (w szczególności niemożność uzyskania większej liczby komplementarnych replik) nie pozwoliła na przeprowadzenie ilościowej analizy na komplementarnych obszarach P i E, lecz jedynie na sąsiadujących ze sobą obszarach P i E w tych samych (a więc nie komplementarnych) replikach miocytów serca larw *Xenopus laevis*. Choć we wszystkich stadiach rozwojowych gęstości cząstek strony E są zawsze mniejsze niż po stronie P, po obu stronach błony obserwuje się wzrost ich zagęszczenia z wiekiem embrionalnym larwy płaza [69] (tab. 4, ryc. 26). Tak jak w przypadku strony P w miocytach serca zarodków kury [67], tak po stronie E wzrost gęstości cząstek jest najbardziej intensywny we wczesnych okresach embriogenezy serca *Xenopus* (tab. 4, ryc. 26). Tendencja wzrostowa utrzymuje się w dalszym rozwoju, lecz jej tempo jest zwolnione [69]. Można zatem powiedzieć, że różnicowanie się błon miocytów serca w ontogenezie kręgowców polega na dodawaniu cząstek białkowych do frakcji lipidowej, czyli na zagęszczeniu błony komponentą białkową. Byłoby interesujące znaleźć potwierdzenie tej informacji w prostych, jak się wydaje, obserwacjach biochemicznych nad rozwojem błon.

FIZJOLOGICZNA INTERPRETACJA ZAGĘSZCZENIA CZĄSTEK

Wartości gęstości cząstek błonowych można porównać do zagęszczenia poszczególnych kanałów, nośników i receptorów oznaczanych przez analizę wbudowywania w błonę ligandów specyficznych dla poszczególnych typów kanałów, nośników lub receptorów białkowych [27]. Z porównania tego wynika, że szybkie kanały sodowe (zarówno oznaczane tetrodoksyną, jak i saksitoksyną) oraz kanały wapniowe oznaczane nitrendypiną stanowią jedynie małą frakcję w całej populacji białkowych cząstek błony widocznych na replikach w ME, natomiast ich znaczną część stanowią mogą ogniska pompy sodowo-potasowej oznaczane ouabainą

[27]. Mimo to gęstość cząstek obserwowanych po stronie P znacznie przewyższa gęstość miejsc wbudowujących znane ligandy. Wartości tych ostatnich są jednak zbliżone do gęstości cząstek obserwowanych w replikach po stronie E. Stąd sugestia, aby cząstki strony E (niestety w mniejszym stopniu skupiające uwagę badaczy) uznać za wykładnik liczby czynnych kanałów, receptorów czy nośników błony [70].

Bezsporna wydaje się korelacja wysokiej gęstości cząstek błony z jej aktywnością czynnościową. Za przykład posłużyć mogą wspomniane już błony osłonek mielinowych, których bierna izolacyjna rola skorelowana jest z niską zawartością cząstek [7-9, 84, 105], jak również gęsto obsadzone cząstkami błony lameli chloroplastów, zaangażowane w procesy fotosyntezy [8], lub bogate w cząstki błony grzebieni mitochondriów, na których intensywnie przebiegają procesy fosforylacji oksydacyjnej [139-143].

ROZMIESZCZENIE CZĄSTEK W BŁONIE

Najbardziej typowym układem cząstek, obserwowanym w rozluptywanych błonach (szczególnie zwierząt wielokomórkowych — *Metazoa*) jest układ równomierny [84]. Z wyjątkiem wyspecjalizowanych obszarów błony, jak np. połączenia międzykomórkowe, cząstki nie tworzą wtedy żadnych regularnych układów i wydaje się, że ich rozmieszczenie jest kwestią przypadku. W pewnych szczególnych stanach mogą występować agregacje cząstek [169].

Obszary specjalizacyjne błon o pewnych szczególnych układach cząstek można podzielić na stałe i przejściowe [23]. Stałe obszary specjalizacyjne występują przede wszystkim w połączeniach międzykomórkowych, których szczegółowe omówienie wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Przykładem mogą być tutaj dwuszeregowo ustawione cząstki w błonach zakończeń nerwowych [30, 170, 171, 173], charakterystyczne dla stref aktywnych błony presynaptycznej [30, 41, 52, 78, 115, 117] lub regularnie rozmieszczone w układzie heksagonalnym cząstki w rejonie złącza szczelinowego (gap junction), które uważa się za wyznaczniki koneksonów [4]. Ponadto stałe obszary zróżnicowanego rozmieszczenia cząstek występują np. u niektórych pierwotniaków, gdzie spotyka się obszary błon pozbawione cząstek [83, 147]. W miocytach mięśni gładkich i serca kaweele, tj. zagłębienia sarkolemy, uważane dawniej za pęcherzyki pinocytotyczne, w zasadzie są wolne od cząstek [76]. Plemniki ssaków jest charakterystycznym przykładem specjalizacji rozmieszczenia cząstek błony [40].

Do przejściowych odchyień od równomiernego rozmieszczenia cząstek dochodzi w procesie egzocytozy [125]. W czasie endocytozy lub fuzji błon dochodzi do usunięcia cząstek z obszarów błon zaangażowanych w te procesy [22, 72, 84, 96, 100, 169]. Uważa się, że warunkiem interakcji błon jest zanik cząstek IMP w rejonach podlegających fuzji. Otwieranie się pęcherzyków synaptycznych, w wyniku fuzji błon pęcherzyków i błony presynaptycznej zakończeń nerwowych, związane jest z występowaniem w strefach aktywnych szczególnych układów dużych cząstek, które uważa się za miejsca kanałów do przepływu jonów wapnia [52, 54, 78, 114]. W niezróżnicowanych mioblastach cząstki IMP występują grupowo. Różnicowanie się mioblastów i ich fuzja towarzyszy pojawieniu się równomiernego rozmieszczenia cząstek IMP na błonach miotub [42]. Dojrzewanie zakończeń nerwowych polega na przejściu od chaotycznego do wysoce uporządkowanego rozmieszczenia cząstek w strefach aktywnych błony presynaptycznej [78], natomiast wiele lokalnych agregacji cząstek, obserwowanych w rozmaitych tkankach, nie znajduje na razie funkcjonalnego wytłumaczenia; stanowią one zapewne nieznane specjalizacje błon [135].

Zgodnie z przyjętym modelem płynnej mozaiki zakłada się możliwość przemieszczania się struktur białkowych w komponencie lipidowej błony. Ruch poprzez błonę ma być związany z zadaniami transportowymi błony (transport substancji przez błonę). Przemieszczanie się cząstek w płaszczyźnie błony (jak liście pływające po stawie) objawia się okresowymi lub lokalnymi zmianami zagęszczenia cząstek lub zmianą sposobu ich rozmieszczenia (agregacja). Ruchliwość cząstek w preparacie zmienić można wahaniem pH [84, 102], działaniem glicerolu na komórkę [83, 87] oraz oddziaływaniem hormonów [59]. W krwinkach czerwonych stwierdzono, że ruch ten związany jest z występowaniem antygenów powierzchniowych, lektyn i receptorów wirusowych [84]. Zmiana zaś wypowego na równomierne obsadzenie błon cząstkami jest charakterystyczna dla różnicujących się komórek [42, 69].

OBSERWACJA STEREOSKOPOWA ZWIĘKSZA WYKRYWALNOŚĆ CZĄSTEK

Różny stopień wystawiania cząstek białkowych ponad poziom lipidowego tła repliki jest zazwyczaj przyczyną zaniżenia mierzonych wartości liczby cząstek na jednostkę powierzchni błony [38, 39, 46, 85]. Dzieje się tak z powodu subiektywnej oceny co cząstką jest, a co nie jest, a w przypadku niejasnego jej obrazu — pomijania cząstki [38]. Niskie



Ryc. 27. Przykład par zdjęć stereoskopowych wykonanych (przy różnicy nachylenia repliki względem kierunku strumienia elektronów 5°) w celu lepszego rozeznania w organizacji błony komórkowej na replikach komplementarnych miocytów serca owcy po stronie P (górną parą) i E (dolną parą). Dla uzyskania efektu stereoskopowego górną i dolną parę zdjęć należy oglądać za pomocą stereoskopu. Obszary komplementarne pozostają w przybliżeniu ułożone symetrycznie względem poziomej linii oddzielającej obie stereopary. Widoczne w centrum złącze szczelinowe (gap

cząstki odznaczają się krótkim cieniem, który przy niekorzystnym nachyleniu lokalnego tła lipidowego może w ogóle nie występować (ryc. 31).

Najlepsze rezultaty w rozpoznawaniu cząstek osiąga się stosując obserwacje trójwymiarowych obrazów replik, poprzez robienie par zdjęć (ryc. 27) różniących się kątem ustawienia stolika goniometrycznego. Obrazowanie stereoskopowe zwiększa czułość metody wykrywania obecności cząstek [65]. W obrazie płaskim (w przypadku cieniowania bez rotacji preparatu) cząstkę rozpoznaje się po obecności jej cienia (ryc. 16, 21, 28). Na zmontowanych stereoparach fakt obecności cienia cząstki jest jedynie pomocniczy, natomiast do rozpoznawania cząstki służą elementy struktury jej samej, widziane pod różnymi kątami i w ten sposób składające się na trójwymiarowy jej obraz (ryc. 27). Stąd też nawet najniższe „bezcieńowe” cząstki widoczne są bezspornie jako wyniosłości wystające ponad powierzchnię lipidową.

Stosując konsekwentnie metodę obrazowania stereoskopowego uzyskałem wyniki pomiarów gęstości cząstek błonowych o wartościach przeciętnie dwukrotnie wyższych niż cytowane w literaturze [65-67, 69]. Oznacza to, że przy metodzie mono (płaskiego odwzorowania replik) około połowa liczby cząstek jest pomijana. Przydatność metody stereo (przestrzennego obrazowania replik) jest zatem bezsporna, niestety metoda ta nie jest zbyt popularna [26, 93, 151, 155, 156]. Poza tym, że w mikroskopie elektronowym wymaga ona stolika goniometrycznego i odpowiednich uchwytów preparatu, umożliwiających jego nachylenie i rotację, jest to metoda, która podwaja zużycie materiałów fotograficznych, co przy dużych liczbach zdjęć do analizy ilościowej nie jest sprawą bagatelną.

Błąd wynikły z zanizania liczby cząstek błonowych jest większy po stronie E niż po stronie P. Wynika to z faktu, iż po stronie E tylko bardzo nieliczne cząstki są wyraźne, wysokie, podczas gdy większość tej (o wiele mniej liczebnej niż po stronie P) populacji cząstek strony E stanowią cząstki niskie, bardziej podatne na pominięcie przy zliczaniu. Po stronie P natomiast cząstki wysokie stanowią większość, a frakcja cząstek niskich pozostaje w mniejszości; pominięcie mniej licznych cząstek niskich ma zatem mniejszy wpływ na błąd w wyznaczaniu gęstości cząstek na jednostkę powierzchni strony P.

junction) charakteryzuje się regularnym układem większych niż gdzie indziej cząstek (górną parą) oraz regularnym układem dołeczków (dolną parą). Na górnych zdjęciach ponad złączem widoczny obszar desmosomu, poniżej złącza mała kaweola, dwie dalsze kaweole w lewo w skos. Po prawej wyraźny uskok spowodowany przejściem płaszczyzny przelomu z jednej błony na drugą, a co za tym idzie — ze strony P na stronę E. Czarna krawędź uskoku przedstawia przestrzeń międzykomórkową. Pow. 100 000 ×

Dalsze błędy w oszacowaniu gęstości cząstek białkowych w błonie, których nawet obrazowaniem stereoskopowym wyeliminować się nie da, mogą być spowodowane zanikaniem niektórych cząstek, ich fragmentacją lub agregacją w wyniku chemicznego utrwalania tkanki, krioprotekcyjnej glicerynacji, mrożenia, rozłupywania i napyłania.

PROBLEM KOMPLEMENTARNOŚCI

Obserwacje replik komplementarnych są niezbędne do właściwego zrozumienia lokalizacji cząstek błony względem płaszczyzny przełomu. Waga badań nad komplementarnością rozłupywania doceniana jest przez wielu badaczy [37, 65, 68, 166, 175]. Jedynie na podstawie replik komplementarnych rozstrzygnąć można kwestię sposobu przylegania odpowiednich szczegółów rozszczepionych połówek błony. Niestety tylko nieliczni autorzy decydują się na konsekwentne stosowanie obserwacji replik komplementarnych. Głównie ma to miejsce z uwagi na bardziej złożoną procedurę wytwarzania replik komplementarnych względem techniki uzyskiwania replik pojedynczych, trudności w odnalezieniu komplementarnych fragmentów na dużych powiększeniach, częstą utratę komplementarnych fragmentów w wyniku uszkodzeń wytwarzanych replik oraz liczne niejasności interpretacyjne szczegółów komplementarnych przy granicy rozdzielczości repliki (2 nm). Mimo wielu zalet metoda ta nie jest zatem atrakcyjna dla badaczy, gdyż zwykle nie daje wyników proporcjonalnych do koniecznego nakładu pracy.

Wszystkie schematy ilustrujące, co dzieje się z błoną w czasie rozłupywania (np. ryc. 7-9, 11), przedstawiają sytuację tak, jakby po rozszczepieniu błony powstawały jej dwie połówki, których szczegóły idealnie pasują do siebie. Schematów tych jednak nie tworzono na podstawie porównawczych badań replik komplementarnych. W rzeczywistości (szczególnie na dużych powiększeniach) trudno jest dopatrzeć się takiego regularnego przylegania szczegółów w replikach komplementarnych (ryc. 27). W szczególności szeroko dyskutowany jest problem, dlaczego zwykle trudno jednoznacznie doszukać się zagłębień (pits) mających odpowiadać wysuniętemu z nich cząstkom (ryc. 17b, 18B, C, 20b, c). Nawet w wypadku bardzo regularnych układów cząstek, jak np. w obszarach złącz szczelinowych, sprawa przylegania cząstek (będących wyznacznikami koneksonów) do obserwowanych w komplementarnych replikach dołeczków (pits) nie jest jednoznaczna [68]. W złączu szczelinowym sytuacja jest jednak inna niż w przypadku pojedynczej błony, gdyż na obraz błony w rejonie złącza ma wpływ bardzo bliskie (leżące tuż za

szczeliną) sąsiedztwo elementów strukturalnych drugiej błony, która sama nie podlega pęknięciu (Kordylewski, w przygotowaniu).

W przypadku rozłupywania pojedynczej błony sytuacja jest prostsza, ale i tak absolutnej komplementarności obu jej rozszczepionych połówek nie ma. Idealne dopasowanie szczegółów replik komplementarnych byłoby możliwe teoretycznie tylko wówczas, gdyby rozłupywanie nie było związane z żadnymi deformacjami pękających struktur, a następujące po nim wystawienie powierzchni przełomu na działanie próżni i depozyt metalu nie powodowałyby ubytków ani pozyskiwania materiału. Wtedy każde zagłębienia i każda wypukłość musiałyby idealnie odpowiadać odpowiednim wypukłościom i zagłębieniom w „siostrzanej” replice. W istocie jednak zagłębienia mogące być „bliznami” po cząstkach są obserwowane o wiele rzadziej niż mające im odpowiadać cząstki [20]. Fakt ten był nawet podstawą do kwestionowania realności istnienia cząstek. Nie brak też jednak doniesień o możliwości identyfikacji cząstek pasujących do dołeczków [16, 36, 151, 155]. Powszechne generalizowanie tych przypadków jest jednak nieporozumieniem.

Za stwierdzony brak komplementarności połówek rozszczepionych i replikowanych błon obarcza się odpowiedzialnością tzw. deformację plastyczną (która będzie tu omówiona), możliwość wypełniania się dołeczków platyną lub zanikania ich w wyniku kondensacji substancji na powierzchni przełomu, a także możliwość zacierania się ostrych krawędzi drobnych wpukleń i wypukleń przełomu w wyniku napyłania [37]. Wszystkie te argumenty mają charakter spekulatywny i są poparte jedynie teoretycznymi rozważaniami. Systematyczne badania artefaktów, w szczególności artefaktów prowadzących do braku komplementarności, praktycznie nie zostały przeprowadzone.

OGRANICZENIA TECHNIKI FF

Tak jak w każdej innej metodzie preparatyki mikroskopii elektronowej, technika FF charakteryzuje się różnymi ograniczeniami [84, 181]. Należy tu:

- zdcność rozdzielcza rzędu 2 nm [145], nie pozwalającą na rozróżnienie szczegółów struktur wielkocząsteczkowych;
- brak specyficznych wyznaczników do identyfikacji rozmaitych chemicznych komponentów obecnych w replikowanej błonie;
- przypadkowość przebiegu płaszczyzny przełomu;
- trudność w uzyskaniu dużych obszarów dobrej jakości do pomiarów ilościowych;

zestaw rozmaitych artefaktów powstających na różnych etapach procedury, które utrudniają poprawną interpretację uzyskiwanych obrazów [6, 70, 111, 124, 152, 181].

ARTEFAKTY TECHNIKI FF

W żadnej technice preparacyjnej artefaktów uniknąć się nie da. Konieczna jest więc właściwa interpretacja zmian zaistniałych w preparacie [75]. Stosując warianty procedury często trzeba wybierać mniejsze zło, gdyż środek zapobiegający jednym artefaktom jest często źródłem powstawania innych. Należy przede wszystkim uświadomić sobie, że w technice FF sama replika, którą poddaje się obserwacji, jest niczym innym jak artefaktem, a nie biologiczną strukturą. Mimo iż istnieje tendencja interpretowania zdjęć replik w taki sposób, jakoby widoczne tam szczegóły miały być szczegółami preparatu, to jednak nie są one niczym innym jak tylko depozytami platyny i węgla. Ziarna platyny, budujące replikę, rozmieszczone są zależnie od organizacji replikowanej próbki oraz w wyniku nie całkiem poznanych procesów interakcji między cząstkami deponowanego metalu i cząstkami zamrożonej próbki. Ponadto, zanim dochodzi do wytworzenia jej obrazu, próbka zostaje nie tylko poddana drastycznej obróbce, ale nawet zostaje całkowicie usunięta (rozpuszczona) i nie jest przedmiotem obserwacji w mikroskopie.

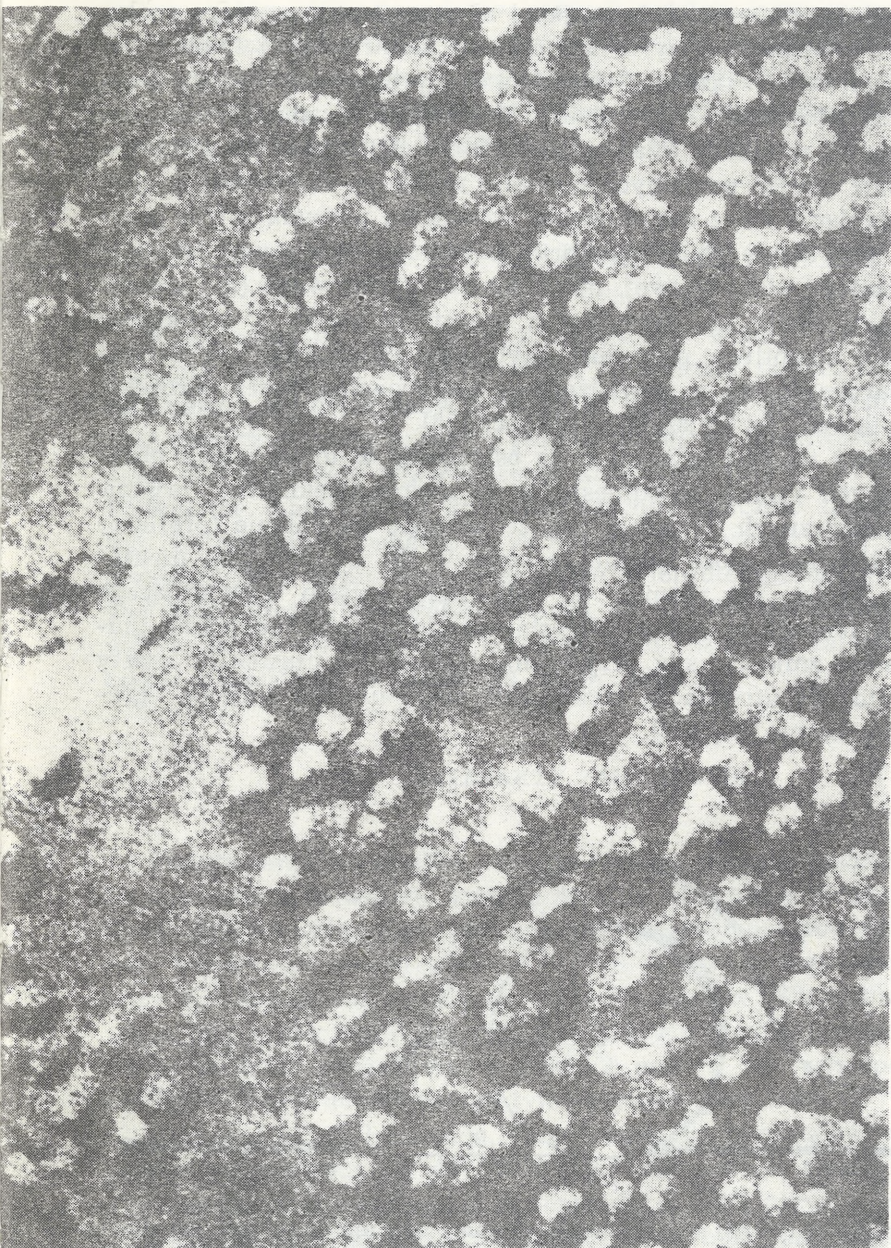
Artefakty techniki FF podzielić można na zasadnicze grupy zależnie od etapu procedury, na którym powstają:

- wywołane utrwalaniem,
- wywołane krioprotektantem,
- wywołane procedurą zamrażania,
- wywołane procedurą rozłupywania,
- wynikające z sublimacji i kondensacji,
- poreplikacyjne,
- wynikające z zaburzenia odtwarzania obrazu w mikroskopie,
- interpretacji obrazu.

O niektórych z nich wspomniano już w tym artykule. Obecnie zajmujemy się omówieniem, w jaki sposób poszczególne rodzaje artefaktów techniki kriorytownictwa wpływają na interpretację struktury błon biologicznych.

ARTEFAKTY UTRWALANIA

Początkowo preferowano rozłupywanie tkanek bez uprzedniego chemicznego ich utrwalania, uważając, że na tej drodze eliminuje się arte-

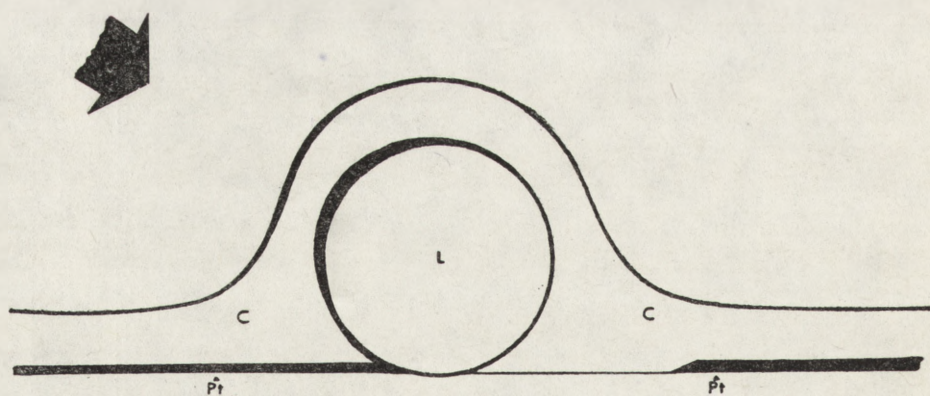


Ryc. 28. Fragment repliki strony P błony komórkowej miocytu serca owcy pod dużym powiększeniem (770 000 \times). Widoczny fragment obszaru złącza szczelinowego ciasno obsadzony cząstkami. W górnej części zdjęcia obszar błony poza połączeniem z pojedynczymi cząstkami. Każda cząstka rzuca wyraźny cień, niektóre cienie padają na sąsiednie cząstki, utrudniając ich dostrzeżenie. Obraz jest mało czytelny ze względu na widoczne przy tym powiększeniu platynowe ziarna repliki

fakty związane z drastyczną ingerencją substancji chemicznej — utrwalacza. Okazało się jednak, że zabiegi krioprotekcyjne i sama procedura zamrażania nieutrwalonej tkanki wprowadzały nowe, inne artefakty. Okazało się, że zarówno utrwalone, jak i nieutrwalone tkanki po rozluźnianiu dają podobne obrazy, a zamrażanie nieutrwalonej tkanki jest bardziej kłopotliwe i związane z ryzykiem nowych artefaktów. Konieczne jest wtedy stosowanie tzw. quick freezing lub rapid freezing ze zmniejszonym do minimum czasem zamrażania [58, 132, 135, 136].

Uzyskiwanie bardzo podobnych obrazów replik po zastosowaniu chemicznego utrwalania i bez zastosowania utrwalania pozwala zatem przypuszczać, że utrwalanie chemiczne przy użyciu powszechnych utrwalaczy do mikroskopii elektronowej, np. aldehydu glutarowego (nie stosuje się czterotlenku osmu), nie wprowadza znacznych zmian w strukturze błon. Stąd też kłopotliwa procedura szybkiego zamrażania bez utrwalania jest bardzo często z powodzeniem zastępowana przez mrożenie utrwalonych tkanek, łatwiejszych w obróbce [58].

Lefort-Tran i in. [74] zalecają dużą ostrożność w interpretacji obrazów zamrożonych próbek w odniesieniu do makromolekularnej organizacji błon biologicznych. Uważają oni, że wstępne utrwalanie (prefiksacja) glutaraldehydem może później prowadzić do fragmentacji niektórych cząstek błony, jak również do zaburzenia (często występującego w niektórych obszarach) ich parakrystalicznego układu, ponieważ glutaraldehyd może zmieniać siły przylegania białkowych cząstek do reszty błony. Ponadto pH utrwalacza może mieć znaczenie dla procesu agregacji cząstek w błonie [84, 102].



Ryc. 29. Schemat sferycznej cząstki (L) o średnicy 100 nm, poddanej napyłaniu platyną i węglem. Strzałka wskazuje kierunek napyłania (45°) względem podłoża. Zachowano skalę grubości napyłonej warstwy platyny 2,2 nm (ciemna linia — Pt) oraz węgla 20 nm (jasny obszar wokół cząstki — C) [134]

Następująca po utrwaleniu procedura odwodnienia tkanki może prowadzić do jej obkurczenia, co w rezultacie może spowodować zaburzenie wyników obserwacji ilościowych, zarówno wartości zagęszczenia cząstek w błonie, jak i rozmiarów samych cząstek. Brak jednak na ten temat jednoznacznych danych. Pęcznienie lub obkurczanie się komórki i jej organeli może powodować zmianę przebiegu błon oraz rozpad struktur błoniastych na pęcherzyki. Rozmaici autorzy dyskutują też inne artefakty utrwalań [1, 11, 21, 45, 50, 51, 58, 132].

ARTEFAKTY KRIOPROTEKCJI

Krioprotektant, np. 30% zbuforowany wodny roztwór glicerolu, z reguły stosuje się po chemicznym utrwaleniu tkanki, stąd nie należy spodziewać się drastycznych zmian w tkance po jego zastosowaniu [84, 111]. Nieliczne prace zwracają jednak uwagę na możliwość zmian w błonach pod wpływem wprowadzenia krioprotektanta [1, 87, 94, 110, 132]. Utrwalanie tkanki przed krioprotekcją niekoniecznie zapobiega artefaktom związanym z penetracją substancji krioprotekcyjnej [17, 132]. Na przykład zbyt gwałtowne przepajanie krioprotektantem może spowodować obkurczanie się próbki. Uważa się, że krioprotektant może mieć wpływ na cytoarchitekturę komórki, stąd też może zaburzać rozmieszczenie cząstek IMP w błonie [82, 84, 87, 181].

ARTEFAKTY ZAMRAŻANIA

Powstawanie kryształów lodu w wyniku niewłaściwego, zbyt wolnego zamrażania powoduje zwykle totalną destrukcję struktur preparatu [181]. Trudno zatem zgrubne artefakty zamrażania pomylić ze szczegółami strukturalnymi preparatu. Replika dotknięta tego rodzaju artefaktami nie nadaje się zwykle w ogóle do analizy. Kłopotliwa jest natomiast interpretacja mikrokryształów, których rozmiary mogą leżeć w pobliżu zdolności rozdzielczej repliki (2 nm), a ich występowanie może być ograniczone do niektórych tylko rejonów preparatu.

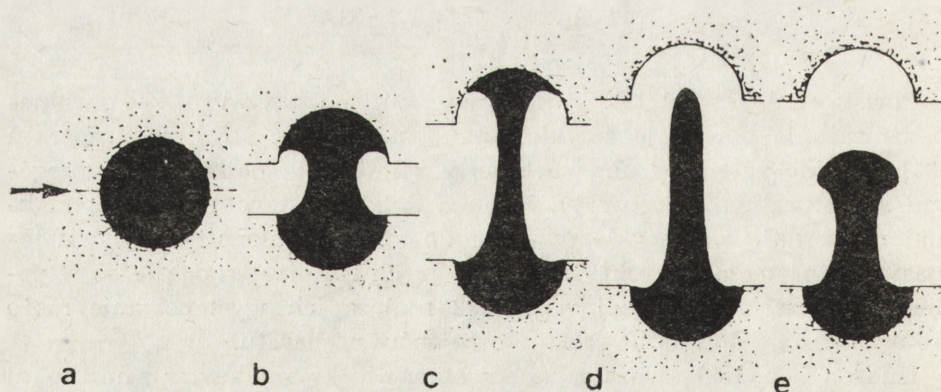
Hudson i in. [58] uważają, że powstawaniu kryształów w zamrożonej próbce zapobiec się nie da; tworzą się one zawsze, chodzi jednak o to, aby specyficznymi zabiegami (krioprotekcją lub/i przyspieszeniem tempa zamrażania) spowodować, by rozmiary ich były jak najmniejsze, tzn. by leżały poniżej rozdzielczości repliki (mniejsze niż 1 nm). Tempo zamrażania powinno wynosić -1000°C/s , tzn. obniżenie temperatury od

+4°C do -100°C musi nastąpić w ciągu mniej niż 1/10 s [58]. Ideałem jest takie zamrożenie nieutrwalonego materiału (umieszczonego w roztworze fizjologicznym bez krioprotektanta), aby w trakcie zamrażania nie doszło do zmiany aktywności biologicznej próbki. Ultraszybkie zamrażanie (nieutrwalonych tkanek bez krioprotekcji) uzyskuje się przez spuszczenie małego skrawka tkanki na blok czystej miedzi, oziębiony ciekłym helem do temperatury -266°C [18, 55]. Daje to zadowalające efekty w tkance na grubość do 20 μm od powierzchni bloku miedzianego [54, 157].

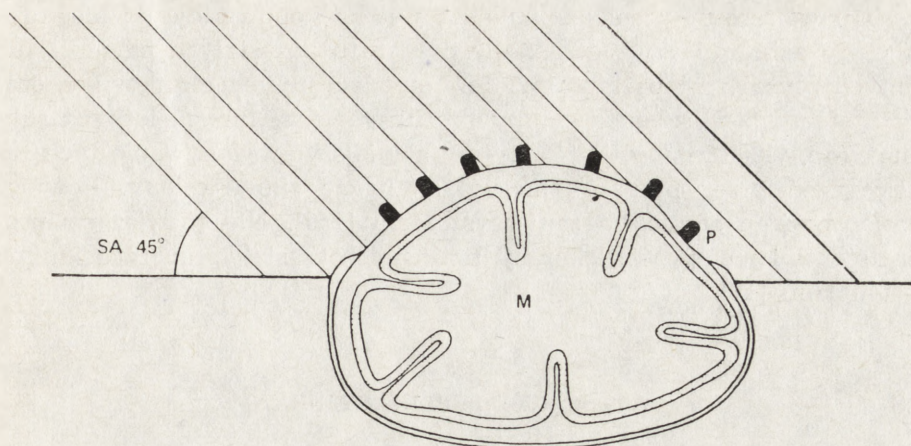
ARTEFAKTY ROZŁUPYWANIA

Jawne „grube” artefakty, powstające w trakcie rozłupywania próbki, to rysy od noża, depozyty pokruszonej tkanki (debrisu), odrywane i przenoszone przez nóż na inne miejsce w preparacie oraz mechaniczne przemieszczenie fragmentów próbki. Są one łatwe do identyfikacji i interpretacji. Gorzej jest z delikatnymi zmianami strukturalnymi na poziomie zdolności rozdzielczej repliki. Może tam dochodzić do fuzji cząstek leżących blisko siebie lub też poszczególne cząstki mogą być wyrwane z podłoża. W ten sposób zaburzeniu ulegać może ich liczba. Na czoło wysuwa się tu problem deformacji plastycznej, który szeroko dyskutowany jest przez badaczy [6, 14, 15, 28, 75, 89, 124, 146].

Sposób odkształcenia cząstki pod wpływem sił rozrywających, zasto-



Ryc. 30. Schemat ilustrujący przykład odkształcenia cząstki na drodze deformacji plastycznej w trakcie rozłupywania po zamrożeniu w ciekłym azocie. Strzałka wskazuje płaszczyznę rozrywania. Cząstka najpierw ulega rozciągnięciu (a — c), po czym część słabiej związana ze środowiskiem (górną) zostaje wysunięta (d), lecz ostateczny kształt cząstki znacznie odbiega od pierwotnego (e) [146]



Ryc. 31. Schemat ilustrujący zależność długości cienia poszczególnych cząstek P od lokalnego ukształtowania błony (na przykładzie powierzchni zewnętrznej błony mitochondrionu M) przy stałym kącie napyłania SA 45° [93]

sowanych w niskiej temperaturze, zależy na pewno od charakteru samej cząstki i od jej związków ze środowiskiem (ryc. 30). Dobre utrwalanie i rozłupywanie w niskiej temperaturze może złagodzić powstawanie artefaktów w tym zakresie. Nie wiadomo jednak, czy wielość kształtów cząstek i szerokie spektrum ich rozmiarów jest wynikiem natywnej różnorodności, czy też wynikiem artefaktów rozłupywania. Przyjęło się, że za wszelką (faktyczną lub domniemaną) niezgodność obserwowanych detali z oczekiwaniami, odpowiedzialnością obarcza się niesprecyzowaną deformację plastyczną próbki.

ARTEFAKTY SUBLIMACJI I KONDENSACJI

W technice „freeze-etching” (FE) po dokonaniu rozłupywania celowo doprowadza się do sublimacji wody z powierzchni preparatu. Przed przypadkowym zanieczyszczeniem jest on wtedy zabezpieczony nożem lub inną osłoną. Ewentualne zanieczyszczenia osiadłe na rytowanej powierzchni są i tak zaraz usuwane przez prąd sublimującej wody [157]. Może też dochodzić nawet do porywania przez sublimujący prąd niektórych elementów struktury preparatu i przemieszczania ich lub gubienia, co jest artefaktem specyficznym dla techniki freeze-etching (FE).

W technice freeze-fracture (FF) czas między przełamaniem tkanki a replikacją powinien być możliwie najkrótszy, aby uniknąć niepożądanego „etchingu”, a także aby nie narażać przełomu na zanieczyszczenie.

Zimna powierzchnia przełomu podatna jest na kondensację na niej drobiny wody sublimującej z odłamków preparatu pozostałych na nożu lub z innych rejonów preparatu [152, 159], a także innych resztkowych cząstek z otoczenia — oleju z pompy próżniowej oraz innych lotnych substancji (np. węglowodorów) [156]. Aby zmniejszyć wyłapywanie tych zanieczyszczeń przez preparat, stosuje się także zimne osłony. Również wysoka próżnia zmniejsza zanieczyszczenia [159]. Nie rozwiązany problem stanowi możliwość dekoracji natywnych cząstek preparatu innymi substancjami [47].

ARTEFAKTY REPLIKACYJNE

Replika zanieczyszczona jest często grubymi depozytami platyny lub węgla, które „odpadły” od elektrody w procesie jej odparowywania. Są to zwykle cząstki grubsze, stałe, które nie zostały zdeponowane na powierzchni preparatu w postaci pary. Delikatna błonka repliki (grubości 25 Å platyny i 200 Å węgla, ryc. 29) może też ulec pęknięciom lub rozzerwaniom w procesie jej przenoszenia na siatkę. Pęknięcia lub braki ciągłości replik są często przeszkodą w identyfikacji odpowiadających sobie obszarów w replikach komplementarnych. Niepożądane jest również zanieczyszczenie repliki resztkami rozpuszczonej tkanki.

Depozyt platyny i węgla może wpływać na zmianę rozmiarów obserwowanych szczegółów strukturalnych, np. średnic cząstek. Mimo stosowanego stałego kąta napyłania, lokalne zmiany ukształtowania replikowanego podłoża mogą być przyczyną rozmaicie kształtującego się cienia występujących na tym podłożu wypukłości, np. cząstek (ryc. 31). Może to być przyczyną niedostrzegania bezcieniowych cząstek i w związku z tym zaniżenia ich liczby. Zakrzywienie napyłanej powierzchni ma wpływ na wyniki szacunku zagęszczenia cząstek [148]. Szczegóły blisko siebie leżące, np. sąsiadujące ze sobą cząstki, mogą nawzajem zasłaniać się cieniami (ryc. 28). Również może dochodzić do wypełnienia platyną małych zagłębień (dołeczków — pits), a ich zanik może być przyczyną braku komplementarności tych struktur do cząstek w replikach komplementarnych [37]. Ostre krawędzie wpukleń i wypukleń mogą ulegać zładgodzeniu w wyniku depozytu metalu w replice [37]. Depozyt węgla daje przejrzyste „halo” wokół ostrych platynowych konturów cząstek (ryc. 29) [134]. Ziarnistości platyny w strukturze repliki zaburzać mogą wyrazistość obrazu na dużych powiększeniach i są przyczyną ograniczenia zdolności rozdzielczej repliki do 2 nm [145].

Ruben [123] zwraca uwagę na możliwą deformację struktur związaną

z napyłaniem platyną. Stwierdza on, że ani szerokość cienia cząstki (particle shadow width — PSW), ani też szerokość „czapeczki” wytworzonej na cząstce przez platynowo-węglowy nalot (particle cap width — PCW) nie są jednoznaczne z faktycznymi rozmiarami natywnej cząstki. PCW jest zależna od charakteru chemicznego cząstki: inaczej powstaje na cząstkach białkowych, a inaczej na metalicznych. Jest ona również zależna od kąta napyłania i grubości podłoża. PSW jest wytwarzana niezależnie od składu chemicznego cząstki i może być lepszym wyznacznikiem jej rozmiarów. Cień cząstki nie powstaje jednak tak, jakby wynikało to z prostoliniowego rozchodzenia się „promieni” napyłanego metalu. Tworzenie się cienia jest procesem niezależnym od tworzenia się „czapeczki”. Odgrywają tu rolę niezupełnie poznane, a skomplikowane mechanizmy interakcji między cząsteczkami deponowanego metalu i elementami pokrywanej struktury [123].

ARTEFAKTY PROJEKCYJNE

Kąt nachylenia repliki względem kierunku strumienia elektronów w mikroskopie jest bardzo ważny dla właściwej kontrastowości obrazu (ryc. 21). W krańcowych wypadkach pokrycie się kierunku strumienia elektronów z kierunkiem, pod jakim została napyłona platyna (zwykle 45°), może wywołać efekt zaniku wytworzonych w replice cieni [71, 156]. Ze względu na znaczną trójwymiarowość powierzchni repliki, kąt jej nachylenia w trakcie wykonywania zdjęć ma duże znaczenie dla odwzorowania odległości między poszczególnymi szczegółami w replice. Jest to bardzo istotne przy wykonywaniu wszelkich pomiarów na zdjęciach replik. Dzięki tym różnicom możliwe jest tworzenie obrazów trójwymiarowych z par zdjęć robionych przy różnym nachyleniu repliki w kolumnie mikroskopu [157].

PROBLEMY INTERPRETACJI OBRAZU

Istnieją dwa sposoby przedstawiania zdjęć replik z mikroskopu elektronowego. Niekiedy stosuje się tzw. obrazy pozytywne, czyli takie, jakie powstają bezpośrednio na ekranie fosforyzującym mikroskopu elektronowego. Wypukłości obecne w replice są ciemne, a ich cienie jasne. Na ogół jednak lepsze efekty osiąga się stosując obrazy negatywowe, tzn. takie, jakie otrzymuje się na kliszy naświetlanej w kolumnie mikroskopu [181]. Wypukłości repliki są wtedy jasne, a ich cienie ciemne.

Na odbitkach fotograficznych efekt ten uzyskuje się przez tzw. double printing: przed ostatecznym uzyskaniem obrazu na papierze fotograficznym z oryginalnego negatywu uzyskuje się stykowo odwrócony negatyw pośredni, który dopiero kopiowany jest na papier [130]. Takie przedstawienie struktur repliki (wypukłości jasne, cienie ciemne) uważa się za bardziej naturalne, zgodne z codziennym doświadczeniem, gdzie oświetlone obiekty rzucają ciemne cienie. Jest to jednak odwróceniem sytuacji w replice, gdzie cień wypukłości jest rezultatem braku depozytu metalu i daje jasną plamę na ekranie mikroskopu elektronowego, podczas gdy metal osadzony na wypukłej strukturze powoduje brak świecenia ekranu w tym miejscu (ryc. 21). Białe cienie mogą jednak prowadzić do błędnych interpretacji struktury obserwowanych detali [157]. W szczególności cyklicznie powtarzające się szczegóły, będące dołączkami, zinterpretować można jako twory krateropodobne [18, 157]. Z tego też względu większość czasopism ultrastrukturalnych zaleca autorom przedstawianie zdjęć replik z czarnymi cieniami.

Niewłaściwa orientacja cienia może również prowadzić do błędów interpretacji obrazu. Dawniej zawsze stosowano oznaczenie kierunku napylania w postaci strzałki w kółku w rogu zdjęcia, informujące równocześnie o kierunku cienia. Obecnie coraz częściej widzi się reprodukcje zdjęć replik bez tej informacji, za to stosowane są ujednoczone zasady orientacji cienia przy montowaniu zdjęć do publikacji. Cienie skierowane skosem w dół dają naturalne złudzenie boczno-górnego oświetlenia i uwypuklają wystające detale. Gdy zdjęcie takie obróci się „do góry nogami” i cienie zostaną skierowane ku górze, dla niektórych obserwatorów nieobeznanych z faktyczną strukturą preparatu wypukłości ukażą się jako zagłębienia [157]. Jest to typowy przykład złudzenia optycznego, demonstrowany na obrazach stosu kostek o czarnych i białych ścianach. Obrócenie takiego rysunku „do góry nogami” powoduje, że kostki wydają się wklęsłe. Dlatego większość czasopism zaleca obecnie takie montowanie zdjęć replik, aby ciemne cienie skierowane były w dół. Aby właściwie zinterpretować obraz z białymi cieniami (w wypadku stosowania obrazu nieodwróconego fotograficznie), zdjęcia fotograficzne należy montować tak, aby cienie skierowane były ku górze [157]. Wszystkie zdjęcia replik reprodukowane w niniejszej pracy (ryc. 16, 22, 27, 28) są przedstawione z ciemnymi cieniami skierowanymi ku dołowi.

Ze względu na znaczną trójwymiarowość struktury repliki oraz możliwość wadliwej interpretacji, co jest w niej wgłębieniem, a co wypukłością, zaleca się stosowanie obserwacji stereoskopowej (ryc. 27) [26, 65, 93, 155, 156], która daje jednoznaczną orientację w preparacie co do jego wypukłości i zakłębnień, pod warunkiem właściwego zmontowania zdjęć w parę. Zamiana zdjęcia prawego z lewym powoduje specyficzny

„artefakt” widzenia trójwymiarowego: wszystkie wypukłości przedstawiają się jako zagłębienia, a wklęsłości są wypukłe.

Przedstawione tu trudności techniczne i interpretacyjne, związane z zastosowaniem obserwacji replik błon biologicznych, narzucają konieczność znacznej ostrożności w wyciąganiu wniosków z uzyskiwanych obrazów. Mimo to, metoda kriorytownictwa nadal służy do lepszego poznania organizacji błon. Kierunki badań oparte na tej technice, które będą rozwijane w przyszłości, to żmudne opracowania ilościowe oraz eksperymenty mające na celu identyfikację cząstek obecnych w błonie.

LITERATURA

- [1] ARANCIA G., ROSATI VALENTE F., TROVALUSCI CRATERI P., Effects of glutaraldehyde and glycerol on freeze-fractured *Escherichia coli*, **118**: 161-176, 1980.
- [2] BAKER J. H., BALDWIN K. M., Changes in membrane structure following tenotomy of the rat soleus muscle, *Muscle and Nerve*, **5**: 222-225, 1982.
- [3] BERRY B., POULSEN R., YUNGE L., BRUNEVAL P., FITCHETT D., deCHASTONAY C., GABBIANI G., HÜTTNER I., Numerical densities of intramembrane particles in the cardiac sarcolemma of normal and myopathic syrian hamster, *Jour. Mol. Cell Cardiol.*, **15**: 503-513, 1983.
- [4] BILIŃSKI S., KLAG J., Ultrastruktura i funkcja połączeń międzykomórkowych, [w] *Ultrastruktura i funkcja komórki*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, t. 2, PWN, Warszawa 1982, 233-253.
- [5] BLAUROCK A. E., STOECKENIUS W., Structure of the purple membrane, *Nature*, **233**: 152-155, 1971.
- [6] BÖHLER S., Artifacts and defects of preparation in freeze-etch technique, [w] *Freeze-fracture: Methods, Artifacts and Interpretations*, red. J. E. Rash, C. S. Hudson, Raven Press, New York 1979, 22.
- [7] BRANTON D., Fracture faces of frozen membranes, *Proc. Natn. Acad. Sci USA*, **55**: 1048-1056, 1966.
- [8] BRANTON D., PARK R. B., Subunits in chloroplast lamellae, *J. Ultrastr. Res.*, **19**: 283-303, 1967.
- [9] BRANTON D., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **261**: 133-138, 1971.
- [10] BRETSCHER M., Some general principles of membrane structure, [w] *The cell surface in development*, red. A. A. Moscona, Wiley, New York 1974.
- [11] BRETSCHER M. S., WHYTOCK S., Membrane-associated vesicles in fibroblasts, *J. Ultrastr. Res.*, **61**: 215, 1977.
- [12] BULLIVANT S., AMES A., 3rd, A simple freeze-fracture replication method for electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **29**: 435-440, 1966.
- [13] BULLIVANT S., WEINSTEIN R. S., A thin section study of the path of fracture planes along frozen membranes, *Anat. Rec.*, **163**: 296, 1969.
- [14] BULLIVANT S., Freeze-fracturing of biological materials, *Micron*, **1**: 46-51, 1969.
- [15] BULLIVANT S., RAYNS D. G., BERTAUD W. S., CHALCROFT J. P., GRAYSTON G. F., Freeze-fractured myosin filaments, *J. Cell Biol.*, **55**: 520-524, 1972.

- [16] BULLIVANT S., Freeze-etching techniques applied to biological membranes, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **268**: 5-14, 1974.
- [17] — Evaluation of membrane structure facts and artifacts produced during freeze-fracturing, *J. Microsc.*, **111**: 101-116, 1977.
- [18] — Advantages and limitations of a simple cold block freeze-fracture technique, *Proc. 38th Ann. Meet. EM Soc Amer.*, red. G. W. Bailey, Baton Rouge, Claitor's Pub. Div., 748-751, 1980.
- [19] CARTAUD J., BENEDETTI E. L., SOBEL A., CHANGEUX J.-P., A morphological study of the cholinergic receptor protein from *Torpedo marmorata* in its membrane environment and in its detergent-extracted purified form, *J. Cell Sci.*, **29**: 313-337, 1978.
- [20] CHALCROFT J. P., BULLIVANT S., An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the structure, *J. Cell Biol.*, **47**: 49-60, 1970.
- [21] CHANDLER D. E., Quick freezing avoids specimen preparation artifacts in membrane fusion studies, [w] *Freeze-fracture: Methods, Artifacts and Interpretations*, red. J. E. Rash, C. S. Hudson, Raven Press, New York 1979, 81.
- [22] CHI E. Y., LAGUNOFF D., KOEHLER J. K., Freeze-fracture study of mast cell secretion, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 2823-2827, 1976.
- [23] CIECIURA L., Zastosowanie techniki freeze-etching do badania błon biologicznych, *Post. Biol. Kom.*, **13**: 23-34, 1986.
- [24] DEAMER D. W., BRANTON D., Fracture planes in an ice-bilayer model membrane system, *Science N. Y.*, **158**: 655-657, 1967.
- [25] DEGUCHI N. P., JORGENSON P. L., MAUNSBACH A. B., Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining, and freeze-fracture of purified membrane-bound (Na^+ , K^+) ATPase, *J. Cell Biol.*, **75**: 619-634, 1977.
- [26] DENNISON M. E., Electron stereoscopy as a means of classifying synaptic vesicles, *J. Cell Sci.*, **8**: 525-539, 1971.
- [27] DOYLE D. D., BRILL D. M., WASSERSTROM J. A., KARRISON T., PAGE E., Saxitoxin binding and "fast" Na channel inhibition in sheep heart plasma membrane, *Am. J. Physiol.*, **249**: H328-H336, 1985.
- [28] EDWARDS H. H., MUELLER T. J., MORRISON M., Distribution of transmembrane polypeptides in freeze-fracture, *Science*, **203**: 1343, 1979.
- [29] ELGSAETER A., SHOTEN D. M., BRANTON D., Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. II. The influence of spectrin aggregation, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 101-122, 1976.
- [30] ELLISMAN M. H., RASH J. E., STAEHLIN L. A., PORTER K. R., Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and nonjunctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibres, *J. Cell Biol.*, **68**: 752-774, 1976.
- [31] FINEAN J. B., COLEMAN R., MICHELL R. H., *Membranes and their cellular functions*, Wiley, New York 1974.
- [32] FISHER K. A., BRANTON D., Freeze-fracture autoradiography: feasibility, *J. Cell Biol.*, **70**: 453-458, 1976.
- [33] FISHER K. A., STOECKENIUS W., Freeze-fractured purple membrane particles: protein content, *Science*, **197**: 72-74, 1977.
- [34] FISHER K. A., Split membrane lipids and polypeptides, [w] *9th International Congress on Electron Microscopy, III*, red. J. M. Sturgess, Toronto 1978, 521-532.

- [35] — *J. Cell Biol.*, **93**: 155, 1982.
- [36] FLOWER N. E., Frozen etched septate junctions. *Protoplasma*, **70**: 479-483, 1970.
- [37] — Complementary plasma membrane fracture faces in freeze-etch replicas, *J. Cell Sci.*, **12**: 445-452, 1973.
- [38] FRANK J. S., BEYDLER S., KREMAN M., RAU E. E., Structure of the freeze-fractured sarcolemma in the normal and anoxic rabbit myocardium, *Circ. Res.*, **47**: 131-143, 1980.
- [39] FRANK J. S., RICH T. L., BEYDLER S., KREMAN M., Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox, *Circ. Res.*, **51**: 117-130, 1982.
- [40] FRIEND D., FAWCETT D. W., Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm, *J. Cell Biol.*, **63**: 641-664, 1974.
- [41] FUKUNAGA H., ENGEL A. G., OSAME M., LAMBERT E. H., Paucity and disorganization of presynaptic membrane active zones in the Lambert-Eaton myastenic syndrome, *Muscle and Nerve*, **5**: 686-697, 1982.
- [42] FURCHT L. T., WENDELSCHAFFER-CRABB G., Changes in intramembranous particle topography and Concanavalin A receptor mobility associated with myoblast differentiation, *Differentiation*, **12**: 39-45, 1978.
- [43] GERRITSEN W. J., VERKLEIJ A. J., ZWAAL R. F. A., VAN DEENEN L. L. M., Freeze-fracture appearance and disposition of Band 3 protein from the human erythrocyte membrane in lipid vesicles, *Eur. J. Biochem.*, **85**: 255-261, 1978.
- [44] GIESE A. C., *Fizjologia komórki*, PWN, Warszawa, 1985.
- [45] GREEN C. R., Fixation induced intramembrane particle movement demonstrated in freeze fracture replicas of a new type of septate junction in Echinoderm epithelia, *J. Ultr. Res.*, **75**: 11-22, 1981.
- [46] GROS D., POTREAU D., MOCQUARD J.-P., The myocardial plasma membrane during development: influence of glutaraldehyde fixation on the density and size of intramembranous particles, *J. Cell Sci.*, **43**: 301-317, 1980.
- [47] GROSS H., MOOR H., Decoration of specific sites on freeze-fractured membranes, [w] 9th International Congress on Electron Microscopy, II, Toronto 1978, 140-141.
- [48] GOODENOUGH D. A., REVEL J. P., A fine structural analysis of intercellular junctions in mouse liver, *J. Cell Biol.*, **45**: 272-290, 1970.
- [49] HAMBURGER V., HAMILTON H. L., A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J. Morphol.*, **88**: 49-92, 1951.
- [50] HASTY D. L., HAY E. D., Freeze-fracture studies of the developing cell surface. II. Particle free membrane blisters on glutaraldehyde fixed corneal fibroblasts and artifacts, *J. Cell Biol.*, **78**: 756, 1978.
- [51] HAY E. D., HASTY L. L., Extrusion of particle free membrane blisters during glutaraldehyde fixation, [w] *Freeze-fracture: Methods, Artifacts and Interpretations*, red. J. E. Rash, C. S. Hudson, Raven Press, New York 1978, 59.
- [52] HEUSER J. E., REESE T. S., LANDIS D. M. D., Functional changes in frog neuromuscular junctions studies with freeze-fracture, *J. Neurocytol.*, **3**: 109-131, 1974.
- [53] HEUSER J. E., SALPETER S. R., Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen deep-etched and rotary replicated Torpedo postsynaptic membrane, *J. Cell Biol.*, **82**: 150-173, 1979.
- [54] HEUSER J. E., REESE T. S., DENNIS M. J., JAN Y., JAN L., EVANS L., Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with

- quantal transmitter release, *J. Cell Biol.*, **81**: 275-300, 1979.
- [55] HEUSER J. E., REESE T. S., Freeze-substitution applied to the study of quick-frozen synapses, *J. Cell Biol.*, **70**: 357a, 1981.
- [56] HIROKAWA N., HEUSER J. E., Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells, *J. Cell Biol.*, **91**: 399-409, 1981.
- [57] HONG K., HUBBELL W. L., Preparation and properties of phospholipid bilayers containing rhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2617-2621, 1972.
- [58] HUDSON C. S., RASH J. E., SHINOWARA N. L., Freeze-fracture and freeze-etch methods, [w] *Current Trends in Morphological Techniques, II*, red. J. J. Johnson, CRC Press, Boca Raton, Florida 1981, 183-217.
- [59] KOCHADORIAN W. A., WADE J. B., UITERWYK C. C., DiSCALA V. A., Membrane structural and functional responses to vasopressin in toad bladder, *J. Membr. Biol.*, **30**: 381-401, 1977.
- [60] KELL M. J., DeFELICE L. J., GOOLSBY W., Equilibrium energy analysis of freeze-fracture planes in membranes, *J. Theor. Biol.*, **115**: 103-127, 1985.
- [61] KILARSKI W., *Molekularna organizacja błony komórkowej*, Kosmos (w druku).
- [62] KIRCHANSKI S., BRANTON D., Effect of integral proteins on frozen membrane fracture, [w] *Proc. 38th Ann. Meet. EM Soc. Amer.* red. G. W. Bailey, Baton Rouge, Claitor's Pub. Div., 756-759, 1980.
- [63] KLYMKOWSKY M. W., HEUSER J. E., STROUD R. M., Protease effects on the structure of acetylcholine receptor membranes from *Torpedo californica*, *J. Cell Biol.*, **85**: 823-838, 1980.
- [64] KOEHLER J. K., Freeze-etching observations on nucleated erythrocytes with special reference to the nuclear and plasma membranes, *Z. Zellforsch.*, **85**, 1, 1968.
- [65] KORDYLEWSKI L., KARRISON T., PAGE E., P-face particle density of freeze fractured vertebrate cardiac plasma membrane, *Amer. J. Physiol.*, **245**: H992-H997, 1983.
- [66] — Measurements on the internal structure of freeze-fractured cardiac plasma membrane, *Amer. J. Physiol.*, **248**: H297-H304, 1985.
- [67] KORDYLEWSKI L., GOINGS G., KARRISON T., PAGE E., Developmental changes in internal structure of chick heart plasma membrane, *Devel. Biol.*, **112**: 485-488, 1985.
- [68] KORDYLEWSKI L., PAGE E., Are gap junctional pits and particles complementary structures?, *Biophys. Jour.*, **47**: 2, Pt. 2, 506a, 1985.
- [69] KORDYLEWSKI L., KARRISON T., PAGE E., Developmental changes in P-face and E-face particle densities of *Xenopus* cardiac plasma membrane, *Tissue and Cell*, **18**: 5, 793-801, 1986.
- [70] KORDYLEWSKI L., Particle patterns in freeze-fractured membranes, [w] *Spectroscopic and Structural Studies of Biomedical Materials*, red. J. Twardowski, Sigma Press, Wilmslow 1987.
- [71] LANGE R. H., Tilting experiments in the electron microscope, [w] *Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological applications*, red. M. A. Hayat, vol. VI, Van-Nostrand Reinhold, Princeton N. Jersey 1976, 241-270.
- [72] LAWSON D., RAFF M. C., GOMPOSTS B., FEWTRELL C., GILULA N. B., Molecular events during membrane fusion. A study of exocytosis in rat peritoneal mast cells, *J. Cell Biol.*, **72**: 242-259, 1977.
- [73] LE MAIRE M., MOLLER J. V., GULIK-KRZYWICKI T., Freeze-fracture

- study of water-soluble standard proteins and detergent-solubilized forms of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *Bioch. Bioph. Acta*, **643**: 115-125, 1981.
- [74] LEFORT-TRAN M., GULIK T., PLATTNER H., BEISSON J., WIESSNER W., Influence of cryofixation procedures on organization and partition of intramembrane particles, [w] 9th International Congress on Electron Microscopy. II, red. J. M. Sturgess, Toronto 1978, 146-147.
- [75] LEPAULT J., DUBOCHET J., Freezing, fracturing, and etching artifacts in particulate suspensions, *J. Ultr. Res.*, **72**: 223-233, 1980.
- [76] LEVIN K. R., PAGE E., Quantitative studies on plasmalemmal folds and caveolae of rabbit ventricular myocardial cells, *Circ. Res.*, **46**: 2, 244-255, 1980.
- [77] LINDER J. C., STAEHELIN L. A., Plasma membrane specializations in a trypanosomatid flagellate, *J. Ultr. Res.*, **60**: 246-262, 1977.
- [78] LYNCH K., HOMER M. J., HARRIS C. D., MORRISEY J., An ultrastructural comparison of neuromuscular junctions in normal and developmentally arrested *Rana pipiens* larvae: Limited maturation in the absence of metamorphosis, *Am. Jour. Anat.*, **176**: 83-95, 1986.
- [79] MALHOTRA S. K., *The Plasma Membrane*, Wiley NY, 1983.
- [80] MARCHESI V. T., TILLACK T. W., JACKSON R. L., SEGREST J. P., SCOTT R. E., Chemical characterization and the surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 1445-1449, 1972.
- [81] MARGARITIS L. H., ELGSAETER A., BRANTON D., Rotary replication for freeze-etching, *J. Cell Biol.*, **72**: 47-56, 1977.
- [82] MARTINEZ-PALOMO A., De SOUZA W., GONZ'ALEZ-ROBLEZ A., Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles, *J. Cell Biol.*, **69**: 507-513, 1976.
- [83] MARTINEZ-PALOMO A., PINTO da SILVA P., CHÁVEZ B., Membrane structure of *Entamoeba histolytica*; fine structure of freeze-fractured membranes, *J. Ultr. Res.*, **54**: 148-158, 1976.
- [84] MARTINEZ-PALOMO A., CHÁVEZ B., GONZÁLEZ-ROBLEZ A., The freeze-fracture technique: application to the study of animal plasma membranes, [w] 9th International Congress on Electron Microscopy. III, red. J. M. Sturgess, Toronto 1978, 503-515.
- [85] MASSON-PÉVET M. W., BLEEKER W. K., GROS D., The plasma membrane of leading pacemaker cells in rabbit sinus node: a qualitative and quantitative ultrastructural analysis, *Circ. Res.*, **45**: 621-628, 1979.
- [86] McDONNELL A., STAEHELIN L. A., Biochemical and structural characterization of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from the chloroplast of higher plants, *J. Cell Biol.*, **79**: 318a, 1978.
- [87] McINTYRE J. A., GILULA N. B., KARNOWSKY M. J., Cryoprotectant-induced redistribution of intramembranous particles in mouse lymphocytes, *J. Cell Biol.*, **60**: 192, 1974.
- [88] McNUTT N. S., Ultrastructure of the myocardial sarcolemma, *Circ. Res.*, **37**: 1, 1-13, 1975.
- [89] MEYER H. W., WINHELMANN H., Die Gefrierätzung und die Struktur biologischer membranen, *Protoplasma*, **68**: 253, 1969.
- [90] MONTAL M., Lipid-protein assembly and the reconstruction of biological membrane, [w] *Perspectives in Membrane Biology*, red. O. Estrada, C. Gitler, Ac. Press N. Y., 591-622, 1974.

- [91] MOOR H., MÜHLETHALER K., Fine structure in frozen-etched yeast cells, *J. Cell Biol.*, **17**: 609, 1963.
- [92] NANNINGA N., *J. Cell Biol.*, **49**: 564, 1971.
- [93] NAVARATNAM V., THURLEY K. W., SKEPPER J. N., Freeze-fracture replication studies of mammalian heart muscle, [w] *Progress in Anatomy*, Vol. 2, red. R. J. Harrison, V. Navaratnam, Cambridge, 201-215, 1982.
- [94] NEIDERMEYER W., PARISH G. R., MOOR H., Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alternations to membrane structure and glycerol uptake, *Protoplasma*, **92**: 177-193, 1977.
- [95] NERMUT M. V., Ultrastructural and chemical analysis of intramembranous particles, [w] *Proc. 8th Europ. Congr. Electron Microscopy*, Vol. 3, red. A. Csanady, P. Röhlich, D. Szabo, Budapest 1984, 1737-1744.
- [96] NEUTRA M. R., SCHAEFFER S. S., Membrane interactions between adjacent mucous secretion granules, *J. Cell Biol.*, **74**: 983-991, 1977.
- [97] NICKEL E., OEBER G., PSCHIED P., Freeze-fracturing of biological material with a new specimen table, *J. Microsc.*, **113**: 101-105, 1978.
- [98] NIEUWKOOP P. D., FABER J., Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), North Holland Publ. Co., Amsterdam 1967.
- [99] OLIVE J., RECOUVREUR M., Freeze fracture features and molecular architecture of photoreceptor membranes, [w] *Proc. 3rd Int. Congr. Eye Res.*, red. J. H. Kinoshita, T. Otori, Osaka 1978, 131.
- [100] ORCI L., PERRELET A., MALAISSE-LAGAE F., VASSALLI P., Freeze-fracture of membrane fusions during exocytosis demonstrated by freeze-etching, *J. Cell Biol.*, **75**: 23-30, 1977.
- [101] PAULI B. U., FRIEDEL G. H., WEINSTEIN R. S., Topography and numerical densities of intramembrane particles in chemical carcinogen-induced urinary bladder carcinomas in Fisher rats, *Lab. Invest.*, **39**: 565-573, 1978.
- [102] PINTO da SILVA P., Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts, *J. Cell Biol.*, **53**: 777-787, 1972.
- [103] PINTO da SILVA P., BRANTON D., Membrane splitting in freeze-etching. Covalently bound ferritin as a membrane marker, *J. Cell Biol.*, **45**: 598-605, 1970.
- [104] PINTO da SILVA P., NICOLSON G., Freeze-etch localization of Concanavalin A to the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts membranes, *Biochem. Biophys. Acta*, **363**: 311-319, 1974.
- [105] PINTO da SILVA P., MILLER R. G., Membrane particles on fracture faces of frozen myelin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 4046-4050, 1975.
- [106] PINTO da SILVA P., DOUGLAS S. D., BRANTON D., Localization of A antigenic sites of human erythrocyte ghosts, *Nature*, **232**: 194-196, 1971.
- [107] PINTO da SILVA P., MOSS P. S., FUDENBERG H. H., Anionic sites of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts membranes, *Exp. Cell Res.*, **81**: 127-138, 1973.
- [108] PINTO da SILVA P., TORRISI M., *J. Cell Biol.*, **93**: 463, 1982.
- [109] PINTO da SILVA P., BARBOSA M. L., KAN F. W. K., Fracture-label: Structural and cytochemical dissection of plasma and intercellular membrane halves; macromolecular permeation of cytoplasmic matrix; labelling of cross-fractured nucleoplasm, [w] *Proc. 8th Europ. Congr. Electron Microscopy*, Vol. 3, red. A. Csanady, P. Röhlich, D. Szabo, Budapest, 1757-1758, 1984.
- [110] PLATTNER H., Ultrarapid freezing and freeze-etching of cell monolayers and suspensions, [w] *Proc. 8th Europ. Congr. Electron Microscopy*, Vol. 3,

- red. A. Csanady, P. Röhlich, D. Szabo, Budapest 1984, 1731-1734.
- [111] PRICAM C., FISHER K. A., FRIEND D. S., Intramembranous particle distribution in human erythrocytes: effect of lysis, glutaraldehyde and poly-L-lysine, *Anat. Rec.*, **189**: 595-608, 1977.
- [112] PRZESTALSKI S., *Błony biologiczne*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1983.
- [113] PUMPLIN D. W., REESE T. S., LLINAS R., Are the presynaptic particles the calcium channels?, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**: 7210-7213, 1981.
- [114] PUMPLIN D. W., FAMBROUGH D. M., (Na^+, K^+) -ATPase correlated with a major group of intramembrane particles in freeze-fracture replicas of cultured chick myotubes, *J. Cell Biol.*, **97**: 1214-1225, 1983.
- [115] RASH J. E., ELLISMAN M. H., Studies of excitable membranes. I. Macromolecular specializations of the neuromuscular junction and the nonjunctional sarcolemma, *J. Cell Biol.*, **63**: 567-586, 1974.
- [116] RASH J. E., COPIO D. S., ELDEFRAWI M. E., HUDSON C. S., Practical labelling techniques for freeze-fracture, *J. Cell Biol.*, **75**: 247a, 1977.
- [117] RASH J. E., HUDSON S., GRAHAM W. F., MAYER R. F., WARNICK J. E., ALBUQUERQUE E. X., Freeze-fracture studies of human neuromuscular junctions. Membrane alterations observed in myasthenia gravis, *Lab. Invest.*, **44**: 519-530, 1981.
- [118] RAYNS D. G., SIMPSON F. O., BERTAUD W. S., Surface features of striated muscle: I. Guinea pig cardiac muscle, *J. Cell Sci.*, **3**: 467-474, 1968.
- [119] RAYNS D. G., Freeze etching studies on muscle, *Phil. Trans. Roy Soc. Lond. B.*, **261**: 139-142, 1971.
- [120] RIX E., SCHILLER A., TAUGNER R., *Histochemistry*, **50**: 91, 1978.
- [121] ROBERTSON J. D., Membrane structure, *J. Cell Biol.*, **91**: 3, Pt. 2, 189s-204s, 1981.
- [122] ROSENBLUTH J., Intramembranous particle distribution at the node of Ranvier and adjacent axolemma in myelinated axons of the frog brain, *J. Neurocytol.*, **5**: 731-745, 1976.
- [123] RUBEN G. C., The shadow widths of very small particles are formed independently of the metal cap build up on the particle, [w] *Proc. 39th Ann. Meet. EM Soc. Amer.*, red. G. W. Bailey, Atlanta, Georgia 1981, 568-569.
- [124] RUSH J. R., HUDSON C. S., red., *Freeze fracture: Methods, Artifacts, and Interpretations*, Raven NY, 1976, 1-204.
- [125] SATIR B., SCHOOLEY C., SATIR P., Membrane fusion in a model system. Mucocyst secretion in *Tetrahymena*, *J. Cell Biol.*, **56**: 153-176, 1973.
- [126] SCALES D., INESI G., Assembly of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membranes, *Biophys. J.*, **16**: 735-751, 1976.
- [127] SCHILLER A., RIX E., TAUGNER R., *Histochemistry*, **59**: 9, 1978.
- [128] SCHINZ R. H., LO M.-V. C., LARRIVEE D. C., PAK W. L., Freeze-fracture study of the *Drosophila* photoreceptor membrane: mutations affecting membrane particle density, *J. Cell Biol.*, **93**: 961-969, 1982.
- [129] SCHOTLAND D. L., BONILLA E. VAN METER M., Duchenne dystrophy: alteration in muscle plasma membrane structure, *Science*, **196**: 1005-1007, 1977.
- [130] SCHULTZ W. W., REYNOLDS R. C., Enhancement of three-dimensional appearance of freeze-fracture images by reversal processing of electron microscopy sheet film, *J. Microsc.*, **112**: Pt. 2, 249-252, 1977.
- [131] SEGREST J. P., GULIK-KRZYWICKI T., SARDET C. H., Association of the membrane-penetrating polypeptide segment of the human erythrocyte

- MN-glycoprotein with phospholipid bilayers, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3294-3298, 1974.
- [132] SEVERNS N. J., GREEN C. R., Rapid freezing of unpretreated tissues for freeze-fracture electron microscopy, *Biol. Cell.*, **47**: 193-204, 1983.
- [133] SEVERNS N. J., Freeze-fracture cytochemistry, [w] *Proc. 8th Europ. Congr. Electron Microscopy*, Vol. 3, red. A. Csanady, P. Röhlich, D. Szabo, Budapest 1984, 1747-1756.
- [134] SHEFFIELD J. B., Contribution of carbon to the image in freeze-fracture replication, [w] *Freeze-fracture: Methods, Artifacts and Interpretations*, red. J. E. Rash, C. S. Hudson, Raven Press, New York 1979, 169-174.
- [135] SHIBATA Y., IIDA H., YAMAMOTO T., Occurrence of membrane particle aggregates on the luminal surface of goldfish intestine revealed by quick-freezing, *J. Ultr. Res.*, **84**: 311-316, 1983.
- [136] SHIBATA Y., YAMAMOTO T., Cytoplasmic surface ultrastructures of cardiac gap junctions as revealed by quick-freeze, deep-etch replicas, *Anat. Rec.*, **214**: 107-112, 1986.
- [137] SIMPSON D. J., Rotary shadowed freeze-fracture replicas, *Balzers Report*, BB 800 013 DE 8006.
- [138] SINGER J. S., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- [139] SJÖSTRAND F. S., CASSELL R. Z., Structure of inner membranes in rat heart muscle mitochondria as revealed by means of freeze-fracturing, *J. Ultr. Res.*, **63**: 111-137, 1978a.
- [140] — The structure of the surface membranes in rat heart muscle as revealed by freeze fracturing, *J. Ultr. Res.*, **63**: 138-154, 1978b.
- [141] SJÖSTRAND F. S., The interpretation of pictures of freeze-fractured biological material, *J. Ultr. Res.*, **69**: 378-420, 1979.
- [142] — The structure of kidney mitochondria in low denaturation embedded and in freeze-fractured material, *J. Ultr. Res.*, **72**: 174-188, 1980.
- [143] — Electron microscopy of cellular components at the molecular level, [w] *Electron Microscopy in Human Medicine*, Vol. 11b, Special Techniques and applications, red. J. V. Johannessen, McGraw Hill 1983, 41-87.
- [144] SKRIVER E., MAUNSBACH A. B., JÖRGENSEN P. L., Ultrastructure of Na, K-transport vesicles reconstituted with purified renal Na, K-ATPase, *J. Cell Biol.*, **86**: 746-754, 1980.
- [145] SLAYTER H. S., High-resolution metal replication of macromolecules, *Ultra-microscopy*, **1**: 341-357, 1976.
- [146] SLEYTR U. B., ROBARDS A. W., Plastic deformation during freeze-cleavage: a review, *J. Microsc.*, **110**: Pt. 1, 1-25, 1977.
- [147] SMITH D. S., NJOGA A. R., LAYER M., JAILFORS A., Observations on freeze-fracture membranes of a Trypanosome, *Tiss. Cell*, **6**: 223-241, 1974.
- [148] SOWERS A. E., HACKENBROCK Ch. R., Lateral diffusion of intramembrane particles in a biomembrane: dependence of rates on intramembrane particle concentrations and membrane curvature, [w] *Proc. 39th Ann. Meet. EM Soc. Amer.*, red. G. W. Bailey, Baton Rouge, 560-561, 1981.
- [149] STAEHELIN L. A., Analysis and critical evaluation of the information contained in freeze-etch micrographs, [w] *Freeze-etching, Techniques and Applications*, red. E. L. Benedetti, P. Favard, Société Française de Microscopie Électronique, Paris 1973, 113-134

- [150] — The interpretation of freeze-etched artificial and biological membranes, *J. Ultr. Res.*, **22**: 326-347, 1968.
- [151] — Stereo electron microscopy applied to high resolution freeze-etch replicas, *Proc. Electron Microsc. Soc. Am.*, **28**: 306-307, 1970.
- [152] STAEHELIN L. A., BERTAUD W. S., Temperature and contamination dependent freeze-etch images of frozen water and glycerol solutions, *J. Ultr. Res.*, **37**: 146-168, 1971.
- [153] STAEHELIN L. A., HULL B. E., Junctions between living cells, *Sci. Amer.*, **238**, 5: 141-152, 1978.
- [154] STEERE R. L., MOSELEY M., New dimensions in freeze-etching, [w] *Proc. 27th Ann. Meet. El. Micr. Soc. Amer.*, red. C. J. Arcenaux, Claitor's Pub., Baton Rouge 1969, 202.
- [155] STEERE R. L., SOMMER J. R., Stereo ultrastructure of nexus faces exposed by freeze-fracturing, *J. Microsc.*, **15**: 205-218, 1972.
- [156] STEERE R. L., RASH J. E., Use of double-tilt device (goniometer) to obtain optimum contrast in freeze-fracture replicas, [w] *Freeze-fracture: Methods, Artifacts and Interpretations*, red. J. E. Rash, C. S. Hudson, Raven Press, New York 1979, 161-167.
- [157] STEERE R. L., Preparation of freeze-fracture, freeze-etch, freeze-dry, and frozen surface replica specimens for electron microscopy in the Denton DFE-2 and DFE-3 freeze-etch units, [w] *Current Trends in Morphological Techniques, II*, red. J. J. Johnson, CRC Press, Boca Raton, Florida 1981, 131-181.
- [158] STEINBACK K. E., RURKE J. J., MULLETT J. E., ARNTZEN C. J., The role of the light harvesting complex in cation-mediated grana formation, [w] *Chloroplast development*, red. G. Akoyunoglou i in., Elsevier/North Holland 1978, 389-400.
- [159] STOLINSKI C., LANDMANN L., ABT H., Design and application of a freeze-fracture stage with cleaver device for Balzers "freeze-etching" apparatus, *J. Microsc.*, **135**: 317-323, 1984.
- [160] TAO-CHENG J. H., ROSENBLUTH J., Membrane specializations in developing nodes of Ranvier, [w] *Proc. 38th Ann. Meet. EM Soc. Amer.*, red. G. W. Bailey, Baton Rouge, Claitor's Pub. Div., 1980, 626-627.
- [161] TILLACK T. W., MARCHESI V. T., Demonstration of the outer surface of freeze-etched red blood cell membranes, *J. Cell Biol.*, **45**: 649-653, 1970.
- [162] TILLACK T. W., SCOTT R. E., MARCHESI V. T., Cell membrane ultrastructure studied by freeze-etching, *Fed. Proc.*, **29**: 489, 1970.
- [163] — The structure of the erythrocyte membranes studied by freeze-etching, *J. Exp. Med.*, **135**: 1209-1227, 1972.
- [164] TONOSAKI A., YAMASAKI M., WASHIOKA H., MIZOGUCHI J., Photo-receptor disk membrane substructure by means of the complementary freeze-fracture-replica methods, [w] *9th International Congress on Electron Microscopy, II*, red. J. M. Sturgess, Toronto 1978, 156-157.
- [165] — Complementary freeze fracture methods applied to cattle disk membranes, *Arch. Histol., Jap.*, **43**: 2, 115-126, 1980.
- [166] TONOSAKI A., YAMASAKI M., WASHIOKA H., YAMASAKI M., MIZOGUCHI J., Double-replica topography of disk membrane structures in the carp (*Cyprinus carpio*), *J. Cell Sci.*, **42**: 33-41, 1980.
- [167] UNWIN N., HENDERSON R., The structure of proteins in biological membranes, *Sci. Amer.*, **2**: 78-94, 1984.

- [168] VERKLEIJ A. J., MOMBERS C. J., LEUMISSEN-BIJVELT J., VERVERAERT P. H. J. T., Lipidic intramembranous particles, *Nature*, **279**: 162-163, 1979.
- [169] VERKLEIJ A. J., Limitations and perspectives of freeze fracturing and freeze etching, [w] *Proc. 8th Europ. Congr. Electron Microscopy*, Vol. 3, red. A. Csanady, P. Röhlich, D. Szabo, Budapest 1984, 1729.
- [170] VERMA V., The presynaptic active zones in three different types of fibres in frog muscle, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **221**: 369-373, 1984a.
- [171] — A comparative study of the membrane structure in different types of muscle fibres in the frog, *Eur. J. Cell Biol.*, **35**: 122-128, 1984b.
- [172] — Innervation and membrane specialization at neuromuscular junctions in submaxillaris muscle of the frog, *J. Ultr. Res.*, **87**: 136-148, 1984c.
- [173] VERMA V., REESE T. S., Structure and distribution of neuromuscular junctions on slow muscle fibres in the frog, *Neurosci.*, **12**: 647-662, 1984.
- [174] VERVERGAERT P. H. J. Th., VERKLEIJ A. J., Lipidic intramembranous particles, [w] *9th International Congress on Electron Microscopy*, II, red. J. M. Sturgess, Toronto 1978, 154-155.
- [175] WEHRLI E., MÜHLETHALER K., MOOR H., Membrane structure as seen with a double replica method for freeze fracturing, *Exp. Cell Res.*, **59**: 336-339, 1969.
- [176] WEINSTEIN R. S., BULLIVANT S., The application of freeze-cleaving technics to studies on red blood cell fine structure, *Blood*, **29**: 780, 1967.
- [177] WEINSTEIN R. S., CLOVES A. W., McNUTT N. S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**: 1195, 1970.
- [178] WEINSTEIN R. S., KHODADAD J. K., STECK T. L., Fine structure of the Band 3 protein in human red cell membranes: freeze-fracture studies, *J. Supramol. Struct.*, **8**: 325-335, 1978.
- [179] — Ultrastructural characterization of proteins at the natural surfaces of the red cell membrane, [w] *The Red Cell*, Liss N.Y., 413-427, 1987.
- [180] — The Band 3 protein intramembrane particle of the human red blood cell, [w] *Membrane Transport in Erythrocytes*, Alfred Benzon Symposium 14, red. U. V. Lassen, H. H. Ussing, J. O. Wieth, Munksgaard, Copenhagen 1980, 35-50.
- [181] WEINSTEIN R. S., PAULI B. U., Freeze-fracture electron microscopy, [w] *Electron Microscopy in Human Medicine*, Vol. 11b, Special Techniques and Applications, J. V. Johannessen ed. McGraw Hill Inter. Book Co., 1-37, 1983.
- [182] WILLISON J. H. M., ROWE A. J., Replica, shadowing and freeze-etching techniques, [w] *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 8, A. M. Glauert ed. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, NY, Oxford 1980.
- [183] YU J., BRANTON D., Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein Band 3 and lipid: effects of spectrin-actin association, *Proc. Nat. Sci. USA*, **73**: 3891-3895, 1976.
- [184] ZINGSHEIM H. P., PLATNER H., Electron microscopic methods in membrane biology, [w] *Methods in Membrane Biology*, Vol. 7, red. E. D. Korn, Plenum NY and London 1976, 1-146.

Otrzymano: 9 grudnia 1987.

Przyjęto: 23 grudnia 1987.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

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

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

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

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

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

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

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TREŚĆ

- J. LIMON, B. NEDOSZYTKO, Zjawisko asymetrii bocznej heterochromatyny konstytutywnej chromosomów metafazowych człowieka 117
- J. SALWA, Podstawy genetycznej indukcji nowotworów komórek plazmatycznych 141
- A. WASIK, Czy można regulować tempo fagocytozy u orzęsków? 153
- L. KORDYLEWSKI, Białkowa komponenta błony komórkowej w badaniach metodą kriorytownictwa . . . 171