

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

Postępy Biologii Komórki

TOM 4 · NR 3

1977 (225–322)

PWN – WARSZAWA

<http://pau.oxfordjournals.org/>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 490 + 110 egz. Ark. wyd. 9. Ark. druk. $6\frac{1}{8} \div \frac{3}{4}$ wkl. Papier druk. sat. XII kl. 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania w kwietniu 1977 r. Podpisano do druku w sierpniu 1977 r.
Druk ukończono w sierpniu 1977 r. Zam. 1269/77. G-15. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

BIAŁKA POWIERZCHNI KOMÓRKI ZWIĄZANE Z TRANSFORMACJĄ NOWOTWOROWĄ

Ryszard FARBISZEWSKI

Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii
Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Opisano różnice w zawartości glikoproteidów w ich składzie na powierzchni komórek transformowanych wirusami onkogennymi i komórek prawidłowych. Zwrócono szczególną uwagę na glikoproteid „LETS”, który jest uwalniany z powierzchni komórek transformowanych do płynu odżywczego. Cechami charakterystycznymi tego glikoproteidu są wysoki ciężar cząsteczkowy i niezwykła wrażliwość na proteazy. Glikoproteid ten jest wykrywany metodami znakowania powierzchni komórki i metodami immunologicznymi. Ponadto krótko opisano hipotetyczne przyczyny zmian w glikoproteidach na powierzchni komórek transformowanych oraz następstwa tych zmian dla funkcji błony komórkowej i samej komórki.

Struktura błon komórek zwierzęcych została dość dokładnie poznana. Ułożenie składników lipidowych i glikoproteidowych decyduje o ich funkcji. Białka trwale wbudowane w podwójną warstwę lipidów nazwali Singer i Nicolson [74, 75] białkami integralnymi błony. Wśród nich występują enzymy, białka antygenowe, białka transportowe i białka receptorowe dla lektyn. Białka przyłączone do powierzchni wiązaniami niekowalencyjnymi określono terminem białek peryferyjnych lub zasocjowanych z błoną komórkową albo białkami płaszcza puszystego (fuzzy-coat proteins).

Głównymi składnikami zewnętrznej warstwy błony komórkowej są glikoproteidy, glikolipidy i glukozaaminoglukany tworzące tzw. płaszcz powierzchniowy, zwany glikokaliksem.

Informacje o organizacji i położeniu cząsteczek występujących od strony powierzchni komórki mają istotne znaczenie dla zrozumienia funkcji błony i dla możliwości sterowania wewnętrznymi procesami komórki. Dane powyższe można uzyskać stosując metody znakowania

powierzchni błon komórkowych, w których znacznik trwale wiąże się ze składnikami powierzchni, nie uszkadza komórki. Sposoby znakowania powierzchni komórki zostały ostatnio przedstawione przez Kawiaka [41].

W ostatnich latach nagromadzono dane wskazujące, że składniki powierzchniowe komórki odgrywają rolę w regulacji podstawowych funkcji i właściwości komórki, takich jak podział i różnicowanie. Ponadto zmiany w strukturze cząsteczkowej powierzchni i zmiany składników powodują modyfikację sposobu rozrostu komórek po ich transformacji. Uważa się, że zmiany na powierzchni komórek są odzwierciedleniem zmian wywołanych w jej aparacie genetycznym przez czynnik powodujący transformację nowotworową. Dokładne poznanie tych zmian może być pomocne w wyjaśnieniu procesu złośliwienia. O zmianach powierzchniowych błon komórek towarzyszących transformacji wirusowej oraz roli błony w procesie transformacji traktują prace przeglądowe Grzelakowskiej - Sztabert [26] oraz Farbiszewskiego i Worowskiego [19].

Szybki postęp badań w ostatnich latach nad białkami powierzchniowymi komórki transformowanej i nowotworowej świadczy o wadze omawianego zagadnienia i skłania nas do dokonania przeglądu nowych osiągnięć w tej dziedzinie.

I. ZMIANY W BIAŁKACH POWIERZCHNI KOMÓREK TRANSFORMOWANYCH WIRUSAMI ONKOGENNYMI

Liczne doniesienia literaturowe omawiające zmiany w białkach powierzchni błony podczas transformacji fibroblastów dotyczą zarówno wzrostu, jak i spadku lub utraty białek. W piśmiennictwie wymienianych jest co najmniej 8 białek o różnym ciężarze cząsteczkowym, które ulegają zmianie podczas procesu transformacji nowotworowej.

Niektóre dane o tych białkach zebrano w tabeli 1.

1. GLIKOPROTEID LETS

Najwięcej miejsca w literaturze poświęcono wielocząsteczkowemu białku, które jest uwalniane z powierzchni komórek transformowanych do środowiska, a określane jest przez wielu autorów różnymi nazwami: białko LETS — large, external, transformation - sensitive [24], glikoproteid LETS [33, 34, 36], galaktoproteid a [22, 23], białko powierzchniowe 250 K [32, 33], składnik Z [66], białko CSP (cell surface protein) [93]. Nazwa białka „LETS” lub glikoproteidu „LETS” wydaje się być najbardziej odpowiednią, określa bowiem lokalizację i niektóre właściwości omawianego białka.

Niektóre dane dotyczące białka LETS uwalnianego z błon komórek transformowanych wirusami onkogennymi oraz metody jego wykrywania przedstawia tabela 2.

TABELA 1. Białka związane z powierzchnią komórki ulegające zmianie podczas transformacji

Nazwa białka lub symbol	Ciężar cząst. $\times 10^{-3}$	Typ komórki	Transformujący wirus	Metoda wykrywania	Spadek — wzrost	Literatura
1. LETS	210 — —	NIL-fibroblasty Ludzkie fibroblasty płuc Różne fibroblasty ludzkie	HSV, Py — SV40	Jodowanie katalizowane lakto-peroksydazą Testy immunologiczne	spadek	32, 36 59 89
2. Miozyna	200	L 929, NRK MEF, 3T3 NRK	MSV	Immunofluorescencja Mikroskopia elektronowa Frakcjonowanie błon	50% spadek	86 58 57
3. Aktyna	45 50	CEF CEF	ASV ASV	Znakowanie Frakcjonowanie błon	spadek	29, 66, 83
4. Ω	210	CEF	RSV	Znakowanie	brak	83, 84
5. Δ	46–47	CEF	RSV	Frakcjonowanie błon	spadek	29, 66, 85
6. SF-145	145	CEF	RSV	Frakcjonowanie błon	spadek	87
7. TSSA	100	CEF	ASV	Znakowanie, immunoprecypitacja Immunoprecypitacja	wzrost	76
—	95	CEF	ASV	Znakowanie i frakcjonowanie błon	wzrost	40
—	90	CEF	ASV	Znakowanie	pojawia się	76
—	73	CEF	ASV	Znakowanie	wzrost	66, 83, 84
—	79	NRK CEF	RSV	Frakcjonowanie błony „	spadek	9
8. MP-1	142	CEF	RSV	Znakowanie	brak	

Użyte skróty: CEF — fibroblasty zarodka kurcząt, BHK — fibroblasty nerki noworodka chomika, RSV — wirus mięsaka Rousa, ASV — wirus mięsaka ptaków, MSV — wirus mięsaka myszy, SV40 — wirus małpi, Py — wirus polyoma, HSV — wirus mięsaka chomika.

TABELA 2. Spadek zawartości białka LETS w błonach komórek transformowanych przez wirusy onkogenne

Gatunek	Typ komórki	Transformujący wirus	Metoda wykrycia	Literatura
Człowiek	Fibroblasty płuc	—	Jodowanie katalizowane lakto-peroksydazą	59
	Różne fibroblasty	SV-40	Testy immunologiczne	88
Kura	Fibroblasty CEF	ASV	Jodowanie katalizowane lakto-peroksydazą Testy immunologiczne Znakowanie i frakcjonowanie błon	32, 38, 84 76
	Prawidłowa linia komórkowa nerek szczura	ASV	Znakowanie i frakcjonowanie błon	76
Mysz	Myoblasty L 8	ASV	Jodowanie i katalizowanie lakto-peroksydazą	37 28
	3T3, 3T6	SV40, Py, MSV		
Chomik	Fibroblasty NIL	HSV, Py		32, 36
	Fibroblasty BHK	Py	Znakowanie katalizowane oksydazą galaktozy Znakowanie katalizowane lakto-peroksydazą	11, 22 32, 60
			Znakowanie katalizowane oksydazą galaktozy	23

Skróty: CEF — fibroblasty zarodka kurcząt, BHK — fibroblasty nerki noworodka chomika, SV40 — wirus małpi, ASV — wirus mięsaka ptaków, Py — wirus polyoma, MSV — wirus mięsaka myszy, HSV — wirus mięsaka chomika.

Charakterystycznymi cechami tego glikoproteidu są:

1. Wysoki ciężar cząsteczkowy, wynoszący około 210 000–270 000 ~~dal-~~ tonów [28, 32, 38, 93].

2. Niezwykła wrażliwość na proteazy. Nawet bardzo niskie stężenia trypsyny usuwają białko LETS z powierzchni komórek prawie całkowicie [32, 36, 38, 84].

3. Jest on wykrywany metodami znakowania powierzchni komórki: enzymatycznym jodowaniem reszt tyrozyłowych i histydyłowych białek powierzchni [28, 35, 36, 38, 60, 72], utlenianiem końcowych reszt galaktozy i galaktozaminy w pozycji 6, z równoczesną redukcją grup aldehydowych trytowanym borowodorkiem [11, 12, 22, 25] oraz metodami immunologicznymi [43, 44, 81, 87].

4. Jest on syntetyzowany w komórce przez własny aparat biosyntezy białka [11, 36, 66, 76, 93]. Komórki w logarytmicznej fazie wzrostu posiadają na swej powierzchni mniejsze ilości tego glikoproteidu niż ko-

mórki będące w fazie spoczynkowej — Go [11, 33, 35, 23, 60]. Pobudzenie komórek do podziału powoduje spadek zawartości tego glikoproteidu na powierzchni błon.

5. Brak lub niedobór glikoproteidu LETS na powierzchni błon fibroblastów i mioblastów transformowanych wirusami onkogennymi i chemicznymi czynnikami karcinogennymi [9, 23, 32, 33, 35–38, 59, 66, 76, 93]. Metodami enzymatycznego znakowania wykazano zmienną organizację powierzchniowych składników błony w cyklu komórkowym. Wysoki poziom glikoproteidu LETS jest charakterystyczny dla komórek prawidłowych będących w fazie spoczynkowej; mniejsza jego ilość znajduje się na powierzchni błon komórek w fazach cyklu G_1 , S, G_2 , a najmniejsza w fazie mitotycznej [31, 35].

Synteza glikoproteidu LETS nie jest całkowicie zahamowana w komórkach transformowanych, gdyż — jak się ostatnio uważa — identyczny z tym glikoproteidem antygen powierzchniowy komórek (SFA) jest wykrywany w pożywce nad warstwą komórek transformowanych [88]. Dotychczas nie ustalono, czy synteza tego glikoproteidu kontynuowana jest z taką samą szybkością jak w prawidłowych komórkach, czy syntetyzowana jest kompletna cząsteczka, czy też zmieniona. Należy przypuszczać, że glikoproteid LETS jest usuwany z powierzchni błon przez własne proteazy wydzielane przez komórki transformowane [33]. Schnebli [71] wykazał, że transformowane fibroblasty myszy degradują ze znacznie większą szybkością znakowane trytem substraty białkowe niż nietransformowane komórki. Transformowane komórki, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, wydzielają enzymy proteolityczne katepsynopodobne na powierzchnię błony [77]. Sylven i wsp. [77] stosując specyficzne przeciwciała znakowane fluoresceiną, skierowane przeciwko katepsynie B_1 , wykazali jej obecność na powierzchni komórek transformowanych. Lipkin i Knecht [45] potwierdzili, że transformowane komórki chomika wiążą znacznie większą ilość przeciwciał wobec antykatepsyny B_1 w porównaniu do linii komórek nietransformowanych.

Ponadto zaobserwowano uwalnianie przez komórki transformowane proteaz o centrach serynowych, które aktywują plazminogen surowicy do plazminy [10, 90]. Enzym ten jest zdolny do trawienia fibryny [55, 56, 91]. Wydzielanie enzymu przez transformowane komórki myszy, chomika, szczura [56] oraz przez ludzkie komórki nowotworowe [65] jest wyższe niż przez odpowiadające im komórki prawidłowe. Stwierdzono ponadto, że glikoproteid LETS jest wrażliwy na plazminę [9]. Dowodem tego są doświadczenia ze znakowanym LETS. W przypadku zmieszania komórek transformowanych z komórkami prawidłowymi, stwierdza się utratę znakowanego LETS z powierzchni błon komórek prawidłowych [33]. Uważa się ponadto, że plazmina jest również odpowiedzialna za zmiany morfologiczne komórek transformowanych [55].

Stwierdzono, że dodanie do hodowli różnych linii komórek prawidłowych proteaz, jak trypsyny, subtilizyny, ficyny, pronazy, chymotrypsyny i bromeliny, powoduje usunięcie glikoproteidu LETS z powierzchni błon [6, 78]. Ostatnio zaobserwowano, że trombina, enzym o wybiórczej swoistości działania, jest zdolna również usuwać glikoproteid o masie cząsteczkowej około 200 000 z powierzchni komórek prawidłowych [79].

Wyniki badań z inhibitorami proteolizy dodawanymi do komórek transformowanych i prawidłowych z równoczesną obserwacją glikoproteidu LETS nie rozstrzygnęły ostatecznie, czy proteazy są pierwotnym, czy wtórnym czynnikiem wywołującym zmiany w zawartości glikoproteidu na powierzchni błon komórek transformowanych.

Badania nad kinetyką zmian zawartości białka LETS na powierzchni komórek prawidłowych podczas procesu transformacji prowadziło wielu autorów. Jednak wyniki badań nie są zgodne. Robbins i wsp. (cyt. według [34]) zaobserwowali niewielki spadek włączania prekursorów do składników powierzchni komórek po kilku dniach od wywołania transformacji. Stone i wsp. [76] stwierdzili zmniejszenie szybkości włączania znakowanych prekursorów do glikoproteidów błon po upływie 48–72 godzin, po zadziałaniu czynników transformujących. Spadek ten wyprzedzał w czasie zmiany morfologiczne komórki. Natomiast Isaka i wsp. [40] techniką znakowania wykazali różnice w szybkości syntezy białek powierzchniowych po 6–7 godzinach po transformacji komórek. Różnice te przebiegały równolegle ze zmianami fenotypowymi komórki. Według Hynes i Wyke [38], zmiany fenotypowe komórki następują po utracie glikoproteidu LETS. W komórkach łagodnie transformowanych glikoproteid LETS nie jest usuwany z powierzchni błon [12].

Ostatnio Pietras i Szego [62] stwierdzili w badaniach *in vitro* zmiany we właściwościach komórek nabłonkowych pęcherza moczowego i macicy szczurów już po 30 min działania chemicznego czynnika kancerogenego na te komórki. Pośrednim dowodem świadczącym o zaburzeniach w integralności błon komórkowych był wzrost aktywności katepsyny B₁ na powierzchni komórek i w pożywce. Autorzy podkreślają szczególną zgodność tych obserwacji *in vitro* z danymi uzyskanymi przez innych autorów *in vivo*. W tkance nowotworowej pęcherza moczowego u ludzi [8] i narządu rodowego u kobiet [5] oraz w płynach pozakomórkowych tkanek nowotworowych [7] stwierdzono znaczny wzrost aktywności peptydaz i kwaśnych proteaz lizosomalnych.

2. ANTYGEN POWIERZCHNI KOMÓRKI — SF ANTYGEN (SFA)

Antygen powierzchniowy fibroblastów zarodka kurcząt wykryli w 1973 r. Ruoslahti i wsp. [67], w rok później opisano antygen ludzkich fibroblastów [68]. Ostatnio wykazano obecność antygeny na powierzchni

komórek gleju ludzkiego, natomiast nie stwierdzono go w komórkach nowotworowych glejaka [89]. Na podstawie sączenia molekularnego, ruchliwości elektroforetycznej na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS i ultrawierowania wykazano, że SFA składa się z 2 frakcji o masie cząsteczkowej około 210 000 i 145 000 daltonów [87, 88]. Glikoproteidom tym nadano nazwy SF-210 i SF-145. Dotychczas nie ustalono, czy antygen SF-145 jest identyczny z białkiem błon fibroblastów zarodka kurcząt, wykrytym przez Bussela i Robinsona [9] o masie cząsteczkowej 142 000 daltonów. Glikoproteid ten, aczkolwiek posiada masę cząsteczkową zbliżoną do SF-145, nie jest tak wrażliwy na trypsynę, jak antygeny SF-210 i SF-145.

Zaobserwowano, że białko powierzchni komórek, wędrujące podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym razem z oczyszczoną aktyną fibroblastów (masa cząsteczkowa 45 000 daltonów), użyte jako antygen, w badaniach immunologicznych daje identyczne linie precypitacyjne jak SFA [44, 92].

Obecnie uważa się, że antygen powierzchniowy SFA jest glikoproteidowym kompleksem złożonym co najmniej z trzech glikopeptydów o masie cząsteczkowej 210 000, 145 000 i 45 000 daltonów i zlokalizowanym prawdopodobnie w strukturach włókienkowych fibroblastów (cyt. według [93]). Wskazują na to badania immunofluorescencyjne [81].

Antygen ten jest wrażliwy na proteazy i może być usuwany z powierzchni błon fibroblastów transformowanych wirusami onkogennymi [24, 93]. Wymienione właściwości antygeny odpowiadają glikoproteidowi LETS. Nie jest wykluczone, że LETS i SFA są identycznymi glikoproteidami [43].

Obecność SFA wykazano również w ludzkiej surowicy i osoczu [69]. Stwierdzono ponadto, że poziom SFA w surowicy może ulegać znacznemu zmniejszeniu w przypadku powstawania skrzepu w niskiej temperaturze. Podwyższenie temperatury skrzepu do 37°C przyczynia się do uwolnienia antygeny i znacznego wzrostu jego zawartości w surowicy. Ruoslahti i Vaheri [69] tłumaczą to zjawisko interakcją fibrynogenu lub fibryny w niskich temperaturach z rozpuszczalnym antygenem powierzchniowym SFA i następnie adsorpcją jego na skrzepie.

3. AKTYNA

Aktyna jest białkiem występującym w strukturach włókienkowych komórek — mikrofilamentach, zlokalizowanych u podstawy błon komórkowych i biegnących równolegle do niej, wewnątrz błony oraz w cytoplazmie [17, 27, 50, 51, 53, 61]. Przyjmuje się, że funkcja mikrofilamentów związana jest z ruchem komórki [52]. Porównawcze badania nad ultrastrukturą komórek transformowanych wirusami onkogennymi i od-

powiadających im komórek prawidłowych doprowadziły do zgodnego poglądu o zmianach w organizacji i rozmieszczeniu mikrofilamentów w komórkach transformowanych.

Wyniki badań immunofluorescencyjnych z użyciem przeciwciał przeciwko aktynie wskazują na spadek tego białka o około 30 do 50% w komórkach transformowanych [29, 85]. Pollack i wsp. [63] stwierdzili znaczny ubytek mikrofilamentów zawierających aktynę po transformacji nowotworowej. Podobne obserwacje poczynili McNutt i wsp. [50], Hubbard i Cohn [29] na fibroblastach zarodka kurcząt transformowanych wirusem mięsaka Rousa i Gruenstein i wsp. [25] na fibroblastach myszy i komórkach HeLa. Black i wsp. [4] wykazali poza ubytkiem mikrofilamentów w komórkach transformowanych myszy SV3T3 chaotyczne ich rozmieszczenie u podstawy błony komórkowej. Culp [13] ponadto stwierdził, że komórki transformowane wirusami SV40 i MSV, hodowane *in vitro* wydzielają aktynę do płynu odżywczego. Autor ten [14] uważa, że rozmieszczona w mikrofilamentach pod powierzchnią błony i w jej wnętrzu aktyna odgrywa ważną rolę we wzajemnym oddziaływaniu komórek i w oddziaływaniu komórek z różnymi powierzchniami.

Odmienne wyniki uzyskano na podstawie badań ultrastruktury nowotworowych komórek inwazyjnych pochodzenia nabłonkowego w porównaniu do komórek transformowanych wirusami onkogennymi. McNutt [49], zaobserwował wzrost ilości mikrofilamentów u podstawy błon komórek nowotworowych nabłonka skóry. Podobnie Malech i Lentz [46] stwierdzili wzrost ilości mikrofilamentów w inwazyjnych komórkach nowotworowych naskórka u myszy wzbudzanych przez chemiczne czynniki karcinogenne. Autorzy ci uważają, że wzrost ilości tych mikrostruktur jest charakterystyczny dla komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań Gabbianiego i wsp. [20, 21], którzy wykazali wzrost mikrofilamentów w komórkach nowotworowych naskórka i komórkach gruczolakoraka ludzkiej tkanki.

Odmienność wyników badań nad mikrofilamentami komórek transformowanych wirusami onkogennymi *in vitro* i komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego *in vivo* wskazuje na potrzebę dalszych badań nad stanem fizykochemicznym aktyny i jej właściwościami. Stwierdzono, że cząsteczki tego białka wykazują zdolność polimeryzacji w zależności od warunków środowiska.

4. MIOZYNA

Białkiem wykazującym związek z błoną komórkową jest miozyna. Metodami immunologicznymi wykazano obecność tego białka na powierzchni komórek zarodka kurczęcia i komórek wątroby [42], niektórych komórek gryzoni i komórek HeLa [86] oraz fibroblastów linii WI38 [57].

Niektórym autorom nie udało się jednak wykazać obecności miozyny na powierzchni linii komórkowych WI38 [58]. Ostlund i wsp. [57] zaobserwowali, że całkowita ilość miozyny w błonie prawidłowych komórek nerki szczura zmniejsza się podczas procesu transformacji nowotworowej, wywołanej przez wirus mięsaka myszy. Ostatnio Culp [14] wykazał metodami immunologicznymi, iż fibroblasty transformowane nowotworowe podczas hodowli *in vitro* wydzielają miozynę do pożywki.

Niektórzy autorzy uważają, że miozyna łącznie z aktyną zlokalizowaną u podstawy błon, w ich wnętrzu i na powierzchni błony jest odpowiedzialna za prawidłowy kształt komórki, za jej ruchliwość i adhezję [48, 52, 70]. Asocjacja tych białek ze składnikami powierzchni błony działa stabilizująco na błonę [39]. Utrata glikopeptydów z powierzchni komórek spowodowana transformacją — zdaniem wielu autorów — przyczynia się do wzrostu „płynności” błony [3, 18, 30, 73], modyfikacji aktywności markerów enzymatycznych błony i zmian fenotypowych komórki [38].

Dane dotyczące zmian zawartości miozyny w błonach komórek transformowanych są skąpe.

5. INNE BIAŁKA

Bussel i Robinson [9] scharakteryzowali białka powierzchni fibroblastów zarodka kurzego, uwalniane w trakcie hodowli do płynu inkubacyjnego i określili ich masę cząsteczkową na 142 000 daltonów. Kuusela i wsp. [44] wyizolowali z powierzchni fibroblastów białko uwalniane z błon o masie cząsteczkowej 145 000 daltonów. Na podstawie różnicy w szybkości włączania znakowanych prekursorów do obu białek i podatności ich na trawienie trypsyną uważa się, że białka te nie są identyczne. Glikoproteid o masie cząsteczkowej 145 000 daltonów należy prawdopodobnie do kompleksu białek związanych z antygenem powierzchniowym SFA.

Robbins [66] opisał dwa wielkocząsteczkowe białka uwalniane z błon fibroblastów zarodka kurcząt transformowanych RSV. Jedno, o masie cząsteczkowej 206 000 daltonów zwane białkiem Ω , które nie jest wrażliwe na proteazy i niedostępne do jodowania. Drugie białko o nieco większej masie cząsteczkowej, łatwo jodowane, wrażliwe na enzymy proteolityczne, odpowiadające białku LETS.

Wielu autorów opisało zmiany w glikoproteidach powierzchni komórek transformowanych, polegające na ich wzroście lub zwiększeniu niektórych tylko jego składników.

Warren i wsp. [80], za pomocą podwójnego znakowania ^{14}C i ^3H 1 - fukozą oraz glukozaminą melanocytów myszy, wykazali znaczny wzrost glikopeptydów bogatych w kwas sialowy i zawierających fukozę w gliko-

proteidach powierzchni błon tych komórek. Zawartość glikopeptydów pochodzących z glikoproteidowych powierzchni prawidłowych komórek różnych tkanek myszy lub fibroblastów była znacznie niższa. Wyraźnie zmniejszona była również ilość impulsów ^{14}C i ^3H w szczycie glikopeptydowym otrzymanym po rozdziale glikoproteidów powierzchni błon tych komórek.

Ogata i wsp. [54], za pomocą chromatografii powinowactwa na Sephadexie z konkanawaliną A, wyizolowali z komórek BHK, transformowanych wirusem polyoma, wielkocząsteczkowy glikopeptyd znakowany fukozą, bogaty w kwas sialowy. Glikopeptyd ten wykazywał duże podobieństwo do peptydu wyizolowanego przez Warrena i wsp.

Opisane badania nad włączaniem znakowanych prekursorów do białek powierzchni komórek transformowanych, jak również badania z zastosowaniem technik znakowania powierzchni, pozwoliły ustalić zależność pomiędzy utratą lub wzrostem glikopeptydów powierzchni komórek a procesem transformacji nowotworowej.

II. PRZYCZYNY ZMIAN W BIAŁKACH POWIERZCHNI KOMÓREK PO TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Zmiany w glikoproteidach powierzchni komórek transformowanych są różnorodne. Z przedstawionych danych wynika, że dotyczyć one mogą bądź pojawiania się nowych komponent glikoproteidowych lub glikopeptydowych, bądź utraty lub zmniejszania ilości tych związków na powierzchni komórek. Istnieć mogą również zmiany jakościowe w białkach powierzchni komórek bez zmian ich ilości. Dotychczas jednak nie ustalono, jaki czynnik wewnątrzkomórkowy lub wewnątrz błonowy jest odpowiedzialny za zmiany w glikoproteidach na powierzchni błon komórek transformowanych.

Glikopeptydy i glikoproteidy, których ilość wzrasta po transformacji, są szczególnie interesujące ze względu na możliwość pojawiania się nowych antygenów nowotworowych, które są odpowiedzialne za odczyny immunologiczne gospodarza.

Zmiany w białkach powierzchni komórek towarzyszące transformacji mogą zależeć od wielu czynników i nie można ich tłumaczyć wyłącznie bezpośrednim działaniem wirusów onkogennych i kancerogenów na błonę komórkową, penetracją ich do wnętrza i zmianami w genomie komórki, a następnie zmienionymi mechanizmami biosyntezy glikoproteidów.

Zdaniem niektórych autorów, białka antygenowe pojawiające się w przypadkach transformacji wirusami onkogennymi powstają w wyniku zmian aktywności enzymatycznych sterujących syntezą składników błon [15].

Niektórzy autorzy sugerują, że pojawianie się nowych białek i gliko-

proteidów na powierzchni komórek transformowanych może być spowodowane rozpadem wielkocząsteczkowych komponent wewnątrzkomórkowych, a następnie ich „wędrowką” przez błonę na jej powierzchnię [12].

Przyjmuje się obecnie, że pojawienie się antygenów na błonie transformowanej komórki jest wyrazem modyfikacji genomu komórki, niezależnie od tego, czy są wynikiem wbudowania się kwasów nukleinowych wirusa onkogenego do genomu transformowanej komórki, czy też zmienioną ekspresją własnego materiału genetycznego komórki [16].

Przyczyny spadku, względnie utraty glikoproteidów na powierzchni błon komórek transformowanych mogą być różnorodne. Według Hyneisa [34] czynnik transformujący komórkę może powodować:

(a) zmianę w syntezie glikoproteidów poprzez całkowite przerwanie syntezy, zmniejszone wytwarzanie białka lub niekompletną albo zmniejszoną syntezę (zmiany w glikozylacji lub rozpad prekursorów),

(b) przyśpieszenie utraty białka z powierzchni błony spowodowane skróceniem okresu połowicznego rozpadu białka.

Wymienione możliwości mogą zachodzić w różnych kombinacjach. Na podstawie szybkości włączania znakowanych prekursorów, przypuszcza się, że okres połowicznego rozpadu glikoproteidów błon komórek transformowanych jest krótszy niż glikoproteidów błon komórek prawidłowych [47, 64]. Ponadto sugeruje się, że przyczyną mogą być proteazy, pojawiające się na powierzchni komórek transformowanych.

III. SKUTKI ZMIAN W GLIKOPROTEIDACH POWIERZCHNI KOMÓREK TRANSFORMOWANYCH

Różnice w poziomie glikoproteidów na powierzchni komórek prawidłowych i transformowanych oraz odmiennosc ich składu, wynikająca ze zmienionych w wyniku transformacji wirusowej mechanizmów biosyntezy tych związków, są przyczyną zmian we właściwościach błon komórkowych. Dziś sądzi się powszechnie, że szybki i wielowarstwowy wzrost komórek transformowanych, obserwowany w howoli *in vitro*, zmniejszenie przyczepności do podłoża, łatwość ulegania aglutynacji i zmiany szybkości transportu do tych komórek cukrów i aminokwasów są związane ze zmianą powierzchni komórki. Czy opisane zmiany we właściwościach komórek transformowanych i nowotworowych powstają w wyniku naruszenia integralności błon komórkowych, jest sprawą nie wyjaśnioną. Zdania autorów są podzielone. Jedni sądzą, że w następstwie utraty wielkocząsteczkowych glikopeptydów dochodzi do wzrostu labilności błony komórkowej [3, 18, 30]. Jednak wyniki badań nad organizacją błon komórek nowotworowych i transformowanych oparte na zjawisku elektronowego rezonansu paramagnetycznego [39] oraz fotolizy

laserowej (pulsed laser photolysis) [18] i badania depolaryzacji fluorescencyjnej błon [73] są kontrowersyjne.

Badania ze znakowanymi cząsteczkami złota koloidalnego, przeprowadzone na prawidłowych i transformowanych komórkach, wskazują nawet na szybsze ich przemieszczanie przez błony komórek prawidłowych niż transformowanych [1, 2]. Huggins i wsp. [30] przypisują duże znaczenie w stabilności błony komórkowej, wytwarzaniu kompleksów między glikopeptydami uwolnionymi z powierzchni komórki a białkami wewnątrz błonowymi i podbłonowymi umieszczonymi w strukturach włókienkowych komórek. Mimo braku bezpośrednich dowodów na istnienie takich kompleksów Hynes [34] sądzi, że czynniki onkogenne transformujące komórki mogą powodować ich rozpad, uwolnienie z powierzchni błony i pojawienia się odmiennych właściwości komórek.

Ostatnio wykazano w badaniach elektronomikroskopowych ludzkich komórek nowotworowych inwazyjnych pęcherza moczowego spadek ilości tzw. cząstek wewnątrz błonowych (intramembrane particles), określanych jako integralne białka błony lub białka amfipatyczne. W większości tych komórek rozmieszczenie cząsteczek jest przypadkowe i chaotyczne [82]. Nieinwazyjne komórki nowotworowe cechuje wzrost cząstek wewnątrz błonowych i ich regularne rozmieszczenie wewnątrz błony komórkowej.

Weinstein [82] uważa, że cząstki wewnątrz błonowe pozostają we wzajemnej zależności od peryferyjnych białek błony i w prawidłowych komórkach ich rozmieszczenie jest regulowane obecnością glikoproteidów błony. Utrata ich z powierzchni komórek transformowanych i komórek nowotworowych inwazyjnych powoduje zaburzenia w utrzymaniu cząstek wewnątrz błonowych i zmianę rozmieszczenia.

Pogląd Weinsteina wydaje się być podobny do zaproponowanej przez Hugginsa i Hynesa hipotezy o tworzeniu kompleksów między glikoproteidami powierzchni błony a białkami integralnie związanymi ze strukturą błon.

Glikopeptydy usuwane z powierzchni komórek transformowanych spełniają ważną rolę biologiczną. Autoradiograficzne dowody wskazują, że są one ważnym czynnikiem w adhezji międzykomórkowej [13, 14]. Potwierdzają to wcześniejsze wyniki badań Yamady i wsp. [94], świadczące o znaczeniu tych związków we wzajemnej zlepności komórek transformowanych.

Ostatnio ukazała się praca Keski - Oja, w której autor nazywa glikoproteid — uwalniany do środowiska z powierzchni fibroblastów transformowanych nowotworowo — fibronektyną, dla podkreślenia jego powiązań z fibryną i strukturą włókienkową (Keski - Oja, J., Polymerization of a major surface-associated glycoprotein, fibronectin, in cultured fibroblasts, FEBS Letters, 71: 325-329, 1976). Stwier-

dzono, że glikoproteid ten może być substratem dla transglutaminazy osoczowej (XIII czynnika krzepnięcia, aktywowanego trombiną) i wiązać się krzyżowo w obecności jonów wapnia z ϵ -aminową grupą lizyny drugiej cząsteczki glikoproteidu lub z ϵ -aminową grupą lizyny pochodzącą od fibryny, tworząc wielkocząsteczkowy kompleks białkowy (Keski-Oja, J., Mosher, D. F. and Vaheri, A., Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIII, *Cell*, 9: 29-35, 1976).

LITERATURA

- [1] ALBRECHT - BÜHLER G., A quantitative difference in the movement of marker particles in the plasma membrane of 3T3 mouse fibroblasts and their polyoma transformants, *Exp. Cell Res.*, 78: 67-70, 1973.
- [2] ALBRECHT - BÜHLER, G., YARNELL M. M., A quantitation of movement of marker particles in the plasma membrane of 3T3 mouse fibroblasts. Experimental methods, *Exp. Cell Res.*, 78: 59-66, 1973.
- [3] BARNETT R. E., FURCHT L. T., SCOTT R. E., Differences in membrane fluidity and structure in contact-inhibited and transformed cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 1992-1994, 1974.
- [4] BLACK P. H., CHOU I. N., ROBLIN R., Differences in surface membrane components between normal, viral-transformed and revertant cells, [w] *Cell Biology and Tumor Immunology Vol. 1.* red P. Bucalossi i wsp., Excerpta Medica American Elsevier, 1975, 1: 119-129.
- [5] BLACKWOOD C. E., MANDL I., LONG M. E., Proteolytic enzymes and their inhibitors in human gynecological tumors, *Am. J. Gynec.*, 91: 419-429, 1965.
- ✓ [6] BLUMBERG P. M., ROBBINS P. W., Effect of proteases on activation of resting chick embryo fibroblasts and on cell surface proteins, *Cell*, 6: 137-147, 1975.
- ✓ [7] BOSMANN H. B., Elevated glycosidases and proteolytic enzymes in cell transformed by RNA tumor viruses, *Biochim. Biophys. Acta*, 264: 339-343, 1972.
- [8] BOYLAND E., WALLACE D. M., WILLIAMS D. C. The activity of the enzymes sulphates and β -glucuronidase in the urine, serum and bladder tissue, *Brit. J. Cancer*, 9: 62-79, 1955.
- ✓ [9] BUSSEL R. H., ROBINSON W. S., Membrane proteins of uninfected and *Rous sarcoma* virus-transformed avian cells, *J. Virol.*, 12: 321-327, 1973. 32
- ✓ [10] CHRISTMAN J. K., ACS G., Purification and characterization of a cellular fibrinolytic factor associated with oncogenic transformation: the plasminogen activator from SV-40 transformed hamster cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 340: 339-347, 1974.
- ✓ [11] CRITCHLEY D. R., Cell surface proteins of NIL 1 hamster fibroblasts labeled by a galactose oxidase tritiated borohydride method, *Cell*, 3: 121-125, 1974.
- ✓ [12] CRITCHLEY D. R., WYKE J. A., HYNES R. O., Cell surface and metabolic labelling of the proteins of normal and transformed chicken cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 436: 335-352, 1976.
- [13] CULP L. A., Topography of substrate-attached glycoproteins from normal and virus-transformed cells, *Exp. Cell Res.*, 92: 467-477, 1975.
- [14] — Electrophoretic analysis of substrate-attached proteins from normal and virus-transformed cells, *Biochemistry*, 15: 4094-4104, 1976.
- [15] DAVIES D. A. L., Mouse histocompatibility isoantigens derived from normal and from tumour cells, *Immunology*, 11: 115-125, 1966.

- [16] DMOCHOWSKI L., BOWEN J. M., Current trends in basic immunology as applied to the problem of human neoplasia, *Amer. J. Clin. Path.*, **62**: 167-172, 1974.
- [17] DURHAM A. C. H., A unified theory of the control of actin and myosin in nonmuscle movements, **2**: 123-136, 1974.
- [18] EDWARDS H. E., THOMAS J. K., BURLESON G. R., KULPA C. F., The study of Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells using fluorescent probes, *Biochim. Biophys. Acta*, **448**: 451-459, 1976.
- [19] FARBISZEWSKI R., WOROWSKI K., Rola błony komórkowej w procesie transformacji nowotworowej, *Post. Biol. Kom.*, **2**: 131-145, 1975.
- [20] GABBIANI G., TRENCH P., HOLBOROW E. J., Increase of contractile proteins in human cancer cells, *Lancet*, **2**: 796-797, 1975.
- [21] GABBIANI G., CSANK - BRASSERT J., SCHNEEBERGER J. C., KAPANCI Y., TRENCH P., HOLBOROW E. J., Contractile proteins in human cancer cells, *Am. J. Pathol.*, **83**: 457-474, 1976.
- ✓ [22] GAHMBERG C. G., HAKOMORI S., Altered growth behavior of externally labelled glycoprotein and glycolipid, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3329-3333, 1973.
- ✓ [23] GAHMBERG C. G., KIEHN D., HAKOMORI S. I., Changes in surface - labelled galactoprotein and glycolipid concentration in cells transformed by a temperature sensitive polyoma virus mutant, *Nature*, **248**: 413-415, 1974.
- ✓ [24] GRAHAM J. M., HYNES R. O., DAWIDSON E. A., BAINTON D. F., The location of proteins labelled by the ¹²⁵I - lactoperoxidase system in the NIL 8 hamster fibroblast, *Cell*, **4**: 353-365, 1975.
- [25] GRUENSTEIN E., RICH A., WEIHING R. R., Action associated with membranes from 3T3 mouse fibroblast and HeLa cells, *J. Cell Biol.*, **64**: 223-234, 1975.
- [26] GRZELAKOWSKA - SZTABERT B., Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej, *Post. Biochem.*, **20**: 3-22, 1974.
- ✓ [27] HEAYSMAN J. E. M., PEGRUM S. M., Early contacts between normal fibroblast and mouse sarcoma cells. An ultrastructural study, *Exp. Cell Res.*, **78**: 71-78, 1973.
- ✓ [28] HOGG N. M., A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 489-492, 1974.
- ✓ [29] HUBBARD A. L., COHN Z. A., Externally disposed plasma membrane proteins. I. Enzymatic iodination of mouse L cells, *J. Cell. Biol.*, **64**: 438-460, 1975.
- [30] HUGGINS J. W., CHESNUT R. W., DURHAM N. N., CARRAWAY K. L., Molecular changes in cell surface membranes resulting from trypsinization of sarcoma 180 tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 630-637, 1976.
- [31] HUNT R. C., GOLD E., BROWN J. C., Cell cycle dependent exposure of a high molecular weight protein on the surface of mouse L cells, **413**: 453-458, 1976.
- ✓ [32] HYNES R. O., Alteration of cell - surface proteins by viral transformation and proteolysis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3170-3174, 1973.
- ✓ [33] — Role of surface alterations in cell transformation: the importance of proteases and surface proteins, *Cell*, **1**: 147-156, 1974.
- [34] — Cell surface proteins and malignant transformation, *Biochim. Biophys. Acta*, **458**: 73-107, 1976.

- ✓ [35] HYNES R. O., BYE J. M., Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts, *Cell*, **3**: 113-120, 1974.
- [36] HYNES R. O., HUMPHREYS K. C., Characterization of the external proteins of hamster fibroblast, *J. Cell Biol.*, **62**: 438-448, 1974.
- [37] HYNES R. O., MARTIN G. S., SHEARER M., Viral transformation of rat myoblast: effects on fusion and surface properties, *Develop. Biol.*, **48**: 35-46, 1976.
- ✓ [38] HYNES R. O., WYKE J. A., Alternations in surface proteins by temperature sensitive mutants of *Rous sarcoma virus*, *Virology*, **64**: 492-504, 1975.
- [39] INBAR M., BEN-BASSAT H., FIBACH E., SACHS L., Mobility of carbohydrate-containing structures on the surface membrane and the normal differentiation of myeloid leukemic cells to macrophages and granulocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 2577-2588, 1973.
- ✓ [40] ISAKA T., YOSHIDA M., OWADA M., TOYOSHIMA K., Alterations in membrane polypeptides of chick embryo fibroblasts induced by transformation with avian sarcoma viruses, *Virology*, **65**: 226-237, 1975.
- [41] KAWIAK J., Metody znakowania powierzchni komórek, *Post. Biol. Komórki*, **3**: 265-286, 1976.
- ✓ [42] KEMP R. B., JONES B. M., GRÖSCHEL-STEWARD U., Abolition by myosin and heavy meromyosin of the inhibitory effect of smooth-muscle actomyosin antipodies on cell aggregation in vitro, *J. Cell Sci.*, **12**: 631-639, 1973.
- ✓ [43] KESKI-OJA J., VAHERI A., RUOSLAHTI E., Fibroblast surface antigen (SF): The external glycoprotein lost in proteolytic stimulation and malignant transformation, *Int. J. Cancer*, **17**: 261-269, 1976.
- ✓ [44] KUUSELA P., RUOSLAHTI E., VAHERI A., A cell-type specific glycoprotein present in serum and plasma membrane of normal but not of transformed chicken fibroblast polypeptide chain composition, *Biochim. Biophys. Acta*, **379**: 295-303, 1975.
- [45] LIPKIN G., KNECHT M. E., A diffusible factor restoring contact inhibition of growth to malignant melanocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 849-853, 1974.
- [46] MALECH H. L., LENTZ T. L., Microfilaments in epidermal cancer cells, *J. Cell Biol.*, **60**: 473-482, 1974.
- [47] MALLUCI L., POSTE G., WELLS V., Synthesis of cell coat in normal and transformed cells, *Nature (New Biol.)*, **235**: 222-223, 1972.
- [48] MAPSTONE T. B., CULP L. A., Early events during substrate adhesion of normal and virus-transformed mouse fibroblasts, *J. Cell Sci.*, **20**: 479-495, 1976.
- [49] McNUTT N. S., Ultrastructural comparison of the interface between epithelium and stroma in basal cell carcinoma and control human skin, *Lab. Invest.* **35**: 132-142, 1976.
- ✓ [50] McNUTT N. S., CULP L., BLACK P. H., Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. II. Ultrastructural study, *J. Cell Biol.*, **50**: 691-708, 1971.
- ✓ [51] — Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape in untransformed, transformed, and revertant BALB/c 3T3 cells, *J. Cell Biol.*, **56**: 412-428, 1973.
- [52] MOORE P. B., ANDERSON D. R., HUGGINS J. W., CARRAWAY K. L., Cytoskeletal proteins associated with cell surface envelopes from sarcoma 180 ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Res., Commun.*, **72**: 288-294, 1976.

- ✓ [53] NICOLSON G. L., Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells, I. Cytoplasmic influence over cell surface components, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**: 57-108, 1976.
- [54] OGATA S. I., MURAMATSU T., KOBATA A., New structural characteristic of large glycopeptides from transformed cells, *Nature*, **259**: 580-582, 1976.
- ✓ [55] OSSOWSKI L., QUIGLEY J. P., REICH E., Fibrinolysis associated with oncogenic transformation, Morphological correlates, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4312-4320, 1974.
- [56] OSSOWSKI L., UNKELESS J. C., TOBIA A., QUIGLEY J. P., RIFKIN D. B., REICH E., An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. II. Mammalian fibroblast cultures transformed by DNA and RNA viruses, *J. Exp. Med.*, **137**: 113-126, 1973.
- 3903 ✓ [57] OSTLUND R. E., PASTAN I., ADELSTEIN R. S., Myosin in cultured fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **249**: 3909-3907, 1974.
- ✓ [58] PAINTER R. G., SHECTZ M., SINGER S. J., Detection and ultrastructural localization of human smooth muscle myosin-like molecules in human non-muscle cells by specific antibodies, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 1359-1363, 1975.
- ✓ [59] PEARLSTEIN E., HYNES R. O., FRANKS L. M., HEMMINGS V. J., Surface proteins and fibrinolytic activity of cultured mammalian cells, *Cancer Res.*, **36**: 1475-1480, 1976.
- ✓ [60] PEARSTEIN E., WATERFIELD M. D., Metabolic studies on ¹²⁵I-labeled baby hamster kidney cell plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **362**: 1-12, 1974.
- ✓ [61] PERDUE J. F., The distribution, ultrastructure and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts, *J. Cell. Biol.*, **58**: 265-283, 1973.
- [62] PIETRAS R. J., SZEGO C. M., Early membrane alternations in isolated cells treated in vitro with chemical carcinogenesis, *Cancer Letters*, **1**: 237-242, 1976.
- ✓ [63] POLLACK R., OSBORN M., WEBER M., Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 994-998, 1975.
- [64] POSTE G., The synthesis of surface coat materials in normal and transformed cells, *Exp. Cell Res.*, **77**: 264-270, 1973.
- ✓ [65] RIFKIN D. B., LOEH J. N., MOORE G., REICH E., Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures, *J. Exp. Med.*, **139**: 1317-1328, 1974.
- [66] ROBBINS P. W., Comparisons of major cell-surface proteins of normal and transformed cells, *Am. J. Clin. Pathol.*, **63**: 671-676, 1975.
- ✓ [67] RUOSLAHTI E. A., VAHERI A., KUUSELA P., LINDER E., Fibroblast surface antigen; a new serum protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **322**: 352-358, 1973.
- ✓ [68] RUOSLAHTI E., VAHERI A., Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane, *Nature*, **248**: 789-791, 1974.
- ✓ [69] — Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma, *J. Exp. Med.*, **141**: 497-501, 1975.
- [70] SCHENK P., Microfilaments in human epithelial cancer cells, *Z. Krebsforsch.*, **84**: 241-256, 1975.

- ✓ [71] SCHNEBLI H. P., A protease-like activity associated with malignant cells, *Schweiz. Med. Wsch.*, **102**: 1194-1197, 1972.
- [72] SHIN B. C., CARRAWAY K. L., Cell surface constituents of sarcoma 180 ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **330**: 254-268, 1973.
- [73] SHINITZKY M., INBAR M., Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells, *J. Mol. Biol.*, **85**: 603-615, 1974.
- ✓ [74] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- ✓ [75] SINGER S. J., The molecular organization of membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 805-833, 1974.
- [76] STONE K. R., SMITH R. F., JOKLIK W. K., Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblasts and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses, *Virology*, **58**: 86-100, 1974.
- [77] SYLVEN B., SNELLMAN O., STRÄULI P., Immunofluorescent studies on the occurrence of cathepsin B₁ at the tumor surfaces, *Virchows Arch. B. Cell Path.*, **17**: 97-112, 1974.
- ✓ [78] TENG N. N. H., CHEN L. B., The role of surface proteins in cell proliferation as studied with thrombin and other proteases, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 413-417, 1975.
- ✓ [79] — Thrombin — sensitive surface protein of cultured chick embryo cells, *Nature*, **259**: 578-580, 1976.
- [80] WARREN L., ZEIDMAN I., BUCK C. A., The surface glycoproteins of a mouse melanoma growing in culture and as a solid tumor in vivo, *Cancer Res.*, **35**: 2186-2190, 1976.
- ✓ [81] WARTIOVAARA J., LINDER E., ROUSLATHI E., VAHERI A., Distribution of fibroblast surface antigen. Association with fibrillar structures of normal cells and loss upon viral transformation, *J. Exp. Med.*, **140**: 1522-1533, 1975.
- [82] WEINSTEIN R. S., Changes in plasma membrane structure associated with malignant transformation in human urinary bladder epithelium, *Cancer Res.*, **36**: 2518-2524, 1976.
- ✓ [83] WICKUS G. G., ROBBINS P. W., Plasma membrane proteins of normal and *Rous sarcoma* virus — transformed chick embryo fibroblast, *Nature, New Biol.*, **245**: 65-66, 1973.
- ✓ [84] WICKUS G. G., BRANTON P. E., ROBBINS P. W., *Rous sarcoma* virus transformation of the chick cell surface, [w] *Control Proliferation in Animal Cells*, red. B. Clarkson and R. Baserga, Cold Spring Harbor Laboratory N. Y., 541-546, 1974.
- ✓ [85] WICKUS G., GRUNSTEIN E., ROBBINS P. W., RICH A., Decrease in membrane — associated actin of fibroblasts after transformation by *Rous sarcoma* virus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 746-749, 1975.
- ✓ [86] WILLINGHAM M. C., OSTLUND R. E., PASTAN I., Myosin is a component of the cell surface of cultured cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 4144-4148, 1974.
- ✓ [87] VAHERI A., RUOSLAHTI E., Disappearance of a major cell-type specific surface glycoprotein antigen (SF) after transplantation of fibroblast by *Rous sarcoma* virus, *Int. J. Cancer*, **13**: 579-586, 1974.
- [88] — Fibroblast surface antigen produced but not retained by virus — transformed human cells, *J. Exp. Med.*, **142**: 530-538, 1975.
- ✓ [98] VAHERI A., RUOSLAHTI E., WESTERMARK B., PONTEN J., A common

cell - type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: Loss in malignant cells, *J. Exp. Med.*, **143**: 64-72, 1976.

✓ [90] UNKELESS J. C., TOBIA A., OSSOWSKI L., QUIGLEY J. P., RIFKIN D. B., REICH E., An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. I. Chick embryo fibroblast cultures transformed by avian RNA tumor viruses, *J. Exp. Med.*, **137**: 85-111, 1973.

✓ [91] UNKELESS J., DANO K., KELLERMAN G. M., REICH E., Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Partial purification and characterization of the cell factor, a plasminogen activator, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4295-4305, 1974.

[92] YANG Y., PERDUE J. F., Contactile proteins of cultured cells. I. The isolation and characterization of an actin-like protein from cultured chick embryo fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4503-4509, 1972.

✓ [93] YAMADA K. M., WESTON J. A., The synthesis, turnover, and artificial restoration of a major cell surface glycoprotein, *Cell*, **5**: 75-81, 1975.

• [94] YAMADA K. M., YAMADA S. S., PASTAN I., Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness and contact inhibition of movement to transformed fibroblast, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 1217-1221, 1976.

Otrzymano: 22 grudnia 1976.

Przyjęto: 31 stycznia 1977.

Adres autora: ul. Mickiewicza 2, 15 - 222 Białystok.

Alfabet

na gk prace przytę 46 (ingel)
(talca wyeh) 1976

PROTEOLIZA KOMÓRKOWA I MECHANIZMY JEJ REGULACJI

Krzysztof WOROWSKI

Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii
Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Degradacja białek odbywa się głównie w lizosomach komórkowych. Jest to proces wieloetapowy wymagający udziału szeregu enzymów proteolitycznych o różnej specyficzności, które uzupełniają się w działaniu na białka. Regulacja proteolizy komórkowej odbywa się poprzez: zmiany szybkości syntezy proteaz komórkowych za pośrednictwem induktorów i represorów; zmiany aktywności tych enzymów zależne od poziomu aktywatorów i inhibitorów oraz pH środowiska; zmiany przepuszczalności błon lizosomalnych i związanym z nią transportem substratów do wnętrza lizosomów; zmiany fizykochemiczne i chemiczne białek zmieniające ich podatność na działanie proteaz.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ DEGRADACJI BIAŁEK

Proteazy należą do najbardziej rozpowszechnionych enzymów. Występują one w każdej komórce, w płynach ustrojowych i wydzielinach gruczołowych. Dzięki ich działaniu białka zużyte w procesach biologicznych są rozkładane do aminokwasów i przywracane do ogólnej puli metabolicznej ustroju. Znaczenie biologiczne enzymów proteolitycznych jest jednak o wiele szersze. Enzymy te aktywują proenzymy i nieczynne formy hormonów peptydowych i białkowych oraz inaktywują ich formy czynne [22, 75, 93, 145, 151, 187], powodują powstawanie i unieczynniają biologicznie czynne peptydy [19, 24, 208], biorą udział w metabolizmie antygenów i przeciwciał [49, 129, 183, 215] i wywierają wiele innych efektów biologicznych [13, 213].

W komórkach występuje wiele enzymów proteolitycznych, różniących się strukturą centrum aktywnego, optimumami pH i specyficznością substratów. Zlokalizowane są one głównie w lizosomach, ale występują także w jądrach [57, 63], mitochondriach [1, 80], mikrosomach [123, 134], cyto-

TABELA 1. Przegląd komórkowych enzymów proteolitycznych, cyt. wg [10], z uzupełnieniami [35, 84, 194]

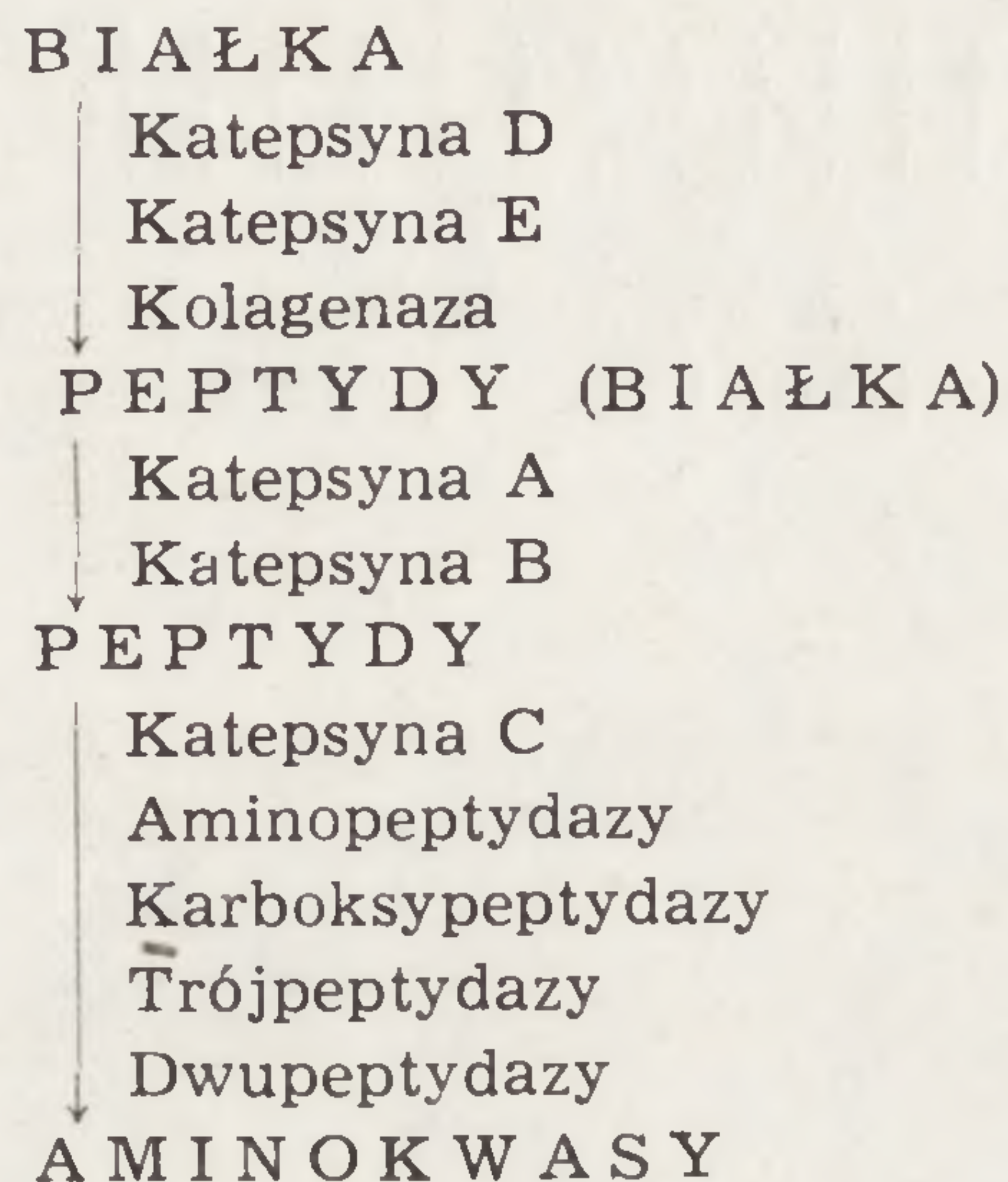
Lp.	Enzym	Centrum aktywne	Substrat używany do oznaczenia aktywności (optimum pH)	Substraty naturalne
1	Katepsyna A	Serynowe?	Karbobenzoksy-L-glutamyl-L-tyrozyna (pH 5,0)	Peptydy i białka
2	Katepsyna B ₁	Sulfhydrylowe	p-nitroanilid benzoilo-L-argininy (pH 5,0–6,5)	Peptydy i białka
3	Katepsyna B ₂	Sulfhydrylowe	Amid benzoilo-L-argininy (pH 6,2)	Peptydy i białka
4	Katepsyna C (dwupeptydyloaminopeptydaza I)	Sulfhydrylowe	Amid glicylo-L-tyrozyny (pH 5,1)	Peptydy
5	Katepsyna D	Karboksyłowe	Hemoglobina (pH 3,5)	Białka
6	Katepsyna E	Karboksyłowe	Albumina (pH 2,5)	Białka
7	Dwupeptydaza	Metaloproteaza	L-tyrozylo-glicyna (pH 7,8)	Dwupeptydy
8	Dwupeptydyloaminopeptydaza II		Naftyloamid L-lizylo-L-alaniny (pH 5,5)	Peptydy
9	Kwaśna karboksypeptydaza	Metaloproteaza	L-leucylo-L-leucylo-L-leucyna (pH 5,0)	Peptydy
10	Kolagenaza	Metaloproteaza	Kolagen (pH 6,0)	Kolagen
11	Elastaza	Serynowe	Elastyna (pH 8,8)	Elastyna
12	Neutralna proteaza (ziarnistości leukocytów)	Serynowe	Hemoglobina (pH 7,0–8,0). Kazeina, azokazeina, albumina (pH 7,0)	Białka
13	Neutralna proteaza (chromatyna jądrowa)	Serynowe	Histony (pH 7,5–8,5)	Histony
14	Proteazy degradujące enzymy pirydoksalowe	Serynowe	Aminotransferaza ornitynowa (pH 8,6–9,0)	Enzymy pirydoksalowe
15	Renina	Karboksyłowe	Angiotenzynogen (pH 6,0)	Angiotenzynogen
16	Aktywator plazminogenu	Serynowe	Plazminogen (pH 8,5)	Plazminogen

plazmie [134, 161, 195] i w błonach komórkowych [172, 188]. Przegląd komórkowych enzymów proteolitycznych podany jest w tabeli 1.

Proteazy lizosomalne spełniają w komórce głównie rolę trawienną, dokonując degradacji białek komórkowych do aminokwasów. Natomiast zlokalizowane w innych organellach komórkowych i w cytoplazmie dokonują najczęściej jedynie ograniczonej proteolizy, która dotyczy głównie białek enzymatycznych.

Degradacja białek w komórce jest procesem wieloetapowym, wymaga-

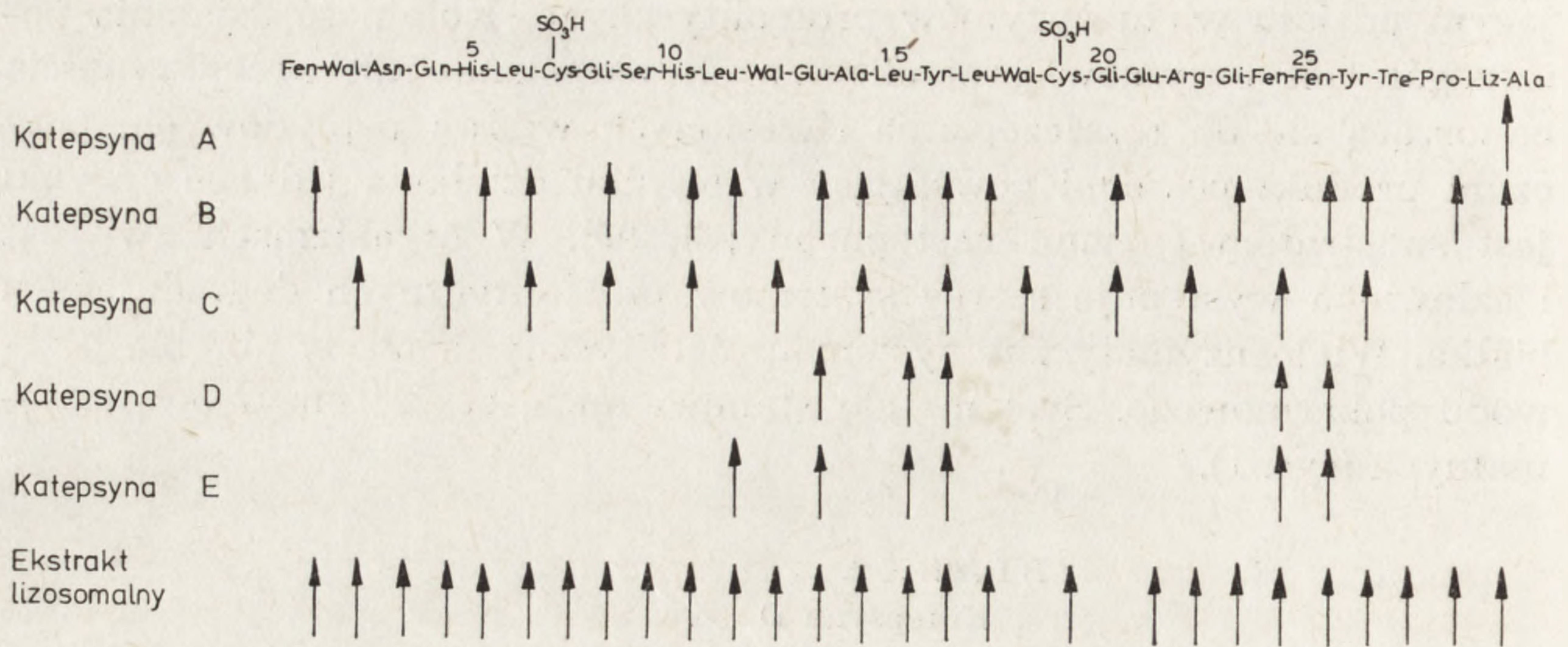
jącym udziału wielu enzymów proteolitycznych. Kolejność działania poszczególnych enzymów proteolitycznych określona jest specyficznością odnoszącą się do rozszczepiania określonych wiązań peptydowych, przy czym produkt pośredni powstający w wyniku działania jednego enzymu jest substratem enzymu następnego [88, 90]. W organizmach zwierząt i człowieka występuje szereg systemów proteolitycznych degradujących białka. Wieloenzymatyczny system proteolityczny działa w obrębie przewodu pokarmowego. System taki stanowi także zespół enzymów lizosomalnych (rys. 1).



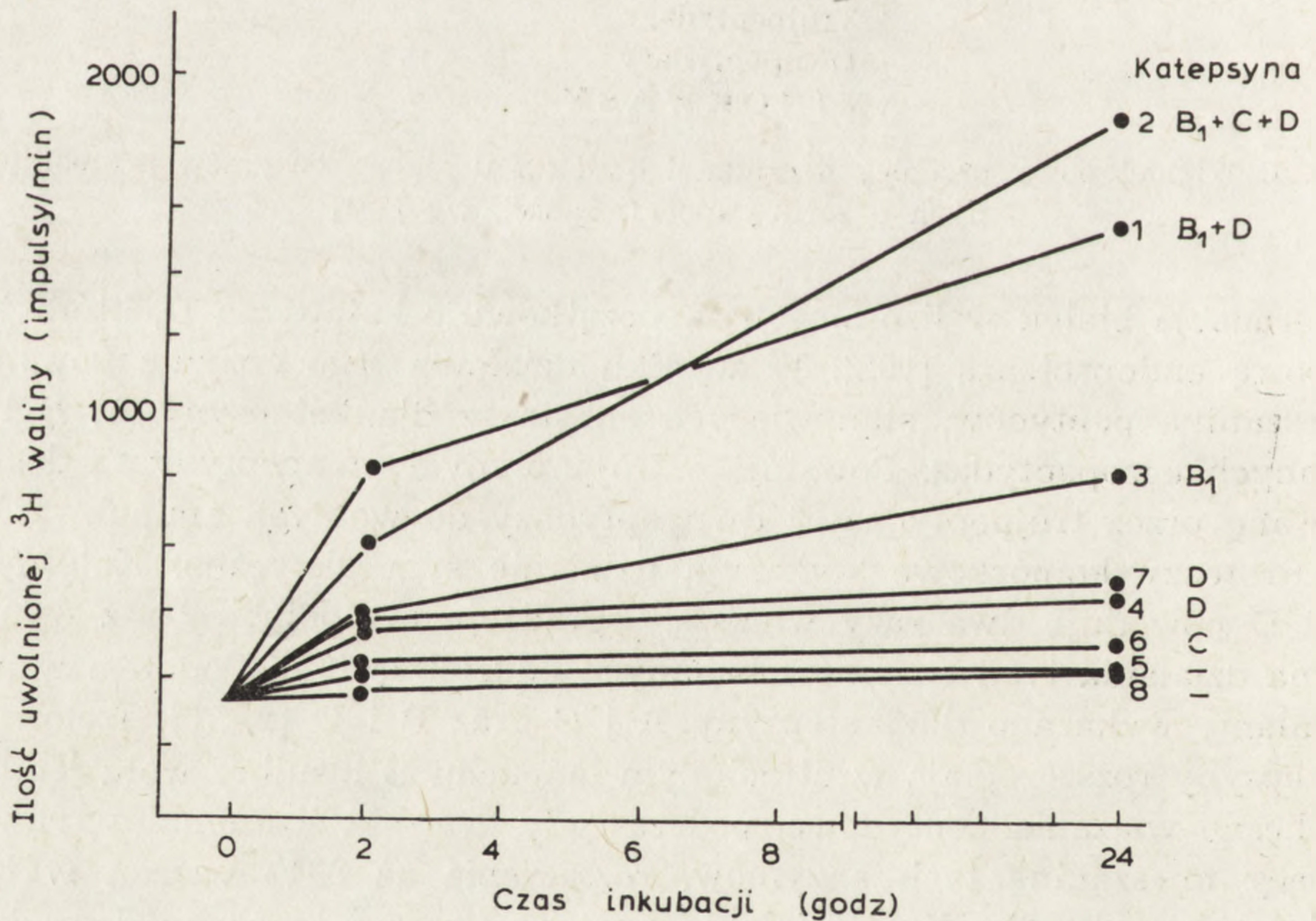
Rys. 1. Wieloetapowy przebieg degradacji białek z udziałem enzymów proteolitycznych o różnej specyficzności, wg [193]

Degradacja białek w lizosomach zapoczątkowuje katepsyna D, która jest typową endoproteazą [192]. W wyniku działania tego enzymu powstaje mieszanina peptydów, stanowiących substraty dla katepsyny A, B i C i innych egzopeptydaz. Powstające trójpeptydy i dwupeptydy są degradowane przez trójpeptydazy i dwupeptydazy do wolnych aminokwasów.

Proteazy komórkowe wykazują działanie synergistyczne. Katepsyna A i D powoduje dwa razy większą degradację hemoglobiny niż wynosi suma działania tych enzymów badanych oddzielnie [94]. Podobne współdziałanie wykazano dla katepsyny A i C oraz B i D [2, 70]. Izolowane katepsyny rozszczepiają w utlenionym łańcuchu B insuliny wołu jedynie nieliczne wiązania peptydowe, podczas gdy ekstrakt lizosomalny, zawierający mieszaninę tych enzymów, rozszczepia aż 93% wiązań w tym substracie (rys. 2). Współdziałanie proteaz lizosomalnych w degradacji białek można śledzić stosując specyficzne inhibitory tych enzymów. Z rysunku 3 wynika, że degradacja białek cytozolu zachodzi najintensywniej w układzie, w którym działają wszystkie proteazy lizosomalne równocześnie, przy czym główna rola w tym procesie przypada katepsynie B₁.



Rys. 2. Degradacja utlenionego łańcucha B insuliny wołu przez katepsynę A, B, C, D i E (cyt. wg [211]) i przez ekstrakt lizosomalny [118])



Rys. 3. Degradacja znakowanych ^3H -waliną białek cytoplazmy wątroby szczura przez enzymy lizosomalne, wg [36].

1 — kontrolna; 2 — z chlorkami; 3 — z pepstatyną; 4 — z leupeptyną; 5 — z pepstatyną i leupeptyną; 6 — z pepstatyną, leupeptyną i chlorkami; 7 — z jodoocetanem; 8 — z pepstatyną i jodoocetanem

Metodom badania degradacji białek *in vivo* poświęcono ostatnio szereg publikacji metodycznych [20, 61, 91, 141].

DEGRADACJA ENZYMATYCZNA RÓŻNYCH BIAŁEK

Nie wszystkie białka są w jednakowym stopniu podatne na działanie proteaz. Zależy to od rodzaju aminokwasów i ich liczby, obecności składników nieaminokwasowych, konfiguracji wiązań peptydowych, obecności innych wiązań niż peptydowe, zwłaszcza wiązań dwusiarczkowych i hydrofobowych oraz od struktury przestrzennej.

Istotną rolę w degradacji białek *in vivo* odgrywa ich aktywność biologiczna i związana z nią szybkość zużywania się ich, prowadząca do zmian konformacyjnych i zwiększenia podatności na proteolizę. Dzięki temu białka czynne biologicznie, np. enzymy, posiadają znacznie krótszy okres półtrwania od białek strukturalnych. Jak wynika z tabeli 2, na 35 wyszczególnionych w niej enzymów 43% z nich posiada $T/2$ krótszy od 24 godzin, 20% ma $T/2$ nie dłuższy niż 48 godzin, a czas biologicznego półtrwania 37% pozostałych nie przekracza 144 godzin. Nieenzymatyczne białka komórkowe mają znacznie dłuższy czas biologicznego półtrwania. Dla poszczególnych frakcji histonów mózgu myszy wynosi on 18, 56, 93 i 117 dni, a dla histonów wątroby tego zwierzęcia 58 i 105 dni [155]. Istnieje związek między podatnością na proteolizę a ciężarem cząsteczkowym i kształtem cząsteczki białkowej [37]. Stwierdzono, że spośród białek cytozolu najszybciej degradowane są białka o wysokich ciężarach cząsteczkowych ($1,5 \times 10^6$ daltona), wolniej o ciężarach cząsteczkowych średniej wielkości ($6 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ daltona), a najwolniej białka o niskich ciężarach cząsteczkowych ($2 \times 10^5 - 5 \times 10^4$ daltona). Białka o strukturze globularnej są najczęściej bardziej podatne na działanie proteaz od białek o strukturze fibrylarnej.

Białkiem odbiegającym znacznie pod względem składu aminokwasowego i struktury przestrzennej jest kolagen. Kolagen zawiera duże ilości proliny i hydroksyproliny, które zmieniają w sposób istotny konfigurację wiązania peptydowego. Ponadto cząsteczka kolagenu składa się z trzech łańcuchów polipeptydowych splecionych z sobą. Ta szczególna struktura kolagenu chroni wiązania peptydowe przed działaniem niespecyficznego proteaz. Białko to jest degradowane dwuetapowo [127, 180]. Degradację kolagenu rozpoczynają kolagenazy. Rozszczepiają one cząsteczkę kolagenu na dwa charakterystyczne fragmenty TC^A i TC^B . Fragmenty te są fagocytowane i całkowicie degradowane przez proteazy wewnątrzkomórkowe.

Pewnymi odrębnościami metabolicznymi charakteryzują się także histony. Wiąże się to ze znaczną zawartością aminokwasów zasadowych w strukturze tych białek i ich lokalizacją w obrębie jądra komórkowego,

TABELA 2. Czas półtrwania (T/2) wewnątrzkomórkowych enzymów wątroby szczura, wg [41]

Lp.	Enzym	Numer klasyfikacyjny	Lokalizacja w komórce	T/2 (godziny)
1	Aldolaza	4.1.2.31	Cytoplazma	118
2	Aminotransferaza alaninowa	2.6.1.2.	Mitochondria	16–24
3	Aminotransferaza asparaginowa	2.6.1.1	Cytoplazma	72
4	Aminotransferaza ornitynowa	2.6.1.13	Mitochondria	16–24
5	Aminotransferaza tyrozynowa	2.6.1.5	Cytoplazma	2–3
6	Arginaza	3.5.3.1.	Cytoplazma	96–120
7	Cytochrom b		Mitochondria	130
8	Cytochrom b ₅		Mikrosomy	120
9	Cytochrom b ₅		Mitochondria	122
10	Cytochrom c		Mitochondria	150
11	Cytochrom P-450		Mikrosomy	50
12	Dehydrataza seryny	4.2.1.13	Cytoplazma	20
13	Dehydrogenaza D-3-fosfoglicerolu	1.1.1.60	Cytoplazma	14
14	Dehydrogenaza α-glicerofosforanu	1.1.1.8	Mitochondria	96
15	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	1.1.1.49	Cytoplazma	15
16	Dehydrogenaza kwasu jabłkowego	1.1.1.38	Cytoplazma	96
17	Dehydrogenaza kwasu mlekowego (izozym 5)	1.1.1.27	Cytoplazma	144
18	Dekarboksylaza ornityny	4.1.1.17	Cytoplazma	0,2
19	Dwuhydrooorotaza	3.5.2.3	Cytoplazma	12
20	Fruktozo-1, 6-dwufosfataza	3.1.3.11	Mikrosomy	36
21	Glukokinaza	2.7.1.2	Cytoplazma	30
22	Histidaza	4.3.1.3	Cytoplazma	36
23	Karbomoiłotransferaza asparaginianowa	2.1.3.2	Cytoplazma	36
24	Katalaza	1.11.1.6	Peroksyzomy	24–30
25	Karboksylaza acetylokoenzymu A	6.4.1.2	Cytoplazma	48
26	Karboksylaza fosfoenolopirogronianu	4.1.1.32	Cytoplazma	5
27	Kinaza dezoksytymidynowa	2.7.4.9	Cytoplazma	2,6–3,7
28	Kinaza kwasu pirogronowego	2.7.1.40	Cytoplazma	30
29	Kinaza tymidynowa	2.7.1.21	Cytoplazma	18
30	Liaza ATP cytrynianowa	4.1.3.8	Cytoplazma	24
31	Oksydaza ksantynowa	1.2.3.2	Cytoplazma	96
32	Oksygenaza tryptofanu	1.13.1.12	Cytoplazma	2–4
33	Reduktaza cytochromu C	1.6.99.3	Mikrosomy	80
34	Reduktaza β-hydroksy-β-metylo-glutarylo- -koenzymu A	1.1.1.34	Mikrosomy	3
35	Syntetaza kwasu δ-amino-lewulinowego	4.2.1.24	Mitochondria	1–1,2

gdzie związane są z kwasem dezoksyrybonukleinowym. Znajomość enzymów degradujących histony ma istotne znaczenie ze względu na rolę jaką spełniają te białka w regulacji funkcji DNA jądrowego. Sugerowany jest mianowicie udział proteaz zawartych w chromatynie jądrowej w de-represji genów [39, 63]. Proteolityczna degradacja histonów jest także ważnym problemem przy izolowaniu tych białek [43]. W komórkach

występują dwie grupy proteaz degradujących białka zasadowe. Różnią się one lokalizacją w obrębie komórki i optimum pH [57, 84]. Jedna z nich zlokalizowana w lizosomach degraduje histony najintensywniej w pH 4,4. Spośród proteaz lizosomalnych histony są degradowane głównie przez katepsynę B i D. Katepsyna B rozkłada histony do niskocząsteczkowych peptydów [39]. Natomiast katepsyna D degraduje białka zasadowe jedynie w niewielkim stopniu [14]. Druga grupa proteaz degradujących białka zasadowe zlokalizowana jest poza lizosomami. Są to proteazy o neutralnych i słabo alkalicznych optimumch pH (pH 7,5–8,0). Izolowano je z jąder grasicy cielej [117], chromatyny wątroby szczura [31, 63], mitochondriów wątroby szczura [80, 84] i mikrosomów nerki szczura [154].

Miejscem degradacji lipoproteidów o niskiej i wysokiej gęstości są lizosomy [160, 184]. Degradacji części białkowej lipoproteidów dokonuje głównie katepsyna B₁, przy czym proces ten zachodzi najintensywniej w pH 3,8–4,5 [144]. Natomiast glikoproteidy są degradowane najszybciej w pH 5,0, za co odpowiedzialna jest głównie katepsyna D [167, 210].

Szczególnie duże znaczenie posiada znajomość mechanizmów degradacji i inaktywacji enzymów [5, 81, 97, 98, 158]. Przyjmuje się, że degra-

TABELA 3. Zawartość proteaz degradujących enzymy pirydoksalowe w różnych narządach szczura, wg [101]

Narząd	Aktywność (j/mg białka)*
Mięśnie szkieletowe:	
mięsień przedramienia	0,7
mięsień grzbietowy	0,2
mięsień podudzia	0,3
Mięśnie gładkie:	
żołądka	0,02
dwunastnicy	0,7
jelita cienkiego	0,6
okrężnicy	0,1
jelita grubego	0,6
Błona śluzowa dwunastnicy	0,05–0,1
Żyła główna	0,2
Pęcherz moczowy	ślad
Macica	0,02
Mięsień sercowy	ślad
Wątroba (mitochondria)	0,01–0,03

* Za jedną jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto taką ilość enzymu, która obniża o 50% aktywność aminotransferazy ornitynowej w standardowych warunkach.

TABELA 4. Specyficzność proteaz degradujących enzymy pirydoksalowe, wg [102]

Substrat	Źródło	Aktywność proteazy (%)*			
		Wątroby	Jelita cienkiego		Mięśnia szkieletowego
			Warstwa mięśniowa	Błona śluzowa	
Aminotransferaza ornitynowa	Wątroba szczura	100	100	100	100
Dehydrataza seryny	Wątroba szczura	72	19	10	56
Deaminaza homoseryny	Wątroba szczura	63	59	89	74
Fosforylaza	Mięsień królika	27	22	70	108
Syntetaza kwasu δ -aminolewulinowego	Retikulocyty królika	6	9	—	+
Aminotransferaza asparaginianowa	Wątroba szczura	0	0	—	0
Aminotransferaza tyrozynowa	Wątroba szczura	0	0	—	0
Dehydrogenaza jabłczanowa	Nerka szczura	0	0	0	0
Dehydrogenaza glutaminianowa	Wątroba wołu	0	0	0	0
Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerolowego	Mięsień królika	7	2	—	3
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	Wątroba szczura	3	—	—	—
Arginaza	Wątroba szczura	0	0	0	0
Glutaminaza	Nerka szczura	0	0	0	0
Kinaza kwasu pirogronowego	Mięsień królika	0	0	0	0
Transkarbamyłaza ornityny	Wątroba szczura	0	0	19	0
Oksydaza ksantynowa	Wątroba szczura	0	0	0	0
Oksydaza D-aminokwasów	Nerka szczura	—	0	—	—

** Za 100% przyjęto aktywność, którą wykazywały enzymy przy użyciu aminotransferazy ornitynowej jako substratu.

1) głowa
 dacja określonej grupy enzymów wymaga odrębnego systemu proteolitycznego. Dotychczas zostały najlepiej poznane, występujące w wielu narządach proteazy, degradujące enzymy pirydoksalowe (tabela 3). Duże ilości tych enzymów zawierają mięśnie szkieletowe, jelito cienkie i wątroba. Z narządów tych zostały one wyizolowane w wysokooczyszczonej postaci. Jak wynika z tabeli 4, proteazy te działają wyłącznie na enzymy pirydoksalowe.

Enzymy pirydoksalowe (transferaza ornitynowa, dehydrataza seryny, deaminaza homoseryny i fosforylaza) są gwałtownie inaktywowane. Natomiast enzymy niepirydoksalowe nie są w ogóle unieczynniane, nawet przy bardzo długich czasach inkubacji. Podatność enzymów pirydoksalowych na działanie tych proteaz zależy w dużym stopniu od obecności koenzymu. Wskazuje na to znacznie krótszy czas ich półtrwania u zwierząt z niedoborem witaminy B₆ w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

TABELA 5. Porównanie właściwości proteaz degradujących enzymy pirydoksalowe, wg [102]

Właściwości	Proteazy			
	Mięśnia szkieletowego	Jelita cienkiego		Wątroby
		Warstwa mięśniowa	Błona śluzowa	
Wspólne:				
1. Specyficzność substratowa wobec enzymów pirydoksalowych	Wysoka	Wysoka	Wysoka	Wysoka
2. Ochronne działanie koenzymu	Występuje	Występuje	Występuje	Występuje
3. Optimum pH	9,0	9,0	8,6	8,6
4. Komórkowy inhibitor białkowy	Hamuje	Hamuje	Hamuje	Hamuje
5. Działanie na ester metylowy p-toluenosulfonylo-L-argininy	Nie degraduje	Nie degraduje	Nie degraduje	Nie degraduje
6. Dwuizopropylodifluorofosforan	Hamuje	Hamuje	Hamuje	Hamuje
7. Inhibitory proteaz sulfhydrylowych	Nie działają	Nie działają	Nie działają	Nie działają
8. Propionian p-aminofenyl-β-fenylu	Nie działa	Nie działa	Nie działa	Nie działa
Różne:				
1. Ciężar cząsteczkowy	13 000	25 000	21 000	16 000
2. Elucja z DEAE-celulozy (bufor fosforanowy, pH 7,0)	0,05M	0,005M	0,25M	0,1M
3. Reakcja z przeciwciałami enzymu izolowanego z warstwy mięśniowej jelita	—	+	—	—
4. Działanie na ester etylowy N-acetylo-L-tyrozyny*	30%	1000%	25%	20%
5. Działanie na ester etylowy L-tyrozyny*	0	100%	0	0
6. Wpływ Ca ⁺⁺ na aktywność	Hamuje	Bez efektu	Bez efektu	Bez efektu

* Za 100% przyjęto aktywność, którą wykazywały enzymy przy użyciu jako substratu aminotransferazy ornitynowej.

Proteazy degradujące enzymy pirydoksalowe izolowane z różnych narządów wykazują szereg podobieństw, ale także różnią się niektórymi właściwościami (tabela 5). Wszystkie proteazy degradujące enzymy pirydoksalowe występują w komórce w formie utajonej, na skutek zablokowania ich miejsc aktywnych przez inhibitor białkowy, który pełni rolę regulacyjną wobec tych enzymów. Enzymy te działają w słabo zasadowym zakresie pH. Ich aktywność hamowana jest przez inhibitory proteaz serynowych, lecz są one niewrażliwe na działanie inhibitorów proteaz sulfhydrylowych. Różnią się one między sobą ciężarami cząsteczkowymi, profilem elucyjnym w czasie chromatografii jonowymiennej, właściwo-

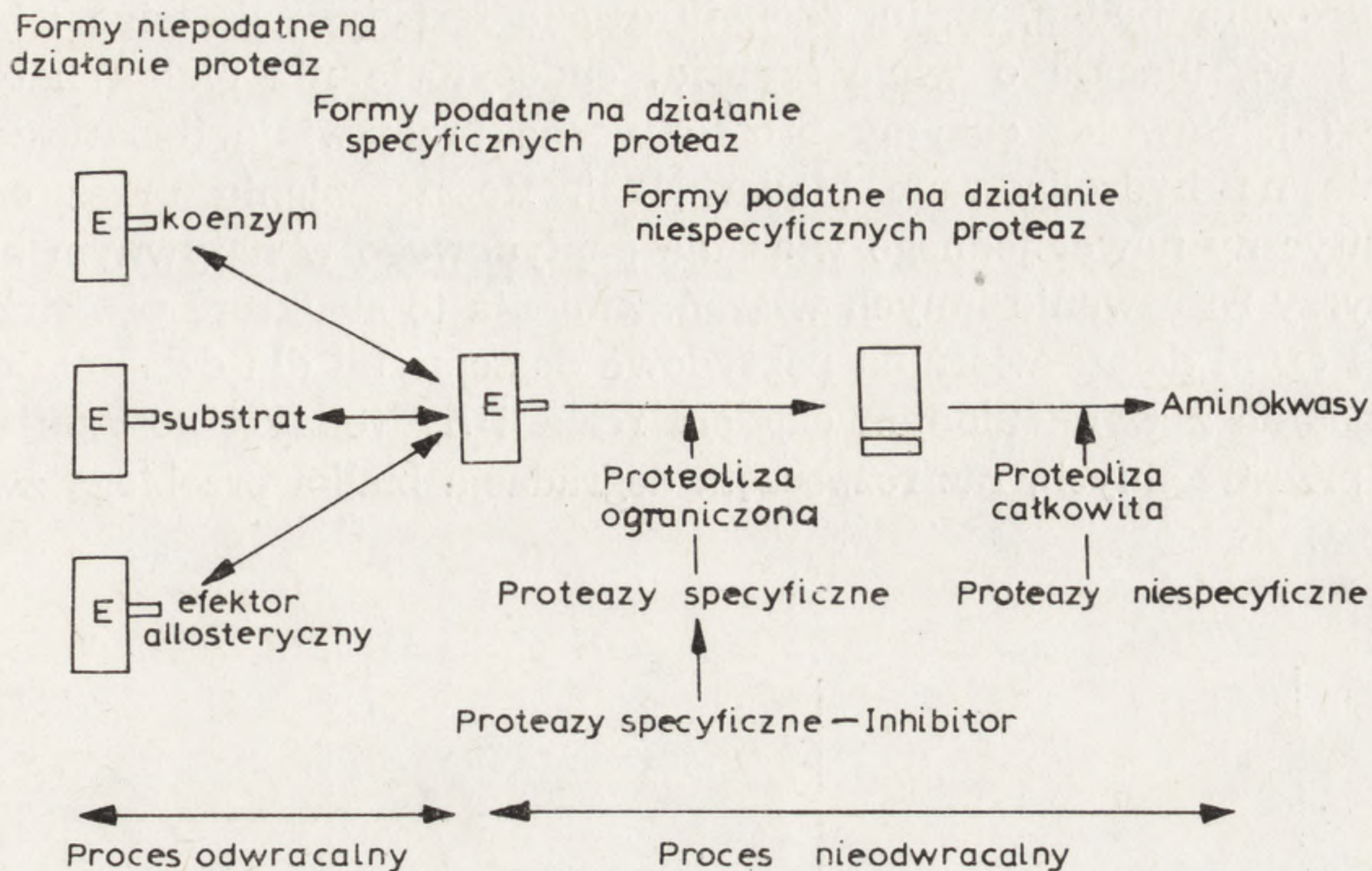
TABELA 6. Modyfikacje chemiczne proteazy izolowanej z warstwy mięśniowej jelita degradujące enzymy pirydoksalowe, wg [102]

Reszta aminokwasowa enzymu	Odczynnik modyfikujący	Aktywność enzymu
1. Seryna 2. Histydyna	Dwuizopropylofluorofosforan (DFP) Błękit metylenowy (fotooksydacja)	Obniża się
	N- α -tosylo-feniloalanino-chlorometyloketon (TPCK) N- α -tosylo-lizyno-chlorometyloketon (TLCK)	Nie obniża się
3. Tyrozyna	Czteronitrometan	Obniża się
4. Cysteina 5. Grupy karboksylowe 6. Grupy aminowe	N-acetyloimidazol p-chlorortęciobenzoesan 1-etylo-3 (3-dwumetylo-aminopropylo)karbodwuimid Bezwodnik kwasu octowego	Nie obniża się

ściami antygenowymi, ruchliwością elektroforetyczną, aktywnością względem estru etylowego tosyloargininy i estru etylowego tyrozyny oraz wpływem kationów wapniowych na aktywność. Na podstawie badań polegających na blokowaniu różnych grup funkcyjnych w proteazie izolowanej z warstwy mięśniowej jelita wnosi się, że centrum aktywne tych enzymów stanowią grupy hydroksylowe seryny (tabela 6). Funkcje pomocnicze w aktywności katalitycznej spełniają reszty histydyny i tyrozyny.

W rozważaniach nad degradacją enzymów zakłada się, że występują one w dwóch formach konformacyjnych [4]. Jedna z nich, niewrażliwa na działanie enzymów proteolitycznych, powstaje po połączeniu się enzymu z substratem, koenzymem lub efektem allosterycznym. Odłączenie tych czynników powoduje przejście w formę wrażliwą. Degradacja białek enzymatycznych zachodzi w dwóch etapach. Pierwszy z nich polega na odłączeniu od białka enzymatycznego, przez specyficzne proteazy, jedynie małego fragmentu peptydowego. Powoduje to obniżenie lub utratę aktywności enzymatycznej. W drugim etapie zachodzi kompletna degradacja tego nadtrawionego białka przez niespecyficzne proteazy lizosomalne (rys. 4).

Stwierdzono ponadto, że enzymy proteolityczne znoszą wrażliwość niektórych enzymów na efekty allosteryczne. Dotyczy to m. in. heksozodwufosfatazy [190] i fosfofruktokinazy [165]. Znany jest fakt, że aktywność heksokinazy zwiększa się po połączeniu się tego enzymu z mitochondriami. Lizosomalne enzymy proteolityczne oraz trypsyna i chymotrypsyna znoszą zdolność wiązania się heksokinazy z mitochondriami przez co obniżają jej aktywność [162]. Ponieważ mitochondria trakto-



Rys. 4. Schemat wewnątrzkomórkowej degradacji enzymów, wg [102]

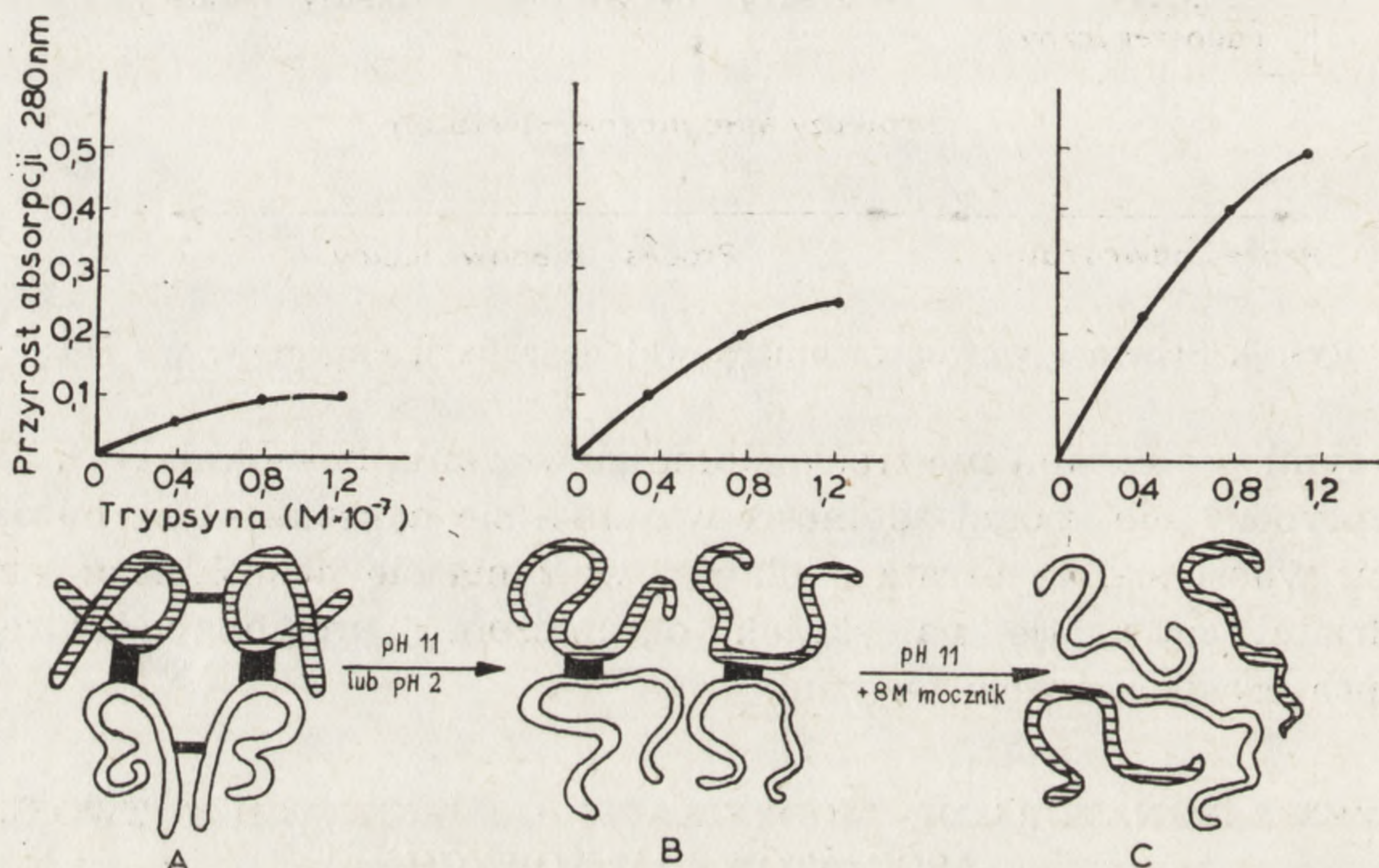
wane tymi proteazami nie tracą zdolności wiązania heksokinazy, a karbo-ksypeptydazy nie znoszą zdolności wiązania się heksokinazy z mitochondriami, wnosi się, że utrata zdolności wiązania się heksokinazy z mitochondriami następuje na skutek ograniczonej proteolizy w rejonie N-końca cząsteczki tego enzymu.

ZNACZENIE DENATURACJI, MODYFIKACJI CHEMICZNYCH I TWORZENIA ASOCJATÓW BIAŁKOWYCH

Warunkiem wychwytywania jak i degradacji białek w lizosomach jest ich denaturacja, modyfikacje chemiczne ich struktury oraz częściowa degradacja.

W wyniku denaturacji struktura kłębuszkowa białka rodzimego, niedostępna dla enzymów proteolitycznych, przechodzi we włókienkową, która jest podatna na działanie tych enzymów. Obserwowano to w przypadku denaturacji albuminy surowicy krwi, hemoglobiny i innych białek [87, 125, 186, 206]. Na rys. 5 przedstawiono wyniki eksperymentów wskazujących na zależność podatności hemoglobiny na proteolizę od stopnia denaturacji tego białka. Denaturacja podwyższa także optimum pH degradacji białek. Białka zdenaturowane mogą być dzięki temu szybciej degradowane niż natywne w warunkach pH komórkowego. Natywna enterotoksyna B wytwarzana przez stafilokoki jest degradowana przez enzymy lizosomalne najintensywniej w pH 3,2, a zdenaturowana termicznie lub za pomocą kwasu nadmanganowego w pH 4,5 [26]. Ponadto

zdenaturowane białka, m. in. zdenaturowana ferrytyna, kazeina i białka osocza krwi, ulegają o wiele szybciej endocytozie niż białka natywne [8, 58, 73]. Również enzymy proteolityczne przejawiają denaturacyjne działanie na hydrolizowane białka [125]. Rozszczepieniu przez enzym proteolityczny nawet jednego wiązania peptydowego w natywnym białku towarzyszy rozrywanie innych wiązań. Zmienia to strukturę przestrzenną białka i czyni dalsze wiązania peptydowe dostępnymi dla działania enzymu. Zgodnie z wymienionym ciągiem reakcji hydrolizy i postępujących zmian przestrzennych, raz rozpoczęta degradacja białka przebiega zwykle do końca.



Rys. 5. Wpływ denaturacji na degradację enzymatyczną hemoglobiny.

A — hemoglobina naturalna, B — hemoglobina częściowo zdenaturowana, C — hemoglobina całkowicie zdenaturowana. Grubość linii łączących podjednostki α i β odpowiada sile wiązań jonowych i wodorowych

Poznano także czynniki chroniące białko przed denaturacją. Do ważnych, z biologicznego punktu widzenia, stabilizatorów białek należą kwasy nukleinowe [31, 150, 216]. Wydaje się, że związanie białek w trakcie ich syntezy z kwasami nukleinowymi chroni je przed enzymatyczną degradacją. W momencie odrywania się białka od rybosomów tworzą się struktury ponadpierwszorzędowe uniemożliwiające proteolizę. Denaturacji zapobiega również łączenie się białek z kwasami tłuszczowymi [21]. Stabilizujący wpływ na strukturę przestrzenną określonego białka mogą mieć cząsteczki innych białek. Dlatego białka występujące w mieszaninie są bardziej odporne na denaturację niż białka izolowane [51].

Wiele enzymów chronionych jest przed proteolizą przez koenzymy i substraty [29, 71]. Stabilizatorami wielu białek [106], w tym także enzymów proteolitycznych [48, 176], są także kationy wapniowe.

Fakt, że denaturacja doprowadza do utraty biologicznych właściwości białek, przyspiesza ich wychwytywanie przez komórki i zwiększa podatność na proteolizę musi być uwzględniany przy stosowaniu w leczeniu biologicznie czynnych preparatów białkowych, enzymów, przeciwciał i hormonów. Używane w leczeniu handlowe preparaty białek mogą być w czasie izolowania lub przechowywania częściowo zmienione, co powoduje, że zostają one szybko pinocytowane i trawione. Takie preparaty ze względu na krótki okres półtrwania, w dużo mniejszym niż zamierzono stopniu mogą spełniać swoją rolę [8, 196].

Inną grupą czynników regulujących proteolizę komórkową są enzymatyczne modyfikacje białek zachodzące po odłączeniu łańcuchów polipeptydowych od rybosomów. Polegają one na: hydroksylacji reszt lizyny i proliny; fosforylacji seryny, treoniny i histydy; metylacji reszt argininy, lizyny, histydy i aminokwasów dwukarboksyłowych; acetylacji lizyny; amidacji reszt aminokwasów dwukarboksyłowych i dezaminacji ich amidów; utlenianiu mostków dwusiarczkowych oraz tworzeniu wiązań międzycząsteczkowych [60, 156, 169, 173]. Często to samo białko może ulegać różnym przekształceniom, przez co rozszerzają się możliwości modelowania jego podatności na działanie enzymów proteolitycznych. Stwierdzono, że defosforylacja enzymatyczna kazeiny zwiększa podatność tego białka na działanie trypsyny [139]. Wskazuje to na możliwość współdziałania enzymów innych grup z proteazami w dokonywaniu degradacji białek. W eksperymentach modelowych, stosując odpowiednie modyfikacje białek lub peptydów, można zwiększyć specyficzną hydrolizę enzymatycznej, czyli ograniczyć działanie proteaz lub też spowodować hydrolizę wiązań peptydowych, uprzednio nie atakowanych przez proteazy, przez co rozszerza się działanie tych enzymów. Zwiększenie specyficznego działania trypsyny można uzyskać przez modyfikację reszt lizyny. Zablokowanie ϵ -aminowych grup lizyny przez 2,4-dwunitrofluorobenzen lub trójfluorotiooctan etylu uniemożliwia hydrolizę wiązań peptydowych utworzonych przez ten aminokwas. W tej sytuacji hydrolizie ulegają wyłącznie wiązania peptydowe przy grupie karboksylowej argininy [3]. Modyfikacja reszt cysteiny lub seryny w białkach i peptydach za pomocą β -bromoetyloaminy prowadzi do powstania S-(β -aminoetylo)-cysteiny, która swą budową przypomina bardzo lizynę. Wiązanie peptydowe w sąsiedztwie tak zmodyfikowanej cysteiny lub seryny ulega hydrolizie pod wpływem trypsyny podobnie jak wiązanie obok lizyny lub argininy [66, 126]. Uprzednie rozszczepienie wiązań dwusiarczkowych powoduje także zwiększenie podatności białek na proteolizę. Redukcyjne rozbicie mostków dwusiarczkowych odgrywa istotną rolę w inaktywacji i degradacji insuliny [77, 127, 199] i immunoglobulin [64].

Stwierdzono, że białka obce [163] i białka zawierające w strukturze

analogi naturalnych aminokwasów [85, 107, 108] są szybciej degradowane. Dotyczy to białek, do których struktury wbudowała się *in vivo* kanawanina, będąca analogiem strukturalnym argininy, bądź *p*-fluorofenylalanina, analog fenyloalaniny, czy 6-fluorotryptofan, analog tryptofanu, i etionina — analog metioniny.

Istotne znaczenie w degradacji białek ma asocjacja cząsteczek różnych białek oraz asocjacja białek z innymi związkami chemicznymi, zwykle typu polijonowego. Stwierdzono, że mieszaniny białek tworzących asocjaty międzycząsteczkowe są degradowane wolniej niż białka pojedyncze [51]. Kompleksy antygenów z przeciwciałami są wolniej degradowane niż antygeny [201]. Polikationy, takie jak histony, protaminy i lizozym, hamują degradację enzymatyczną kolagenu [164], fibryny [114] i innych białek [104, 120, 212]. Natomiast łączenie się niektórych białek z polisacharydami czyni je bardziej [200] lub mniej [143, 191] opornymi na proteolizę.

Łączenie się białek z pochodnymi kwasu mefenamowego i indometacyny chroni je także przed proteolizą [181]. Wiązanie białek zasadowych z żywicami jonowymiennymi daje podobne efekty [79]. W układach enzym-substrat polijony mogą asocjować nie tylko z substratem, ale także z enzymem, co zależy od pH środowiska [140]. W układzie trypsyna-hemoglobina-kwas poliakrylowy, przy wartościach pH większych niż 8,0 jedynie trypsyna jako białko bardziej zasadowe jest naładowana dodatnio. Tworzy ona kompleks z kwasem poliakrylowym, co zmniejsza jej ładunek dodatni i obniża w ten sposób przyciąganie elektrostatyczne przez anionową hemoglobinę, w wyniku czego jej degradacja zwalnia się. Poniżej punktu izoelektrycznego hemoglobiny sytuacja jest odwrotna. Kwas poliakrylowy tworzy kompleks z hemoglobina, zmniejsza to siły odpychania między kationowym enzymem i kationowym substratem i sprzyja ich wzajemnemu oddziaływaniu.

INHIBITORY PROTEAZ KOMÓRKOWYCH

Inhibitory enzymów proteolitycznych występują w komórkach, przestrzeniach międzykomórkowych, w osoczu krwi i płynach ustrojowych. Charakterystyka inhibitorów komórkowych enzymów proteolitycznych podana jest w tabeli 7.

Istotną rolę w regulacji aktywności enzymów lizosomalnych odgrywają glikozaminoglikany [6]. Związki te hamują aktywność wielu enzymów lizosomalnych o kwaśnych optimumach pH, w tym także aktywność katepsyny A, B, C i D. Stopień zahamowania aktywności enzymów lizosomalnych przez glikozaminoglikany zależy od pH. Największe hamowa-

TABELA 7. Inhibitory tkankowych enzymów proteolitycznych

Inhibitor	Swoistość działania inhibicyjnego	Miejsce występowania	Charakterystyka fizykochemiczna i biochemiczna	Literatura
Inhibitor wątrobowy	Katepsyna B ₁ , katepsyna C	Fracja mikrosomalno-cytoplazmatyczna	Termostabilny, wysokocząsteczkowy, działanie inhibicyjne zależy od pH	54, 105
Inhibitor leukocyтарny	Obojętna proteaza, elastaza i kolagenaza leukocytów	Cytoplazma	Termolabilny. Trwały w zakresie pH 6–8	35, 96, 115
Orozomukoid	Katepsyna C	Surowica krwi	Glikoproteid	111, 112
Inhibitor węglowodanowy	Katepsyna B ₁	Surowica krwi	Związany z haptoglobina, występuje we frakcji IV-4 Cohna	178, 179
α ₁ -antytrypsyna	Obojętna proteaza i elastaza leukocytów, proteazy przewodu pokarmowego, krwi i bakterii	Surowica krwi	Glikoproteid o c. cz. 45 000. Znosi aktywność enzymów proteolitycznych w ich działaniu na substraty niskocząsteczkowe i wysokocząsteczkowe. Występuje w stężeniu 21–28 mg%	95, 113, 149
α ₂ -makroglobulina	Katepsyna B ₁ , katepsyna D, kolagenaza tkankowa, obojętna proteaza i elastaza leukocytów, proteazy przewodu pokarmowego, krwi i bakterii	Surowica krwi	Glikoproteid o c. cz. 760 000. Hamuje aktywność proteolityczną, ale jej całkowicie nie znosi, nie obniża lub obniża tylko nieznacznie aktywności enzymów proteolitycznych w ich działaniu na niskocząsteczkowe substraty. Występuje w stężeniu 250–340 mg%	11, 182, 205

nie obserwuje się w pH 4,0–4,5. Wraz ze wzrostem pH ich działanie zmniejsza się. Białka zasadowe znoszą działanie inhibicyjne glikozamino-glikanów. Cytozol wątroby zawiera inhibitor katepsyny B i C [54, 105]. Inhibitor ten jest termostabilny i nie dializuje przez błony półprzepuszczalne. Stopień zahamowania aktywności katepsyny B i C przez ten inhibitor zależy również od pH. W pH zbliżonych do fizjologicznego ha-

hamowanie to osiąga 60–70%. Z tego względu proteazy lizosomalne mogą przejawiać w cytoplazmie tylko śladową aktywność. W cytozolu leukocytów występuje inhibitor proteazy neutralnej [115] i elastazy [96]. Surowica krwi zawiera szereg inhibitorów proteaz komórkowych. Orozomukoid surowicy krwi jest inhibitorem katepsyny C [111], a węglowodanowy inhibitor związany z haptoglobina hamuje aktywność katepsyny B₁ [178, 179]. Silnymi poliwalentnymi inhibitorami enzymów proteolitycznych jest α_1 - antytrypsyna i α_2 - makroglobulina osocza krwi. Efekty wiązania się enzymów proteolitycznych z tymi inhibitorami są odmienne. α_1 - antytrypsyna hamuje zarówno hydrolizę białek, jak i niskocząsteczkowych substratów syntetycznych. Wiązanie enzymów proteolitycznych z α_2 - makroglobulina powoduje znaczne obniżenie ich aktywności proteolitycznej, przy czym nigdy nie jest ona znoszona całkowicie, natomiast aktywność w stosunku do drobnocząsteczkowych substratów jest zachowana aż w 75–100%. Ponadto enzymy będące w kompleksie z α_2 - makroglobulina nie są wrażliwe na działanie wysokocząsteczkowych inhibitorów, podczas gdy inhibitory niskocząsteczkowe wywierają efekt hamujący (tabela 8).

Proenzymy oraz enzymy o zablokowanych inhibitorami centrach aktywnych nie wiążą się z α_2 - makroglobulina, co wiąże się z mechanizmem działania tego inhibitora. Proteazy odszczepiają fragment peptydowy od α_2 - makroglobuliny, w wyniku czego ulega ona zmianom konformacyjnym umożliwiającym wiązanie się z enzymem, które ma miejsce poza jego centrum katalitycznym (rys. 6). Inhibitor stanowi w ten sposób jedynie przeszkodę przestrzenną. Przeszkoda ta jest skuteczna w odniesieniu do substratów wysokocząsteczkowych, natomiast substraty niskocząsteczkowe docierają do centrum aktywnego enzymu i są hydrolizowane. Tłumaczy to także nieskuteczność inhibicyjnego działania inhibitorów wysokocząsteczkowych, takich jak α_1 - antytrypsyna, inhibitor sojowy lub inhibitor trzustkowy, w stosunku do aktywności kompleksów proteaz z α_2 - makroglobulina. Ma to bardzo duże znaczenie fizjologiczne, gdyż kompleks proteaza - α_2 - makroglobulina może degradować białka swą resztkową aktywnością w obecności inhibitorów osoczowych czy tkankowych.

Wśród inhibitorów proteaz znajdują się inhibitory niekompetycyjne i kompetycyjne. Typ hamowania przez określony inhibitor może jednak zależeć od jego stężenia i bardzo często ma charakter mieszany [46, 174, 192].

Działanie enzymów proteolitycznych może być także hamowane przez wysokie stężenia substratów, pośrednie produkty ich degradacji i końcowe produkty reakcji [28, 42, 62, 65, 147, 177, 197].

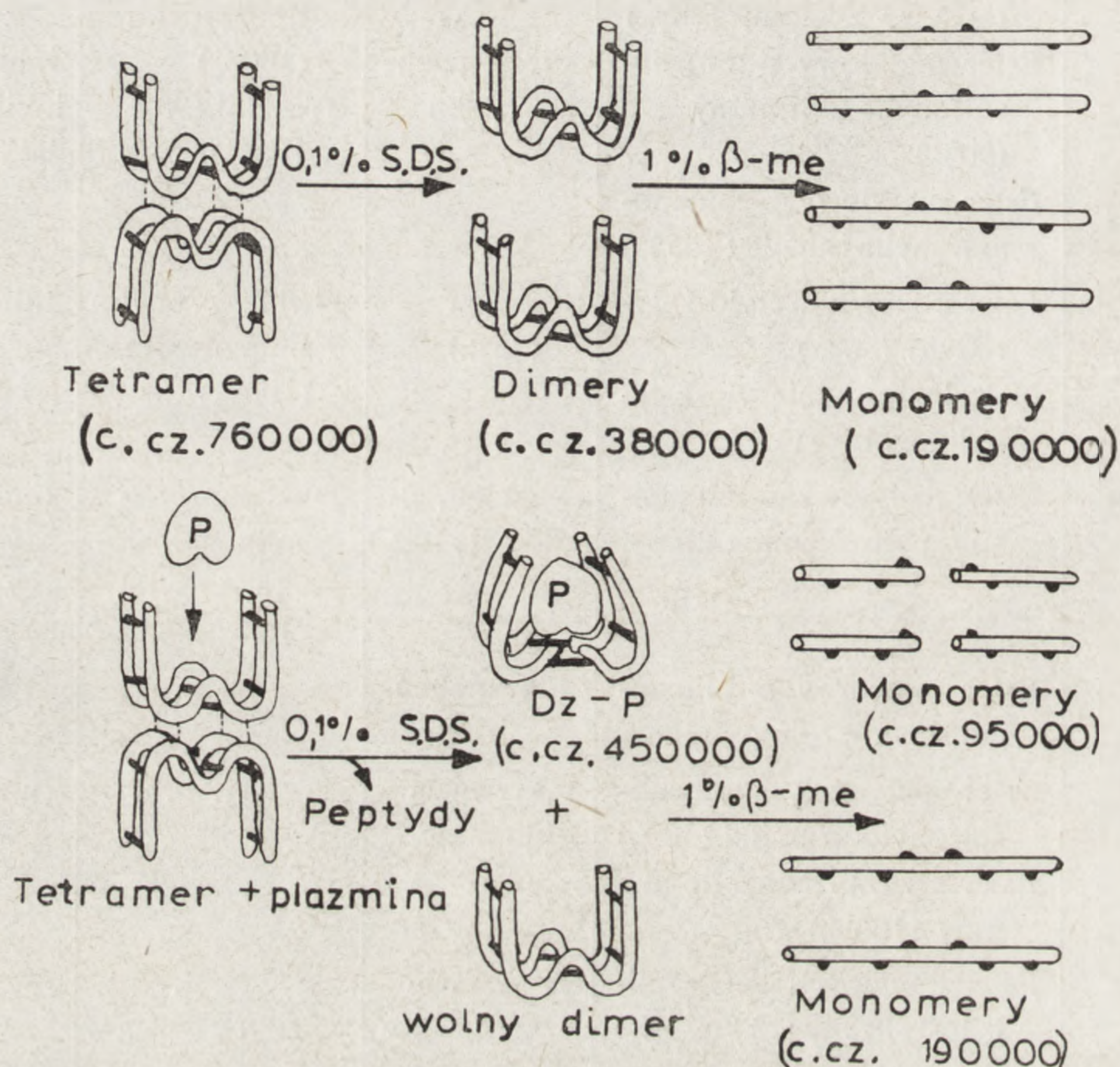
Olbrzymia rola inhibitorów uwidacznia się najwyraźniej w przy-

TABELA 8. Właściwości enzymów proteolitycznych związanych z α_2 -makroglobuliną surowicy krwi człowieka, cyt. wg [11]

Enzym proteolityczny	Enzym związany z α_2 -makroglobuliną			
	Aktywność wobec substratu*		Hamowanie przez inhibitor	
	Niskocząsteczkowego	Wysokocząsteczkowego	Niskocząsteczkowego	Wysokocząsteczkowego**
Trypsyna wołu	p-nitroamilid N- α -benzoilo-D, L- argininy (80%) Ester metylowy p-toluenosulfonylo-L-argininy (90%) Ester metylowy p-toluenosulfonylu-L-lizyny (65%)	Kazeina (5–9%) Fibrynogen (0%)	Dwuizopropylfluorofosforan (100%) Trasylol (90–100%)	Inhibitor z fasoli, inhibitor sojowy, inhibitor z białka jaja (0%)
α -chymotrypsyna wołu	Ester etylowy acetylo-L-tyrozyny (80%) Naftylamid glutarylo-L-fenylalaniny (115%)	Kazeina (25%)	Dwuizopropylfluorofosforan (100%)	Inhibitor sojowy (0%)
Plazmina wołu	Ester metylowy p-toluenosulfonylo-argininy (100%)	Kazeina, fibryna (0%)	Dwuizopropylfluorofosforan, trasylol (100%)	Inhibitor sojowy, inhibitor z fasoli (0%)
Trombina człowieka	Ester metylowy p-toluenosulfonylo-argininy (100%)	Fibrynogen	N. o.	N. o.
Kalikreina człowieka	Ester metylowy p-toluenosulfonylo-argininy (50%) Ester etylowy benzoilo-argininy (100%)	Aktywacja kininogenu (0%)	N. o.	Inhibitor sojowy (0%)
Urokinaza człowieka	Ester metylowy acetylo-glicylo-L-lizyny (75%)	Aktywacja plazminogenu (0%)	N. o.	N. o.
Elastaza świni	N. o.	Hemoglobina (15%)	N. o.	N. o.
Obojętna proteaza leukocytów człowieka	N. o.	Kazeina, fibrynogen (częściowo)	N. o.	N. o.
Katepsyna B ₁ człowieka	Naftylamid benzoilo-D.L.-argininy (80%)	Azokazeina (50%) Kolagen (0%)	p-toluenosulfonylo-chlorometylofenyloalanina (100%)	IgG (częściowe)
Klostridiopeptydaza A	p-fenylazobenzoksykarbonylo-propylo-leucylo-glicylo-prolylo-D-arginina (70%)	Kolagen (3%)	N. o.	N. o.
Kolagenaza maziówki i skóry królika oraz ogona kijanki	N. o.	Kolagen (0%)	N. o.	N. o.
Subtylopeptydaza A	N. o.	Kazeina (25%)	N. o.	α_1 -antytrypsyna (częściowe)

* W porównaniu z enzymem wodnym; ** powyżej 8000 daltonów; N.o. — nie oznaczono

padkach obniżonego stężenia niektórych z nich, co powoduje wystąpienie określonych stanów chorobowych. Stwierdzono między innymi, że wrodzony niedobór α_1 -antytrypsyny prowadzi do rozedmy płuc [121, 124] i uszkodzenia innych narządów [76, 122]. U osób z wrodzonym niedoborem antytrombiny III obserwowano częstszą zapadalność na chorobę



Rys. 6. Model cząsteczki α_2 -makroglobuliny i mechanizm wiązania enzymów proteolitycznych przez ten inhibitor, wg [53].

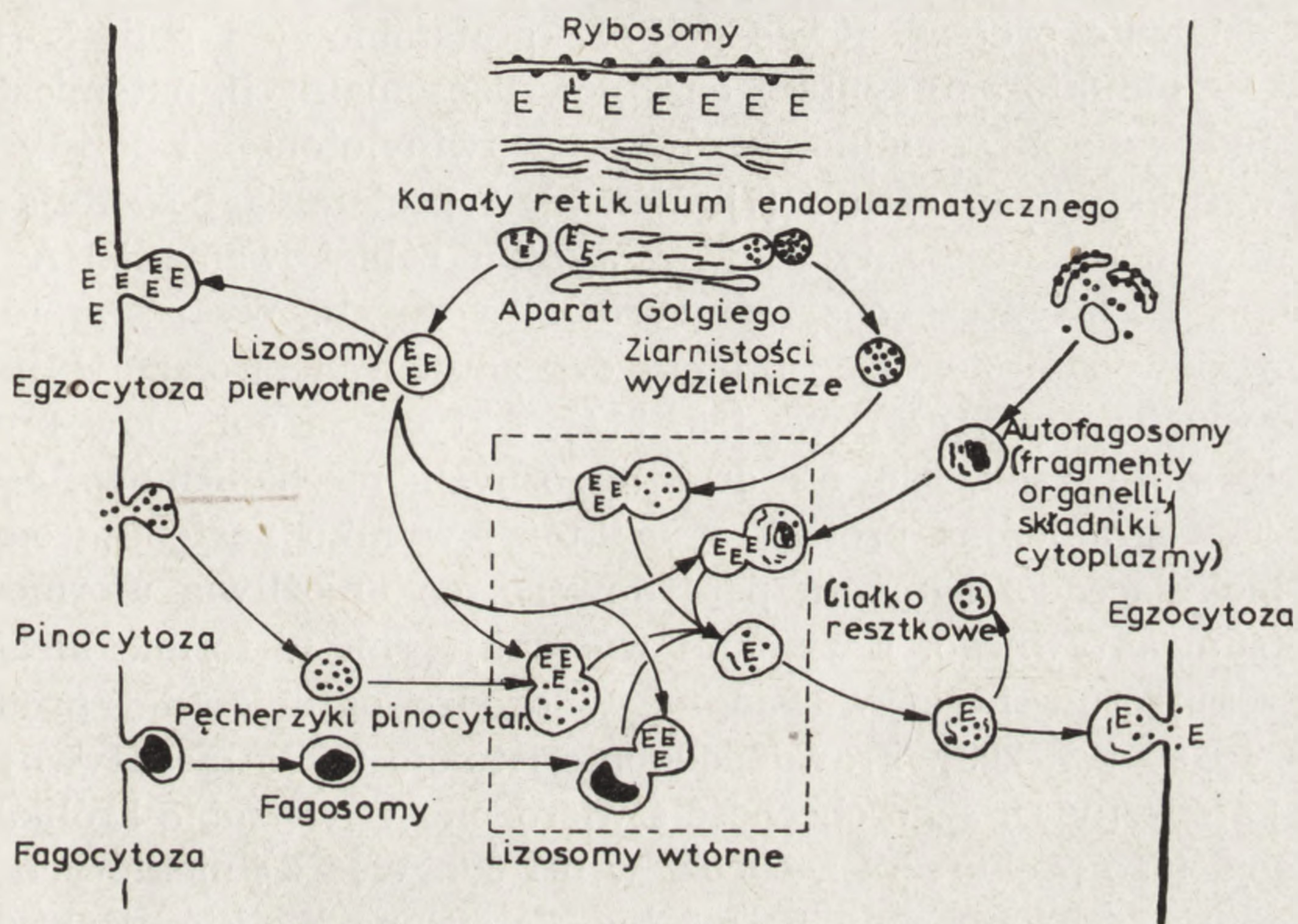
S.D.S. — siarczan dodecylosulfonowy; β -me- β -merkaptioetanol; P — plazmina (c.c.z. 70 000), Dz — dimer zmodyfikowany

zakrzepową [44, 78]. Niedobór inhibitorów elastazy w osoczu krwi sprzyja powstawaniu zmian w ścianach naczyń żylnych, usposabiających do powstawania żylaków [119]. Ochronne działanie inhibitorów uwidacznia się także w przypadkach uwalniania proteaz z lizosomów do cytoplazmy i przestrzeni międzykomórkowych w różnych stanach patologicznych, tym bardziej, że w przypadkach takich ma miejsce wzmożona synteza tych inhibitorów [112]. Inhibitory enzymów proteolitycznych są degradowane w lizosomach [18, 166].

REGULACJA DEGRADACJI BIAŁEK W LIZOSOMACH KOMÓRKOWYCH

Enzymy lizosomalne są syntetyzowane w rybosomach komórkowych, skąd są transportowane przez kanały retikulum endoplazmatycznego do

aparatu Golgiego [148]. W pęcherzykach tego aparatu są one gromadzone i zamykane błoną, w wyniku czego tworzą się lizosomy pierwotne (rys. 7). Twory te nie zawierają substratów. Po połączeniu się lizosomów pierwotnych z materiałem trawiennym powstają lizosomy wtórne. W zależności od pochodzenia tego materiału, powstają autolizosomy zawierające materiał własny komórki, jak np. zużyte białka cytoplazmatyczne, frag-



Rys. 7. Schemat powstawania lizosomów komórkowych, wg [198, 202]. E — enzymy lizosomalne

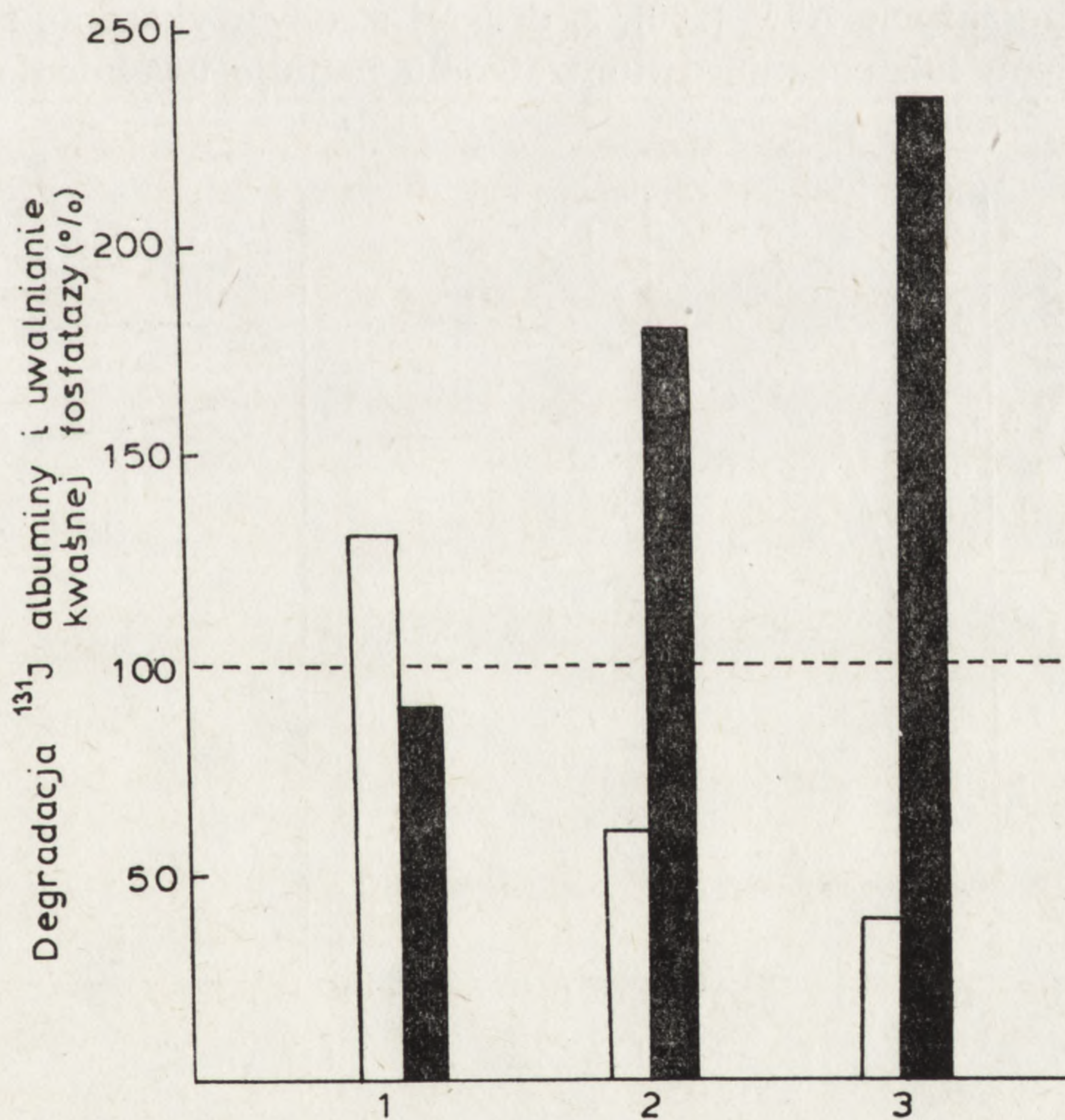
menty zużytych mitochondriów lub retikulum endoplazmatycznego, lub heterolizosomy, które zawierają materiał pobrany ze środowiska drogą pinocytozy i fagocytozy. Powstające w lizosomach produkty trawienia wydostają się do cytoplazmy stanowiąc substraty dla innych przemian metabolicznych komórki. Wewnątrz lizosomów pozostają jedynie substancje odporne na działanie enzymów. Lizosomy takie noszą nazwę ciał reszkowych i są one wydalane z komórek drogą ekskrecji. Asocjacja lizosomów z innymi strukturami komórkowymi, materiałem fagocytowanym lub pinocytowanym, a także różny stopień zaawansowania trawienia tego materiału powoduje, że te organella komórkowe cechuje olbrzymia heterogenność. Dotyczy ona ich rozmiarów, składu enzymatycznego i chemicznego [38, 59, 67, 68, 203].

Poznano szereg czynników fizycznych i związków chemicznych modelujących lizosomalną degradację białek. Działają one na zasadzie różnych mechanizmów. Wpływają na tempo syntezy, aktywację lub inhi-

bieję enzymów lizosomalnych, proces powstawania lizosomów pierwotnych i ich liczbę, transport wewnątrzkomórkowy lizosomów i przepuszczalność błon lizosomalnych. Wzmożona synteza katepsyny D i innych enzymów lizosomalnych następuje po endocytozie [7, 32]. Efekt ten znosi podanie puromycyny. Wzmożona synteza lizosomalnych enzymów proteolitycznych rozpoczyna się dopiero w czasie degradacji białek. Wskazują na to eksperymenty, w których podawano polimery wrażliwe i niewrażliwe na działanie proteaz. Kwas poli-L-glutaminowy i poli-L-lizyna okazały się induktorami syntezy enzymów lizosomalnych, natomiast polimery zbudowane z D-aminokwasów — poliwinylotoluen i polistyren — nie wywoływały tego efektu [7]. Histony i protamina powodują obniżenie aktywności proteolitycznej w wyniku zablokowania RNA odpowiedzialnego za syntezę enzymów proteolitycznych. Wykazano to między innymi w odniesieniu do proteaz degradujących pirolazę tryptofanu i aminotransferazę tyrozynową [25, 214]. Aktywacja enzymów proteolitycznych może zachodzić na drodze różnych mechanizmów. Jednym z nich jest ograniczona proteoliza, w której wyniku następuje odszczerpienie blokującego fragmentu peptydowego, co umożliwia uformowanie się centrum aktywnego. Enzymami występującymi w formie nieaktywnych prekursorów i aktywowanymi w drodze ograniczonej proteolizy są kolagenazy [16, 209]. Prawdopodobnie istnieje także nieaktywny prekursor katepsyny D. Jego obecność stwierdzono w wątrobie królika [55]. Aktywacja tego prekursora zachodzi w pH 3,0. Według niektórych autorów prekursorem katepsyny B₁ ma być katepsyna B₂, której aktywacja ma polegać na również ograniczonej proteolizie [56]. Enzymy proteolityczne o sulfhydrylowych centrach aktywnych, do których należy katepsyna B₁ i katepsyna C, aktywowane są przez związki o właściwościach redukcyjnych, takie jak glutation i cysteina. Katepsyna C aktywowana jest ponadto przez aniony chlorkowe, będące jej efektorami allosterycznymi [74]. Liczbę lizosomów zwiększa niedobór potasu [159], przewlekłe stosowanie barbituranów [142, 157] i naświetlanie promieniami X [217]. Stwierdzono, że lizosomy wędrują do miejsc komórki, w których odbywa się fagocytoza [204]. Migrację lizosomów hamuje kolchicina [130]. Na proces ten mają wpływ także niektóre hormony [40, 45] i cykliczny 3',5' - AMP [189]. Proces endocytozy jest hamowany przez błękit trypanu i suraminę [34, 128]. Enzymy lizosomalne mogą działać efektywnie tylko na substraty, które dostały się do ich wnętrza. Odgraniczenie enzymów lizosomalnych od zawartości komórki warunkują dwa czynniki, którymi jest błona lizosomalna i wiązania jonowe enzymów lizosomalnych z polianionowym lipoproteidem zrębu lizosomów [72, 110]. Elementem kontrolującym degradację białek jest wybiórcza zdolność czynnego transportu substratów do lizosomów i odpływ produktów w odwrotnym kie-

runku. Ważne znaczenie stanu fizykochemicznego i struktury przestrzennej błony lizosomalnej w regulacji proteolizy wewnątrzkomórkowej było powodem poszukiwań licznych czynników fizycznych i związków chemicznych wpływających na tę błonę stabilizująco lub labilizująco [50, 109]. Poprzez modelowanie struktury i funkcji błon lizosomalnych działają hormony katabolizujące i anabolizujące, wpływające na bilans białkowy [82, 103, 104]. Modyfikacja układu przestrzennego składników błony lizosomalnej przez kortyzon zabezpiecza przed ucieczką enzymów z lizosomów i zwiększa pobieranie białek przez lizosomy [30]. Degradacja znakowanej ^{131}J -albuminy w izolowanych lizosomach przebiega szybciej po dodaniu do układu inkubacyjnego preparatów stabilizujących błony lizosomalne, podczas gdy związki labilizujące błony lizosomalne znacznie zwalniają ten proces (rys. 8).

W nieuszkodzonych lizosomach błona lizosomalna jest nieprzepuszczalna dla enzymów zawartych w tych organelach komórkowych, trans-

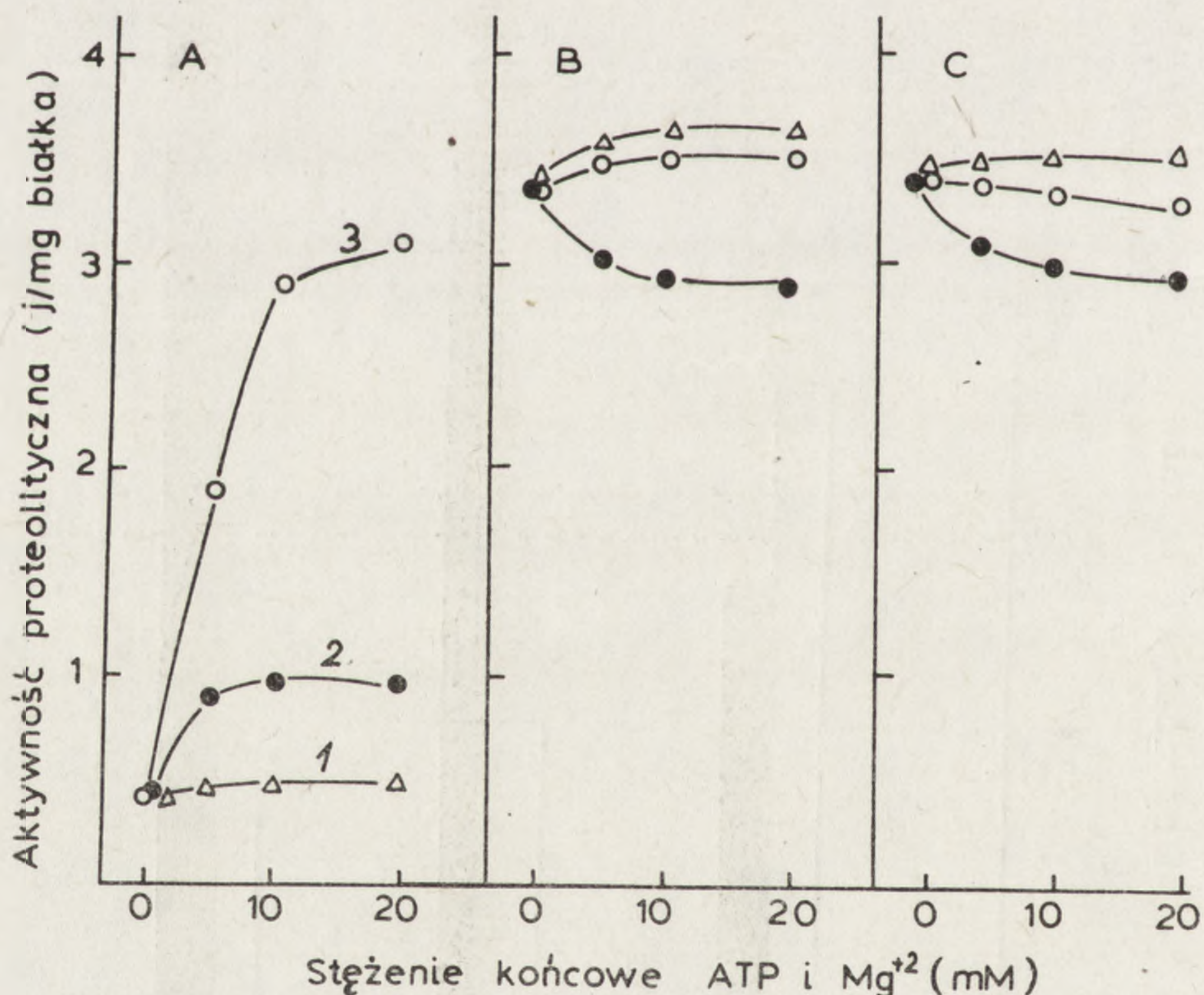


Rys. 8. Wpływ stabilizatorów i labilizatorów błon lizosomalnych na degradację ^{131}J -albuminy (\square) i uwalnianie kwasnej fosfatazy (\blacksquare), wg [15].

1 — chlorochina (1mM), 2 — witamina A (1mM), 3 — etiocholanon (1,75 mM). Degradację albuminy i ilość uwolnionej kwasnej fosfatazy w układzie kontrolnym przyjęto za 100%.

port zaś substratów do wnętrza lizosomów zachodzi sprawnie. W przypadku uszkodzenia błon lizosomalnych kierunek przemieszczania jest odwrotny, ustaje transport czynny substratów do wnętrza lizosomów, z lizosomów zaś wydostają się enzymy do cytoplazmy. Wydostanie się enzymów lizosomalnych poza obręb tych organelli powoduje ich rozcieńczenie, ponadto znajdują się one w pH zbyt wysokim dla swego działania i stykają się z inhibitorami w wyniku czego ulegają szybkiej inaktywacji [135, 137]. Obniżona aktywność proteaz lizosomalnych w takich przypadkach jest powodem zwolnienia degradacji białek, które nagromadzają się w komórkach lub wydalone są poza ich obręb. Przykładem mogą tu być zaburzenia proteolizy tyreoglobuliny powodujące nagromadzenie się tego białka w tarczycy oraz przedostawanie się go do krążenia w stanie niezmiennym [12, 99, 152].

Endocytoza i wewnątrzkomórkowa degradacja białek zależna jest od procesów wytwarzających energię i od udziału związków wysokoenergetycznych [23, 33]. Stwierdzono między innymi, że fagocytozie towarzyszy zwiększenie oddychania komórkowego [170], przyspieszenie glikolizy [47] i zwiększone zużycie ATP [100]. Z drugiej strony wykazano, że odcięcie dopływu tlenu lub podanie dwunitrofenolu hamuje uwalnianie ^{15}S - me-

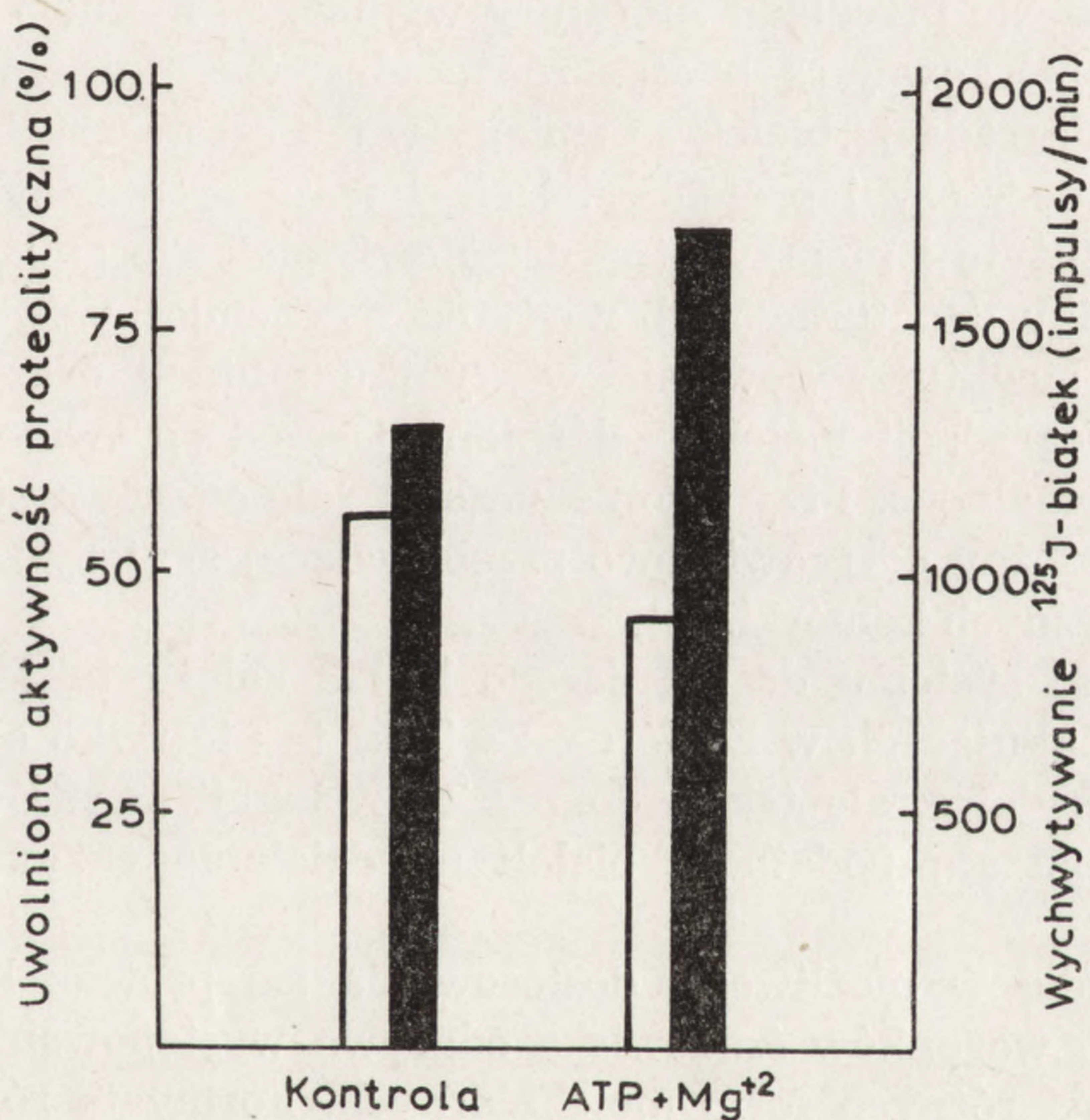


Rys. 9. Wpływ ATP i Mg^{+2} na aktywność proteolityczną lizosomów nieuszkodzonych (A) oraz poddanych działaniu Tritonu X - 100 (B) i ultradźwięków (C), wg [83].

Aktywność proteolityczną oznaczano przy użyciu hemoglobiny, w pH 4.5.

1 - Mg^{+2} , 2 - ATP, 3 - ATP + Mg^{+2}

tioniny lub ^{14}C - leucyny z białek skrawków wątroby [175, 185]. Zwolnienie degradacji białek po zastosowaniu inhibitorów utleniania tkankowego znajduje potwierdzenie także w badaniach innych autorów [86]. Dalsze eksperymenty wykazały zależność szybkości degradacji białek w lizosomach od obecności ATP [69, 89, 92, 131]. Ponieważ ATP wpływa na szybkość degradacji białek tylko w przypadku lizosomów nieuszkodzonych, a nie działa po ich rozbiciu, wysunięto wniosek, że działanie ATP odbywa się poprzez wpływ na błony lizosomalne (rys. 9). Mechanizm stymulacji proteolizy wewnątrzlizosomalnej przez ATP polega na przyspieszeniu włączania do lizosomów białek oraz utrudnieniu uwalniania enzymów lizosomalnych do środowiska (rys. 10).



Rys. 10. Wpływ ATP i Mg^{+2} na uwalnianie aktywności proteolitycznej (\square) i włączanie ^{125}J - białek cytozolu (\blacksquare) do izolowanych lizosomów wątroby szczura, wg [83].

Interesujących danych odnośnie do roli ATP w degradacji wewnątrzkomórkowej białek dostarczył eksperyment polegający na pomiarze szybkości proteolizy ^{131}J - albuminy w lizosomach w zależności od pH środowiska inkubacyjnego [136]. Jeśli umieści się lizosomy w środowisku obojętnym lub zasadowym degradacja albuminy zachodzi wolniej niż w środowisku kwaśnym. Wpływ pH na szybkość tego procesu jest jednak eliminowany przez dodanie ATP. Na tej podstawie postuluje się, że ATP dostarcza energii pompie protonowej działającej w błonach lizosomalnych, która zapewnia niskie pH wewnątrz lizosomów. ATP wydaje

się być również niezbędny jako źródło energii potrzebnej do aktywnego usuwania z wnętrza lizosomów produktów degradacji białek [171]. ATP wykorzystywany jest także do syntezy adenyłowych pochodnych kwasu asparaginowego, które aktywują proteazy działające w obojętnym pH [197]. Dane te dotyczące zależności funkcji błony lizosomalnej od poziomu związków wysokoenergetycznych wskazują, że czynniki uszkodzające błony biologiczne niszczą lizosomy nie tylko w działaniu bezpośrednim, ale także poprzez destrukcję mitochondriów [138].

UWAGI KOŃCOWE

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że mechanizmy regulacji proteolizy komórkowej są bardzo różnorodne. Zasadniczym czynnikiem limitującym degradację białek są zmiany w ich cząsteczkach, które usposabiają do pinocytozy i proteolizy. Dzięki temu organizmy żywe eliminują białka zużyte i nieprzydatne ustrojowi, białka o zmienionej strukturze w wyniku denaturacji lub modyfikacji chemicznych, białka o nieprawidłowej strukturze powstałe w wyniku mutacji oraz białka obce.

Tempo degradacji białek uzależnione jest od sprawnie działającego aparatu lizosomalnego. Przy czym kluczową rolę odgrywa stan błon lizosomalnych, zależny od prawidłowo przebiegającej syntezy związków wysokoenergetycznych komórki.

Sprawność systemu degradującego białka zależy także od poziomu związków redukujących w komórce. Związki te nie tylko aktywują proteazy sulfhydrylowe, ale także, dokonując redukcji mostków dwusiarczkowych, zwiększają podatność białek na działanie enzymów proteolitycznych.

Istotną rolę w możliwości dostosowania się proteaz komórkowych do zmiennych warunków środowiska odgrywa występowanie tych enzymów w postaci różnych form molekularnych. Formy te różnią się między sobą szeregiem właściwości ważnych w katalizie, jak np. powinowactwem do substratów, optimumami pH i innymi. Istnienie izoenzymów wykazano dla katepsyny A [133], B₁ [56], C [132], D [9, 168, 207] i innych proteaz komórkowych [17, 146, 149, 153].

Znajomość mechanizmów regulacji proteolizy komórkowej ma ważne znaczenie praktyczne. Możliwości w tym względzie prowadzą się obecnie głównie do modelowania przepuszczalności błon lizosomalnych [52, 109] oraz do stosowania inhibitorów proteaz komórkowych [116, 214].

LITERATURA

- [1] ALBERTI K. G. M. M., BARTLEY W., Further observation on the production of amino acids by rat-liver mitochondria and other subcellular fractions, *Biochem. J.*, **95**: 641-656, 1965.
- [2] ALI S. Y., EVANS L., Studies on the cathepsins in elastic cartilage, *Biochem. J.*, **112**: 427-433, 1969.
- [3] ANFINSEN C. B., SELA M., TRITCH H., A method for the specific proteolytic cleavage of proteins chains, *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**: 156-163, 1956.
- [4] ARIAS J. M., DOYLE D., SCHIMKE R. T., Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **244**: 3303-3315, 1969.
- [5] AURICCHIO F., LIQUORI A., A study of tyrosine aminotransferase inactivating system in rat liver homogenate, *FEBS Letters* **12**: 329-332, 1976.
- [6] AVILA J. L., CONVIT J., Inhibition of Leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro, *Biochem. J.*, **152**: 57-64, 1975.
- [7] AXLINE S. G., COHN Z. A., In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis, *J. Exp. Med.*, **131**: 1239-1260, 1970.
- [8] BARNHART M. J., Importance of neutrophilic leukocytes in the resolution of fibrin, *Fed. Proc.*, **24**: 846-853, 1965.
- [9] BARRETT A. J., Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver, *Biochem. J.*, **117**: 601-607, 1970.
- [10] — Lysosomal enzymes, [w] *Lysosomes a laboratory handbook*, red. J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1972, 46-135.
- [11] BARRETT A. J., STARKEY P. M., The interaction of α -macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism, *Biochem. J.*, **133**: 709-724, 1973.
- [12] BENUA R. S., DOBYNS B. M., Iodinated compounds in the serum, disappearance of radioactive iodine from the thyroid, and clinical response in patients treated with radioactive iodine, *J. Clin. Endocrinol.*, **15**: 118-130, 1955.
- [13] BENUCK M., MARKS N., Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 153-160, 1975.
- [14] BENUCK M., MARKS N., HASHIM G. A., Metabolic instability of myelin proteins. Breakdown of basic protein induced by brain cathepsin D, *Eur. J. Biochem.*, **52**: 615-621, 1975.
- [15] BERTINI F., BARI D., The effect of drugs on the rate of proteolysis in vitro within secondary liver lysosomes, *J. Cell. Physiol.*, **76**: 225-230, 1970.
- [16] BIRKEDAL - HANSEN H., COBB Ch. M., TAYLOR R. E., FULLMER H. M., Procollagenase from bovine gingiva, *Biochim. Biophys. Acta.* **429**: 229-238, 1976.
- [17] BIRKEDAL - HANSEN H., TAYLOR R. E., FULLMER H. M., Rabbit alveolar macrophage collagenase: evidence of polymeric forms, *Biochim. Biophys. Acta.* **420**: 428-432, 1976.
- [18] BLATRIX C., AMOUCH P., DROUET J., STEINBUCH M., Study on the plasmatic elimination of the α -macroglobulin proteinase complexes. *Path. Biol.*, **21**: 11-14, 1973.
- [19] BORGES D. R., LIMAOS E. A., PRADO J. L., Catabolism of vasoactive polypeptides by perfused rat liver, *Naynyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **295**: 33-40, 1976.

- [20] BOUDET A., HUMPHREY T. J., DAVIES D. D., The measurement of protein turnover by density labelling, *Biochem. J.*, **152**: 409-416, 1975.
- [21] BOYER P. D., BALLOU G. A., LUCK J. M., The combination of fatty acids and relative compounds with serum albumin, *J. Biol. Chem.*, **167**: 407-424, 1947.
- [22] BRIGGS D. W., GEORGE W. J., FISHER J. W., Inactivation of erythroprotein by hepatic lysosomes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **144**: 394-399, 1973.
- [23] BROSTROM C. O., JAFFAY H., Protein catabolism in rat liver homogenates A re - evaluation of the energy requirement for protein catabolism, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4001-4008, 1970.
- [24] BUCZKO W., de GAETANO G., FRANCO R., DONATI M. B., Biological properties of dialysable peptides derived from plasmin digestion of bovine fibrinogen preparations, *Thrombos. Haemostas.*, **35**: 651-657, 1976.
- [25] CAFFERY J. M., WHICHARD L., IRVIN J. L., Induction of hepatic tryptophan pyrrolase and tyrosine transaminase by histones and other polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta*, **157**: 616-626, 1968.
- [26] CANONICO P. G., Lysosomal catabolism of a protein toxin: staphylococcal enterotoxin B, *Biochim. Biophys. Acta*, **322**: 251-257, 1973.
- [27] CHANDLER M. L., VARANDANI P. T., Kinetic analysis of the mechanism of insulin degradation by glutathione — insulin transhydrogenase (Thiol: protein - disulfide oxidoreductase), *Biochemistry*, **14**: 2107-2115, 1975.
- [28] CHEESEMAN C. J., SMYTH D. H., Interaction of amino acids peptides and peptidases in the small intestine, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **190**: 149-163, 1975.
- [29] CHERN Ch. J., BLACK J. A., The action of proteolytic enzymes on human erythrocyte pyruvate kinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**: 466-474, 1975.
- [30] CHERTOW B. S., BUCHMAN W. E., MAYRON M., SCHWARTZ T. B., Hormonal modification of mouse liver lysosomal protein metabolism by cortisone acetate, *Endocrinology*, **92**: 722-727, 1973.
- [31] CHONG M. T., GARRARD W. T., BONNER J., Purification and properties of a neutral protease from rat liver chromatin, *Biochemistry*, **13**: 5128-5134, 1974.
- [32] COHN Z. A., FEDORKO M. E., HIRSCH J. G., The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophage lysosomes, *J. Exptl. Med.*, **123**: 757-766, 1966.
- [33] CROKER B. P., SALADINO A. J., TRUMP B. F., Ion movements in cell injury: relationship between energy metabolism and the pathogenesis of lethal injury in the toad bladder, *Am. J. Pathol.*, **59**: 247-277, 1970.
- [34] DAVIES M., LLOYD J. B., BECK F., The effect of trypan blue, suramin and aurothiomalate on the breakdown of ¹²⁵J - labelled albumin within rat liver lysosomes, *Biochem. J.*, **121**: 21-26, 1971.
- [35] DAVIES P., RITA G. A., KRAKAUER K., WEISSMANN G., Characterization of a neutral protease from lysosomes of rabbit polymorphonuclear leucocytes, *Biochem. J.*, **123**: 559-569, 1971.
- [36] DEAN R. T.; The roles of cathepsins B₁ and D in the digestion of cytoplasmic proteins in vitro by lysosomal extracts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 518-523, 1976.
- [37] — Lysosomal enzymes as agents of turnover of soluble cytoplasmic proteins, *Eur. J. Biochem.*, **58**: 9-14, 1975.
- [38] DE DUVE C., WATTIAUX R., Functions of lysosomes, *Ann. Rev. Physiol.*, **28**: 435-492, 1966.

- [39] DE LUMEN B. O., TAPPEL A. L., Histone hydrolase activity of rat liver lysosomal cathepsin B₂, *Biochim. Biophys. Acta*, **293**: 217-225, 1973.
- [40] DETER R. L., Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole, and acid phosphatase — bearing particle populations during the early phase of glucagon - induced autophagy in rat liver, *J. Cell. Biol.*, **48**: 473-489, 1971.
- [41] DICE J. F., GOLDBERG A. L., A statistical analysis of the relationship between degradative rates and molecular weights of proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**: 213-219, 1975.
- [42] DIETRICH F. M., Inactivation of egg - white lysozyme by ultrasonic waves and protective effect of amino - acids, *Nature*, **195**: 146-148, 1962.
- [43] DOUNCE A. L., UMANA R., The proteases of isolated cell nuclei, *Biochemistry*, **1**: 811-819, 1962.
- [44] EGEBERG O., Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia, *Thrombos. Diathes. Haemorrhag.*, **13**: 516-521, 1965.
- [45] EKHOLM R., SMEDS S., On dense bodies and droplets in the follicular cells of the guinea pig thyroid, *J. Ultrastruct. Res.*, **16**: 71-82, 1966.
- [46] ELKINS - KAUFMAN E., NEURATH H., Structural requirements for specific inhibitors of carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.*, **178**: 645-654, 1949.
- [47] EVANS W. H., KARNOVSKY M. L., The biochemical basis of phagocytosis. IV. Some aspects of carbohydrate metabolism during phagocytosis, *Biochemistry*, **1**: 159-166, 1962.
- [48] FEDER J., GARRETT L. R., WILDI B. S., Studies on the role of calcium in thermolysis, *Biochemistry*, **10**: 4552-4555, 1971.
- [49] FEHR K., LOSPALLUTO J., ZIFF M., Degradation of immunoglobulin G by lysosomal acid proteases, *J. Immunol.*, **105**: 973-983, 1970.
- [50] FERGUSON W. W., EDMONDS A. W., STARLING J. R., WANGENSTEEN S. L., Protective effect of prostaglandin E₁ (PGE₁) on lysosomal enzyme release in serotonin - induced gastric ulceration. *Ann. Surg.*, **177**: 648-654, 1973.
- [51] FERENČIK M., ŠTEFANOVIČ J., The interaction of protein substrates (antigens) during an in vitro degradation by rabbit cathepsin D, *Folia Microbiol.*, **18**: 402-409, 1973.
- [52] FIGURSKI R., Wpływ leków i niektórych związków chemicznych na lizosomy, *Pol. Tyg. Lek.*, **29**: 1899-1900, 1974.
- [53] FINE J. M., LAMBIN P., STAINBUCH M., Apport de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide — SDS à l'étude de la structure de l'alpha - 2 - macroglobuline humaine et de ses complexes avec les proteinases, *Rev. Franc. Transf. Immuno - hematol.*, **18**: 247-268, 1975.
- [54] FINKRNSTAEDT J. T., Intracellular distribution of proteolytic enzymes in rat liver tissue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**: 302-304, 1957.
- [55] FIRFAROVA K. F., OREKHOVICH V. N., On inactive precursor of cathepsin D from chicken liver, *Biochim. i Biophys. Res. Commun.*, **45**: 911-916, 1971.
- [56] FRANKLIN S. G., MERTIONE R. M., Chromatographic evidence for multiple forms of cathepsin B₁, *Biochem. J.*, **127**: 207-213, 1976.
- [57] FURLAN M., JERICIJO M., SUHAR A., Purification and properties of a neutral protease from calf thymus nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **167**: 154-160, 1968.
- [58] GABATHULER M. P., RYSER H. J. P., Uptake of ferritin and albumin by tumor cells in culture. Differences in rates and in response to an inhibitor, *Fed. Proc.*, **26**: 6868, 1967.

- [59] GAJDOS A., Les lysosomes, *Presse Méd.*, **74**: 923-928, 1966.
- [60] GALLOP P. M., PAZ M. A., Posttranslation protein modifications, with special attention to collagen and elastin, *Physiol. Rev.*, **55**: 418-487, 1975.
- [61] GARLICK P. J., WATERLOW J. C., SWICK R. W., Measurement of protein turnover in the rat liver. Analysis of the complex curve for decay of label in a mixture of proteins, *Biochem. J.*, **156**: 657-663, 1976.
- [62] GARNER Ch. W., BEHAL F. J., Human liver alanine aminopeptidase. Inhibition by amino acids, *Biochemistry*, **14**: 3208-3212, 1975.
- [63] GARRELS J. I., ELGIN S. C. R., BONNER J., A histone protease of rat liver chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 545-551, 1972.
- [64] GHETIE V., Evenimente cellulare care stau la baza catabolizării immunoglobulinelor, *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.*, **17**: 317-324, 1972.
- [65] GIBIŃSKI K., GONCIARZ Z., The leukocyte proteolysis of blood proteins, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **44**: 377-388, 1970.
- [66] GIVOL D., The cleavage of rabbit immunoglobulin G by trypsin after mild reduction and aminoethylation, *Biochem. J.*, **104**: 390-400, 1967.
- [67] GLAUMAN H., BEREZESKY J. K., ERICSSON J. L. E., TRUMP B. F., Lysosomal degradation of cell organelles. I. Ultrastructural analysis of uptake and digestion of intravenously injected mitochondria by Kupffer cells, *Lab. Invest.*, **33**: 239-251, 1975.
- [68] — Lysosomal degradation of cell organelles. II. Ultrastructural analysis of uptake and digestion of intravenously injected microsomes and ribosomes by Kupffer cells, *Lab. Invest.*, **33**: 252-261, 1975.
- [69] GLAUMAN H., TRUMP B. F., Lysosomal degradation of cell organelles. III. Uptake and disappearance in Kupffer cells of intravenously injected isotope — labeled mitochondria and microsomes in vivo and in vitro, *Lab. Invest.*, **33**: 262-272, 1975.
- [70] GOETTLICH W., YOUNG J. O., TAPPEL A. L., CATHEPSINS D., A and B, and the effect of pH in the pathway of protein hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **243**: 137-146, 1971.
- [71] GOLDBERG A. L., DICE J. F., Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 835-869, 1974.
- [72] GOLDSTONE A., KOENIG H., Physicochemical modification of lysosomal hydrolases during intracellular transport, *Biochem. J.*, **132**: 267-282, 1973.
- [73] GONCIARZ Z., Studies on intracellular proteolysis, *Ann. Med. Sec. Pol. Ac. Sci.*, **23**: 152-172, 1975.
- [74] GORTER J., GRUBER M., Cathepsin C: an allosteric enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **198**: 546-555, 1970.
- [75] GRENBAUM L. M., HIRSHKOVITZ A., SHOICHET J., The activation of trypsinogen by cathepsin B, *J. Biol. Chem.*, **234**: 2885-2890, 1959.
- [76] GREENWALD A. J., JOHNSON D. S., OSKVIK R. M., ASCHENBENER C. A., RANDA D. C., α_1 -antitrypsin deficiency emphysema, cirrhosis, and intestinal mucosa atrophy, *J. Am. Med. Ass.*, **231**: 273-276, 1975.
- [77] GRISOLIA S., WALLACE R., Insulin degradation by lysosomal extract from rat liver; model for a role of lysosomes in hormone degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 22-27, 1976.
- [78] GRUENBERG J. C., SMALLRIDGE M. R. C., USAR M. C., ROSENBERG R. D., Inherited antithrombin — III deficiency causing mesenteric venous infarction: a new clinical entity, *Ann. Surg.*, **181**: 791-794, 1975.
- [79] GRUENEWALD R., LEVINE S., FORBES L., Resistance to proteolytic

- degradation of myelin basic proteins adsorbed on resin, *Roc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **143**: 750-752, 1973.
- [80] HAAS R., WEISS E., JUSIC M., HEINRICH P. C., Limited proteolysis of the very — lysine - rich histone H1 by a membrane — bound proteinase from rat liver, *FEBS Letters*, **63**: 117-119, 1976.
- [81] HAIDER M., SEGAL H. L., Some characteristics of the alanine aminotransferase — and arginase — inactivating system of lysosome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**: 228-237, 1972.
- [82] HALME J., WOESSNER J. F. Jr., Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus, *J. Endocr.*, **66**: 357-362, 1975.
- [83] HAYASHI M., HIROI Y., NATORI Y., Effect of ATP on protein degradation in rat liver lysosomes, *Nature New. Biol.*, **242**: 163-166, 1973.
- [84] HEINRICH P. C., RAYDT G., PUSCHENDORF B., JUSIC M., Subcellular distribution on histone — degrading enzyme activities from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **62**: 37-43, 1976.
- [85] HENDIL K. B., Degradation of abnormal proteins in HeLa cells, *J. Cell. Physiol.*, **87**: 289-296, 1976.
- [86] HERSHKO A., TOMKINS G. M., Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture, *J. Biol. Chem.*, **246**: 710-714, 1971.
- [87] HILZ H., WIEGERS U., ADAMIETZ P., Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of masked proteins, *Eur. J. Biochem.*, **56**: 103-108, 1975.
- [88] HUANG F. L., TAPPEL A. L., Action of cathepsin C and D in protein hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **236**: 739-748, 1971.
- [89] HUISMAN W., BOUMA J. M., GRUBER M., Influence of thiols, ATP and CoA on protein breakdown by subcellular fractions from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **297**: 93-97, 1973.
- [90] HUISMAN W., LANTING L., DODDEMA H. J., BOUMA J. M. W., GRUBER M., Role of individual cathepsins in lysosomal proteins digestion as tested by specific inhibitors, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **370**: 297-307, 1974.
- [91] HUMPHREY T. J., DAVIES D. D., A new method for the measurement of protein turnover, *Biochem. J.*, **148**: 119-127, 1976.
- [92] IGNARRO L. J., KRASSIKOFF N., SLYWKA J., Release of enzymes from a rat liver lysosome fraction: inhibition by catecholamines and cyclic 3',5' - adenosine monophosphate, stimulation by cholinergic agent and cyclic 3',5' - guanosine monophosphates, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **186**: 86-99, 1973.
- [93] ITIKAWA A., KAWADA J., Role of thyroid lysosomes in the hydrolysis of thyroglobulin and its relation to the development of iodide goiter, *Endocrinology*, **95**: 1574-1581, 1974.
- [94] IODICE A. A., LEONG V., WEINSTOCK J. M., Separation of cathepsin A and D of skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**: 477-486, 1966.
- [95] JANOFF A., Inhibition of human granulocyte elastase by serum α_1 - antitrypsin, *Ann. Rev. Resp. Dis.*, **105**: 121-122, 1972.
- [96] JANOFF A., BLONDIN J., Inhibition of the elastase — like osterase in human leucocyte granules by human leucocyte cell sap, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**: 1050-1056, 1971.
- [97] JECKEL D., ANDERS R., PFLEIDERER G., Proteolytische spaltung nativer

- lactat — dehydrogenase aus schweineherz, Hoppe - Seyler's, Z. Physiol. Chem., **354**: 737-748, 1973.
- [98] JOHNSON L. W., VELICK S. F., The synthesis and degradation of fructose diphosphate — aldolase and glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase in rabbit liver, J. Biol. Chem., **247**: 4138-4143, 1972.
- [99] KAHN A., COGAN S. R., BERGER S., Circulating iodoprotein in two patients with autonomous thyroid modules, J. Clin. Endocrinol. Metab., **22**: 1-7, 1962.
- [100] KARNOVSKY M. L., Metabolic shifts in leukocytes during the phagocytic event, w Ciba Foundation Study Group 10, Biological activity of the leukocyte, red. G. E. W. Wolstenholme i M. O. Conuor, Little Brown and Co., Boston, 1961, 60.
- [101] KATUNUMA N., Enzyme degradation and its regulation by group - specific proteases in various organs rats, [w] "Current topics in cellular regulation", red. B. L. Horecker, E. R. Stadtman, Acad. Press., New York, London, **7**: 175-203, 1973.
- [102] — Regulation of intracellular enzymes levels by limited proteolysis, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **72**: 83-104, 1975.
- [103] KATZ J., TROLL W., LEVY M., FILKINS K., RUSSO J., LEVITZ M., Estrogen — dependent trypsin — like activity in the rat uterus. Localization of activity in the 12000 g pellet and nucleus, Arch. Biochem. Biophys., **173**: 347-354, 1976.
- [104] KATZ J., TROLL W., RUSSO J., FILKINS K., LEVITZ M., Effect of protease inhibitors on in vitro breakdown of uterine histones from hormone - treated rats, Endocrin. Res. Commun., **1**: 331-337, 1974.
- [105] KAYE C., DABICH D., An inhibitor of trypsin - like activity in rat liver, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**: 1366-1368, 1969.
- [106] KILBY B. A., YOUATT G., The inhibition of trypsin and chymotrypsin by certain organic phosphorus esters, Biochem. J., **57**: 303-309, 1954.
- [107] KNOWLES S., BALLARD F. J., Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells, Biochem. J., **156**: 609-617, 1976.
- [108] KNOWLES S. E., GUNN J. M., HANSON R. W., BALLARD F. J., Increased degradation rates of protein synthesized in hepatoma cells in the presence of amino acid analogues, Biochem. J., **146**: 595-600, 1975.
- [109] KOĆMIERSKA - GRODZKA D., Farmakologiczna regulacja trawienia wewnątrzkomórkowego, Post. Hig. Med. Dośw., **29**: 719-737, 1976.
- [110] KOENIG H., Vital staining of lysosomes by acridine orange, J. Cell Biol., **19**: 87-93, 1963.
- [111] KOJ A., Inhibition of cathepsin C activity in the rat liver granule fraction by some plasma glycoproteins, [w] Abstract of VIII Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Amsterdam, 1972, 916.
- [112] — Naturalne inhibitory enzymów lizosomalnych, Ann. Acad. Med. Lodz., **14**: 241-249, 1973.
- [113] KOJ A., CHUDZIK J., PAJDAK W., DUBIN A., The occurrence of common inhibitors of trypsin and of leucocyte neutral proteinase in human serum, Biochim. Biophys. Acta., **268**: 199-206, 1972.
- [114] KOPEĆ M., Fibrynoliza — niektóre nowsze aspekty i poglądy, Post. Hig. Med. Dośw., **29**: 77-90, 1975.
- [115] KOPITAR M., LEBEZ D., Intracellular distribution of neutral proteinases

- and inhibitors in pig leucocytes. Isolation of two inhibitors of neutral proteinases, *Eur. J. Biochem.*, **56**: 571-581, 1976.
- [116] KRUZE D., FEHR K., BÖNI A., Effect of antirheumatic drugs on cathepsin B₁ from bovine spleen, *Z. Rheumatol.*, **35**: 95-102, 1976.
- [117] KURECKI T., KOWALSKA-LOTH B., TOCZKO K., CHMIELEWSKA J., Evidence that neutral protease from calf thymus chromatin is a serine type enzyme, *FEBS Letters*, **53**: 313-315, 1975.
- [118] KUSSENDRAGER K. D., JONG Y., BOUMA J. M. W., GRUBER M., The degradation of the B chain of oxidised insulin by extracts of rat liver lysosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **279**: 75-86, 1972.
- [119] LACHOWICZ W., Soderżanie aktywnej pankreatopeptydazy E w siworotce krwi bolnych warikoznym rozszirenim wen niźnich konieczności, *Wracz, Delo*, **1**: 45-50, 1972.
- [120] LAHAV M., NE'EMAN N., JAMES J., GINSBERG J., The effect of Leukocyte hydrolases on bacteria. III. Bacteriolysis induced by extracts of different leucocyte populations and the inhibition of lysis by macromolecular substrates, *J. Infectious Diseases*, **131**: 149-157, 1975.
- [121] LAUREL C. B., ERIKSSON S., Electrophoretic alpha₁-globulin pattern of serum alpha₁-antitrypsin deficiency, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **15**: 132-142, 1963.
- [122] LEDOUX - CORBUSIER M., ACHTEN G., alpha₁-antitrypsin deficiency and skin abnormalities, *J. Cutaneous Path.*, **2**: 25-29, 1975.
- [123] LEWIAN T. M. J., BILINKINA V. S., TRUDOLJUBOWA M. G., ORECHOWICZ V. N., O proteolityczeskiej aktywności ribosom, *Biochimija*, **40**: 1322-1324, 1975.
- [124] LIEBERMAN J., The mechanisms of antitrypsin deficiency and their role in the pathogenesis of pulmonary emphysema, *Pneumonologie*, **152**: 7-14, 1975. 9-57, 1957.
- [125] LINDERSTROM - LANG K., Structure and enzymatic break-down of proteins, *Cold Spring Harbour Symp., Quant. Biol.*, **14**: 117-126, 1950.
- [126] LINDLEY H., A new synthetic substrate for trypsin and its application to the determination of the amino-acid sequence of proteins, *Nature*, **178**: 647-648, 1956.
- [127] LINDNER J., *Biochemie und Morphologie der Wundheilung, Med. Mitt.*, **47**: 9-57, 1957.
- [128] LLOYD J. B., DAVIES M., WILLIAMS K. E., BECK F., Protein digestion within lysosomes and the effect of endocytosed inhibitors, [w] *Tissue proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publ. Co., 1971, 253-262.
- [129] LOSPALLUTO J., FEHR K., ZIFF M., Intracellular proteases and digestion of immunoglobulins, [w] *Tissue proteinases*, A. J. Barrett, J. T. Dingle (red.), North-Holland Publ. Co., 1971, 263-289.
- [130] MALAWISTA S. E., BODEL P. T., The dissociation by colchicine of phagocytosis from increased oxygen consumption in human leucocytes, *J. Clin. Invest.*, **46**: 786-796, 1967.
- [131] MALBICA J. O., Effect of ATP on cysteine and other thiolinduced labilization of rat liver lysosomes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**: 1140-1144, 1971.
- [132] MATSUDA K., MISAKA E., Studies on cathepsin of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms, *J. Biochem.*, **76**: 639-649, 1974.

- [133] — Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. II. Comparative studies on multiple forms of cathepsin A., *J. Biochem.*, **78**: 31–39, 1975.
- [134] MCDONALD J. K., ZEITMAN B. B., ELLIS G., Detection of a lysosomal carboxypeptidase and a lysosomal dipeptidase in highly - purified dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C) and the elimination of their activities from preparations used to sequence peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 62–70, 1972.
- [135] MEGO J. L., Protein digestion in isolated heterolysosomes, [w] *Lysosomes in biology and pathology*, red. J. T. Dingle, North - Holland Publ. Co., Amsterdam, **3**: 138–168, 1972.
- [136] MEGO J. L., FARB R. M., BARNES J., An adenosine triphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in heterolysosomes, *Biochem. J.*, **128**: 763–769, 1972.
- [137] MEGO J. L., MCQUEEN J. D., The uptake and degradation of injected labeled proteins by mouse - liver particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **100**: 136–143, 1965.
- [138] MELA L., MILLER L. D., BACALZO L. V. Jr., OLOFSSON K., WHITE R. R., Role of intracellular variations of lysosomal enzyme activity and oxygen tension in mitochondrial impairment in endotoxemia and hemorrhage in the rat, *Ann. Surg.*, **178**: 727–735, 1973.
- [139] MELLANDER O., Protein quality, *Nutrition Rev.*, **13**: 161–193, 1955.
- [140] MORAWETZ H., SAGE H., The effect of poly (acrylic acid) on the tryptic digestion of hemoglobin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**: 103–109, 1955.
- [141] MORGAN H. E., RANNELS D. E., KAO R. L., Factors controlling protein turnover in heart muscle, *Circ. Res.*, **34**: suppl. 3, III — 22–29, 1974.
- [142] MULDER G. J., Effect of phenobarbital treatment on lysosomal enzyme activity in rat liver, *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 1328–1331, 1971.
- [143] MUZAFFAR T. Z., STALKER A. L., BRYCE W. A. J., DHALL D. P., Structural alternations in fibrin clots with dextran, *Thrombos. Diathes. Haemorrhag.*, **28**: 257–267, 1972.
- [144] NAKAI T., OTTO P. S., WHAYNE T. F. Jr., Proteolysis of canine apolipoproteins by acid proteases in canine liver lysosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **422**: 380–389, 1976.
- [145] NAKASHIMA K., OGINO K., Regulation of rabbit liver fructose - 1,6 - diphosphatase. II. Modification by lysosomal cathepsin B₁ from the same cell, *J. Biochem.*, **75**: 353–365, 1974.
- [146] NAUSS K. M., Two forms of dipeptidase in cod muscle, *Hoppe - Seyler's, Z. Physiol. Chem.*, **352**: 665–673, 1971.
- [147] NOREN O., Studies on a soluble dipeptidase from pig intestinal mucosa Enzymatic Properties, *Acta Chem. Scand. B*, **28**: 711–716, 1974.
- [148] NOVIKOFF A. B., ESSNER E., QUINTANA N., Golgi apparatus and lysosomes, *Fed. Proc.*, **23**: 1011–1022, 1964.
- [149] OHLSON K., OLSON J., The neutral protease of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastase, *Eur. J. Biochem.*, **42**: 519–527, 1974.
- [150] OKADA S., Inactivation of deoxyribonuclease by X - rays. III. Modification of the effect of radiation on the DNA - DNase, system, *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**: 113–120, 1957.
- [151] OTTO K., Cathepsins B₁ and B₂, [w] *Tissue proteinases* red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North - Holland Publ. Co., Amsterdam, 1971, 1–28.

- [152] OWEN C. A. Jr., MCCONAKEY W. M., An unusual iodinated protein of the serum in hashimoto's thyroiditis, *J. Clin. Endocrinol.*, **16**: 1570-1579, 1956.
- [153] OYA M., YOSHINO M., MIZUTANI S., Molecular heterogeneity of human placental aminopeptidase isozymes, *Experientia*, **31**: 1019-1020, 1976.
- [154] PAIK W. K., LEE H. W., Enzymatic hydrolysis of histones in rat kidney microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**: 333-340, 1970.
- [155] PIHA R. S., CUENOD M., WAELSCH H., Metabolism of histones of brain and liver, *J. Biol. Chem.*, **241**: 2397-2404, 1966.
- [156] PIZZO S. V., SCHWARTZ M. Z., HILL R. L., MCKEE P. A., Mechanism of of ancrod anticoagulation a direct proteolytic effect on fibrin, *J. Clin. Invest.*, **51**: 2841-2850, 1972.
- [157] PLATT D., KATZENMEIER U., Untersuchungen zur frage der induzierbarkeit lysosomaler enzyme der rattenleber durch phenobarbital, *Arzneim-Forsch.*, **20**: 258-261, 1970.
- [158] PRASLOV V. S., FAVOROVA O. O., MARGULIS G. V., KISSELEV L. L., Limited proteolysis of the tryptophanyl - RNA synthetase, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**: 92-106, 1975.
- [159] PRIEUR D. J., YOUNG D. W., REAGAN R. L., OLSON H., Induction of anomalous lysosomes in the renal papillae of beige mice by experimental potassium deficiency, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **144**: 683-687, 1973.
- [160] RACHMILEWITZ D., STEIN O., ROHEIM P. S., STEIN Y., Metabolism of iodinated hig density lipoproteins in the rat. II. Autoradiographic localization in the liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **270**: 414-425, 1972.
- [161] RAUNER R. A., SCHMIDT J. J., NAJJAR V. A., Proline endopeptidase and exopeptidase activity in polymorphonuclear granulocytes, *Mol. Cell. Biochem.*, **10**: 77-80, 1976.
- [162] ROSE J. A., WARMS J. V. B., Mitochondrial heksokinase. Release, rebinding and location, *J. Biol. Chem.*, **242**: 1635-1645, 1967.
- [163] ROY A. B., Comparative studies on the liver sulphatases, *Biochem. J.*, **68**: 519-528, 1958.
- [164] SAKAMOTO S., SAKAMOTO M., GOLGHABER P., GLIMCHER M. J., The inhibition of mouse bone collagenase by lysozyme, *Calc. Tiss. Res.*, **14**: 291-299, 1974.
- [165] SALAS M. L., SALAS J., SOLS A., Desensitization of yeast phosphofructokinase to ATP inhibition by treatment with trypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**: 461-466, 1968.
- [166] SANDHAUS R. A., JANOFF A., Degradation of human α_1 -antitrypsin by hepatocyte acid cathepsins, *Ann. Rev. Resp. Dis.*, **110**: 263-272, 1974.
- [167] SAPOLSKY A. J., HOWELL D. S., WOESSNER J. F. Jr., Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage, *J. Clin. Invest.*, **53**: 1044-1053, 1974.
- [168] SAPOLSKY A., WOESSNER J. F. Jr., Multiple forms of cathepsin D from bovine uterus, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2069-2076, 1972.
- [169] SARNECKA - KELLER M., Biologiczne konsekwencje enzymatycznej modyfikacji białek, *Przegl. Lek.*, **29**: 940-947, 1972.
- [170] SBARRA A. J., KARNOVSKY M. L., The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes, *J. Biol. Chem.*, **234**: 1355-1362, 1959.
- [171] SCHIMKE R. T., Regulation of protein degradation in mammalian tissues,

- [w] Mammalian protein metabolism, red. H. N. Munro, Acad. Press., New York, 4: 177-228, 1970.
- [172] SCHNEBLI H. P., A protease-like activity associated with malignant cells, *Schweiz. Med. Wschr.*, **102**: 1194-1197, 1972.
- [173] SCHREIBER A. D., KAPLAN A. P., AUSTEN K. F., Inhibition by C1 INH of Hageman factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis, and kinin generation, *J. Clin. Invest.*, **52**: 1402-1409, 1973.
- [174] SCHWERT G. W., EISENBERG M. A., The kinetics of the amidase and esterase activities of trypsin, *J. Biol. Chem.*, **179**: 665-672, 1949.
- [175] SIMPSON M. V., The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices, *J. Biol. Chem.*, **203**: 143-154, 1953.
- [176] SIPOS T., MERKEL J. R., An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin, *Biochemistry*, **9**: 2766-2775, 1970.
- [177] SJÖSTRÖM H., Enzymatic properties of pig intestinal proline dipeptidase, *Acta Chem., Scand. B*, **28**: 802-808, 1974.
- [178] SNELLMAN O., SYLVEN B., Haptoglobin acting as a neutral inhibitor of cathepsin B activity, *Nature*, **216**: 1033-1033, 1967.
- [179] — A carbohydrate inhibitor of cathepsin B activity associated with haptoglobin, *Experientia*, **30**: 1114-1115, 1974.
- [180] SOPATA J., DONCEWICZ A. M., Presence of gelatin-specific proteinase and its latent form in human leukocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**: 510-523, 1974.
- [181] STANČIKOVA M., TRNAVSKY K., Study of the antiproteolytic activity of fenamates and indomethacin, *Pharmacology*, **9**: 80-84, 1973.
- [182] STARKEY P. M., Binding and inhibition of cathepsin B₁ by α_2 -macroglobulin, *Biochem. Soc. Transact.*, **1**: 381-382, 1973.
- [183] ŠTEFANOVIČ J., FERENČIK M., MURGAŠOVÁ J., Porovnanie degradace proteinových antigénov serovými a bunkovými proteázami, *Bratisl. Lek. Listy*, **58**: 167-172, 1972.
- [184] STEIN O., RACHMILEWITZ D., SANGER L., EISENBERG S., STEIN Y., Metabolism of iodinated very low density lipoprotein in the rat. Autoradiographic localization in the liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **360**: 205-216, 1974.
- [185] STEINBERG D., VAUGHAN M., Intracellular protein degradation in vitro, *Biochim. Biophys. Acta*, **19**: 584-585, 1956.
- [186] STEWART G. A., STANWORTH D. R., The effect of acid treatment upon the susceptibility of rabbit IgG to proteolytic cleavage with various enzymes, *Immunochemistry*, **12**: 713-721, 1975.
- [187] SUSKA - BRZEZIŃSKA E., Enzymatyczna inaktywacja neurohormonów, *Post. Biochem.*, **18**: 473-488, 1976.
- [188] SYLVEN B., SNELLMAN O., STRÄNK P., Immunofluorescent studies on the occurrence of cathepsin B₁ at tumor cell surfaces, *Virchows Arch.*, **17**: 97-112, 1974.
- [189] SZEGO C. M., SEELER B. J., Hormone induced activation of target-specific lysosomes: acute translocation to the nucleus after administration of gonadal hormones in vivo, *J. Endocrinol.*, **56**: 347-360, 1973.
- [190] TAKET K., POGELL B. M., Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.*, **240**: 651-662, 1965.
- [191] TANGEN O., WIK K. O., ALMQUIST A. M., ARFORS K. E., HINT H. C.,

- Effects of dextran on the structure of plasmin - induced lysis of human fibrin, *Thrombos. Res.*, **1**: 487-492, 1972.
- [192] TAPPEL A. L., Lysosomal enzymes and other components, [w] *Lysosomes in biology and pathology*, red. J. T. Dingle, M. B. Fell, North - Holland Publ. Co., Amsterdam, **2**: 207-244, 1971.
- [193] — Lysosomes, *Comprehensive Biochem.*, **23**: 77-98, 1968.
- [194] TAYLOR J. C., CRAWFORD J. P., Purification and preliminary characterization of human leukocyte elastase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**: 91-101, 1975.
- [195] TAYLOR S. L., TAPPEL A. L., Distribution of dipeptidase activity between lysosomes and soluble fraction of rat liver, *Canad. J. Biochem.*, **53**: 502-508, 1974.
- [196] TRUSZ - GLUZA M., Studies on substrates of leukocyte proteases, *Acta Med. Pol.*, **16**: 7-13, 1975.
- [197] UMANA C. R., Protein degradation at neutral pH. Possible enzymic and control mechanism, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**: 31-38, 1971.
- [198] VAES G., Digestive capacity of liposomes, [w] *Lysosomes and storage diseases*, red. H. G. Hers, F. Van Hoof, New York, Academic Press, 1973, 43-77.
- [199] VARANDANI P. T., Insulin degradation. X: Identification of insulin degrading activity of rat liver plasma membrane as glutathione - insulin - transhydrogenase, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **55**: 689-696, 1973.
- [200] VEGARUD G., CHRISTENSEN T. B., The resistance of glycoproteins to proteolytic inactivation, *Acta Chem. Scand. B*, **29**: 887-888, 1975.
- [201] WALKER J. G., SISKIND G. W., Studies on the control of antibody synthesis. Effect of antibody affinity upon its ability to suppress antibody formation, *Immunology*, **14**: 21-29, 1968.
- [202] WATTIAUX R., Drugs and lysosomes, [w] *Fundamentals of biochemical pharmacology*, red. Z. M. Bacq, Pergamon Press, Oxford, New York, 1971, 176-184.
- [203] WEISSMANN G., Lysosomes, *Blood*, **24**: 594-606, 1964.
- [204] WEISSMANN G., ZURIER R. B., HOFFSTEIN S., Leukocytic protease and the immunologic release of lysosomal enzymes, *Am. J. Pathol.*, **68**: 539-559, 1972.
- [205] WERB Z., BURLEIGH M. C., BARRETT A. J., STARKEY P. M., The interaction of α_2 - macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other natal proteinases, *Biochem. J.*, **139**: 359-368, 1974.
- [206] WHITLEY E. J., BOWMAN D. E., Isolation and properties of navy bean proteinase inhibitor component I, *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**: 42-50, 1975.
- [207] WIEDERUNDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P., BROGHAMMER U., KIRSCHKE H., LANGNER J., Intrazellular proteinabbau. VI. Isolierung, eigenschaften und biologische badeutung von kathepsin D aus der rattenleber, *Acta Biol. Med. Germ.*, **35**: 269-283, 1976.
- [208] WIŚNIEWSKI K., TARASIEWICZ S., MAĆKOWIAK J., BUCZKO W., MO- NIUSZKO - JAKONIUK J., The effects of trypsin digested globulin degradation products (TDPG) on the activity of central nervous system, *Pharmacology*, **12**: 321-330, 1974.
- [209] WIZE J., SOPATA J., WOJTECKA - ŁUKASIK E., KSIEŻNY S., DANCE- WICZ A. M., Isolation, purification and properties of a factor from rheumatoid synovial fluid activiting the latent forms of collagenolytic enzymes, *Acta Biochim. Polon.*, **22**: 239-250, 1975.

- [210] WOESSNER J. F., Cartilage cathepsin D and its action on matrix components, *Fed. Proc.*, **32**: 1485–1488, 1973.
- [211] WOROWSKI K., Swoistość enzymów proteolitycznych badana na utlenionym łańcuchu peptydowym B insuliny wołu, *Wiad. Chem.*, **28**: 329–342, 1974.
- [212] — Enzymatic degradation of protein mixture, *Enzyme*, **19**: 48–59, 1975.
- [213] — Biologiczne znaczenie ograniczonej proteolizy, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **29**: 619–664, 1975.
- [214] — Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 51–74, 1976.
- [215] ZABŁOCKI B., ZABŁOCKA E., Lizosomy i ich znaczenie w immunologii, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **25**: 531–545, 1971.
- [216] ZUBAY G., DOTY P., Complex formation between bovine serum albumin and sodium deoxyribonucleate induced by heat, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**: 213–214, 1957.
- [217] ZYSS R., KASZCZYŃSKA M., BOCZYŃSKI E., Wpływ promieniowania jonizującego na strukturę komórek wątrobowych i aktywność enzymatyczną pewnych struktur komórkowych. I. Struktura i aktywność enzymatyczna lizosomów. *Biul. WAM*, **13**: 473–487, 1970.

Otrzymano: 24 grudnia 1976.

Przyjęto 8 lutego 1977.

Adres autora: ul. Mickiewicza 2, 15 - 222 Białystok.

KALOZA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH W ŚWIETLE NOWYCH BADAŃ

Barbara GABARA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Kaloza obserwowana była w komórkach roślin, przynależnych do wielu grup systematycznych, zarówno w tkankach somatycznych, jak i generatywnych. Bez względu na to, czy kaloza jest normalnie pojawiającym się składnikiem ściany komórkowej, czy też powstaje w wyniku uszkodzenia komórek, każda komórka roślinna wydaje się być zdolna do jej syntezy w określonych warunkach, pod wpływem różnorodnych bodźców. Kaloza może pojawiać się w ciągu bardzo krótkiego okresu życia komórki w formie niezamaskowanej bądź jej wykrywalność błękitem anilinowym jest niemożliwa wskutek występowania kalozy w połączeniu z białkami. W syntezie i transporcie kalozy podczas mikrosporogenezy wydaje się uczestniczyć aparat Golgiego posiadający podobny jak plazmalemma zestaw syntetaz glukanu. Brak jest jednoznacznych dowodów wskazujących na funkcję kalozy. Jakakolwiek byłaby jednak rola kalozy, nie wydaje się aby pełniła ona funkcję sita molekularnego czy bariery izolującej różnicujące się komórki.

Chociaż minęło ponad sto lat od chwili odkrycia kalozy w rurkach sitowych [89] i prawie tyle samo — w komórkach macierzystych pyłku [78], skład chemiczny, lokalizacja, miejsce syntezy oraz funkcja tej substancji pozostają nadal kontrowersyjne.

1. WYKRYWANIE KALOZY

Kaloza może być wykrywana i badana dzięki jej specyficznemu powinowactwu do błękitu anilinowego, błękitu rezorcynowego czy lakmoidu. Najbardziej szeroko stosowany test na kalożę oparty jest o błękit anilinowy, który barwi kalożę na jasnoniebiesko [66]. Metoda ta była użyta w 1880 r. i odtąd stosowana jest z powodzeniem. Adaptacją tej klasycznej metody jest wiązanie błękitu anilinowego w żółto - zie-

lonej barwy kompleks fluoryzujący [14] uważany za specyficzny dla kalozy [33].

Chociaż przebieg reakcji między kalozą i błękitem anilinowym jest nieznany, Kessler [68] wykazał, że kaloza pojawiająca się w rurkach sitowych *Vitis* jest β -1,3-glukanem, a późniejsze badania potwierdziły sugestię, że błękit anilinowy wykazuje powinowactwo do β -1,3-glukanów. Dla przykładu, usunięto ze ścian komórek szparkowych *Ophioglossum* za pomocą β -1,3-glukanazy substancję barwiącą się błękitem anilinowym [97], wykazano powinowactwo między błękitem anilinowym i oczyszczonymi β -1,3-glukanami pochodzenia bakteryjnego i grzybowego [88] oraz udowodniono, że β -1,3-glukany wyizolowane z łagiewek pyłkowych *Lilium* fluoryzują z błękitem anilinowym [59].

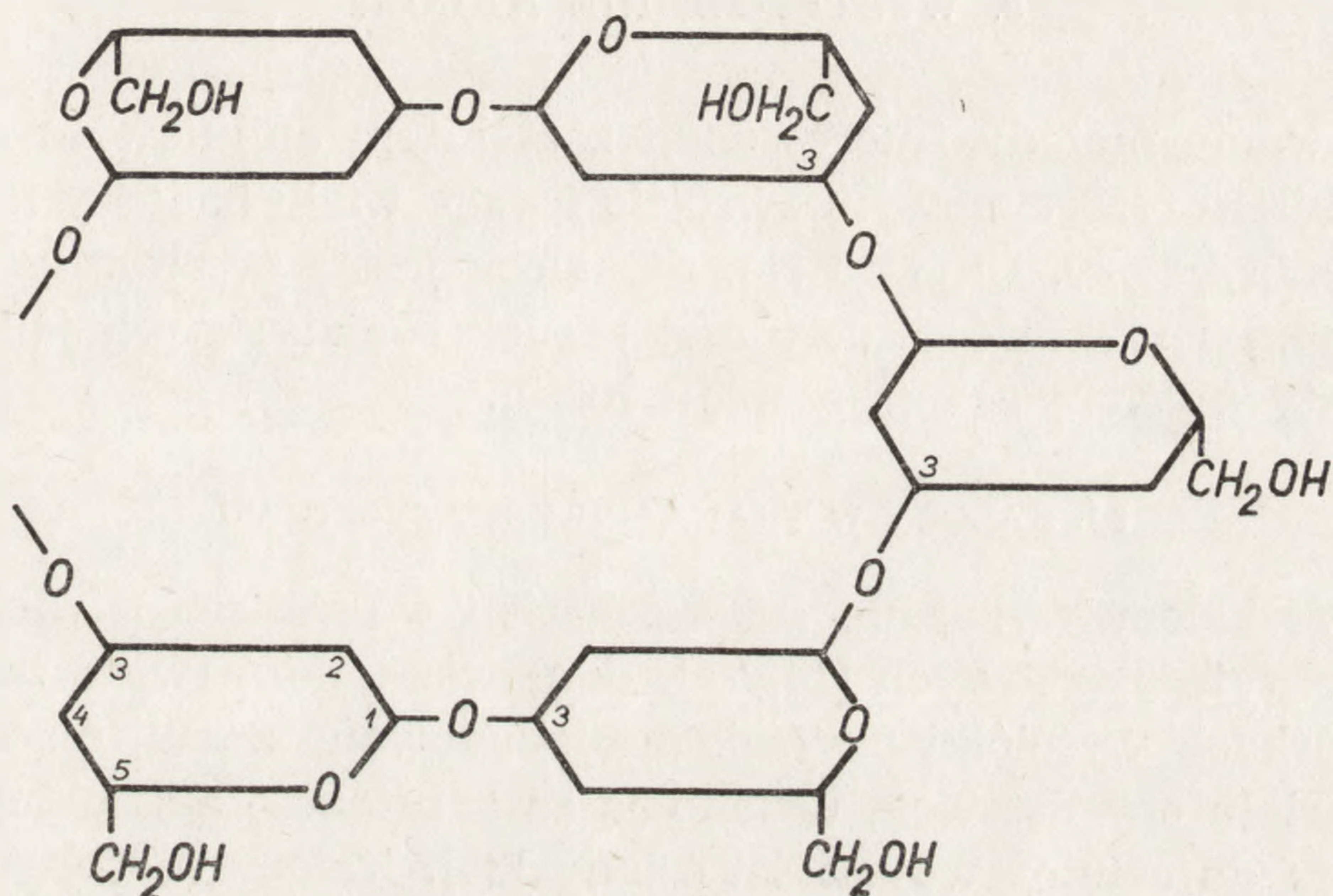
Na podstawie tych danych wysunięto przypuszczenie, że błękit anilinowy wykazuje specyficzne powinowactwo do wielu β -1,3-glukanów ścian komórkowych, jak i β -1,3-glukanów obecnych w substancjach zapasowych glonów — paramylonie i laminarynie (Clarke i Stone, cyt. za [116]; [79]).

Ostatnio Reynolds i Dashek [99] badając lokalizację kalozy w łagiewkach pyłkowych *Lilium longiflorum* zastosowali barwienie błękitem anilinowym lub lakmoidem (homolog błękitu rezorcynowego pozbawiony bromu) w połączeniu z enzymatycznym trawieniem białek i polisacharydów. Ponieważ kaloza w ścianach nie rosnących odcinków łagiewek pyłkowych *Lilium* barwiła się jedynie lakmoidem, wykazującym również powinowactwo do białek, Reynolds i Dashek sugerują obecność w ścianach łagiewek pyłkowych *Lilium* kalozy w połączeniu z białkami. Istnienie kalozy w formie glikoproteidów nie wydaje się zaskoczeniem, zwłaszcza w przypadku ściany łagiewki pyłkowej u *Lilium* wykazującej obecność hydroksyproliny [16, 17]. Zdaniem Reynoldsa i Dashek [99] negatywny wynik testu na kalożę w łagiewkach pyłkowych *Lilium* po zastosowaniu błękitu anilinowego zaprzecza ogólnie akceptowanej metodzie wykrywania kalozy, polegającej na pojawianiu się fluorescencji w obecności błękitu anilinowego.

2. CHARAKTERYSTYKA KALOZY

Kaloza jest substancją bezbarwną i nierozpuszczalną w wodzie, alkoholu, odczynniku Schweitzera, rozpuszcza się natomiast w zimnym rozcieńczonym KOH, stężonym H_2SO_4 i roztworach stężonych $SnCl_2$ i $CaCl_2$, podlega wytrawieniu kalożą (β -1,3-glukanazą). Ponadto pęcznieje w NH_3 , a pęczniąc w wodzie sześciokrotnie powiększa swą objętość. Wyszuszone może wykazywać pozytywną dwójłomność [32, 127], natomiast w stanie spęczniałym jest izotropowa. Ponieważ uważa się powszech-

nie, że kaloza jest polisacharydem tworzącym nierozgałęzione spiralne łańcuchy (rys. 1), zbudowanym z reszt glukozydzowych połączonych wiązaniami glikozydowymi (1-3) [68] lub β -1,3-poliglukanem zbudowanym z reszt β -D-glukopyranozowych [112], a niektóre rodzaje kalozy rozpuszczają się w 5-15% NaOH i KOH, zaliczana ona bywa do grupy hemiceluloz [41]. Natomiast wyniki badań Reynoldsa i Dashek [99] wskazują na przynależność kalozy do grupy glikoproteidów.



Rys. 1. Budowa cząsteczki kalozy (Frey - Wyssling [41])

Istnienie glikoproteidów zawierających kalozę potwierdzają wcześniejsze obserwacje nad rurkami sitowymi [89, 109]. Z nie opublikowanych badań Reynoldsa (cyt. za [99]) wynika ponadto, że matriks otaczające rozwijające się mikrospory *Vernonia* sp. wiąże zarówno białka, jak i kalozy, co sugeruje jej glikoproteidowy charakter.

Przedstawione dane zdają się popierać wysuniętą wcześniej koncepcję istnienia heterogennej kalozy, o różnym składzie chemicznym [14], zależnym od pochodzenia. Z badań Curriera [14] wynika ponadto, że kaloza jest substancją amorfna. Badania późniejsze na poziomie mikroskopu elektronowego wykazują, że może ona również wykazywać strukturę ziarnistą [23, 48]. Można by sądzić, że zmienność struktury kalozy spowodowana jest różnymi metodami utrwalania. Zastosowanie jednak tego samego utrwalacza (5% aldehyd glutarowy) uwidacznia bądź ziarnistą strukturę kalozy otaczającej komórki macierzyste pyłku *Helleborus foetidus* [24], bądź też większość kalozy jest homogenna, a ziarnistą strukturę wykazuje jedynie zewnętrzna część ściany [23].

Kaloza jest PAS negatywna [48, 51, 52] zarówno po zastosowaniu metod na poziomie mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego, co zgodne

jest z wcześniejszymi doniesieniami [66]. Kaloza jest stosunkowo łatwa do zidentyfikowania w mikroskopie elektronowym w tkankach utrwalonych aldehydem glutarowym i OsO_4 , ponieważ po zastosowaniu tych utrwalaczy jest ona bardziej elektronowo - przejrzysta aniżeli ściany pektynowo - celulozowe. Natomiast po KMnO_4 niemożliwe jest odróżnienie kalozy od ścian pektynowo - celulozowych [36].

3. WYSTĘPOWANIE KALOZY

Zastosowanie metody fluorescencji z błękitem anilinowym oraz barwienie błękitem rezorcynowym zwróciło uwagę wielu badaczy na miejsce występowania kalozy. Okazało się, że kaloza jest powszechnie występującym składnikiem komórki roślinnej tkanek somatycznych jak i komórek generatywnych u całego szeregu roślin.

3.1. KALOZA W TKANKACH SOMATYCZNYCH

Obecność kalozy wykazano we włoskach i włosnikach u wielu przedstawicieli okrytozalążkowych [14, 73]. Ponieważ kaloza tworzyła w badanych komórkach wyściółki przyscienne, zbudowane z kul, drobnoziarnistego materiału czy listewek, uznano ją za substancję adkrustującą [74], przylegającą do celulozowej części ściany [35]. Kalozy nie obserwowano w młodych komórkach epidermy, natomiast ilość kalozy w starzejących się komórkach epidermy i włosków wzrastała w miarę starzenia [73]. Obecność kalozy wykazano również w różnicujących się komórkach szparkowych u paproci, np. *Ophioglossum* [97], oraz w liściach 15 gatunków *Selaginella*, gdzie pojawianie się kalozy poprzedza mineralizację ścian komórkowych [130, 131]. Kaloza została opisana w otoczkach kryształów szczawianu wapnia [120], a ponadto jako składnik podłoża w cystolitach [41] u wielu gatunków z rodzaju *Ficus*, przy czym należy zaznaczyć, że nie obserwowano pojawiania się kalozy w cystolitach innych rodzin, np. *Acanthaceae*, *Combretaceae*, *Moraceae*, *Oleaceae*, *Urticaceae* [74].

Kaloza występuje w rozwijających się włóknach perycyklicznych *Salix fragilis* i *Salix alba* oraz we włóknach łykowych *Acer pseudoplatanus* i *Tilia cordata*. Kaloza wydaje się być równomiernie rozmieszczona na terenie całej ściany włókien, a pojawia się okresowo w ich ścianach, poprzedzając zawsze proces lignifikacji [58]. Obecność β - 1,3 - glukanów (kalozy) obserwowana była również w ścianach komórkowych u wielu grzybów, np. *Pythium butleri*, *Neurospora crassa*, *Phytophthora cinnamomi* [4, 77, 124].

Pierwsze doniesienia o występowaniu kalozy w komórkach tkanek somatycznych dotyczą jednak komórek sitowych ([89], Esau cyt. za

[34]). Kaloza pojawia się w tych komórkach w miarę zbliżania się okresu spoczynkowego, tworząc zasklepki. W komórkach sitowych funkcjonujących dłużej niż jeden sezon kaloza znika na wiosnę. Trwałe zasklepki kalozowe znajdują się jedynie w komórkach martwych pozbawionych protoplastu [34].

Badając rozmieszczenie kalozy w nasionach zbóż, zauważono niewielkie jej ilości w nie kiełkujących zarodkach, a obfitość kalozy — w ścianach komórek koleoptyla, zawiązków liściowych i tkanek formującego się korzenia, po umieszczeniu materiału w wodzie przez okres 12–24 godz. [42].

Waterkeyn [129] wykazał okresowe pojawianie się kalozy w przegrodzie pierwotnej dzielących się komórek *Hyacinthus*, *Tradescantia* i *Polypodium* tylko w okresie środkowej i późnej telofazy, natomiast pod koniec telofazy oraz w młodej ścianie poprzecznej kaloza była już niewykrywalna.

Obok tych dowodów świadczących o występowaniu kalozy w komórkach tkanek somatycznych istnieją dane świadczące o tym, że kaloza pojawia się w wyniku odwracalnych lub nieodwracalnych uszkodzeń komórek [8, 34, 94], powstających wskutek niewłaściwego preparowania żywego materiału. Stwierdzono okresowe pojawianie się tej substancji w komórkach miękiszowych *Gossypium hirsutum* poddanych działaniu ultradźwięków [15]. Zaobserwowano pojawianie się kalozy w ścianach komórek rosnących nici spermatogenicznych *Chara vulgaris* jedynie w materiale nie utrwalonym. Brak kalozy w materiale utrwalonym jak również w ścianach komórkowych różnicujących się spermatyd sugeruje pojawianie się kalozy w efekcie uszkodzenia komórek [95].

Rzeczywistą obecność kalozy w rurkach sitowych jest również dyskutowana. W aktywnych komórkach sitowych u roślin drzewiastych występowanie kalozy w płytkach sitowych wydaje się być wynikiem uszkodzenia komórek sitowych [31, 34, 139], wskutek niewłaściwego utrwalenia, ponieważ w materiale utrwalonym szybko przenikającym utrwalaczem można stwierdzić, że kaloza pojawia się stopniowo dopiero w miarę zbliżania się okresu spoczynkowego. Natomiast z badań nad rozmieszczeniem kalozy w 25 - letniej kulturze tkankowej *Daucus carota* wynika, że kaloza występuje we floemie i że w sprzyjających warunkach mogłaby być ona markerem służącym do identyfikacji floemu w kulturach tkanek roślinnych [84].

Z badań Northcote i Wooding [93] wynika, że kaloza w elementach sitowych pojawia się w wyniku zranienia. Ilość kalozy zmniejsza się wraz z odległością elementów sitowych od miejsca zranienia [27]. Z drugiej strony, kaloza nie występowała w elementach sitowych liści *Cucurbita ficifolia* rosnących w warunkach stałego oświetlenia [31].

Aby wykazać, czy kaloza pojawiająca się w komórkach tkanek somatycznych roślin wyższych może być normalnym składnikiem ścian komórkowych, Fulcher i wsp. [42] przeprowadzili doświadczenie na dwóch rodzajach tkanek: korzeniach 3–4 - dniowych siewek *Zea mays* i hodowanej 72 godz. in vitro tkance miękiszowej *Helianthus tuberosus*.

Małe fragmenty obu tkanek utrwalano w 5% aldehydzie glutarowym z 0,025 M buforem fosforanowym, pH 6,8, w ciągu 24 godz. w temperaturze 0°C. W celu wyeliminowania możliwości powstawania kalozy przyranej w czasie stosunkowo powolnego utrwalania, pewne odcinki badanych tkanek były przed utrwaleniem szybko odcinane i umieszczane w ciekłym azocie aż do całkowitego zamrożenia, przenoszone do mieszaniny suchego lodu z etanolem, trzymane w temperaturze –20°C przez noc, a następnie pozostawiane aż do uzyskania temperatury pokojowej. Ponieważ odcinki tkanek były maksymalnie zamrożone w ciągu 5 sekund po odcięciu, wydawało się nieprawdopodobne, ażeby mogła wytworzyć się i zakumulować kaloza przyranna.

Tkanki utrwalone w aldehydzie glutarowym zatapiano w żywicy epoksydowej i po sporządzeniu skrawków 1/4–1 µm grubości i usunięciu żywicy barwiono je błękitem anilinowym. Jako kontrolę stosowano materiał traktowany egzogenną β - 1,3 - glukanazą.

W materiale utrwalonym bezpośrednio aldehydem glutarowym, jak i zamrażanym uprzednio w ciekłym azocie, błękit anilinowy wykazywał powinowactwo do przegrody pierwotnej, jak i nowo powstającej poprzecznej ściany komórkowej. Nie wykrywano materiału fluoryzującego na terenie nowej ściany po potraktowaniu β - 1,3 - glukanażą, co wskazuje, że może być on analogiczny do kalozy rurek sitowych. Ponadto wykazano, że błękit anilinowy tworzy kompleks fluoryzujący z materiałem względnie młodej lub niecałkowicie uformowanej ściany poprzecznej, a fluorescencja nie występowała w większości bardziej dojrzałych ścian komórkowych u obu badanych tkanek. Bez względu na jego charakter chemiczny, materiał tworzący kompleks fluoryzujący z błękitem anilinowym jest wyraźnie związany z wczesnymi stadiami tworzenia ściany poprzecznej. Wyniki pracy Fulchera i wsp. [42] przeczą więc koncepcji powstawania kalozy w przegrodzie pierwotnej w wyniku zranienia czy powolnego przenikania utrwalacza do badanego materiału.

Stosując utrwalanie wierzchołków wzrostu korzeni *Hyacinthus orientalis* w temperaturze pokojowej, podwyższonej do 80, 100 i 180°C lub obniżonej do –20, –40, –185 i –196°C, wykazano ostatnio, że kaloza występuje w przegrodzie pierwotnej tych komórek, co również przeczy pojawianiu się kalozy w wyniku uszkodzenia komórek [76].

Wyniki przytoczonych badań, jak również obserwacje Craftsa i Curriera [11] wskazują, że każda komórka tkanki somatycznej jest zdolna

do syntezy kalozy w określonych warunkach, pod wpływem różnorodnych bodźców. Możliwość kontrolowanego bądź niekontrolowanego pojawiania się kalozy przeczy stwierdzeniu, że kaloza jest normalnym składnikiem ścian komórkowych komórek roślinnych. Kaloza może pojawiać się i zanikać w ciągu bardzo krótkiego okresu życia komórki bądź też jej obecność jest maskowana dzięki połączeniu z białkami [42, 129].

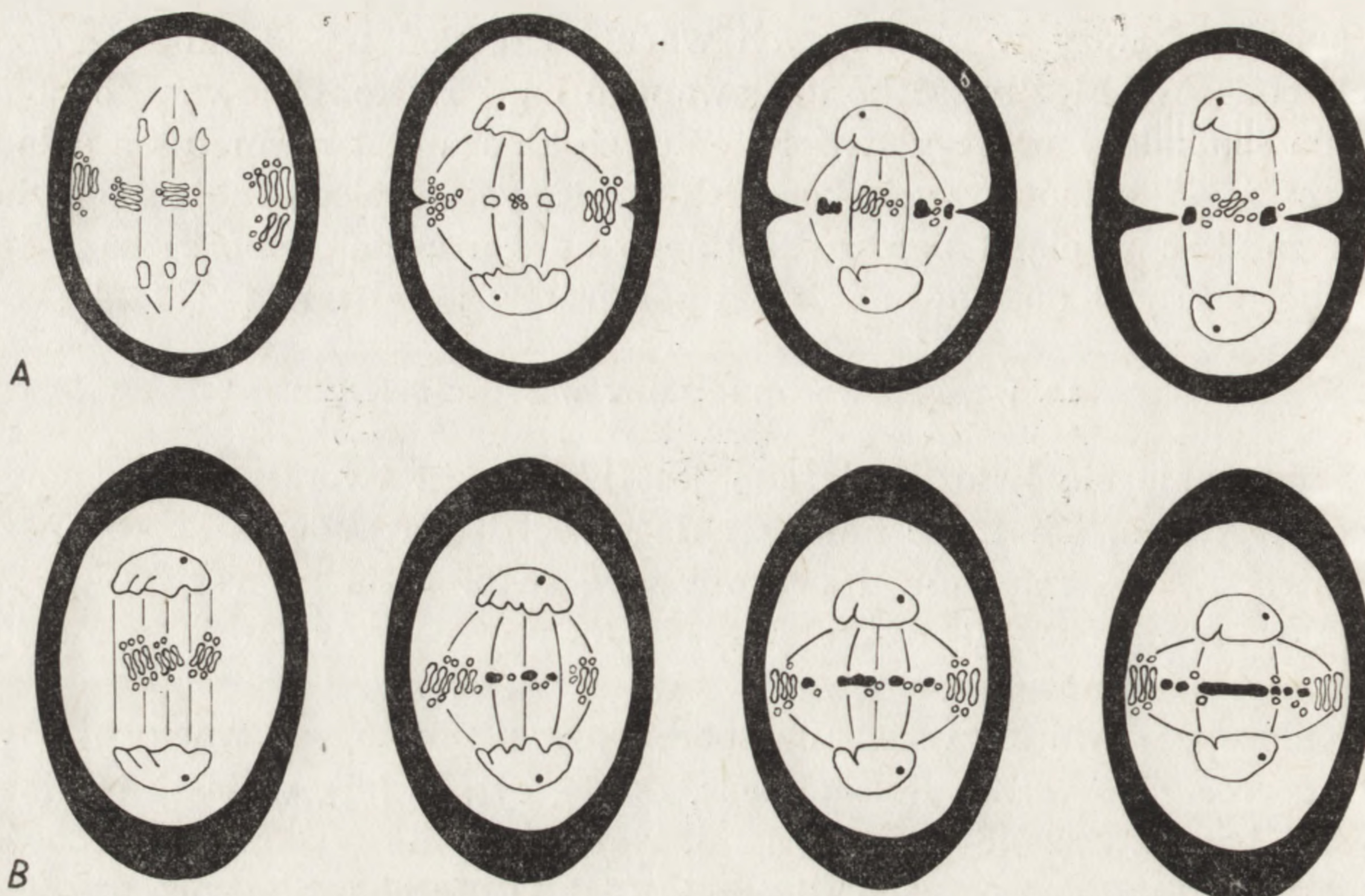
3.2. WYSTĘPOWANIE KALOZY W SPOROGENEZIE

Pojawianie się kalozy związane jest również z tworzeniem komórek generatywnych. Obecność kalozy była stwierdzona podczas sporogenezy u wątrobowców, mszaków i paprotników, w procesie mikrosporogenezy i makrosporogenezy u roślin nago- i okrytozalążkowych jak również w okresie powstawania gamet.

Kaloza pojawia się w ścianie sporocytów u niektórych wątrobowców, *Anthoceros*, *Geothallus*, *Riccia* (Beer, Doyle, cyt. za [6]), w postaci kalozy czystej bądź związanej z pektynami. Natomiast nie wykazano obecności tej substancji w sporocytach *Riccardia* [64]. U *Marchantia* sporocyty wydzielają kalozę w profazie mejotycznej, a u *Riccia* przeciwnie — dopiero w stadium postmejotycznym [20].

Brak jest kalozy u 15 zbadanych gatunków mchów [6] podobnie jak i u widłaków. Jedyny, jak dotąd, wyjątek stanowi *Selaginella*, u której ściana mikrosporocytu w okresie mejozy zbudowana jest z kalozy z dodatkiem pektyn [135]. Natomiast u *Osmunda* pojawiają się kalozowe przegrody pierwotne, otoczone przez ścianę zbudowaną z polisacharydów niekalozowej natury. Obok kalozy, w przegrodzie pierwotnej obserwuje się na brzegach sporocytów u *Osmunda* małe zgrupowania kalozy w formie stożków czy łódeczek, związane z niemi cytoplazmatycznymi łączącymi sąsiednie sporocyty [134].

3.2.1. Występowanie kalozy w mikrosporogenezie. Kaloza w mikrosporogenezie u *Spermatophyta* pojawia się w czasie profazy podziału heterotypowego, w stadium pachytenu [60]. Ilość kalozy tak szybko wzrasta, że pod koniec profazy I podziału otacza ona szczelnie protoplast mikrosporocytu i przerwaniu ulegają pasma cytoplazmatyczne (plazmodesmy) łączące sąsiednie mejocyty, następuje więc całkowita izolacja komórek siostrzanych [60–62]. Jest to I pokład kalozy. Jeżeli po podziale I następuje cytokineza, w płaszczyźnie przegrody pierwotnej większości *Angiospermae* pojawia się kaloza (rys. 2 A, B) w postaci wakuol kalozowych, zlewających się odśrodkowo w ciągłą listwę ściany poprzecznej (cytokineza centrypetalna) lub też w postaci septum rozbudowującego się dośrodkowo (centryfugalnie) (rys. 3, 4); zależnie od typu cytokinezy [43–46, 48]. W wyniku cytokinezy powstają diady (rys. 5). Waterkeyn



Rys. 2. Schemat kolejnych stadiów cytokinezy w mikrosporogenezie

A — cytokineza sukcesywna, przegroda zakłada się centrypetalnie, B — cytokineza sukcesywna, przegroda zakłada się centryfugalnie (kaloza — czarna)

i Bienfait [133] uważają, że kaloza otacza raczej przegrodę pierwotną aniżeli ją buduje, ponieważ przegrody pierwotne komórek macierzystych pyłku mogą być wyizolowane we wczesnych stadiach rozwoju i uwolnione od kalozy przez jej rozpuszczenie. W przypadku komórek macierzystych pyłku u *Magnolia* nie obserwowano nigdy kalozy otaczającej przegrodę pierwotną [44].

Drugi pokład kalozy powstaje w okresie interkinezy, a po zakończeniu telofazy podziału homotypowego formuje się trzeci wspólny pokład kalozy wokół komórek tetrady, wytwarzany przez każdą z komórek. Ściany kalozowe powstające w mikrosporogenezie nazywane są ścianami specjalnymi [5, 50, 126, 132].

Grubość poszczególnych pokładów kalozy w ścianie specjalnej jest różna (rys. 2 A, B) u poszczególnych gatunków [43, 61, 125, 126, 128], jak również ilość pokładów może być zmienna. Dla przykładu, u *Eleocharis palustris* kaloza nie jest odkładana wokół pojedynczych mikrospor pod koniec mejozy i cała tetradą otoczona jest jedynie kalozą uformowaną w okresie przedmejotycznym [21]. Natomiast u *Styphelia* (*Epacridaceae*), gdzie po normalnej mejozie 3 jądra komórki macierzystej pyłku wędrują do jednego bieguna komórki i degenerują, kaloza nie pojawia się w płaszczyźnie przegrody pierwotnej [39],

U ogromnej większości gatunków tetrady są układem stosunkowo

nietrwałym i ich ściany kalozowe ulegają szybko hydrolizie pod wpływem kalazy. Eschrich [29] badał aktywność kalazy w ekstraktach rozwijających się pylników *Cucurbita* i stwierdził aktywność tego enzymu w pylnikach jedynie w okresie rozpuszczania ściany kalozowej. Kalaza jest wydzielana przez komórki tapetum [82] i zachowuje aktywność około 48 godz. po rozpuszczeniu tetrad. Podobnie Stieglitz i Stern [119] zmierzili aktywność β -1,3-glukanazy w okresie mejozy i w czasie rozpuszczania kalozy wokół komórek tetrad u *Lilium*. Stosunkowo mała ilość aktywnej glukanazy była obecna w pylnikach, w których mikrosporocyty przechodzą profazę i I podział mejotyczny. Aktywność tego enzymu wzrastała natomiast gwałtownie w II podziale mejotycznym, osiągając szczyt w okresie uwalniania mikrospor z tetrad.

3.2.2. Występowanie kalozy w megasporogenezie. Kaloza w megasporogenezie u nagozalążkowych została opisana jedynie u przedstawiciela *Cycadales* — *Encephalartos poggei* [113, 125]. U okrytozalążkowych została ona wykryta dopiero w 1967 r. (*Orchis maculata* [105]) i opisana jako substancja pojawiająca się okresowo w ścianie komórkowej megasporocytów, charakteryzujących się monosporowym i bisporowym typem rozwoju woreczka zalążkowego, obok hemiceluloz, celulozy i dużej ilości pektyn [70]. Kaloza w megasporogenezie, podobnie jak w mikrosporogenezie, pojawia się w profazie podziału heterotypowego, ale w odróżnieniu od mikrosporogenezy nieco później, bo dopiero w diakinezie [105]. Położenie pierwszej warstwy kalozy odpowiada późniejszej lokalizacji aktywnej megaspory w tetradzie, przekształcającej się w komórkę macierzystą woreczka zalążkowego [70, 106]. I tak kaloza w megasporocycie typu *Polygonum* pojawia się na biegunie chalazalnym (rys. 6), a w typie *Oenothera* — na biegunie mikropylarnym. Obecność kalozy w ścianie jednego tylko bieguna komórki trwa bardzo krótko. Wkrótce kaloza pojawia się w innych ścianach mejocytów (rys. 7), znikając przy tym często z miejsca pierwotnej lokalizacji. Powierzchnia ściany megasporocytu zawierająca kalozę stopniowo wzrasta, osiągając maksymalne wysycenie kalozą ścian podłużnych przed I podziałem mejotycznym, a zmniejsza się w diadzie (rys. 8). Ale już w stadium triady, a następnie tetrad (rys. 9), obserwuje się ponownie silną fluorescencję ścian. Tak więc wzrost zawartości kalozy zachodzi w ścianach megasporocytów gotowych do podziałów, jak i w czasie I i II podziału [71]. Podobnie obecność kalozy wykazują ściany poprzeczne i tworząca się przegroda pierwotna. Maksymalne wysycenie ścian kalozą w megasporogenezie powoduje, podobnie jak w mikrosporogenezie, zanik plazmodesm.

Obecność kalozy we wszystkich ścianach megasporocytów utrzymująca się i po ich podziale jest obserwowana wyłącznie u storczyków [103],

natomiast u większości gatunków okres maksymalnego przesylenia ścian mejocytów kaloza jest bardzo krótki.

Nie wszystkie gatunki roślin charakteryzujące się monosporowym woreczkiem zalążkowym wykazują obecność kalozy w ścianach podłużnych. U *Verbascum olympicum*, *V. phlomoides*, *Menyanthes trifoliata* i *Oenothera muricata* kaloza obserwowana była w czasie megasporogenezy jedynie, podobnie jak w przypadku roślin charakteryzujących się bisporowym typem rozwoju woreczka zalążkowego, w ścianach poprzecznych [71]. Nawet w obrębie jednego rodzaju *Oenothera* lokalizacja kalozy bywa ograniczona wyłącznie do ścian poprzecznych (*O. muricata* [106] bądź widoczna jest ona także w ścianach bocznych (*O. lamarckiana* [65], *O. biennis* [103]).

Pojawianie się kalozy wyłącznie w ścianach poprzecznych wiąże się prawdopodobnie z efektem Rennera [106]. W wyniku mejozy połowa megaspor otrzymuje letalne zespoły chromosomów i istnieje jednakowa możliwość przejścia zespołu chromosomów do megasory chalazalnej, jak i mikropylarnej. Z tego względu tylko jedna z megaspor chalazalnych i jedna z mikropylarnych (w stadium tetrad) będzie aktywna. Skoro każdy z biegunów megasporocytu może stać się miejscem formowania aktywnej megaspor, taki megasporocyt nie może być zróżnicowany biegunowo. Odkładanie się kalozy w ścianach komórek w okresie megasporogenezy jest więc uwarunkowane genetycznie [106].

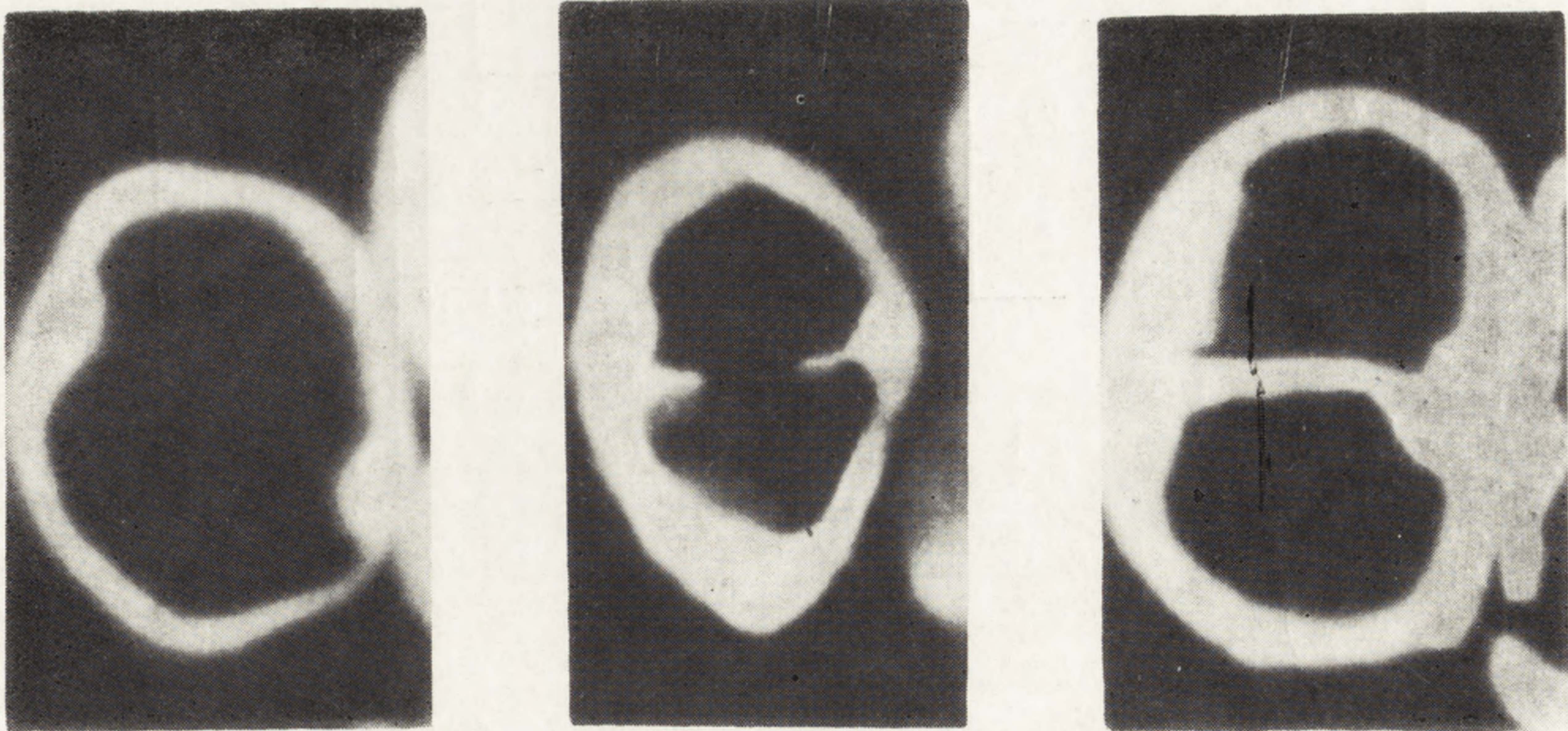
Kaloza natomiast nie była nigdy obserwowana u tych gatunków roślin okrytozalążkowych, które charakteryzuje tetrasporowy typ rozwoju woreczka zalążkowego [100–103, 111].

W przypadku monosporowego woreczka zalążkowego ściany poprzeczne nieaktywnych megaspor dzięki częściowej hydrolizie kalozy upodabniają się do płytek sitowych i dzięki temu możliwe staje się przechodzenie materiałów z nieaktywnych, degenerujących megaspor do rozwijającego się woreczka zalążkowego [104].

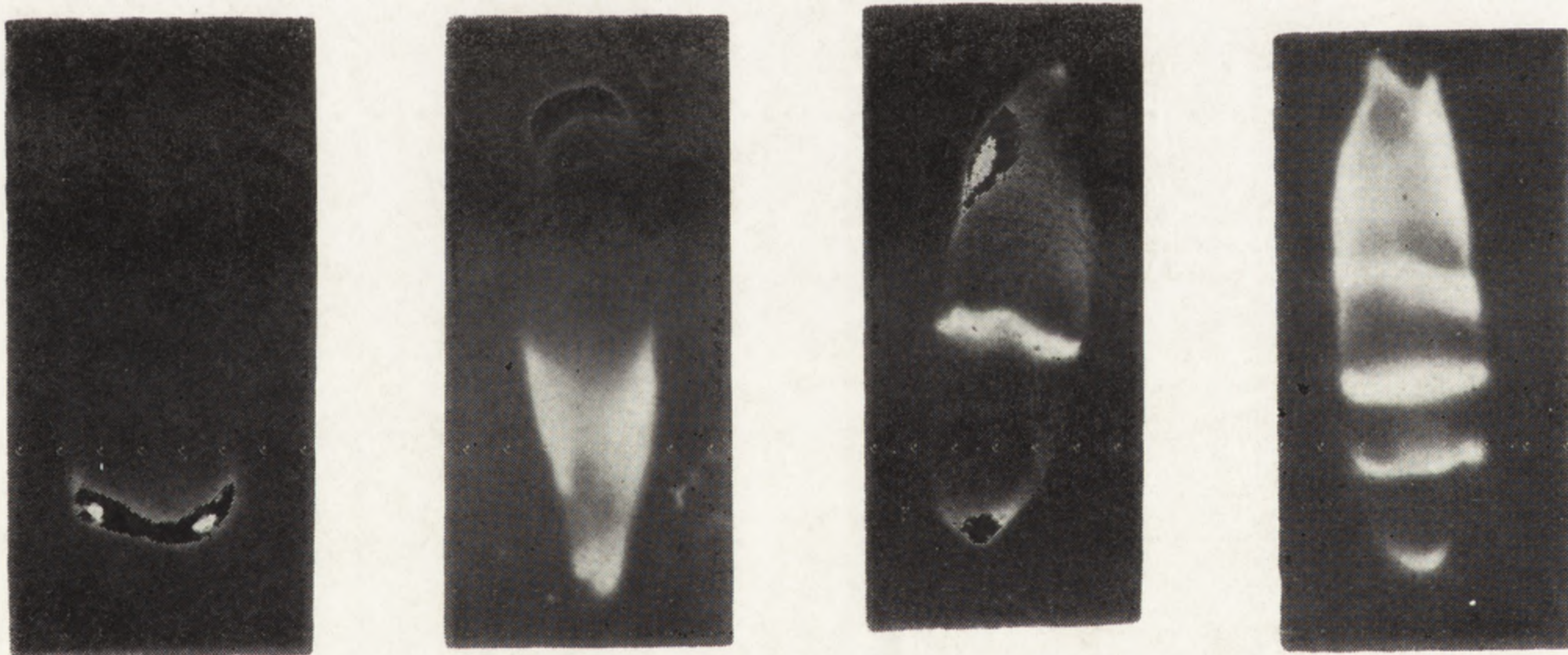
3.3. WYSTĘPOWANIE KALOZY W GAMETOGENEZIE

Obecność kalozy obserwowana była w dojrzałych, będących odpowiednikiem gametofitu męskiego roślin niższych, ziarnach pyłku u rodzaju *Pinus* [80, 128]. Kaloza występuje tutaj w zewnętrznej części intyny, tworząc wyściółkę. Podobnie intyna *Impatiens* w okresie niemal całkowitego uformowania zawiera kalozę obok substancji pektynowych, małej ilości celulozy i hemiceluloz (Flynn, cyt. za [21]). Kaloza w znacznej ilości obserwowana była również w intynie 3 gatunków rodziny *Compositae* [114].

Po I podziale mitotycznym jądra ziarna pyłku i powstaniu komórki vegetatywnej i generatywnej, na ich granicy pojawia się okresowo kaloza

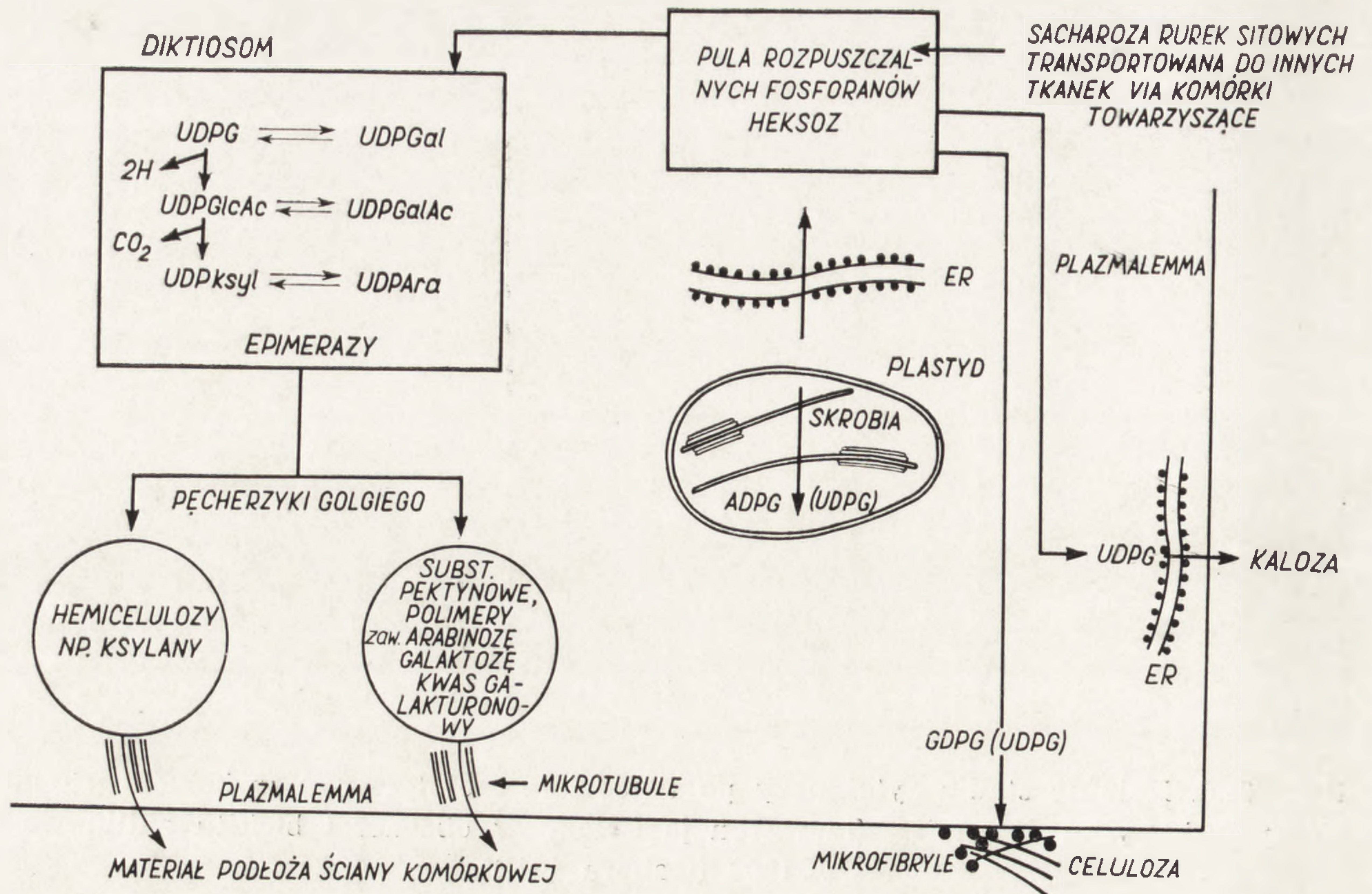


Rys. 3-5. Kolejne stadia cytokinezy po I podziale mejotycznym w komórkach macierzystych pyłku *Magnolia*, fluorescencja kalozy w obecności błękitu anilinowego, $\times 1200$ (Gabara [44])

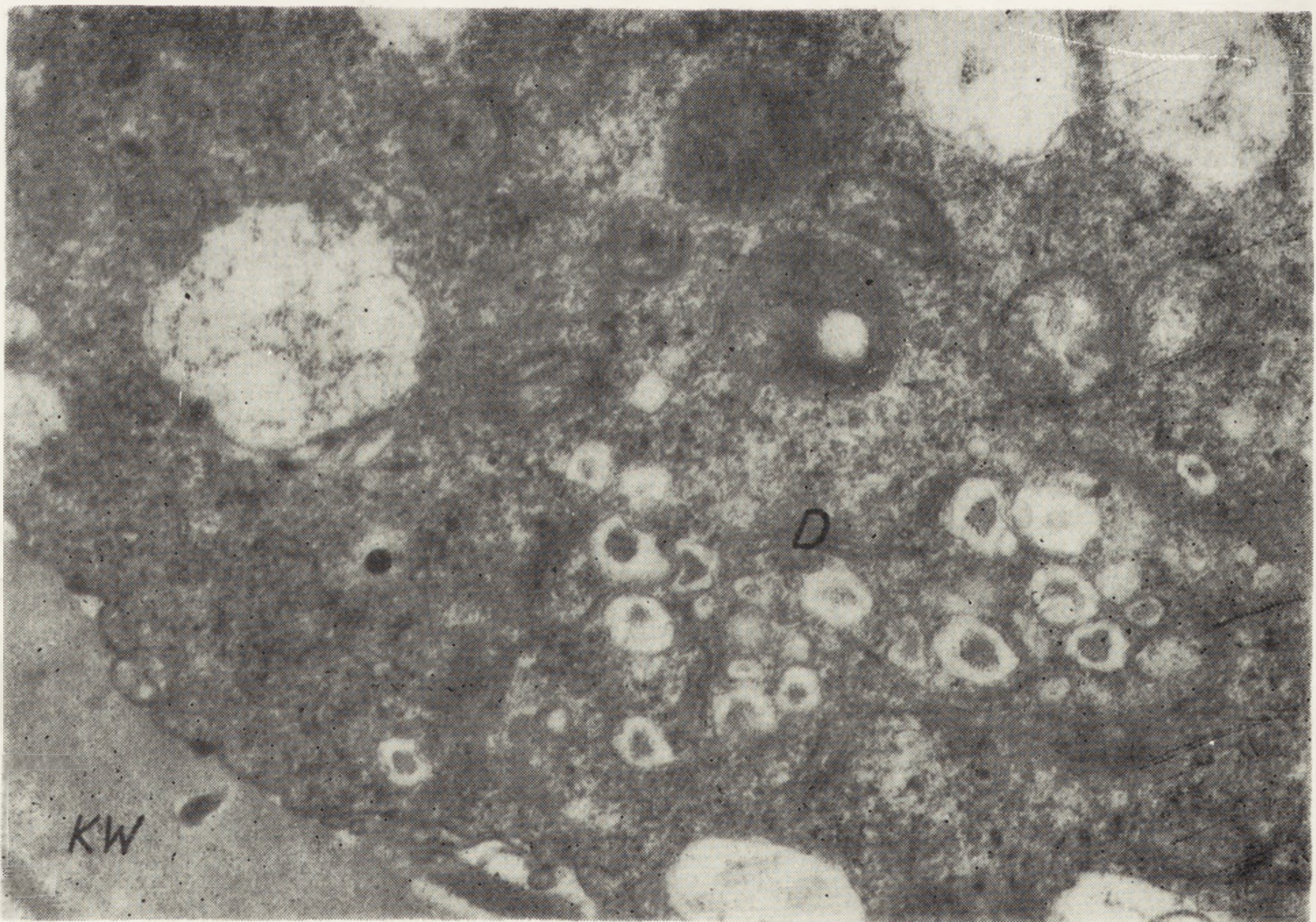


Rys. 6 - 9. Kolejne stadia rozwoju megasporocytu, fluorescencja kalozy w obecności błękitu anilinowego, $\times 700$.

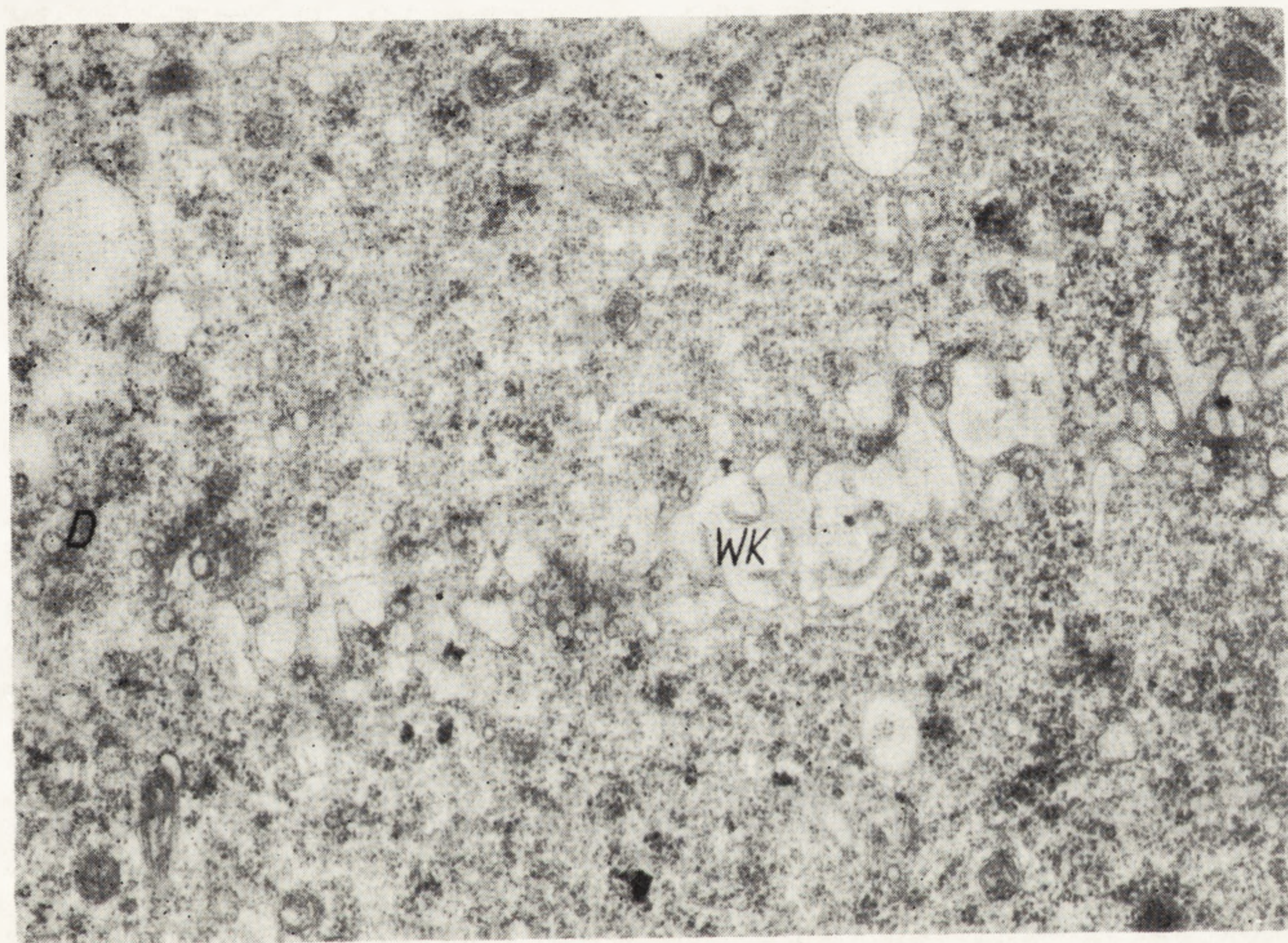
6 — *Epipactis latifolia*, 7-9 — *Laurentia longiflora* (Kuran [70])



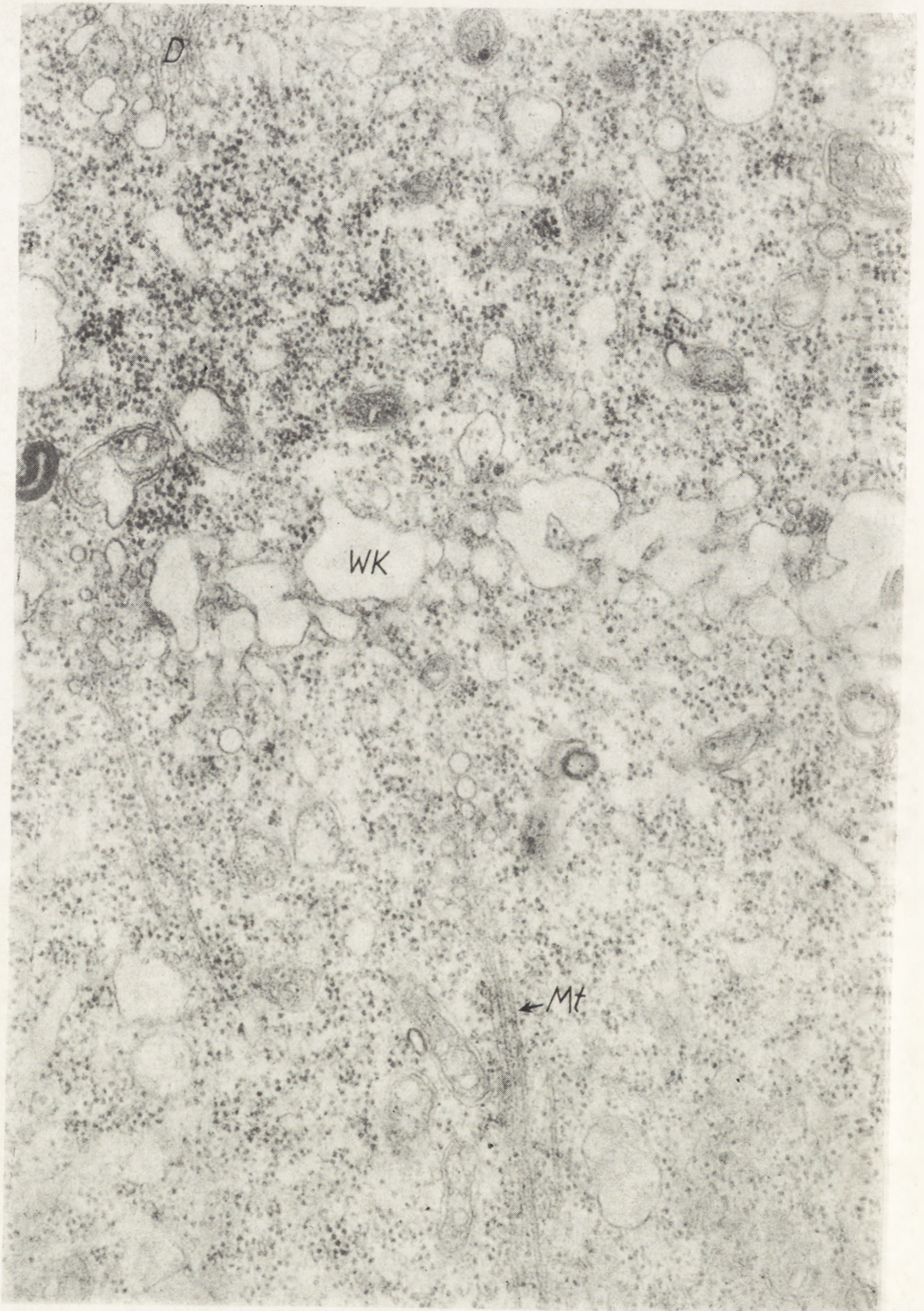
Rys. 10. Schemat ewentualnych dróg syntezy materiałów ściany komórkowej
 G — glukoza, ksyl — ksyloza, Ara — arabinoza, Gal — galaktoza, GalAc — kwas galakturonowy, GlcAc — kwas glukuronowy (Northcote [90])



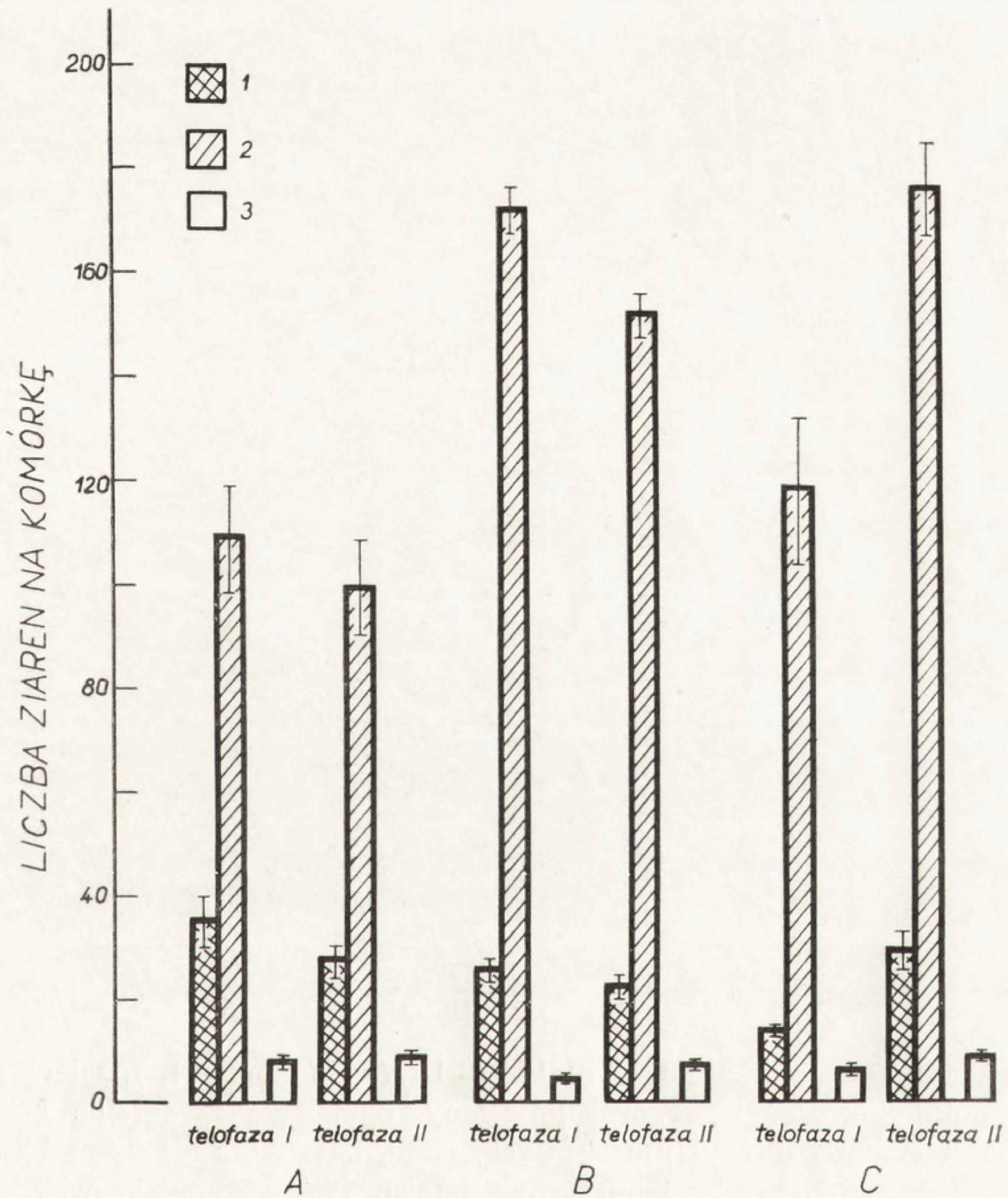
Rys. 11. Komórka macierzysta pyłku *Muscari comosum*. Podobna ultrastruktura i gęstość elektronowa ziarnistej substancji obecnej w pęcherzykach i wakuolach Golgiego i materiału ściany kalozowej (KW) (D — diktiosom), $\times 21300$ (Gabara [48])



Rys. 12. Komórka macierzysta pyłku *Dactylis glomerata* w stadium telofazy I podziału meiotycznego. Obok diktiosomów (D) otoczonych licznymi pęcherzykami w najmłodszej części przegrody, wakuole kalozowe (WK) z ziarnistą substancją, $\times 25200$ (Gabara [48])

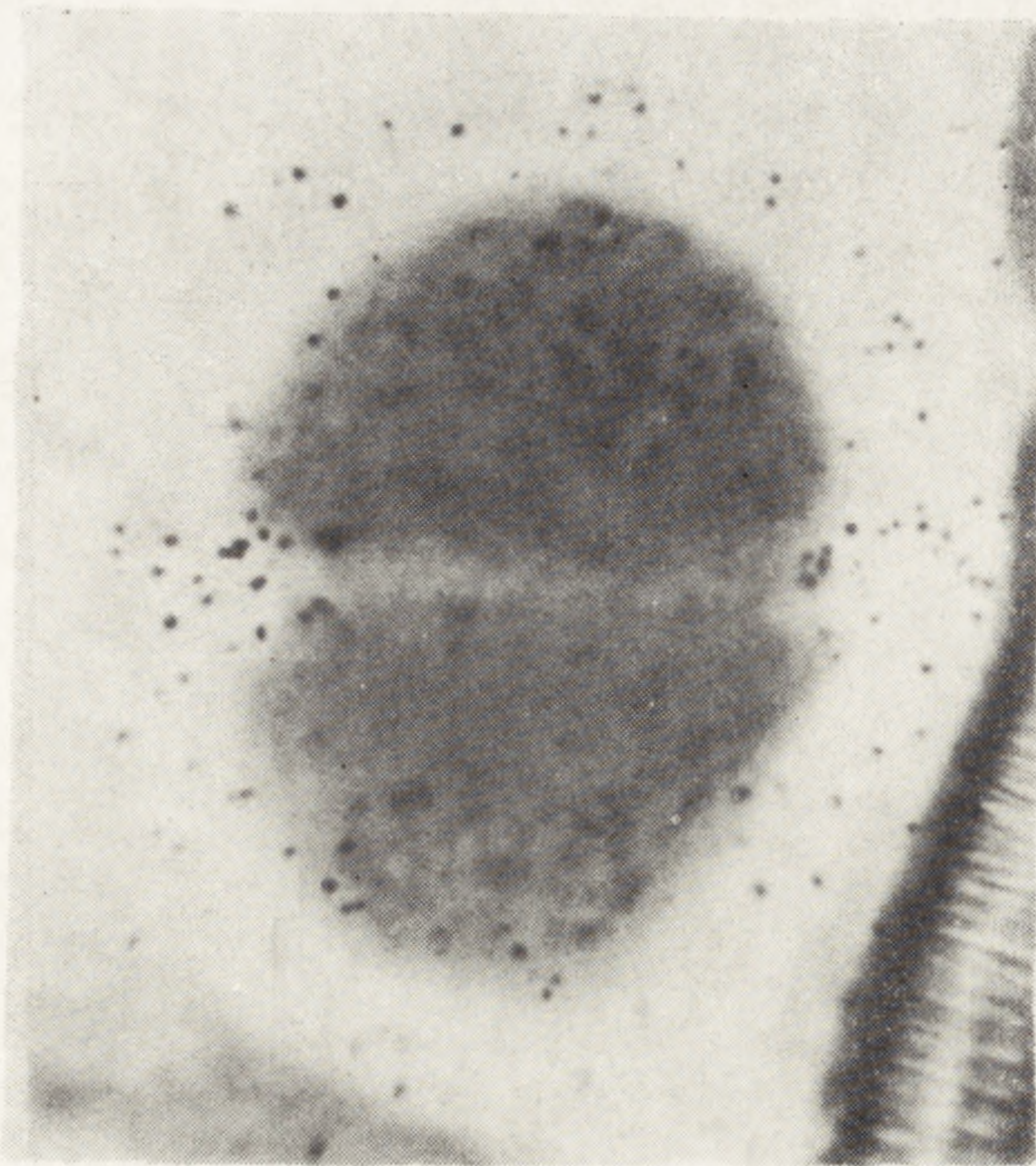


Rys. 13. Komórka macierzysta pyłku *Dactylis glomerata* w stadium telofazy I podziału mejotycznego. Późniejsze stadium niż rys. 11. Wakuole kalozowe (WK) z ziarnistą zawartością i liczne pęcherzyki gromadzące się w płaszczyźnie podziału komórki (D — diktiosom, Mt — mikrotubule), $\times 44100$ (Gabara [48])

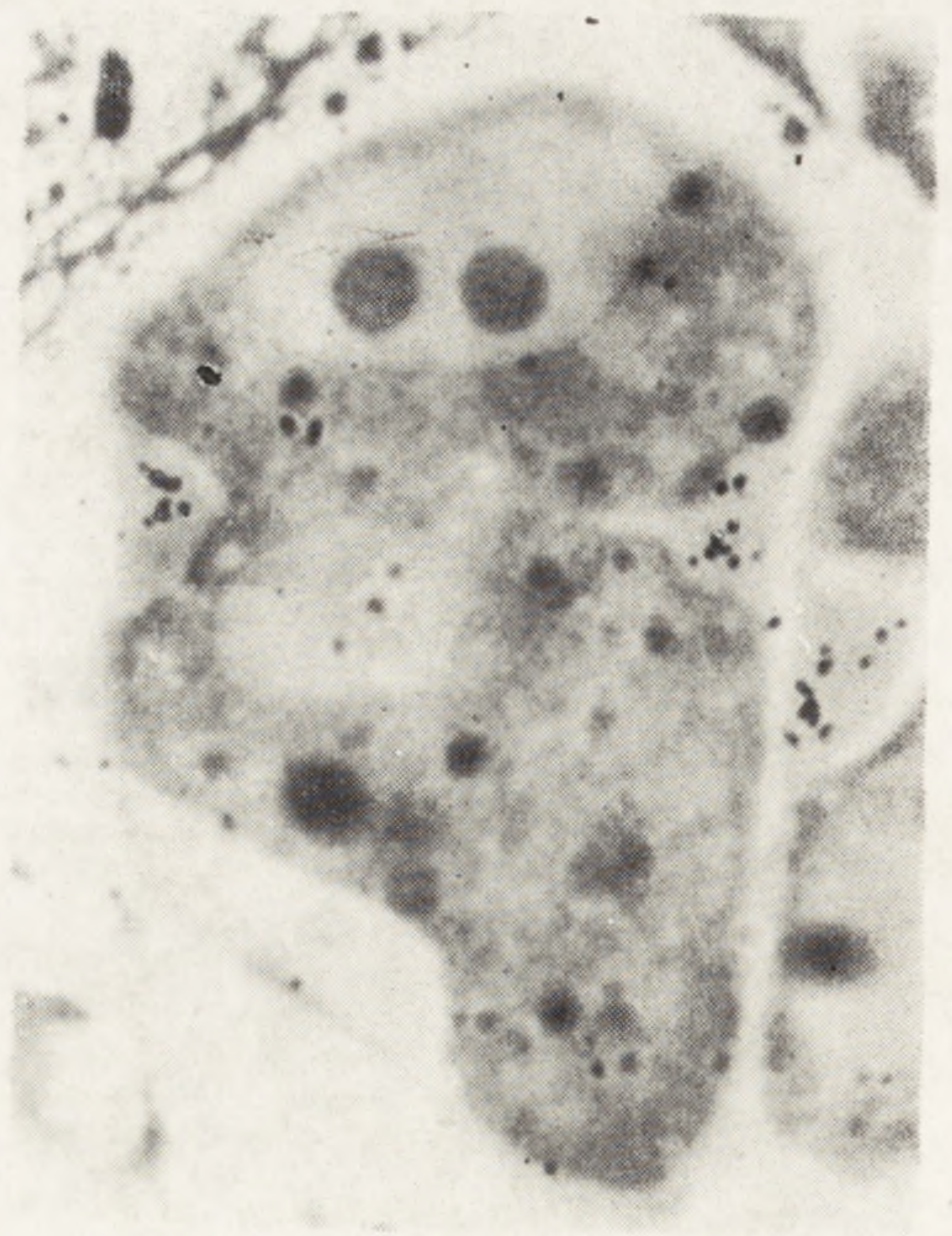


IRys. 14. Wykres przedstawiający włączanie DL - glukozy - 1 - ^3H do cytoplazmy (1) ii ściany (2) komórek macierzystych pyłku i do komórek tapetum (3) *Magnolia soulangeana*.

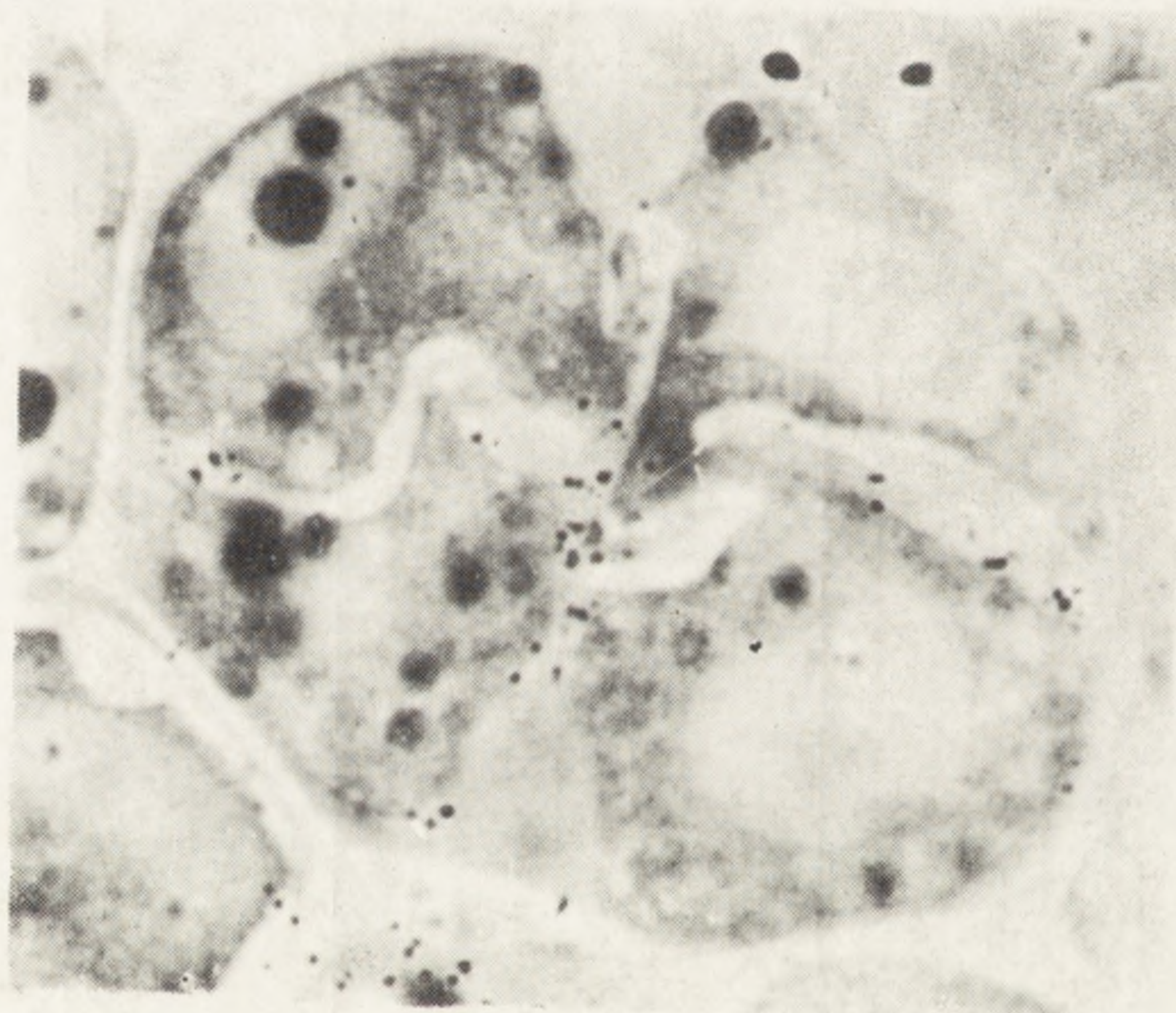
A — 1 godz. inkub. w glukozie ^3H , 12 godz. postinkubacji w glukozie nieradioaktywnej, B — 5 godz. inkub. w glukozie ^3H , 12 godz. postinkubacji w glukozie nieradioaktywnej, C — 20 godz. inkub. w glukozie ^3H (Gabara [48])



15



16



17

Rys. 15, 16, 17. Włączanie DL - glukozy - 1 - ^3H do komórek macierzystych pyłku *Magnolia*; 15 — preparat gnieciony, barwienie hemateiną Mayera, telofaza I, $\times 2000$; 16 — 1 μm skrawek, epon, barwienie błękitem toluidynowym, telofaza I, przekrój optyczny, $\times 1500$; 17 — 1 μm skrawek, epon, barwienie błękitem toluidynowym, tetradą, $\times 1500$ (Gabara [48])

[54, 55, 83], zanikająca po oddzieleniu się komórki generatywnej od ściany ziarna pyłku. Okresowe pojawianie się kalozy w ścianach komórek generatywnych stwierdzono u kilku gatunków roślin okrytozalążkowych, nagozalążkowych, wątrobowców, paprotników różnozarodnikowych i jednozarodnikowych [54–57]. U tych grup systematycznych pojawianie się kalozy poprzedza tworzenie komórek plemnikotwórczych.

W okresie kiełkowania ziaren pyłku, kaloza pojawia się w łagiewce pyłkowej, w ścianie najstarszego odcinka [128], w postaci listewek wysięlających wewnętrzną ścianę ziarna pyłku, jak i w świetle łagiewki, gdzie tworzy korki kalozowe zamykające częściowo lub całkowicie światło łagiewki, odgradzając starszą część łagiewki od strefy wierzchołkowej [53]. Ponieważ korki kalozowe powstają w tych rejonach łagiewek pyłkowych, które skręcają się lub pęcznieją, niektórzy badacze uważają, że tworzą się one w wyniku uszkodzeń (Tsinger i Petrowskaja - Baranowa, cyt. za [108]).

Istnieją wyraźne różnice w formie i rozmieszczeniu kalozy w zależności od tego czy łagiewki pyłkowe rozwijają się w słupkach krzyżówek zgodnych, czy też niezgodnych [75]. I tak Tupý [121] stwierdził około dwukrotnie więcej kalozy na jednostkę długości łagiewki pyłkowej, w przypadku niezgodnego zapylenia w porównaniu z zapyleniem zgodnym. Kaloza gromadziłaby się w niezgodnych łagiewkach w konsekwencji ograniczonej zdolności łagiewek do wykorzystania sacharozy. Wniosek autor oparł na przypuszczeniu, że część glukozy zużywana jest głównie do tworzenia ściany łagiewki, a reszta pozostająca w wyniku ograniczonego oddychania odkładana jest w postaci kalozy. Jeżeli zużycie cukru jest takie samo w zgodnych i niezgodnych krzyżówkach, znacznie więcej niewykorzystanej glukozy pozostawałoby w krótkich, zablokowanych na pewnym etapie rozwoju łagiewkach niezgodnych, co pociągałoby za sobą akumulację w takich łagiewkach większej ilości kalozy. Ponadto, więcej kalozy powinno gromadzić się w łagiewkach *in vitro* aniżeli *in vivo*, gdzie zachowane są optymalne warunki dla rozwoju łagiewek pyłkowych [121].

4. SYNTEZA KALOZY

Pomimo licznych prac dotyczących kalozy, miejsce jej syntezy i polimeryzacji jest nadal dyskutowane.

Badania nad rozwojem rurek sitowych wykazały obecność paciorkowatego retikulum endoplazmatycznego w okresie powstawania kalozy [10], a obserwacje rozwoju komórek macierzystych pyłku u *Endymion* [1] pozwoliły przypuszczać, że powstawanie kalozy może być związane z retikulum endoplazmatycznym i że kaloza bądź jej prekursorzy mogłyby być syntetyzowane na terenie retikulum endoplazmatycznego bądź w jego

pobliżu, a następnie transportowane do plazmalemmy. Również Dunbar [22] zaobserwowała, że w cytoplazmie komórek macierzystych pyłku u kilku gatunków *Campanulaceae*, w okresie tworzenia kalozy, występuje głównie retikulum endoplazmatyczne. Na tej podstawie autorka przypuszcza, że retikulum endoplazmatyczne uczestniczy w syntezie kalozy. Podobny pogląd wyraża Northcote [90], Roland [107] oraz Arsanto i Coulon [2] przypisując retikulum endoplazmatycznemu i plazmalemmie uczestnictwo w tworzeniu kalozy (rys. 10), przy czym prekursorzy kalozy byłyby transportowane w kanałach retikulum endoplazmatycznego, w formie niskocząsteczkowych polimerów glukanu [107].

Natomiast badania nad ultrastrukturą komórek macierzystych pyłku *Berberis*, *Dactylis*, *Magnolia* i *Muscari* [44, 45, 46, 48] skłaniają do wniosku, że w tworzeniu ściany kalozowej uczestniczy inna organella komórkowa, a mianowicie aparat Golgiego. W okresie bowiem poprzedzającym cytokinezę w komórkach macierzystych pyłku obserwuje się nagromadzenie dużych ilości struktur Golgiego (rys. 2 A, B) przy niemal całkowitym braku retikulum endoplazmatycznego, a w czasie samego podziału aktywne formy struktur Golgiego bądź pęcherzyki gromadzą się (rys. 12, 13) w płaszczyźnie podziału komórki [44–46, 48]. To grupowanie się struktur Golgiego zgodne jest z typem cytokinezy (centrypetalnym lub centryfugalnym). Zlewające się wakuole Golgiego tworzące większe zespoły wykazują w mikroskopie świetlnym obecność kalozy.

Za słuszością koncepcji udziału aparatu Golgiego w tworzeniu kalozy przemawia ponadto fakt występowania ziarnistego materiału w pęcherzykach i wakuolach Golgiego, analogicznego do kalozy budującej ścianę specjalną (rys. 11).

Rola aparatu Golgiego w tworzeniu kalozy zgodna jest z ogólnie przyjętą koncepcją udziału aparatu Golgiego w sekrecji polisacharydów [67, 85, 90]. Pęcherzyk Golgiego byłby miejscem, wewnątrz którego zawartość mogłaby podlegać różnym zmianom, np. w stopniu polimeryzacji polisacharydów [8].

Wydaje się, że niektóre pęcherzyki Golgiego zawierają fosforylowane prekursorzy kalozy (ich odpowiednikiem mogłaby być ziarnista zawartość wakuol Golgiego w komórkach macierzystych pyłku u *Muscari* [48]), wydalone następnie na powierzchnię plazmalemmy w czasie powstawania ściany, gdzie ulegałyby polimeryzacji do kalozy [30]. Z drugiej strony ziarnisty materiał pęcherzyków Golgiego mógłby stanowić gotową kalozę.

Również Echlin i Godwin [23] oraz Willemse [136] przypuszczają, że pęcherzyki Golgiego mogłyby brać udział w tworzeniu ściany kalozowej. Echlin i Godwin [23], badając rozwój ziaren pyłku u *Helleborus foetidus*, zaobserwowali pojawianie się dużej ilości struktur Golgiego charaktery-

stycznych dla aktywnej sekrecji. Na tej podstawie autorzy ci uważają, że kaloza powstaje przez agregację zawartości pęcherzyków pochodzących z diktiosomów.

Badając biosyntezę glukanów we frakcji diktiosomów i błon plazmatycznych izolowanych z łodyg *Allium cepa* zwrócono uwagę na syntezę β -1,3- i β -1,4-glukanu, powstających w różnych ilościach w zależności od stężenia urydyno - dwufosforanu lub stosunku ilościowego diktiosomów do błon plazmatycznych [122]. Wyniki Raya i wsp. [98], a także Van der Woude i wsp. [122] wskazują, że w aparacie Golgiego i błonach plazmatycznych istnieją warunki do syntezy glukanów oraz że diktiosomy mogą syntetyzować β -1,3-glukany. Z badań Van der Woude i wsp. [122] wynika ponadto, że diktiosomy i błony plazmatyczne mają podobny zestaw syntetaz glukanu. Jest to zrozumiałe, jeśli wziąć pod uwagę fakt istnienia w tkankach roślin wyższych systemu enzymatycznego: UDP - -glukoza: β -1,3-glukan β -3-glukozylotransferaza [37, 38].

Na udział aparatu Golgiego w tworzeniu kalozy wskazują również badania autoradiograficzne nad włączaniem glukozy ^3H do komórek macierzystych pyłku (rys. 14) u *Magnolia* [48]. Z badań tych wynika wyraźnie, że DL-glukoza - 1 - ^3H wbudowuje się do ściany kalozowej w stadium telofazy I i II (rys. 15, 16, 17), przy czym ziarna srebra widoczne są głównie na terenie powstającego septum kalozowego. Podobne wyniki uzyskano w przypadku komórek macierzystych pyłku *Gerbera jamesonii*, w których glukoza radioaktywna wbudowuje się intensywnie do ściany kalozowej zarówno w czasie, jak i po zakończeniu ich podziału [115].

Obserwacje komórek macierzystych pyłku *Magnolia* wskazują ponadto na wybiórcze znakowanie kalozy, nie obserwuje się bowiem włączania glukozy ^3H do komórek tkanek pylnika *Magnolia* [48]. Podobnie, badając rozwój elementów sitowych u *Acer* [93] i u *Pinus pinea* [137] zauważono, że jedynym elementem komórkowym, który wykazywał włączanie glukozy radioaktywnej, jest kaloza rurek sitowych. Pomimo zastosowania techniki autoradiograficznej na poziomie mikroskopu elektronowego nie udało się wykazać, jakie organelle komórkowe związane są z syntezą tego polisacharydu [137]. Natomiast Arsanto i Coulon [2] na podstawie różnicowania elementów metafloemu u *Cucurbita pepo* i *Ecballium elaterium* oraz włączania D-glukozy - 6 - ^3H do kalozy przypuszczają, że prekursorzy kalozy są częściowo — jeśli nie całkowicie — tworzone na zewnątrz plazmalemmy, w przestrzeni peryplazmatycznej, dzięki syntezie β -1,3-glukanu obecnej na plazmalemmy.

Odkąd wiadomo, że aparat Golgiego jest częścią systemu odpowiedzialnego za transport wewnątrz komórki oraz że bierze on udział w syntezie polisacharydów ściany komórkowej [9, 12, 13, 18, 28, 45, 47, 87, 92, 112] i że polisacharydy tworzone z glukozy radioaktywnej są znajdo-

wane w aparacie Golgiego komórek, np. czapeczki korzeni pszenicy czy kukurydzy [40, 72, 92], słusznym wydaje się przypuszczenie, że są one syntetyzowane wewnątrz tej organelli komórkowej.

Glukoza radioaktywna podawana pylnikom *Magnolia* mogłaby być włączana do diktiosomów [40, 72, 92], gdzie wiązałyby się z powstającym polisacharydem i następnie w formie spolimeryzowanego związku byłaby odtransportowywana do ściany kalozowej. Wniosek ten zdają się popierać wyniki uzyskane na izolowanej frakcji diktiosomów z zastosowaniem znakowanej glukozy. Stwierdzono, że prekursorzy polisacharydów ściany pojawiają się najpierw w diktiosomach, a następnie we frakcji pęcherzyków, zanim zostaną włączone do ściany komórkowej [26].

Kessler i wsp. [69] badając włączanie sacharozy C^{14} i fruktozy C^{14} do kiełkujących komórek pyłku *Lapageria rosea* i *Impatiens oliveri* zaobserwowali powstawanie β -1,3-glukanu z dostarczonej do pożywki sacharozy, chociaż nie następowało wydłużanie łagiewki pyłkowej pod wpływem znakowanego substratu. Na tej podstawie autorzy uważają, że egzogenne cukry są natychmiast przekształcane w kalozę w czasie kiełkowania ziaren pyłku. Podobny mechanizm zdaje się mieć miejsce także w przypadku egzogennej DL-glukozy - 1 - 3H , przekształcanej w kalozę otaczającą powstające komórki diad i tetrad u *Magnolia*.

Biorąc pod uwagę ontogenezę aparatu Golgiego nie można wykluczyć istnienia dwóch możliwości: albo aparat Golgiego jest miejscem wiązania glukozy radioaktywnej z powstającym polisacharydem, albo też polisacharyd syntetyzowany byłby wewnątrz ER, gdzie podlegałby kondensacji i w zmodyfikowanej formie poprzez aparat Golgiego wędrowałby do plazmalemy [91]. Przeciwno tej drugiej koncepcji świadczy brak retikulum endoplazmatycznego w komórkach macierzystych pyłku u *Magnolia*. Ponadto Villemez i wsp. [123] postulując, że wprawdzie enzymy syntetyzujące różne polisacharydy ścian zawarte są w plazmalemmie, ale jedynym odstępstwem od tej reguły jest enzym syntetyzujący kalozę. Powszechnie wiadomo, że część glukozy radioaktywnej może być włączana do kompleksu węglowodanowego, część zaś ulega rozpadowi w czasie glikolizy i jej metabolity mogą być następnie użyte w syntezie białek czy kwasów nukleinowych [96]. Brak znakowania jądra i plastydów w komórkach *Magnolia* wskazywałby, iż ogromna większość — jeśli nie cała dawka — glukozy 3H ulegałaby przekształceniu w kalozę.

5. FUNKCJA KALOZY

Najbardziej rozpowszechniony jest pogląd, w myśl którego kaloza jest substancją zabezpieczającą miejsce zranienia przed ubytkiem lub uszkodzeniem cytoplazmy [14], chroniąc jednocześnie przed infekcją mikroorga-

nizmów (Rowlins i Takahashi, cyt. za [42]). Wyniki pracy Fulchera i wsp. [42], opisane wcześniej, przeczą jednak koncepcji powstawania kalozy jedynie w wyniku zranienia lub uszkodzenia komórek w trakcie powolnego przenikania utrwalacza.

Kalozie przypisuje się również aktywną rolę w regulowaniu międzykomórkowego ruchu substancji w rurkach sitowych [32, 81] jak również w worku pyłkowym [60].

Heslop - Harrison [61], a następnie Heslop - Harrison i Mackenzie [63] podając tymidynę ^3H do komórek macierzystych pyłku *Lilium* zauważyli, że włączanie tego izotopu następuje jedynie przed wytworzeniem ściany kalozowej bądź po uwolnieniu komórek z tetrad. Na tej podstawie Heslop - Harrison wysunął wniosek o istnieniu bariery kalozowej uniemożliwiającej kontakt nie tylko między poszczególnymi mejocytami, ale także izolującej je od tkanki tapetum. Być może podobną funkcję pełni kaloza pojawiająca się w komórkach sitowych — jako substancja ochronna i uszczelniająca [138]. Dzięki barierze kalozowej spory byłyby całkowicie odcięte od informacji genetycznej, która mogłaby być przekazywana za pośrednictwem mRNA z macierzystego sporofitu [61].

Kaloza wokół komórek macierzystych pyłku nie tylko izoluje poszczególne mejocyty [19, 126], odgranicza je od komórek tkanki sporogennej, ale pełni ona również funkcję selektywnego filtra molekularnego umożliwiającego przejście substancji odżywczych i zatrzymującego związki, których obecność w komórkach tetrad mogłaby zagrozić autonomii jądra [60].

Wyniki doświadczeń wykazujące iż glukoza radioaktywna i prekursorzy lipidów (kwas palmitynowy, kwas mewalonowy i octan sodu) są włączane do komórek macierzystych pyłku u kilku gatunków roślin okrytozalążkowych [48, 49, 115] przeczą koncepcji istnienia bariery kalozowej w pylnikach. Podobny wniosek wynika z łatwości przenikania przez kalozę małych cząstek żelaza (Rowley i Dunbar, cyt. za [22]) czy substratów stosowanych w celu wykrycia enzymów [43, 44]. Wydaje się również nieprawdopodobne, aby komórki tetrad otoczone ścianą kalozową były zdolne do syntezy wszystkich potrzebnych substancji bez istnienia drogi, którą mogłyby być dostarczane różne materiały potrzebne dla ich dalszego rozwoju [22].

Również brak kalozy podczas rozwoju tetrasporowych woreczków zalążkowych [100–103, 111] przeczy istnieniu bariery zapobiegającej niezgodności genetycznej w megasporogenezie. Podobnie kaloza pojawiająca się w ziarnie pyłku na granicy komórki generatywnej i wegetatywnej [54] nie może zapobiegać niezgodności immunologicznej. Wydaje się natomiast prawdopodobne, że kaloza pojawiająca się w przegrodzie pierwotnej komórek tkanek somatycznych [42, 129] czy też otaczająca komórkę genera-

tywną może pełnić funkcję bariery izolującej komórki w procesie różnicowania, pozwalając na utrwalenie indywidualności nowo powstałych komórek [54]. Kaloza zabezpieczałaby komórki różnicujące się przed działaniem czynników morfogenetycznych ze strony organizmu macierzystego.

Jeżeli jednak przyjąć, że kaloza pełni ważną rolę w procesie różnicowania komórek i zabezpiecza indywidualność komórek, to jak wytłumaczyć funkcję kalozy w tych komórkach, w których pojawia się ona dopiero po podziałach mejotycznych (sporocyt *Riccia*, ściana poprzeczna tetrad w megasporogenezie)? Nie można sobie wyobrazić, żeby megasporocyty nie wykazujące obecności kalozy aż do I podziału mejotycznego czy sporocyty aż do zakończenia mejozy nie podlegały wpływom czynników morfogenetycznych. Nasuwa się ponadto pytanie, jaką rolę pełni kaloza pojawiająca się między komórką generatywną i wegetatywną jednego i tego samego ziarna pyłku czy też w starzejącej się łagiewce pyłkowej. I wreszcie, jeśli przyjąć, że kaloza izoluje komórki w procesie różnicowania, powstaje pytanie, jaki czynnik zabezpiecza indywidualność komórek u roślin nie wytwarzających kalozy, np. woreczek zalążkowy tetrasporowy czy sporocyt u *Jungermaniales* [64] lub *Pteridophyta* [134].

Kalozie przypisuje się rolę w regulowaniu ciśnienia osmotycznego roztworów przepływających przez komórki sitowe [32]. Podobnie gwałtowne wzmoczenie wzrostu mikrospor po ich uwolnieniu z otoczki kalozowej wydaje się być pochodzenia osmotycznego, gdyż przemieszczanie substancji z komory pylnika do mikrospor jest szybsze niż gdyby zachodziło ono drogą dyfuzji [63]. Kaloza, poprzez wchłanianie wody i związaną z tym zmianę ciśnienia osmotycznego w komórce, mogłaby uczestniczyć w nadawaniu kierunku przemieszczania się wody wraz z substancjami odżywczymi do aktywnej, rozwijającej się megaspory.

Interesującą koncepcję przedstawiły Barskaja i Balina [3] sugerując, że kaloza zabezpiecza rozwijające się mikrospory przed odwodnieniem i dostarcza wody, kiedy pobieranie wody przez roślinę jest niewystarczające. Kaloza pełniłaby więc funkcję swoistego magazynu wody dla komórek, które otacza.

Zaobserwowano, że kaloza w ząbkach liściowych u *Selaginella* jest zastępowana przez krzemionkę, a pojawianie się kalozy we włóknach perycyklicznych i łykowych poprzedza proces lignifikacji [58]. Ponieważ procesowi intensywnej mineralizacji towarzyszy silne odwodnienie, kaloza poprzez wchłanianie wody mogłaby brać udział w mineralizacji ścian [70] lub ich lignifikacji.

Całkiem odmienną koncepcję przedstawia Mühlendorf [86]. Według tego autora kaloza w okresie rozpadu tetrad może stanowić wygodne źródło rozpuszczalnych węglowodanów, dostępnych natychmiast dla doj-

rzewających mikrospor [3]. Podobnie Stanley [117] przypuszcza, że kaloza w komórkach pyłku pełni funkcję węglowodanu zapasowego, zużywanego zarówno w czasie rozwoju pyłku, jak i na początku kiełkowania (Eschrich, cyt. za [118]). Kaloza odcinając część cytoplazmy łagiewki pyłkowej wyznacza jednocześnie drogę dla strumienia cytoplazmy wewnątrz łagiewki [117].

Z rozkładu kalozy otaczającej tetradę mogą wreszcie pochodzić materiały wchodzące w skład egzyny [21, 25].

W niektórych rozwijających się mikrosporach, np. *Ipomaea purpurea*, wzorec egzyny jest widoczny już w ścianie kalozowej otaczającej rozwijające się mikrospory. Z tego też powodu Waterkeyn i Bienfait [133] sugerują, że kaloza pełni funkcję matrycy dla odwzorowywania egzyny pierwotnej, której z kolei ukształtowanie wyznacza specyficzną dla danego gatunku budowę egzyny. Kaloza otaczające komórki tetrad funkcjonowałyby więc na zasadzie odbicia lustrzanego [134]. Podobnie obecność kalozy bądź jej brak wokół komórek macierzystych pyłku *Eleocharis* wydaje się bardzo istotnym czynnikiem w tworzeniu wzorca dla egzyny [21], a brak kalozy w płaszczyźnie przegrody pierwotnej u *Styphelia* (*Epacridaceae*) wiązany jest z nieobecnością ektoegzyny pierwotnej w tym rejonie [39].

LITERATURA

- [1] ANGOLD R. E., The ontogeny and fine structure of the pollen grain *Endymion non-scriptus*, Rev. Paleobot. Palynol., **3**: 205–212, 1967.
- [2] ARSANTO J. P., COULON J., Application des méthodes cytochimique et radio - autographique de détection ultrastructurale des polysaccharides à l'étude de la différenciation des plateaux criblés du métaphloème caulinaire de deux Cucurbitacées voisines (*Ecballium elaterium* R. et *Cucurbita pepo* L.), C. R. Acad. Sci. Paris, **280**: 601–604, 1975.
- [3] BARSKAJA E. J., BALINA N. V., O roli kallozy w pylnikach rastienij, Fizjologia Rast., **18**: 716–721, 1971.
- [4] BARTNICKI - GARCIA S., Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi, Ann. Rev. Microbiol., **22**: 87–108, 1968.
- [5] BEER R., Studies in spore development, Ann. Bot., **25**: 199–214, 1911.
- [6] BIENFAIT A., WATERKEYN L., Sur la nature des parois sporocytaires chez les Mousses et chez quelques Ptéridophytes. Étude comparative, C. R. Acad. Sci. Paris, **282**: 2079–2081, 1976.
- [7] BONNER J., VARNER J. E., Plant Biochemistry, Academic Press, New York, 1965.
- [8] BONNETT H. T., NEWCOMB E. H., Coated vesicles and other cytoplasmic components of growing root hairs of radish, Protoplasma, **66**: 59–75, 1966.
- [9] BOWLES D. J., NORTHCOTE D. H., The sites of synthesis and transport of extracellular polysaccharides in the root tissues of maize, Biochem. J., **130**: 1133–1145, 1972.

- [10] BOUCK G. B., CRONSHAW J., The fine structure of differentiating sieve tube elements, *J. Cell Biol.*, **25**: 79-96, 1965.
- [11] CRAFTS A. S., CURRIER H. B., On sieve tube function, *Protoplasma*, **57**: 188-202, 1963.
- [12] CRONSHAW J., Tracheid differentiation in tobacco pith cultures, *Planta*, **72**: 78-90, 1967.
- [13] CRONSHAW J., BOUCK G. B., The fine structure of differentiating xylem elements, *J. Cell Biol.*, **24**: 415-431, 1965.
- [14] CURRIER H. B., Callose substance in plant cells, *Amer. J. Bot.*, **44**: 478-488, 1957.
- [15] CURRIER H. B., WEBSTER D. H., Callose formation and subsequent disappearance: studies with ultrasound stimulation, *Plant Physiol.*, **39**: 843-847, 1964.
- [16] DASHEK W. V., HARWOOD H. J., Proline, hydroxyproline and lily pollen tube elongation, *Ann. Bot.*, **38**: 947-953, 1974.
- [17] DASHEK W., V., HARWOOD H. J., ROSEN W. G., The significance of a wall-bound, hydroxyproline-containing glycopeptide in lily pollen tube elongation, [w] *Pollen development and physiology*, red. J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, 1973.
- [18] DAUWALDER M., WHALEY W. G., Patterns of incorporation of ^3H galactose by cells of *Zea mays* root tips, *J. Cell Sci.*, **14**: 11-27, 1974.
- [19] DE FOSSARD R. A., Development and histochemistry of the endothecium in anthers of in vitro grown *Chenopodium rubrum* L., *Bot. Gaz.*, **130**: 10-22, 1969.
- [20] DENIZOT J., Recherches sur les formations callosiques au cours de la sporogénèse de quelques *Marchantiales* et *Sphaerocarpaceae*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**: 2769-2772, 1971.
- [21] DUNBAR A., Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (*Cyperaceae*). I. Ultrastructure and ontogeny, *Bot. Notiser*, **126**: 197-254, 1973.
- [22] — Pollen ontogeny in some species of *Campanulaceae*. A study by electron microscopy, *Bot. Notiser*, **126**: 277-315, 1973.
- [23] ECHLIN P., GODWIN H., The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. II. Pollen grain development through the callose special wall stage, *J. Cell Sci.*, **3**: 175-186, 1968.
- [24] — The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. III. The formation of the pollen grain wall, *J. Cell Sci.*, **5**: 459-477, 1969.
- [25] ECHLIN P., The role of the tapetum during microsporogenesis of *Angiosperms*, [w] *Pollen development and physiology*, red. J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, 1973.
- [26] EISINGER W., RAY P. M., Function of Golgi apparatus in synthesis and transport of cell wall polysaccharides, *Plant Physiol.*, **49** (Suppl. 1) 2, 1972.
- [27] ENGLEMAN E. M., Sieve element of *Impatiens sultanii*. I. Wound reaction, *Ann. Bot.*, **29**: 83-101, 1965.
- [28] ESAU K., CHEADLE V. J., GILL R. H., Cytology of differentiating tracheary elements. I. Organelles and membrane systems, *Amer. J. Bot.*, **53**: 756-764, 1966.
- [29] ESCHRICH W., Untersuchungen über den Ab- und Aufbau der Callose (III. Mitteilung über Callose), *Z. Bot.*, **49**: 153-218, 1961.
- [30] — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pollen-Mutterzellen Callose (IV. Mitteilung über Callose), *Protoplasma*, **55**: 419-423, 1962.

- [31] — Beziehungen zwischen dem Auftreten der Callose und der Feinstruktur der primären Phloems bei *Cucurbita ficifolia*, *Planta*, **59**: 243–261, 1963.
- [32] — Physiologie der Siebröhrencallose, *Planta*, **65**: 280–300, 1965.
- [33] ESCHRICH W., CURRIER H. B., Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions, *Stain, Technol.*, **39**: 303–307, 1964.
- [34] EVERT R. F., DERR W. F., Callose substance in sieve elements, *Amer. J. Bot.*, **51**: 552–559, 1964.
- [35] EVERT R. F., MURMANIS L., Ultrastructure of the secondary phloem of *Tilia americana*, *Ibid.*, **52**: 95–106, 1965.
- [36] EVERT R. F., MURMANIS L., SACHS J. B., Another view of the ultrastructure of *Cucurbita phloem*, *Ann. Bot.*, **30**: 563–585, 1966.
- [37] FEINGOLD D. S., NEUFELD E. F., HASSID W. Z., Synthesis of a β -1,3-linked glucan by extracts of *Phaseolus aureus* seedlings, *J. Biol. Chem.*, **233**: 783–788, 1958.
- [38] FLOWERS H. M., BATRA K. K., KEMP J., HASSID W. Z., Biosynthesis of insoluble glucans from uridine diphosphate - D - glucose with enzyme preparations from *Phaseolus aureus* and *Lupinus albus*, *Plant Physiol.*, **43**: 1703–1709, 1968.
- [39] FORD J., Ultrastructural and chemical studies of pollen wall development in the *Epacridaceae*, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., London, 1971.
- [40] FOWKE L. C., PICKETT - HEAPS J. D., A cytochemical and autoradiographic investigation of cell wall deposition in fiber cells of *Marchantia berteroana*, *Protoplasma*, **74**: 19–32, 1972.
- [41] FREY - WYSSLING A., Die Pflanzliche Zellwand, Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1959.
- [42] FULCHER R. G., Mc CULLY M. E., SETTERFIELD G., SUTHERLAND J., β -1,3-glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis, *Can. J. Bot.*, **54**: 539–542, 1976.
- [43] GABARA B., Cytokinesis in pollen mother cells, I. *Tradescantia virginiana*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **36**: 359–365, 1967.
- [44] — Cytokinesis in pollen mother cells. II. *Magnolia soulangeana* Soul., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **162**: 450–458, 1971.
- [45] — Struktury Golgiego w świecie roślin, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 163–176, 1974.
- [46] — A possible role for the endoplasmic reticulum in exine formation, *Grana*, **14**: 16–22, 1974.
- [47] — Characterization of fibrous compound of Golgi vesicles in tapetal cells of *Delphinium*, *Protoplasma*, **86**: 159–168, 1975.
- [48] — Udział organelli komórkowych w tworzeniu ścian podczas mikrosporo-genezy, *Praca hab.*, *Acta Universitatis Lodz.*, 1976.
- [49] — Radioautographic visualization of incorporation of lipid precursors into anthers of *Muscari comosum* (L.) Mill., *Acta Soc. Bot. Pol.*, w druku.
- [50] GENEVÈS L., Apports de la microscopie électronique à l'étude de quelques aspects de la spermatogénèse chez *Ribes rubrum* (Grossulariacées). Ultrastructure du cytoplasme périphérique et élaboration des cloisons callosiques pendant la microsporo-génèse, *Rev. Cytol. Biol. Végét.*, **32**: 51–58, 1969.
- [51] — Elaboration des polysaccharides destinés à l'incorporer dans les parois, au cours de la méiose, dans les anthères du *Ribes rubrum* L. (Grossulariacées), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **277**: 169–172, 1973.
- [52] — Distribution des polysaccharides pariétaux, en relation avec l'évolution de diverses cytomembranes, dans les méiocytes staminaux du *Ribes rubrum*

- (Grossulariacées), et principalement, au cours du cloisonnement, *J. Microsc.* **19**: 65–88, 1974.
- [53] GÓRSKA - BRYLASS A., Cytomorfologiczne badania nad kalozą łagiewek pyłkowych, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**: 757–767, 1965.
- [54] — Transitory callose envelope surrounding the generative cell in pollen grains, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **36**: 419–422, 1967.
- [55] — Callose in the wall of the developing male gametophyte in *Gymnospermae*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **37**: 119–124, 1968.
- [56] — Callose in gametogenesis in liverwortes, *Bull. Acad. Polon.*, **17**: 549–554, 1969.
- [57] — The callose stage of the generative cells in pollen grains, *Grana*, **10**: 21–31, 1970.
- [58] GÓRSKA - BRYLASS A., SMOLIŃSKI M., Callose in the developing pericyclic and phloem fibres, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **35**: 301–305, 1966.
- [59] HERTH W., FRANKE W. W., BRITTIGER H., KUPPEL A., KEILICH G., Alkali - resistant fibrils of β - 1,3 - and β - 1,4 - glucans: structural polysaccharides in the pollen tube wall of *Lilium longiflorum*, *Cytobiologie*, **9**: 344–367, 1974.
- [60] HESLOP - HARRISON J., Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development, [w] *Pollen physiology and fertilization*, red. H. F. Linskens, Amsterdam, 1964.
- [61] — Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants, *Endeavour*, **25**: 65–72, 1966.
- [62] — Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes, *Ann. Bot.*, **30**: 221–230, 1966.
- [63] HESLOP - HARRISON J., MACKENZIE A., Autoradiography of soluble (2 - ^{14}C) thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium anthers*, *J. Cell Sci.*, **2**: 387–400, 1967.
- [64] HORNER H. T., LERSTEN N. R., BOWEN C. C., Spore development in the liverwort *Riccardia pinguis*, *Amer. J. Bot.*, **53**: 1048–1064, 1966.
- [65] JALOUZOT M. F., Aspects ultrastructuraux de la mégasporogénèse d'*Oenothera Lamarckiana* an rapport avec les dépôts callosiques observés, *Ann. Univ. et ARERS*, **9**: 36–45, 1971.
- [66] JENSEN W. A., *Botanical histochemistry*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1962.
- [67] JONES D. D., MORRÉ D. J., Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. III. Control by exogenous sugars, *Physiol. Plant.*, **29**: 68–75, 1973.
- [68] KESSLER G., Zur Charakterisierung der Siebröhrenkallose, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **68**: 5–43, 1958.
- [69] KESSLER G., FEINGOLD D. S., HASSID W. Z., Utilization of exogenous sugars for biosynthesis of carbohydrates in germinating pollen, *Plant. Physiol.*, **35**: 505–509, 1960.
- [70] KURAN H., Lokalizacja kalozy w ścianach megasporocytów i megaspor podczas rozwoju monosporowych woreczków zalążkowych, *Praca doktorska*, UŁ, 1971.
- [71] — Callose localization in the walls of megasporocytes and megaspores in the course of development of monospore embryo sacs, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **41**: 519–534, 1972.

- [72] LEFFINGELL T. P., Electron microscope studies of the incorporation of ^3H glucose during differentiation and division, *J. Cell Biol.*, **39**: 79a, 1968.
- [73] LERCH G., Kallose in der Epidermis höherer Pflanzen, *Flora*, **154**: 36–52, 1964.
- [74] LERCH G., Über Struktur und Bildung der Zystolithen-Kallose, *Biol. Plant.*, **6**: 48–56, 1964.
- [75] LINSKENS H. F., Pollen physiology, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **15**: 255–270, 1964.
- [76] LONGLY B. G., WATERKEYN L., Les étapes callosiques de la plaque cellulaire dans la mitose somatique chez *Hyacinthus orientalis* L., *C. R. Acad. Sci. Paris*, **283**: 761–763, 1976.
- [77] MAHADEVAN P. R., TATUM E. L., Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*, *J. Cell Biol.*, **35**: 295–302, 1967.
- [78] MANGIN L., Observation sur le développement du pollen, *Bull. Soc. Bot. France*, **36**: 386–393, 1889.
- [79] MARECHAL L. R., GOLDEMBERG S. H., Uridine diphosphate glucose β - 1,3 - glucan β - 3 - glucosyltransferase from *Euglena gracilis*, *J. Biol. Chem.*, **239**: 3163–3167, 1964.
- [80] MARTENS P., WATERKEYN L., Structure du pollen „aile” chez les conifères, *Cellule*, **62**: 173–222, 1962.
- [81] Mc NAIRN R. B., CURRIER H. B., Translocation blockage by sieve tube callose, *Planta*, **82**: 369–380, 1968.
- [82] MEPHAM R. H., LANE G. R., Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*, *Protoplasma*, **68**: 175–192, 1969.
- [83] — Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*, *Protoplasma*, **70**: 1–20, 1970.
- [84] MŁODZIANOWSKI F., SZWEYKOWSKA A., Histogenesis in the tissue culture of carrot (*Daucus carota* L.). III. Distribution of callose, *Bull. Soc. Amis. Sc. Lettr., Poznań*, **7**: 1–14, 1966.
- [85] MOLLENHAUER H. H., MORRÉ D. J., Golgi apparatus and plant secretion, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **17**: 27–46, 1966.
- [86] MÜHL DORF A., Über die Vorgänge der Bildung und Auflösung der Wände bei den Pollentetraden angiospermer Pflanzen, *Beih. Bot. Zbl.*, **60**: 557–640, 1941.
- [87] MÜHLETHALER K., Ultrastructure and formation of plant cell walls, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **18**: 1–24, 1967.
- [88] NAKANISHI I., KIMURA K., SUSUI S., YAMAZAKI E., Complex formation of gel-forming bacterial (1–3) β - D - Glucans (curdlantype polysaccharides) with dyes in aqueous solution, *Carbohydr. Res.*, **32**: 47–52, 1974.
- [89] NÄGELI C. W., Über die Siebröhen von Cucurbita, *Sitzber. Bayerisch. Akad. Wiss.*, **1**: 212–238, 1861.
- [90] NORTHCOTE D. H., Fine structure of cytoplasm in relation to synthesis and secretion in plant cells, *Proc. Roy. Soc. B.*, **173**: 21–30, 1969.
- [91] — The Golgi apparatus, *Endeavour*, **30**: 26–33, 1971.
- [92] NORTHCOTE D. H., PICKETT - HEAPS J. D., A function of the Golgi — apparatus in polysaccharide synthesis and transport in the root-cap cells of wheat, *Biochem. J.*, **98**: 159–167, 1966.
- [93] NORTHCOTE D. H., WOODING F. B. P., Development of sieve tubes in *Acer pseudoplatanus*, *Proc. Roy. Soc., B*, **163**: 524–537, 1965.
- [94] OLSZEWSKA M. J., GABARA B., Recherches cytoenzymatiques et auto-

- radiographiques sur les poils absorbants en croissance, *Protoplasma*, **64**: 381–399, 1967.
- [95] OLSZEWSKA M. J., GODLEWSKI M., A cytochemical study of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L., *Folia Histochem., Cytochem.*, **11**: 9–20, 1973.
- [96] PETERSON M. R., LEBLOND C. P., Uptake by the Golgi region of glucose labeled with tritium in the 1 or 6 position, as an indicator of synthesis of complex carbohydrates, *Exp. Cell Res.*, **34**: 420–423, 1964.
- [97] PETERSON R. L., FIRMINER M. S., DOBRINDT L. A., Nature of the guard cell wall in leaf stomata of three *Ophioglossum* species, *Can. J. Bot.*, **53**: 1698–1711, 1975.
- [98] RAY P. M., SHININGER T. L., RAY M. M., Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**: 605–612, 1969.
- [99] REYNOLDS J. D., DASHEK W. V., Cytochemical analysis of callose localization in *Lilium longiflorum* pollen tubes, *Ann. Bot.*, **40**: 409–416, 1976.
- [100] RODKIEWICZ B., Walls with callose in the megaspores and hypostase of ovules of *Antirrhinum majus* observed in a fluorescence microscope, *Bull. Acad. Polon.*, **15**: 493–495, 1967.
- [101] — Differences in the distribution pattern of callose in cell walls during megasporogenesis in some species of flowering plants, *Bull. Acad. Polon.*, **16**: 663–665, 1968.
- [102] — Callose isolation in megasporogenesis in some flowering plants, *Bull. Soc. Lettr. Łódź*, **19**: 1–10, 1968.
- [103] — Callose in cell walls during megasporogenesis in *Angiosperms*, *Planta*, **93**: 39–47, 1970.
- [104] — Callose walls in megaspores in *Fuchsia* and *Epilobium*, *Caryologia*, **25**: 59–66, 1973.
- [105] RODKIEWICZ B., GÓRSKA - BRYLASS A., Occurrence of callose in the walls of meiotically dividing cell in the ovule of *Orchis*, *Naturwiss.*, **54**: 499, 1967.
- [106] RODKIEWICZ B., KURAN H., The specificity of callose distribution in cell walls during megasporogenesis in *Onagraceae*, *Caryophyllaceae* and *Scrophulariaceae*, *Ann. Univer. et ARERS*, **9**: 31–35, 1971.
- [107] ROLAND J. C., The relationship between the plasmalemma and plant cell wall, *Intern. Rev. Cyt.*, **36**: 45–92, 1973.
- [108] ROSEN W. G., Ultrastructure and physiology of pollen, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **19**: 435–462, 1968.
- [109] SALMON J., Differentiation des tubes criblés chez les angiospermes. Recherches cytologiques, *Rev. Cytol. Cytophysiol. Veg.*, **9**: 55–168, 1974.
- [110] SAUTER J. J., MARQUARDT H., Cytochemical investigations on cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity in pollen tetrads, *Z. Pflanzenphysiol.*, **63**: 15–18, 1970.
- [111] SCHWAB C. A., Callose in megasporogenesis of *Diarrhena* (*Gramineae*), *Can. J. Bot.*, **49**: 1523–1524, 1971.
- [112] SIEVERS A., Beteiligung des Golgi - Apparatus bei der Bildung der Zellwand vom Wurzelhaaren, *Protoplasma*, **56**: 188–192, 1963.
- [113] DE SLOOVER J. L., Études sur les *Cycadales*. I. Méiose et mégasporogénèse chez *Encephalartos poggei*, *Cellule*, **62**: 105–116, 1961.
- [114] SOUTHWORTH D., Cytochemical reactivity of pollen walls, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 73–80, 1973.

- [115] — Incorporation of radioactive precursors into developing pollen walls, [w] Pollen development and physiology, red. J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, 1973.
- [116] SOUTHWORTH D., DICKINSON D. B., β -1,3-glucan synthase from *Lilium longiflorum* pollen, *Plant Physiol.*, **56**: 83–87, 1975.
- [117] STANLEY R. G., Pollen chemistry and tube growth, [w] Pollen development and physiology, red. J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, 1973.
- [118] STANLEY R. G., LINSKENS H. F., Pollen: biology, biochemistry management, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974.
- [119] STIEGLITZ H., STERN H., Regulation of β -1,3-glucanase activity in developing anthers of *Lilium*, *Dev. Biol.*, **134**: 169–173, 1973.
- [120] THALER I., WEBER F., Kallosehülle um Kalziumoxalat-Drüsen, *Phyton*, **7**: 8, 1957.
- [121] TUPÝ J., Callose formation in pollen tubes and incompatibility, *Biol. Plant.*, **1**: 192–198, 1959.
- [122] VAN der WOUDE W. J., LEMBI C. A., MORRÉ D. J., KINDINGER J. I., ORDIN L., β -glucan synthetases of plasma membrane and Golgi apparatus from onion stem, *Plant Physiol.*, **54**: 333–340, 1974.
- [123] VILLEMEZ C. L., McNAB J. M., ALBERSHEIM P., Formation of plant cell wall polysaccharides, *Nature*, **218**: 878–880, 1968.
- [124] WANG M. C., BARTNICKI-GARCIA S., Synthesis of β -1,3-glucan microfibrils by a cell-free extract from *Phytophthora cinnamomi*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**: 351–354, 1976.
- [125] WATERKEYN L., Étude des dépôts de callose au niveau des parois sporocytaires, au moyen de la microscopie de fluorescence, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **252**: 4025–4027, 1961.
- [126] — Les parois microsporocytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*, *Cellule*, **62**: 225–255, 1962.
- [127] — Anisotropie optique et structure des dépôts membranaires callosiques, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **259**: 2498–2501, 1964.
- [128] — Callose microsporocytaire et callose pollinique, [w] Pollen physiology and fertilization, red. H. P. Linskens, Amsterdam, 1964.
- [129] — Sur l'existence d'un „stade callosique”, présenté par la paroi cellulaire, au cours de la cytokinèse, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **265**: 1792–1794, 1967.
- [130] WATERKEYN L., BIENFAIT A., Production et dégradation de callose membranaire dans les stomates en formation chez quelques Fougères, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**: 251–254, 1966.
- [131] — Les émergences callosiques et silicifiées dans les feuilles de Sélaginelles, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **264**: 1608–1611, 1967.
- [132] — La paroi spéciale callosique et les premiers dépôts de l'exine chez *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *C. R. Acad. Sci. Paris*, **267**: 56–58, 1968.
- [133] — On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *Grana*, **10**: 13–20, 1970.
- [134] — Morphologie et nature des parois sporocytaires chez les Ptéridophytes, *Cellule*, **69**: 7–23, 1971.
- [135] — Sur une localisation particulière de la callose dans la paroi microsporocytaire et l'endospore mégasporale des Sélaginelles, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **274**: 2489–2491, 1972.
- [136] WILLEMSE M. T. M., Morphological and fluorescence microscopical investiga-

- tion on sporopollenin formation in *Pinus silvestris* and *Gasteria verrucosa*, [w] Sporopollenin, red. J. Brooks i wsp., London, 1971.
- [137] WOODING F. B. P., The development of the sieve elements of *Pinus pinea*, *Planta*, **69**: 230–243, 1966.
- [138] WOODING F. B. P., Fine structure and development of phloem sieve tube content, *Protoplasma*, **64**: 315–324, 1967.
- [139] ZIMMERMANN M. H., Transport in the phloem, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**: 167–190, 1960.

Otrzymano: 7 lutego 1977.

Przyjęto: 20 lutego 1977.

Adres autorki: ul. Banacha 12/16, 90 - 227 Łódź.

OBUMIERANIE KOMÓREK W CZASIE ROZWOJU ZARODKOWEGO

Zofia BIELAŃSKA - OSUCHOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Fizjologii Zwierząt,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Streszczenie. Śmierć komórek jest zjawiskiem fizjologicznym w czasie rozwoju zarodkowego kręgowców, stanowi jeden z mechanizmów rozwojowych. W artykule omówiono lokalizację degeneracji komórek w czasie embiogenezy i organogenezy. Charakter cytologiczny degeneracji komórek, jak się wydaje, jest jednakowy niezależnie od miejsca i czasu przebiegu tego procesu. Obumarłe komórki są usuwane przez sąsiednie — zdrowe na drodze fagocytozy. Przyczyny degeneracji komórek są różnorodne i niedokładnie jeszcze wyjaśnione. Czynniki teratogenne powodują również procesy degeneracyjne, które nakładają się często na fizjologiczne obszary nekrotyczne.

WSTĘP

Śmierć komórek jest jednym z mechanizmów zapewniających normalny przebieg rozwoju zarodkowego. Na pierwszy rzut oka stwierdzenie takie może wydać się absurdalne, gdyż normalnie rozwój zarodkowy kojarzy się z mnożeniem się komórek, z przechodzeniem od jednokomórkowej zygoty do postaci złożonej z wielu milionów komórek. Gdzie więc miejsce na śmierć komórek? Po chwili namysłu jednak każdy przypomni sobie, że w rozwoju owadów przy przeobrażeniu całkowitym obumierają wszystkie komórki narządów larwalnych, a zostają tylko tarcze imaginalne, z których rozwija się imago — ostateczna forma owada, że kijanka płazów bezogonowych w czasie metamorfozy traci ogon i skrzela na skutek degeneracji i śmierci komórek, że u ssaków i człowieka zanika na skutek śmierci komórek przewód żeński (kanał Müllera) i przewód pranercza (kanał Wolffa), zależnie od płci genetycznej, że degeneruje pranercze. Śmierć komórek jest jednak zjawiskiem znacznie szerszym niż te kilka przytoczonych przykładów. Zwrócili na nie uwagę Ernst w 1926 r. [19] i Fell w 1925 i 1939 r. [22, 23], lecz prace te długo pozostawały nie-

docenione i jakby nie zauważone. Dopiero Glücksmann w 1951 r. [27] w szerokim monograficznym opracowaniu podkreślił powszechność degeneracji i śmierci komórek w trakcie rozwoju zarodkowego. Od tego czasu w wielu pracowniach zainteresowano się zagadnieniem śmierci komórek jako jednym z mechanizmów rozwoju ontogenetycznego.

Pierwsze prace wiązały śmierć komórek zarodkowych z procesami patologicznymi, stąd — zwłaszcza w literaturze anglosaskiej i niemieckiej — nomenklatura, jakiej się używa dla określenia tego zjawiska, została zaczerpnięta z patologii. Jako synonimy stosowane są: śmierć komórek, degeneracja, nekroza, destrukcja, dezintegracja. Wprowadzono także termin „nekrobioza” dla odróżnienia śmierci komórek jako procesu fizjologicznego [73] od nekrozy — patologicznej śmierci komórek.

Z wielu badań wynika, że zagadnienie fizjologicznej śmierci komórek w czasie embriogenezy jest ważne nie tylko ze względu na poznanie i zrozumienie mechanizmów rozwojowych, ale także z punktu widzenia teratologii. Chciałabym przedstawić pewne problemy, które wyłoniły się przy badaniu tego zagadnienia w rozwoju zarodkowym kręgowców.

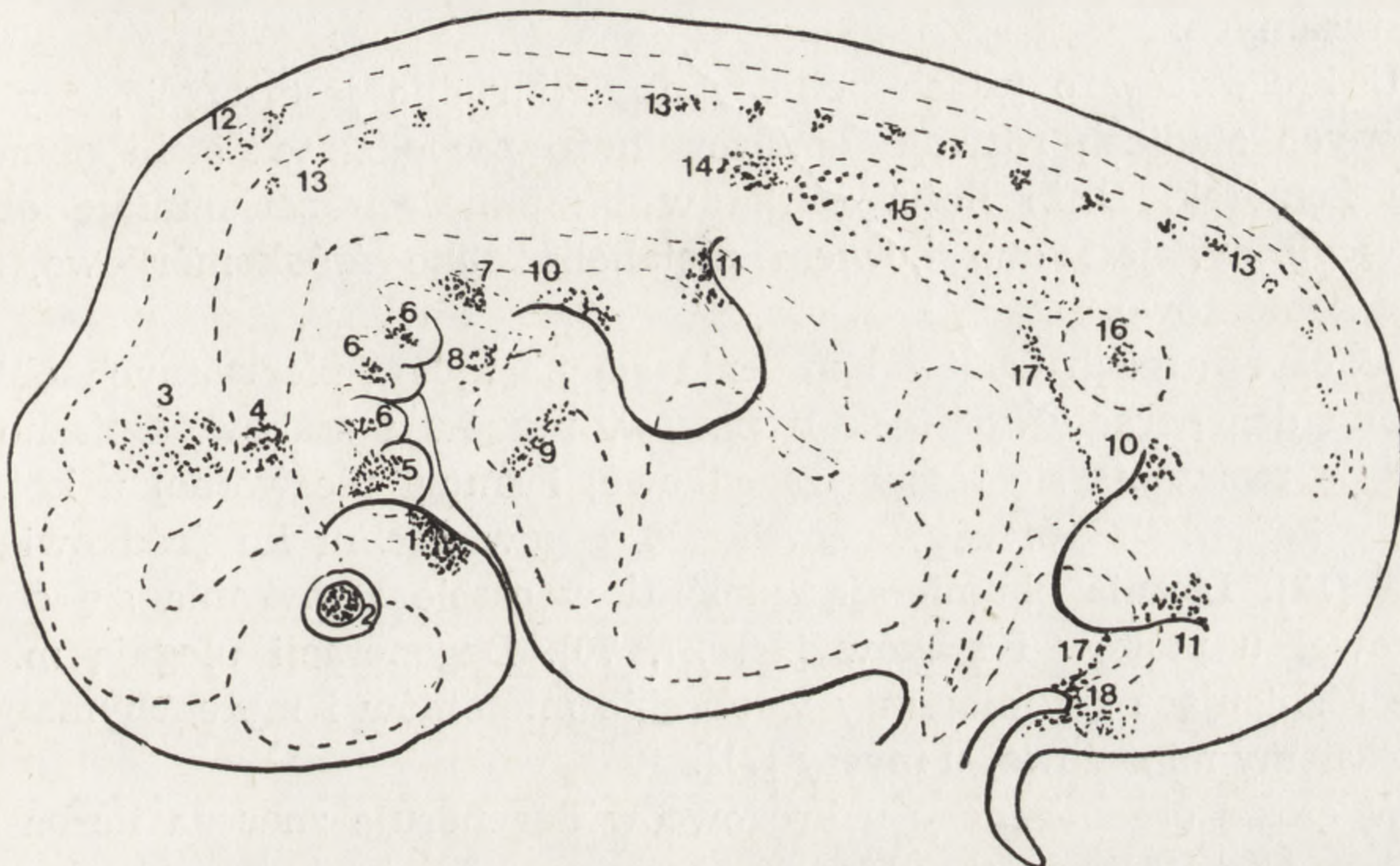
I. LOKALIZACJA OBSZARÓW ŚMIERCI KOMÓREK W CZASIE ROZWOJU ZARODKOWEGO KRĘGOWCÓW

W czasie rozwoju zarodkowego śmierć komórek zachodzi stale w pewnych określonych fazach rozwojowych w z góry zdeterminowanych obszarach, w dającej się przewidzieć kolejności. Niekiedy przebiega ona tak szybko, że może zostać nie zauważona i przeoczona. Glücksmann [27] podaje zestawienie obszarów nekrotycznych występujących w ciągu rozwoju embrionalnego kręgowców. Schematycznie przedstawiono to na rys. 1 u zarodka ssaka w stadium zaawansowanej organogenezy.

Inwentaryzacją obszarów nekrotycznych u zarodków człowieka wielkości 3–30 mm CR (długości ciemieniowo pośladkowej) zajął się Iliès [38, 40–42]. Stwierdził on, że można wyróżnić: 1. stałe obszary nekrotyczne, które lokalizują się w zawiązkach tych samych narządów, wspólne nieraz dla wszystkich kręgowców, występujące w homologicznych obszarach embriogenezy oraz 2. niestałe obszary nekrotyczne u niektórych tylko zarodków, o różnym zasięgu i intensywności obumierania komórek. Stałe obszary nekrotyczne związane są z procesami podlegającymi kontroli morfogenetycznej, histogenetycznej i filogenetycznej, podczas gdy obszary niestałe są determinowane przez zmienność rytmu rozwoju zarodka. Na ogół śmierć komórek występuje w obszarach o aktywnym wzroście i intensywnej proliferacji komórek.

W ostatnich latach zajęto się szczególnie niektórymi obszarami nekrotycznymi ze względu na ich pojawianie się w bardzo wczesnych eta-

pach embriogenezy, na znaczenie dla powstawania anomalii rozwojowych oraz na możliwość eksperymentowania i wyjaśnienia przyczyn przebiegu i znaczenia omawianego procesu. Wydaje się więc celowe krótkie scharakteryzowanie lokalizacji pewnych obszarów nekrotycznych.



Rys. 1. Schemat rozmieszczenia obszarów nekrotycznych u zarodka ssaka w stadium zaawansowanej organogenezy.

1 — bruzda węchowa i błona gardłowa, 2 — soczewka i siatkówka oka, 3 — IV komora mózgu, 4 — pęcherzyk słuchowy, 5 — zawiązek żuchwy, 6 — mezenchyma łuków skrzelowych, 7 — zawiązek tchawicy i płuc, 8 — rozdwojenie aorty, 9 — serce, 10 — przednia część zawiązka odnóży, 11 — tylna część zawiązka odnóży, 12 — rdzeń przedłużony i rdzeń kręgowy, 13 — segmentalne sklerotomy, myotomy, w dalszym rozwoju zwoje rdzeniowe, 14 — przednercze, 15 — pranercze, 16 — nerka ostateczna, 17 — przewód płciowy, 18 — błona stekowa i mezenchyma ogonowa

Śmierć komórek obserwowano w bardzo wczesnych stadiach rozwoju ssaków. Opisano ją w czasie bruzdkowania w moruli i blastuli szczura [16, 53], myszy [15, 26, 74] i nietoperza *Pipistrelus* [63]. Procesy śmierci i rozpadu komórek w tak wczesnych stadiach rozwoju udało się wykryć dopiero za pomocą mikroskopu elektronowego. U szczura w moruli obumierają i rozpadają się pojedyncze blastomery. Równocześnie w niektórych innych blastomerach, zwłaszcza środkowych, podobnie jak u myszy, eliminowana jest część cytoplazmy na drodze autofagii, dzięki czemu tworzy się jama blastocysty. W jamie blastocysty obserwuje się resztki organelli komórkowych [26, 53]. W blastocystyce degenerują zarówno komórki w węźle zarodkowym, jak i w trofoblaście. El - Shershaby i Hinchliffe [15] podają, że w blastocystyce myszy otoczonej jeszcze osłonką przejrzystą, złożonej z 64 komórek, degeneruje z nich równocześnie 6-8. Rozpadłe komórki są fagocytowane przez sąsiadujące z nimi

zdrowe, żywotne. W tych widoczne są wakuole zawierające resztki komórkowe oraz ciała resztkowe. Nie wiadomo, czy degeneracja komórek zachodzi również w czasie implantacji zarodka ssaka. Degeneracja komórek nabłonka macicy oraz fagocytoza w komórkach trofoblastu nie pozwalają na jednoznaczną interpretację obrazów histologicznych i ultrastrukturalnych.

U kręgowców o jajach polilecytalnych trudno jest ustalić, czy we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego zachodzi też stałe obumieranie komórek. Duże ilości żółtka w blastomerach zaciemniają obraz morfologiczny, jest ono bowiem metabolizowane śródkomórkowo, jak i poza komórkowo.

W okresie gastrulacji i tworzenia się narządów pierwotnych obserwowano degenerację komórek u płazów, ptaków i ssaków. Opisano je w czasie tworzenia się tarczki zarodkowej i smugi pierwotnej u królika między komórkami przesuwanymi się z powierzchni ku środkowi zarodka [13]. Licznie obumierają komórki w czasie zamykania się cewki nerwowej u ptaków i ssaków [24, 27, 70]. Degeneracji ulegają m. in. także różnicujące się mioblasty w obrębie miotomów i mezenchymatycznej blastemy mięśniowej u myszy [71].

W czasie organogenezy u kręgowców degeneruje znaczna liczba komórek w rozwijającym się układzie nerwowym, np. w pęcherzykach mózgowych, w różnych ośrodkach pnia mózgu i rdzenia kręgowego, w zwojach rdzeniowych, w plakodach nerwowych [1, 24, 27, 28, 30, 36, 38, 40, 41, 50, 60].

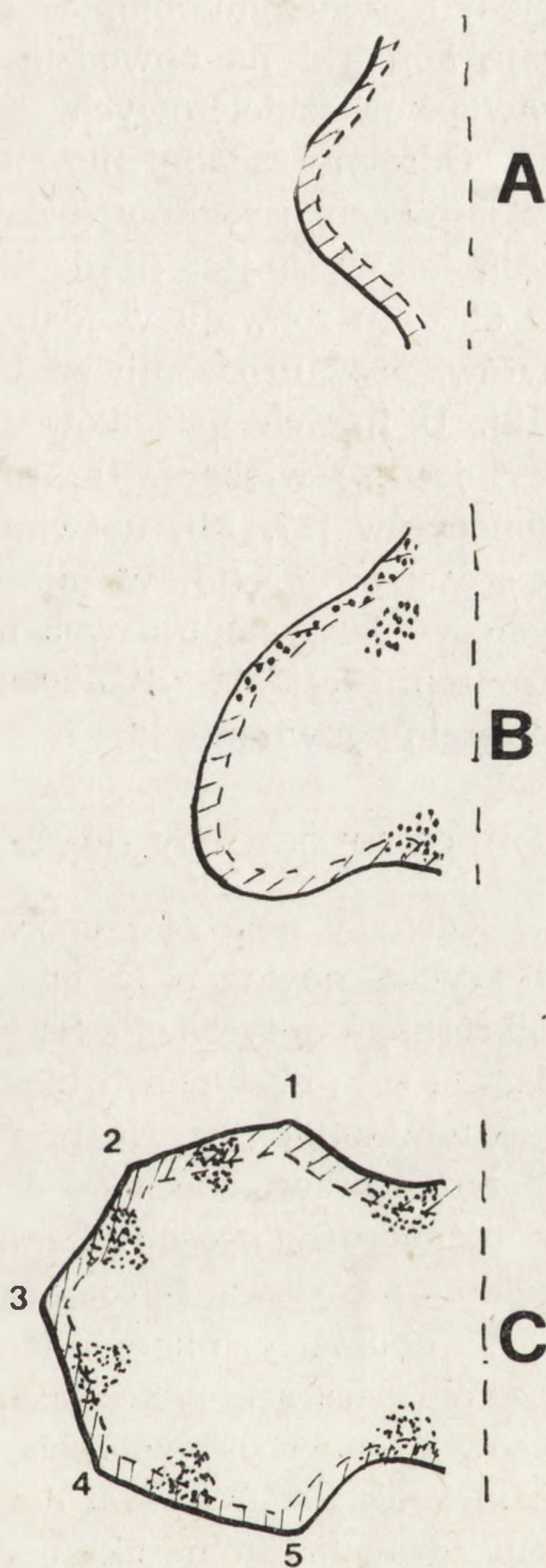
Śmierć komórek w rozwoju układu nerwowego przebiega szybko i jest bardzo częsta. U żab (*Xenopus*) umiera w rdzeniu kręgowym i zwojach rdzeniowych 9 na 10 neuronów przed uzyskaniem pełnej metamorfozy. U zarodka kury w śródmózgowiu degeneruje około 50–70% neuronów [1]. Alley [1] obliczył, że w jądrze pasma śródmózgowego nerwu trójdzielnego u chomika liczba neuronów w 13 dniu rozwoju wynosi 3000, po czym następuje gwałtowne zmniejszanie się ich ilości, która przy urodzeniu wynosi około 1750, tj. tyle, co u osobnika dorosłego. Najwięcej neuronów degeneruje w czasie rozwoju płazów, mniej w rozwoju ptaków, a najmniej w rozwoju ssaków. Jest to być może adaptacja związana z większym rozwojem mózgowia.

Zagadnieniem śmierci komórek w rozwoju serca zajęło się wielu badaczy. U zarodków kury pierwsze objawy śmierci komórek obserwuje się w czasie łączenia się parzystych zawiązków cewek sercowych (stadium 9–11, według Hamburgera i Hamiltona), tj. kiedy wytwarza się niepełna przegroda. Degenerują zarówno komórki zawiązka wsierdza, jak i mięśnia sercowego [49, 61]. W dalszym rozwoju serca kury, degeneracja komórek zachodzi w wielu miejscach. Pexieder [63, 64] obliczył,

że między 2 a 8 dniem inkubacji występuje 31 obszarów nekrotycznych różnej wielkości, o różnej lokalizacji i o różnym czasie występowania. W wielu obszarach nekrotycznych nasilenie degeneracji jest tak duże, że równocześnie umiera 30–100% komórek. Najliczniej degenerują komórki w 4 dniu inkubacji, kiedy obszary nekrotyczne zlokalizowane są w poduszeczkach opuszki serca. Najwięcej natomiast obszarów nekrotycznych obserwowano w sercu w 6 dniu inkubacji. Od 10 dnia inkubacji liczba ognisk degeneracyjnych i liczba umierających komórek znacznie się zmniejsza. Podobną lokalizację obszarów nekrotycznych obserwowano w czasie rozwoju serca zarodków ssaków. Śmierć komórek w ścianie opuszki serca występuje u zarodków szczurów w 14–16 dniach rozwoju [64]. U zarodków człowieka wielkość 3–30 mm CR śmierć komórek obserwowano w nasierdziu, w niektórych przegrodach serca, w ścianie aorty i tętnicy płucnej [38, 40].

W trakcie rozwoju odnoży u ptaków i ssaków pojawiają się stałe ogniska ne-

Rys. 2. Schemat rozmieszczenia obszarów nekrotycznych we wczesnych stadiach rozwoju zawiązka odnoża ssaka



krotyczne [14, 55–58, 68, 76]. Pierwsze obszary nekrotyczne obserwuje się w stadium pączka odnoża, złożonego z mezenchymy i ektodermalnej czapeczki szczytowej, przy podstawie pączka po przedniej i tylnej stronie (rys. 2). Rozszerzają się one stopniowo i obejmują około 4/5 czapeczki szczytowej. W czasie tworzenia się płytki dłoni i stopy zanika obszar nekrotyczny po tylnej stronie zawiązka. Na początku okresu różnicowania się palców pojawiają się nowe ogniska nekrotyczne w ektodermie i mezenchymie między zawiązkami palców. U myszy i szczura są one bardzo wyraźne przed zawiązkiem 1 palca, między palcem 1 a 2 oraz między palcem 4 a 5 [54, 58, 71]. Następne ogniska degeneracji pojawiają się już w związku z tworzeniem się elementów szkieletowych,

kiedy mezenchyma błoniasta tworzy przedchrzęstne zagęszczenia. Obumierają komórki na obwodzie zagęszczeń oraz na proksymalnych końcach zawiązków szkieletowych.

Odrębne zagadnienie stanowi masowa degeneracja oogonii i oocytów w jajnikach zarodków ssaków i człowieka. Pewne dane liczbowe wskazują jak duże jest nasilenie tego procesu. U zarodków świni domowej w 50 dniu rozwoju w jednym jajniku znajduje się około 1100000 gonocytów, przy urodzeniu znaleziono zaledwie ich połowę, tj. około 500000 [12]. U innych gatunków ssaków intensywność degeneracji gonocytów jest jeszcze większa. U krów przed urodzeniem degeneruje około 95% gonocytów [17, 18], u świnki morskiej [43] i u makaka [3] około 87%, u szczura 70% [6]. W jajniku zarodkowym człowieka największa liczba gonocytów występuje w 5 miesiącu rozwoju, dochodzi do 6800000. Przy urodzeniu jest już tylko 2000000, z czego połowa degeneruje jeszcze przed okresem pokwitania [2].

II. CYTOLOGICZNY OBRAZ OBUMIERANIA KOMÓREK ZARODKOWYCH

Obszary nekrotyczne zwłaszcza rozleglejsze są stosunkowo łatwe do wykrycia, nawet przy obserwacji zarodka pod małym powiększeniem mikroskopu optycznego. Są one bowiem mętne, nieprzezroczyste i ciemne. Barwią się przyżyciowo błękitem siarczanu Nilu, czerwienią obojętną lub błękitem toluidyny. Na preparatach histologicznych widoczne są w tych obszarach tzw. ziarenka degeneracyjne lub nekrosferule barwiące się w różnorodny sposób: hematoksyliną, orangem G, błękitem toluidyny, zielenią metylową, pyroniną lub metodą Feulgena [8, 27, 55]. Są to różne formy obumarłych komórek.

W obszarach nekrotycznych, zależnie od stanu zaawansowania procesów degeneracyjnych, obserwuje się zarówno komórki zdrowe i normalne, jak i z objawami degeneracji. W miarę nasilenia się procesu procent zdrowych komórek znacznie się zmniejsza, a degenerujące wykazują różne fazy obumierania. Następnie pojawiają się komórki, które aktywnie fagocytują resztki obumarłych lub całe degenerujące.

Glücksman [27] opisując morfologiczne przejawy śmierci komórek zarodkowych stwierdził, że drogi jakimi ten proces przebiega są różne zależnie od specjalizacji komórek i czynników jakie tę degenerację powodują. Późniejsze obserwacje cytologiczne, cytochemiczne i ultrastrukturalne wskazują jednak, że śmierć komórek w różnych ogniskach nekrotycznych zarodków kręgowców zachodzi w sposób podobny, a może nawet i jednakowy. Kristić i Pexieder [47] uważają, że na poziomie ultrastrukturalnym obraz morfologiczny śmierci komórek jest jednolity. Dokładne prześledzenie jednak morfologicznych zmian w czasie tego procesu jest

bardzo trudne, gdyż śmierć komórki następuje bardzo szybko. Ponadto, jak prawie zawsze na podstawie samych obrazów uzyskanych w mikroskopie optycznym czy elektronowym trudno jest ustalić rzeczywistą kolejność zmian zachodzących w komórce.

W obumierającej komórce pierwsze zmiany widoczne są w jądrze komórkowym. Chromatyna staje się coraz bardziej zagęszczona i zbita, często obserwuje się jej zagęszczenie obwodowe przy błonach jądrowych lub w formie dużego półksiężyca (rys. 3, 5). Prowadzi to następnie do całkowitej pyknozy i obkurczenia się jądra. Obserwuje się też zmiany w błonie jądrowej lub całkowity jej rozpad połączony z fragmentacją pyknotycznej chromatyny. Powstają wtedy kuleczki, zawierające DNA, nazwane przez niektórych wspomnianymi nekrosferulami [40]. Są one nieraz widoczne w przestrzeniach między komórkami. U zarodków człowieka Ilies [40] obserwował złogi glikogenu w jądrach obumierających komórek.

Równocześnie z zaawansowanymi zmianami w jądrze komórkowym obserwuje się zmiany kształtu obumierających komórek. Tracą one połączenia i kontakty z sąsiednimi komórkami i zaokrąglają się. Cytoplazma ulega zagęszczeniu prawdopodobnie na skutek odwodnienia. Zagęszczenie cytoplazmy pociąga za sobą zbliżenie się do siebie wolnych rybosomów [70]. Niekiedy rybosomy są tak gęsto skupione, że tworzą rodzaj kryształów [7, 60, 61], jak np. w obszarach nekrotycznych odnóża kurczęcia [59] i szczura [71]. W innych komórkach, jak w obszarach nekrotycznych w błonie międzypalcowej kurczęcia, Litvac i Litvac [48] nie zauważyli zmian w rybosomach, natomiast jako pierwszy objaw degeneracji komórek opisali wakuolizację mitochondriów. W szeregu innych komórek obserwowano też wakuolizację mitochondriów [7].

Cytoplazma podstawowa obumierających komórek nie zawsze ulega zagęszczeniu, w wielu miejscach staje się bardzo jasna, przepuszczalna dla elektronów. Błona komórkowa zanika, a organelle komórkowe rozsypują się. Takie obrazy obserwuje się m. in. przy degeneracji komórek w czasie tworzenia się cewki sercowej u kurczęcia [61] i przy degeneracji oogonii i oocytów w jajniku zarodków [49] (Bielańska - Osuchowska nie publikowane) (rys. 6, 8). Na podstawie tych danych wydaje się, że degeneracja komórki wiąże się ze zmianami w przepuszczalności błony komórkowej dla wody lub elektrolitów lub ze zmianami ciśnienia osmotycznego w komórce.

W wielu komórkach zachodzi lokalna degradacja ogniskowa cytoplazmy (autofagia), co przejawia się powstawaniem obszarów o różnej wielkości (0,2–2 μm), w których zamknięte są mitochondria, krótkie odcinki siateczki śródplazmatycznej, ciała myelinowe i osmiofilne [46, 47, 49].

Pewne obserwacje wskazują, że przynajmniej w niektórych obszarach nekrotycznych degeneracja komórek odbywa się bez udziału lizosomów, np. w obszarach nekrotycznych błony międzypalcowej kurczęcia [48], w oogoniach i oocytach zarodkowych [29], (Bielańska - Osuchowska nie publikowane). Wiążą się z tym badania cytochemiczne nad fosfatazą kwaśną, uważaną za wyznacznik lizosomów. Nie uzyskano jednak jednoznacznych wyników. Ballard i Holt [5] badając metodami histochemicznymi obszary nekrotyczne w rozwijającym się odnózu tylnym zarodka szczura stwierdzili, że obumierające komórki wykazują taką samą aktywność fosfatazy kwaśnej i niespecyficznego esterazy, jak sąsiadujące z nimi zdrowe komórki. Forsberg i Olivecrona [25] opisali natomiast zwiększenie się aktywności fosfatazy kwaśnej w degenerujących komórkach w czasie tworzenia się światła pochwy u szczura i myszy. Wydaje się jednak na podstawie szeregu innych obserwacji [9-11], że degeneracja i obumieranie komórek zarodkowych nie są związane ze zwiększaniem się aktywności tego enzymu, co zgodne jest z obserwacjami w mikroskopie elektronowym. Wysoką jego aktywność można natomiast wykazać w komórkach fagocytujących i makrofagach obszarów nekrotycznych.

Badania metodami cytochemicznymi nie dały również odpowiedzi na pytanie, czy zachodzi zmiana aktywności mitochondriów w obszarach nekrotycznych. Badano aktywność enzymów mitochondrialnych, głównie dehydrogenazy bursztynianowej.

Hammar i Mottet w 1971 r. [31] badając in toto zawiązki tylnego odnóża u zarodka kury obserwowali niższą aktywność tego enzymu w obszarach nekrotycznych międzypalcowych niż w obszarach przyszłych palców. Fallon i wsp. [20] w trzy lata później powtórzyli te same badania na skrawkach stosując nieco inne metody histochemiczne oraz metody biochemiczne. Nie stwierdzili oni różnic między obszarami nekrotycznymi a obszarami przyszłych palców. Podobnie nie znaleźli różnic w aktywności innych enzymów mitochondrialnych, jak reduktazy bursztynianowo - cytochromowej — C, reduktazy NADH — cytochromowej. Sądzą oni, że utlenianie bursztynianów nie zmienia się w obszarach nekrotycznych.

Niektórzy autorzy uważają, że przed rozpoczęciem nekrozy zostaje zahamowana synteza DNA i białek w komórce [32, 65]. Saunders i wsp. [32, 68] stwierdzili, że znakowana tymidyna nie inkorporuje się do komórek w obszarach nekrotycznych pączka odnóża u kurczęcia. Według nich zahamowanie syntezy DNA jest jednym z objawów degeneracji. Natomiast Ilies [38, 40-42] podkreśla, że obumieranie komórek w różnych obszarach nekrotycznych u zarodków człowieka zachodzi w strefach o bardzo dużej liczbie mitoz. Obserwuje się również degeneracje komórek w różnych fazach mitozy, co nazwano nawet atretyczną mitozą [6]. Co więcej, dawniej tzw. ziarenka degeneracyjne uważano za meta-

bolity mitotyczne [24, 27, 54, 73]. Wydaje się więc, że degenerujące komórki mogą zachować zdolność syntezy DNA w fazie S poprzedzającej mitozę, w której obumierają. W jądrach komórkowych degenerujących oogonii u zarodków świni domowej nie stwierdzono zmian w zawartości DNA w porównaniu z oogoniami zdrowymi niedegenerującymi [10].

W obszarach nekrotycznych, jak już zaznaczono, degenerujące komórki oraz ich resztki są fagocytowane przez sąsiednie zdrowe (rys. 5, 8, 10), które nazywane są fagocytami lub makrofagami. Są to komórki takiego samego pochodzenia jak i obumierające komórki, a więc komórki neuroektodermalne — w przypadku degeneracji przy zamykaniu się cewki nerwowej [70] czy przy degeneracji w siatkówce [28] — lub komórki endodermalne — fagocytujące zdegenerowane sąsiednie w zawiązku tarczycy [67]. W obszarach nekrotycznych pączka odnóża zdolność fagocytozy mają zarówno zdrowe komórki ektodermalne czapeczki szczytowej, jak i komórki mezenchymatyczne stanowiące jego trzon [45]. W układzie nerwowym zdolność fagocytozy mają różnicujące się komórki glijowe [1]. We wczesnych stadiach zarodkowych ssaków wszystkie komórki blastocysty mają zdolność fagocytozy, o czym już poprzednio wspomniano.

W mikroskopie elektronowym obserwuje się w fagocytach rozmaite formy dużych i małych heterofagosomów i ciałek resztkowych. Wyposażone są one w lizosomy, w niektórych wykazano aktywność fosfatazy kwaśnej [33]. Wydaje się jednak, że w niektórych obszarach nekrotycznych fagocyty rozkładają zdegenerowane komórki bez udziału fosfatazy kwaśnej. Mattanza [52] nie wykrył aktywnej fosfatazy kwaśnej przy degeneracji i fagocytozie w międzymózgowiu u 12-dniowego zarodka myszy. Podobnie fagocytujące komórki sznurów płciowych w jajnikach zarodków świni nie wykazują aktywności tego enzymu wykrywalnej na poziomie mikroskopu optycznego [10, 11].

Komórki zdrowe, które sfagocytowały sąsiednie zdegenerowane, nie tracą jak się wydaje zdolności do dalszego rozwoju i różnicowania się w przeznaczonym im kierunku. Często obserwuje się podziały komórek z heterofagosomami i ciałkami resztkowymi, co świadczy o ich żywotności. Jest bardzo prawdopodobne, że sfagocytowane resztki komórkowe są rozkładane na substancje prostsze, które z kolei są wykorzystywane przez zdrowe komórki. Podobne zjawisko zachodzi w czasie oogenezy u jeżowców *Strongylocentrotus*, gdzie część gonocytów jest fagocytowana przez tzw. komórki pomocnicze, a uzyskane substancje prostsze służą pozostałym oocytom jako surowiec do procesów syntezy. Zjawisko to zostało nazwane fagocytozą odżywczą [4, 35]. Fagocytoza odżywcza może odgrywać szczególnie ważną rolę w okresie rozwoju zarodkowego poprzedzającym wytworzenie się naczyń krwionośnych i krwi oraz w tym

etapie organogenezy, kiedy zawiązek narządu nie jest jeszcze w pełni unaczyniony.

Zdegenerowane komórki lub ich części mogą być także eliminowane do jam ciała i narządów. Niektóre obumarłe komórki w cewce nerwowej wsuwają się do jej światła, nie wiadomo jaki jest ich dalszy los [67]. Zdegenerowane komórki pęcherzyka wsierdziowego u zarodka kurczęcia odrzucane są do galarety sercowej, być może biorą udział w jej tworzeniu [61]. Nasilenie procesów fagocytozy związanej z usuwaniem obumarłych komórek w czasie rozwoju zarodkowego jest bardzo duże, gdyż u noworodków obserwuje się niewiele degenerujących komórek.

III. PRZYCZYNY I ZNACZENIE OBUMIERANIA KOMÓREK W OKRESIE ROZWOJU ZARODKOWEGO

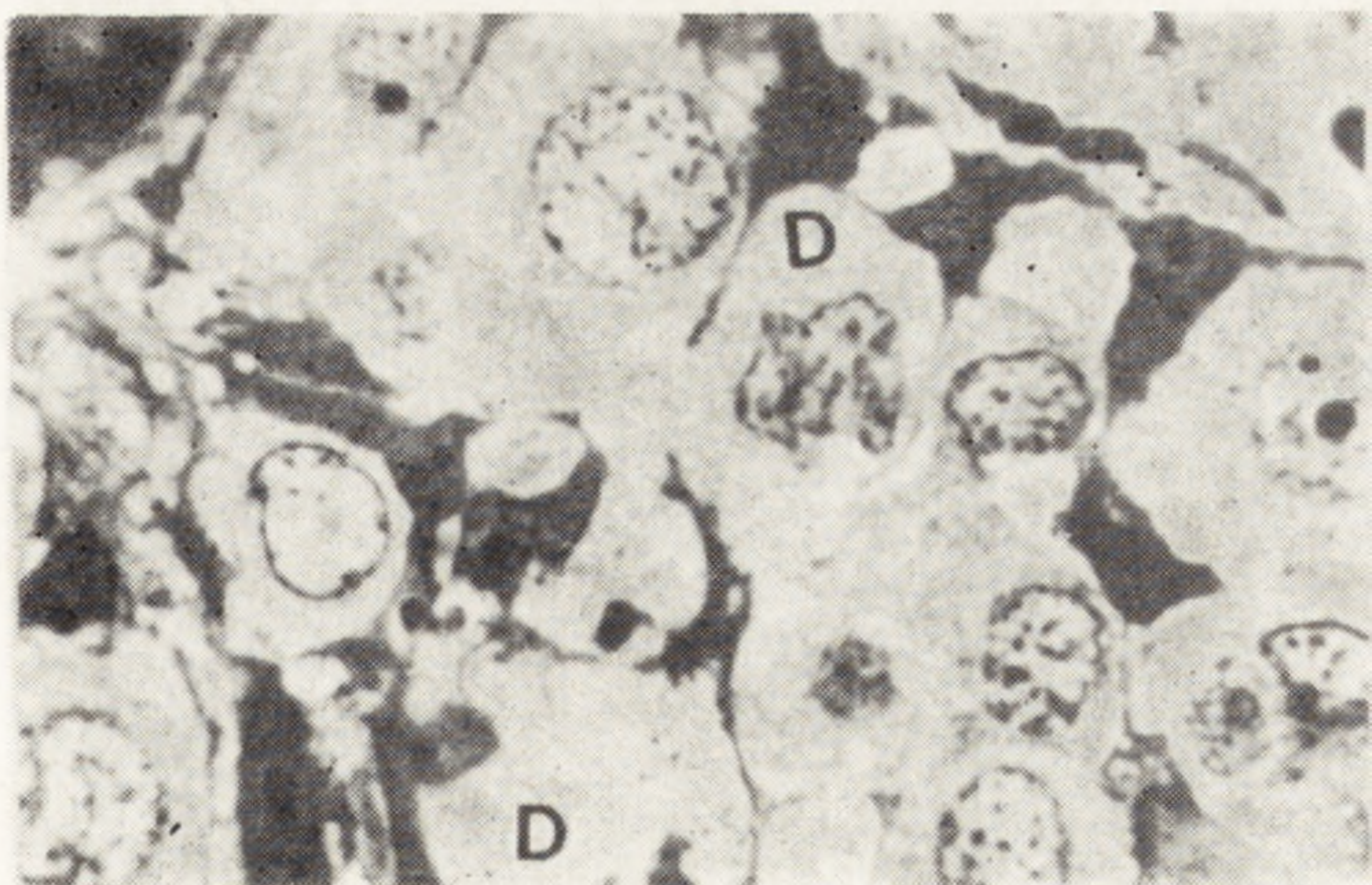
Jak się obecnie wydaje, śmierć komórek w czasie rozwoju zarodkowego kręgowców jest procesem kontrolowanym i programowanym. Przyczyny tego obumierania jednak nie są znane dokładnie i mogą one być różne.

Glücksman [27] sklasyfikował śmierć komórek według znaczenia tego procesu dla rozwoju zarodka. Wyróżnił degenerację morfogenetyczną, histogenetyczną i filogenetyczną.

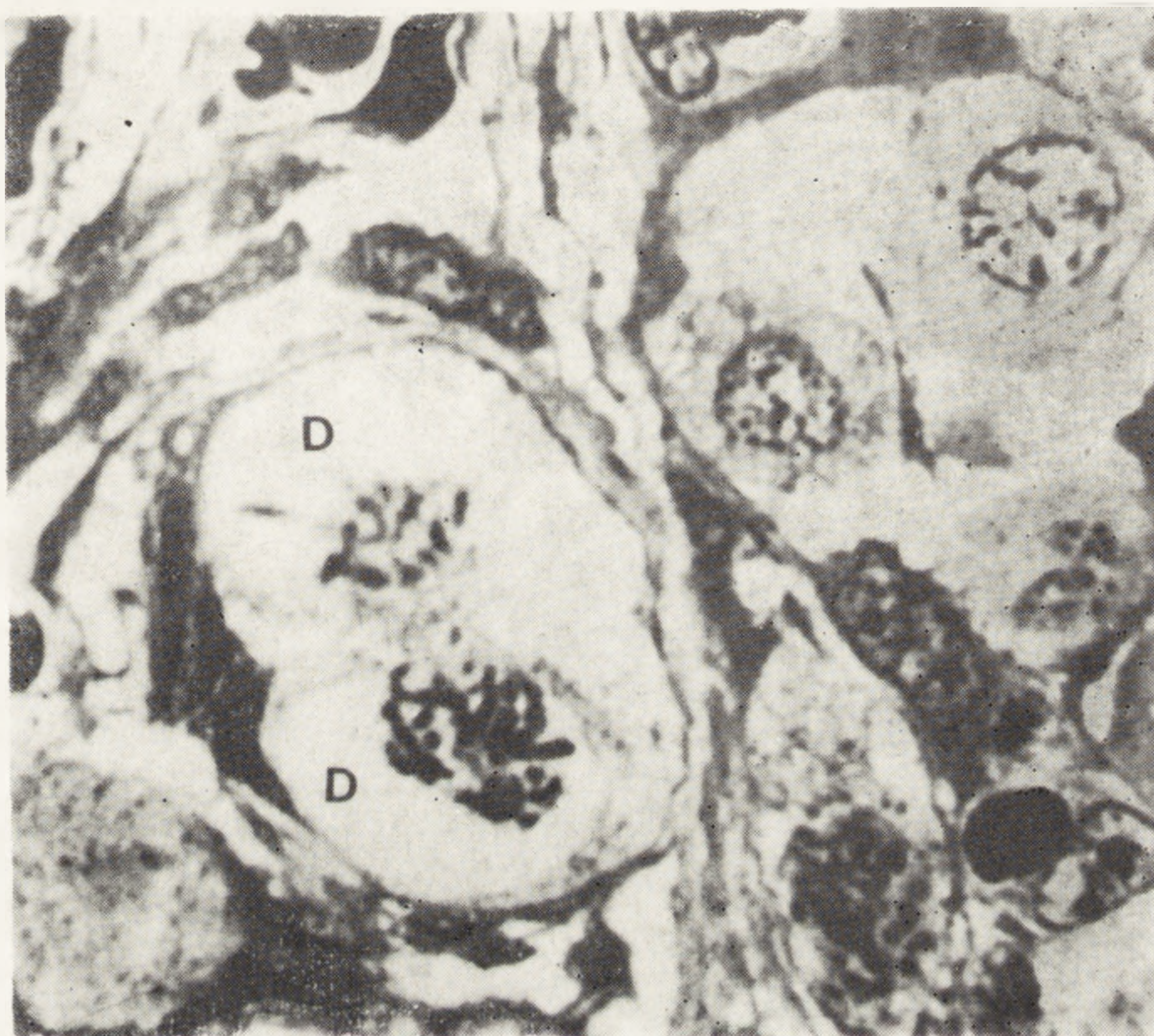
D e g e n e r a c j a m o r f o g e n e t y c z n a związana jest ze zmianami kształtu całego zarodka i poszczególnych narządów, wzrostem tkanek, łączeniem się lub rozdzielaniem zawiązków narządów, tworzeniem się światła w początkowo pełnych zawiązkach. Na skutek śmierci pewnej liczby komórek w określonym miejscu i czasie zostaje modelowany zarodek, aż stopniowo uzyskuje on definitywną formę. Śmierć komórek poprzedza zmianę kształtu narządu lub jego zawiązka wtedy, gdy ścisłe przyleganie komórek nie pozwala na ich ruchy morfogenetyczne. Przykładem degeneracji morfogenetycznej może być śmierć komórek przy zamykaniu się cewki nerwowej, przy tworzeniu się soczewki, pęcherzyka słuchowego, przy zrastaniu się parzystych zawiązków podniebienia.

D e g e n e r a c j a h i s t o g e n e t y c z n a zachodzi w czasie różnicowania się tkanek i narządów. Na przykład w siatkówce oka zbiega się z różnicowaniem się trzech warstw komórek nerwowych. Obumierają prawdopodobnie komórki niezdolne do dalszego różnicowania się [28]. Zaliczyć tu można także degenerację chrząstki w modelu zarodkowym kości długich [73]. Degeneracja histogenetyczna jest również związana z tworzeniem się substancji międzykomórkowej [24].

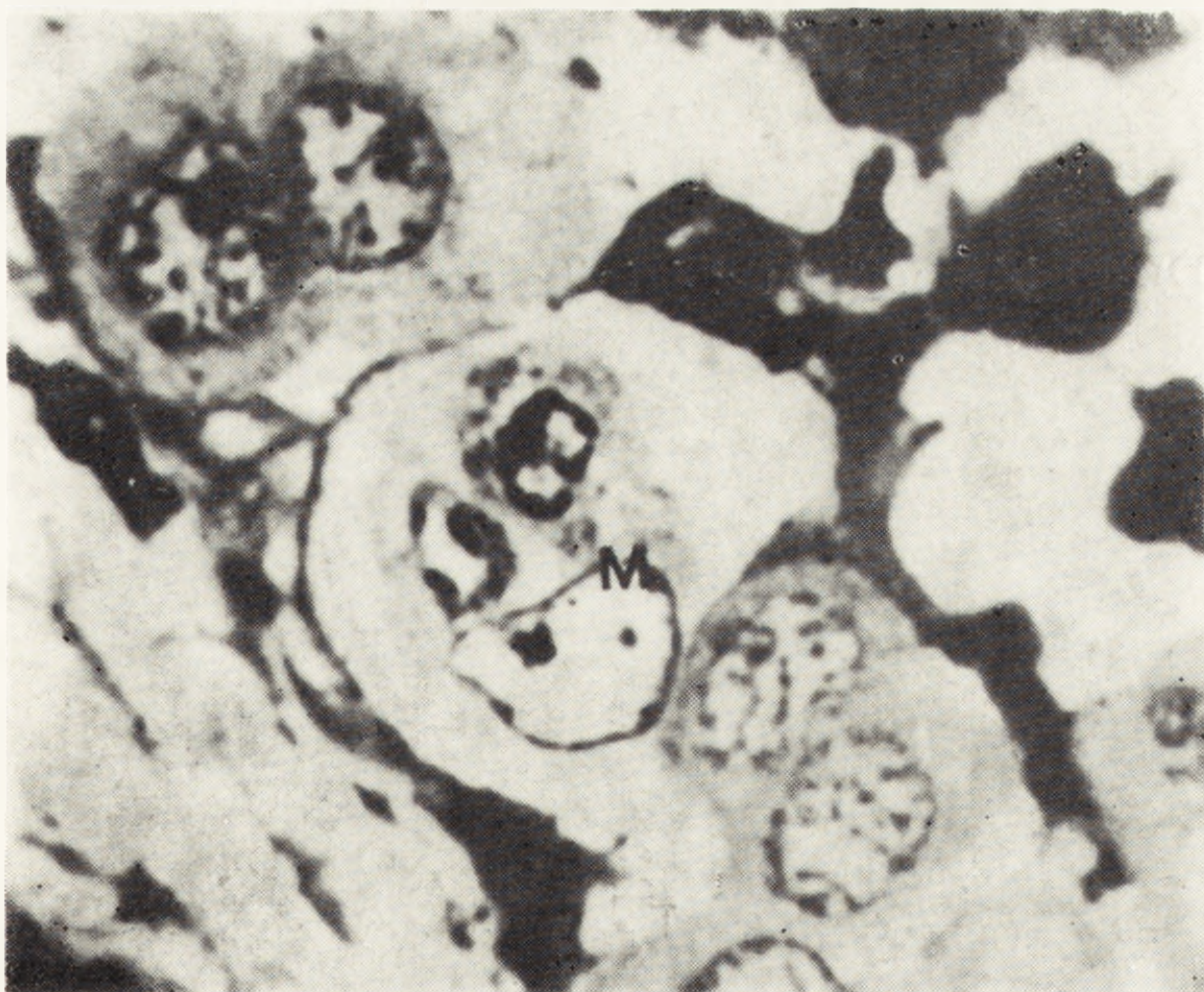
D e g e n e r a c j a f i l o g e n e t y c z n a powoduje zanik narządów szczątkowych oraz larwalnych. Jest to degeneracja przednercza i pra-



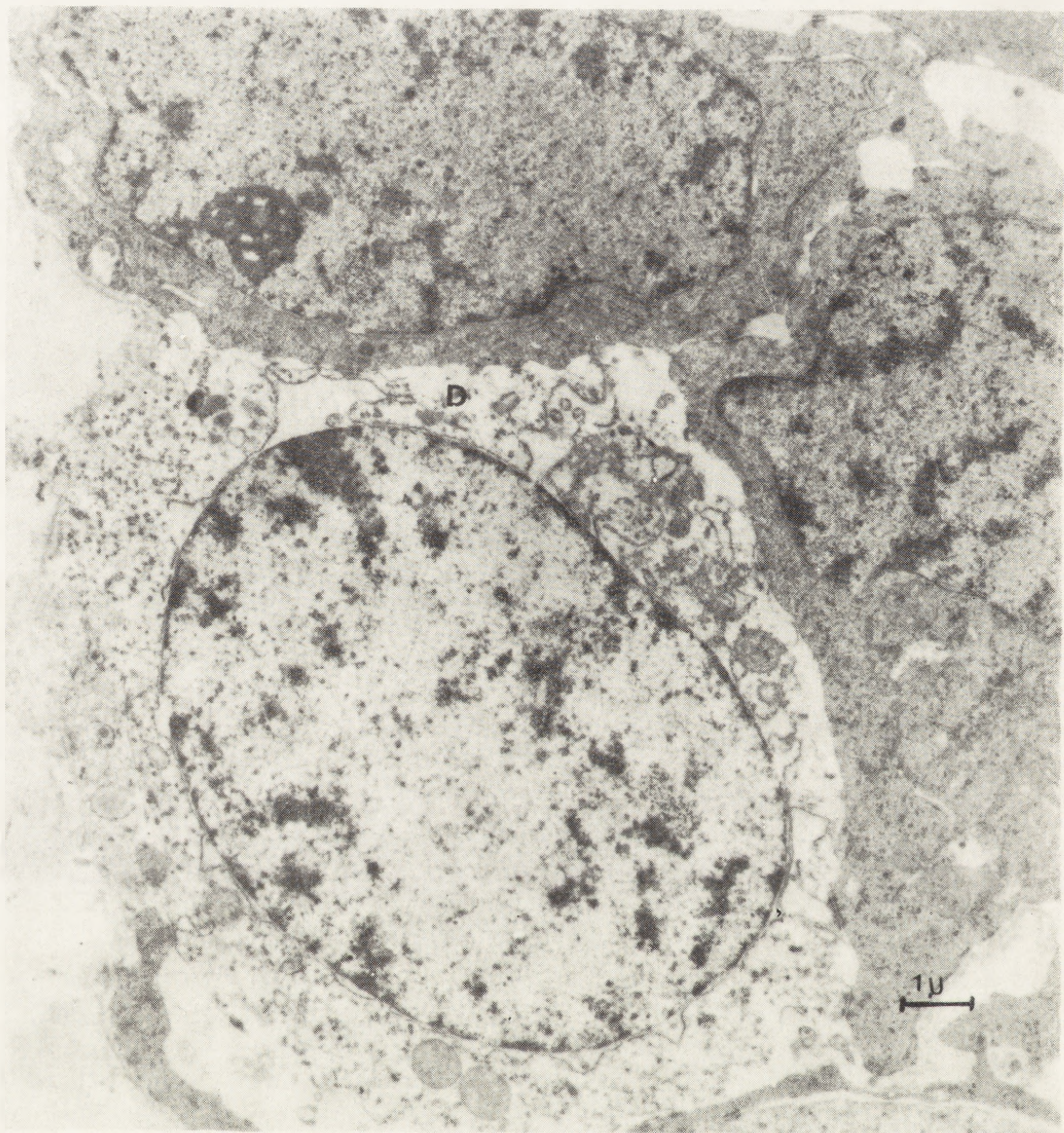
Rys. 3. Degenerujące oogonia (D) w jajniku zarodka ssaka. Skrawek eponowy półcienki, pow. mikr. 600 ×



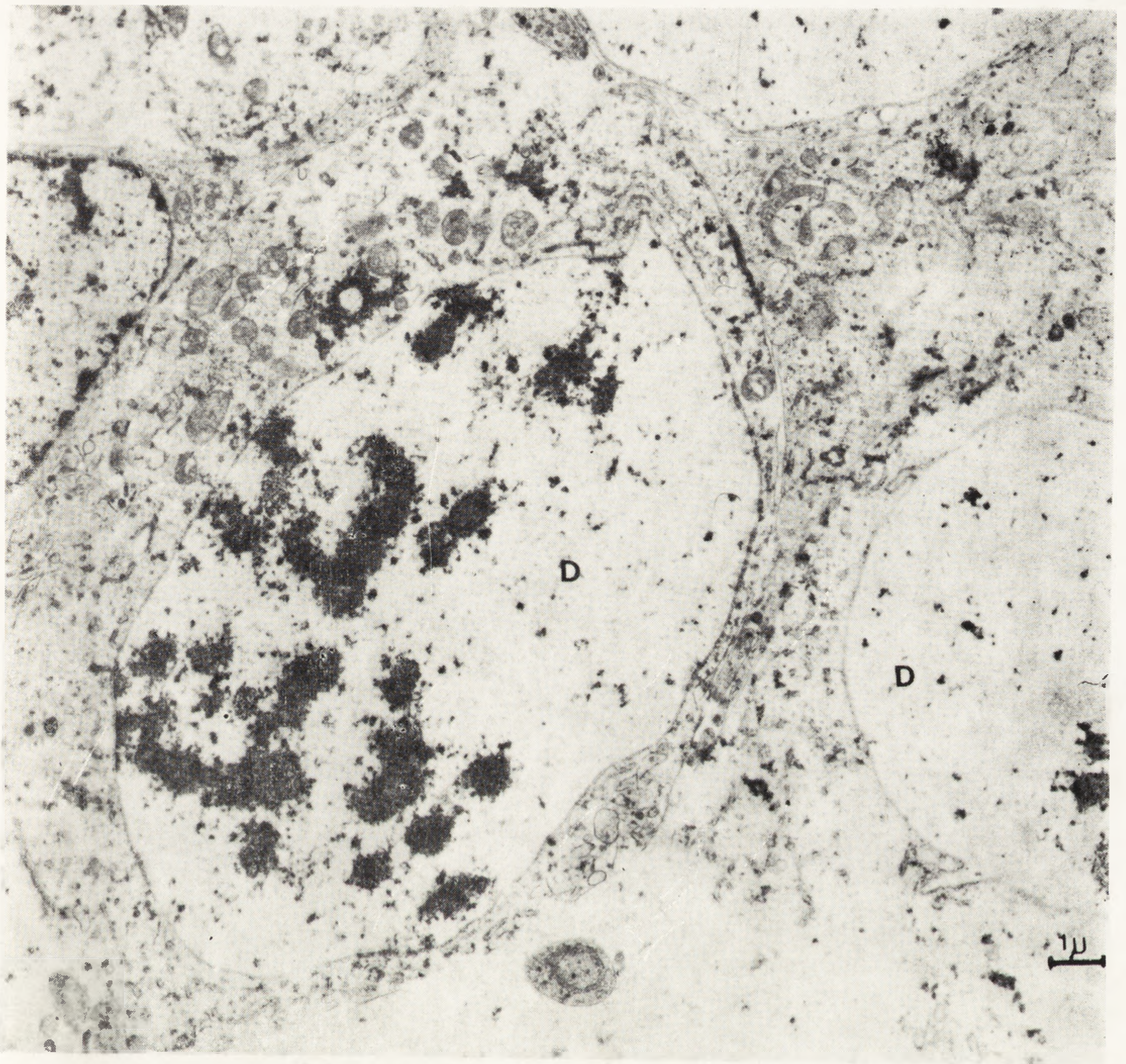
Rys. 4. Degenerujące oocyty (D) w profazie mejotycznej w jajniku zarodka ssaka. Skrawek półcienki eponowy, pow. mikr. 600 ×



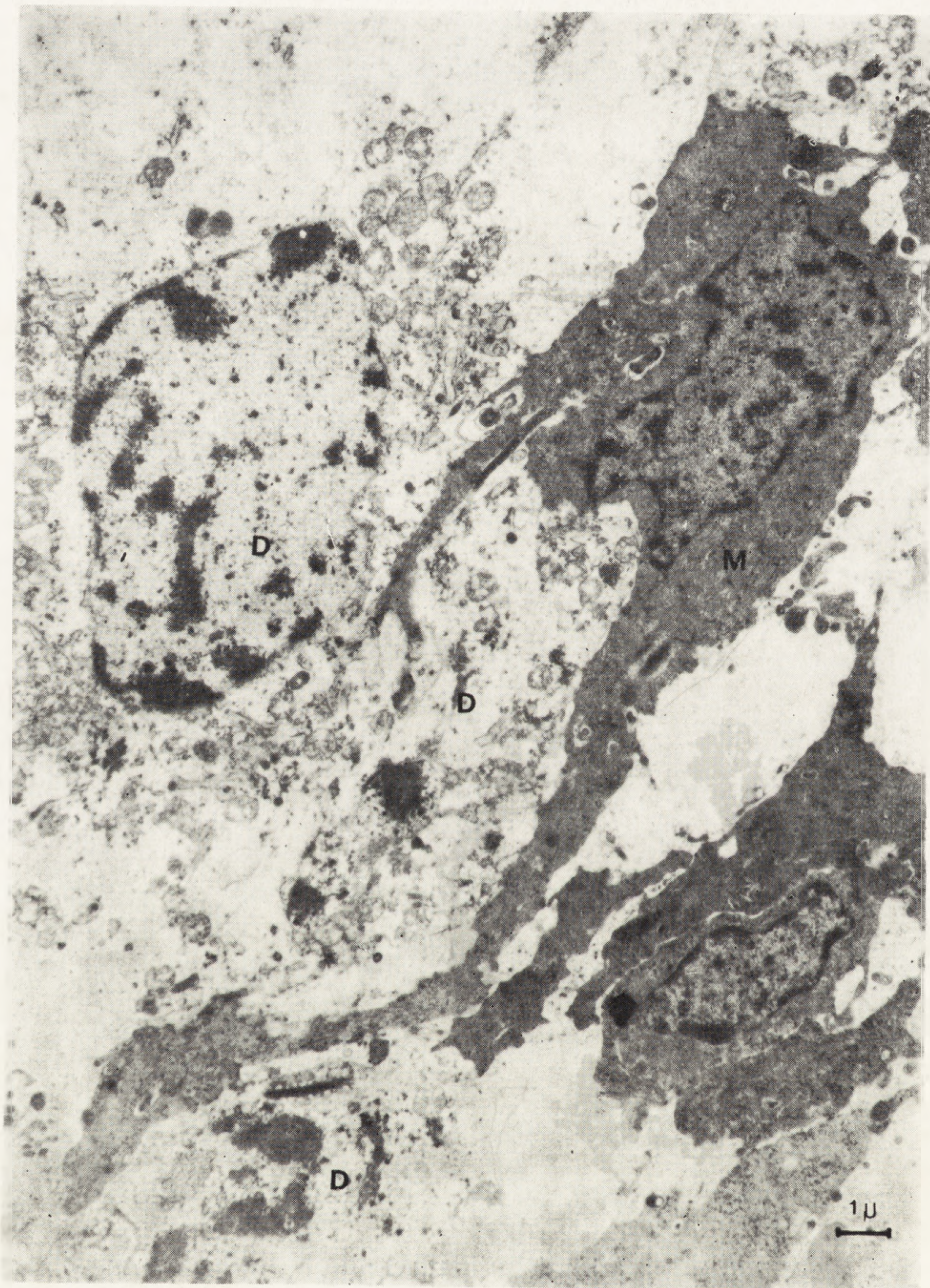
Rys. 5. Makrofag (M) fagocytujący zdegenerowane oogonia w jajniku zarodka świni. Skrawek eponowy półcienki. pow. mikr. 600 ×



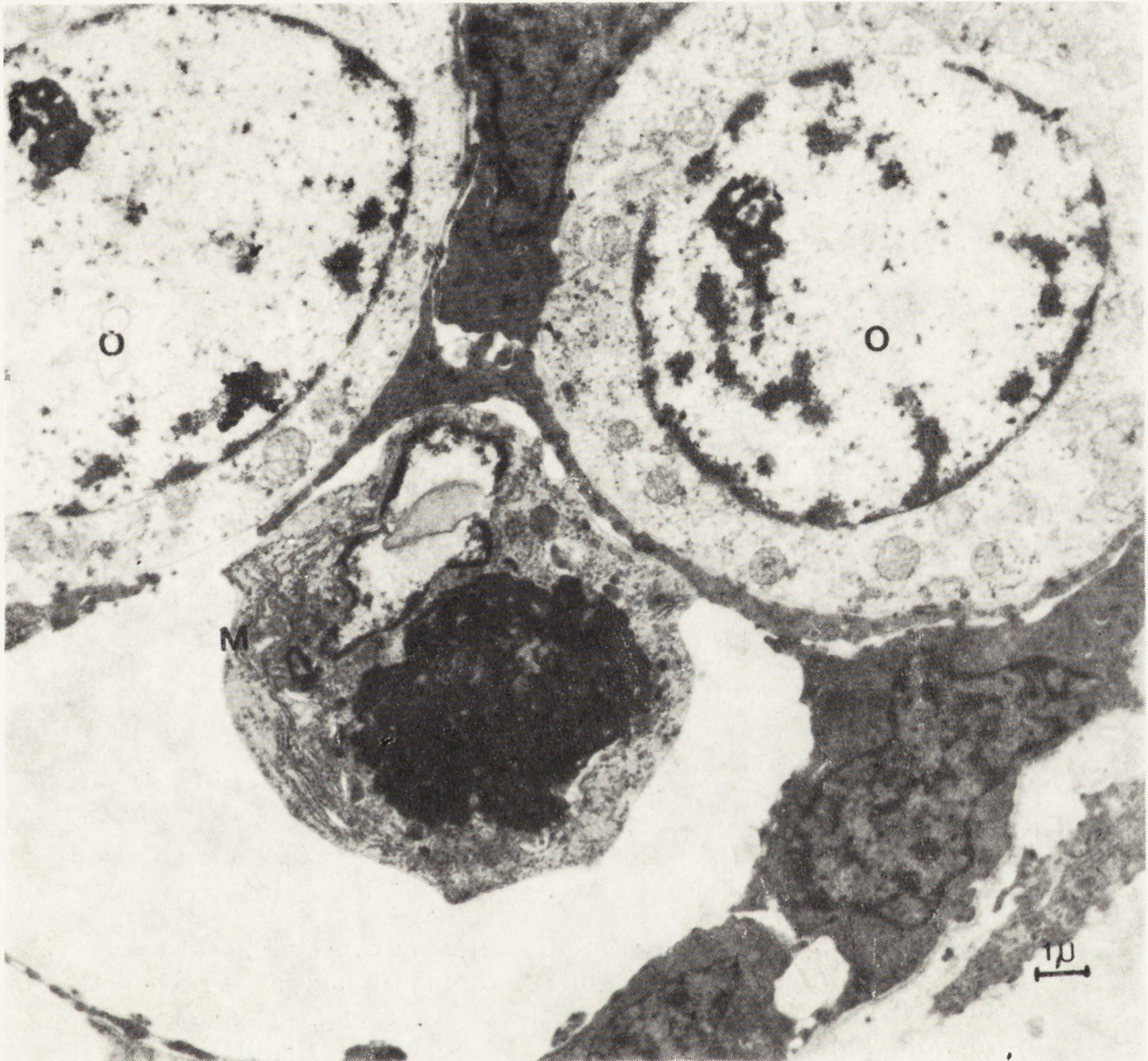
Rys. 6. Degenerujące oogonium (D). Elektronogram z jajnika zarodka świni.



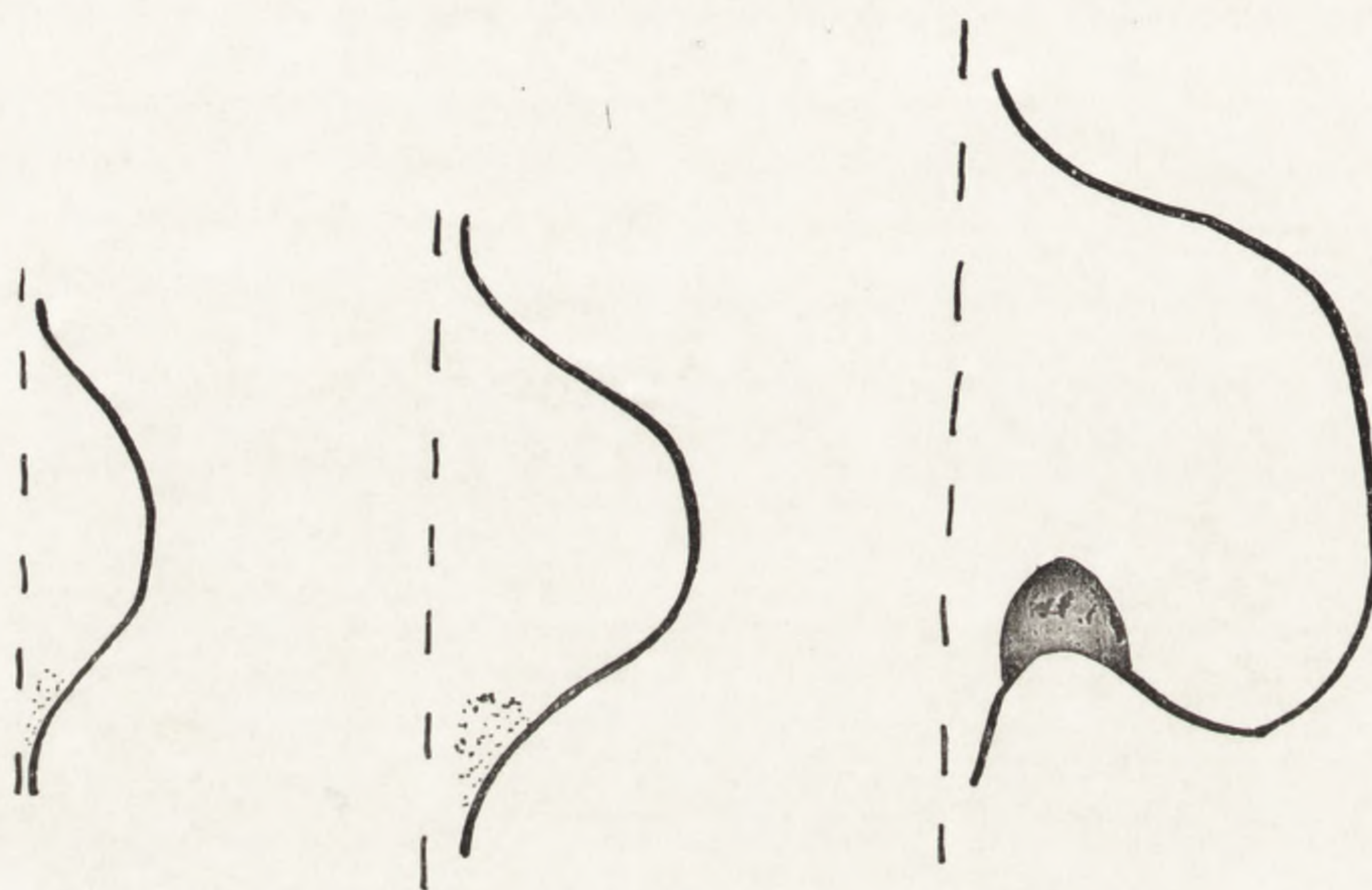
Rys. 7. Degenerujący oocyt (D) w profazie mejotycznej. Elektronogram z jajnika zarodka świni



Rys. 8. Fagocytoza zdegenerowanego gonocyta (D) przez komórkę sznurów płciowych (M), widoczne obok degenerujące oogonia (D). Elektronogram z jajnika zarodka świni



Rys. 9. Makrofag (M) z resztkami sfagocytowanego gonocytu, obok oogonia (O).
Elektronogram z jajnika zarodka świni



ST.17

ST.21

ST.22

Rys. 10. Schemat rozmieszczenia tylnej strefy nekrotycznej — PNZ w rozwoju pączka skrzydła u zarodka kurczęcia. Presumptywna PNZ oznaczona kropkami, 17, 21 i 22 stadium rozwoju kurczęcia wg oznaczeń Hamburgera i Hamiltona.

nercza u ptaków i ssaków, zanik niektórych rejonów skrzelowych u zarodków tych gromad.

Nowsze badania w wielu przypadkach potwierdzają tezy Glücksmana, chociaż przyczyny śmierci komórek wydają się być różne i skomplikowane. Na pewno śmierć komórek zachodzi w ścisłym związku z procesami różnicowania się komórek. Degenerację komórek obserwuje się prawie zawsze w tych obszarach zarodka, które aktualnie się różnicują. Wydaje się, że degenerują te komórki, które nie są w stanie różnicować się normalnie lub odpowiedzieć na bodziec powodujący różnicowanie. Tak np. tłumaczą El-Shershaby i Hinchliffe [15] obumieranie komórek w węzle zarodkowym i trofoblaście blastocysty myszy. Można przypuszczać, że taki sam jest powód degeneracji komórek przy zamykaniu się cewki nerwowej. Obumierające komórki mogą być niekompetentne na działanie induktora nerwowego lub w za słabym stopniu zaindukowane. Schlüter [70] sądzi, że w tym przypadku przyczyną degeneracji komórek jest rozluźnienie się połączeń między komórkami, na skutek zmian w ich ułożeniu przestrzennym. Zostaje wtedy uszkodzony międzykomórkowy przepływ jonów. Zostaje również przerwana funkcjonalna jedność warstwy komórkowej ektodermy przy wyodrębnieniu się neuroektodermy.

Rejony zarodka o wysokiej aktywności mitotycznej, jak już podkreślano, cechują się nasilonym obumieraniem komórek. Nie wiadomo jednak, jaka jest istotna zależność między tymi dwoma procesami. Glücksmann [27, 28] uważa, że w tych rejonach produkowana jest nadmierna liczba komórek i nadliczbowe, niepotrzebne degenerują, jak to obserwował w przypadku rozwoju szypuły soczewki oka. Ilies [40] zwrócił uwagę, że niestałe obszary nekrotyczne powstają tam, gdzie wyraźnie zwiększony jest indeks mitotyczny. Degeneracje komórek, według niego, regulują wzrost danego obszaru i zmieniają tempo jego rozwoju przystosowując je do rytmu rozwoju całego zarodka. Zahamowanie na drodze eksperymentalnej mitoz w zawiązkach odnoży kurczęcia przez poddanie ich działaniu vinblastyny nie powoduje zmian w nasileniu degeneracji komórek w obszarach nekrotycznych [44]. Natomiast Ojeda i Hurle [61] tłumaczą śmierć komórek w zawiązku serca kurczęcia zahamowaniem w nim mitoz.

Inną interpretację podają Forsberg i Källén [24]: przyczyną śmierci komórek są zaburzenia w mitozie. W obszarach o intensywnej proliferacji komórek na skutek bardzo szybko po sobie następujących podziałów komórkowych wiele z nich ma nienormalny przebieg. Podają oni, że liczba anafaz z anomaliami chromosomowymi sięga 5% w zawiązku pochwy myszy, a 10% w mózgu zarodka kurczęcia. Niektóre komórki z zaburzeniami w mitozie kończą podział, ale następnie nie są już zdolne do odpowiedzi na bodźce rozwojowe i obumierają.

W rozwoju zarodka kury pojawia się w 4 dniu inkubacji (24 stadium

rozwojowe) obszar nekrotyczny na brzusznej stronie pączka odnóży przedniego, tuż przy połączeniu z tułowiem. Nazwano go tylko zoną nekrotyczną — PNZ (posterior necrotic zone). Występuje on wyłącznie u ptaków. Saunders i wsp. [21, 68, 69] przeprowadzili szereg doświadczeń, które rzuciły nieco światła na przyczyny śmierci komórek w tym obszarze. Wykazali oni, że PNZ jest zdeterminowana już w 3 dniu inkubacji (w stadium 17), mimo iż nie obserwuje się w niej w tym czasie morfologicznych przejawów degeneracji komórek (rys. 10). Presumptywny obszar PNZ jest wtedy zlokalizowany w mezodermie pod powierzchnią tylnej części pączka skrzydła. Presumptywna PNZ wszczepiona do mezodermy somitów innego zarodka młodszego lub w tym samym wieku nie zmienia swego charakteru i komórki jej umierają zgodnie z zegarem biologicznym dawcy. Obumarłe komórki zostają usunięte przez makrofagi gospodarza. Podobnie w presumptywnej PNZ hodowanej *in vitro* komórki degenerują w tym samym czasie co w PNZ kontrolnej, pozostawionej w zawiązku drugiego skrzydła. Do stadium 22, tj. do 3 i 1/2 dnia inkubacji, można jednak presumptywną PNZ skierować na inną drogę rozwoju. Przeszczepiona bowiem przed osiągnięciem tego stadium do mezodermy na grzbietowej stronie zawiązka skrzydła nie degeneruje, lecz rozwija się dalej, wytwarzając u gospodarza dodatkowe chrząstki i pióra. Taki sam efekt otrzymano wszczepiając pod presumptywną PNZ mezoderme z grzbietowej strony pączka odnóży czy hodując je razem *in vitro*. Determinacja PNZ po stadium 22 jest już nieodwracalna, prawdopodobnie w tym stadium rozpoczynają się procesy degeneracji komórek. Saunders i wsp. wyciągnęli z tych doświadczeń kilka istotnych wniosków. Komórki presumptywnej PNZ nie są skazane na śmierć ani nie są samobójcami. Śmierć ich nie zależy od czynników zawartych w nich samych, lecz jest spowodowana wpływem mezodermy somitów. W normalnym rozwoju zarodka ptaka presumptywna PNZ znajduje się przez pewien czas w bliskim sąsiedztwie mezodermy somitów. Przy zetknięciu się tych obszarów zachodzi indukcja degeneracji komórek w presumptywnej PNZ. Czynnikiem indukującym jest drobnocząsteczkowy, przechodzi przez filtr bakteriologiczny. Czynnika tego jednak nie zidentyfikowano. Działa podobnie jak induktory. Komórki presumptywne PNZ są specjalnie czułe na jego działanie, hamuje on w nich normalne procesy życiowe. PNZ jest determinowana przez hierarchiczne czynniki: genetyczny, przestrzenny i czasowy.

Degeneracja komórek w zawiązkach odnóży jest również uwarunkowana genetycznie. U kreta nie ma obszarów nekrotycznych przed 1 i za 5 zawiązkiem palca, jakie występują u innych ssaków [55]. U tego gatunku zwierzęcia wytwarzają się dwa dodatkowe palce prehallax i prepollux. Błona między palcami tylnego odnóży kaczki zachowuje się w ży-

ciu pozazarodkowym jako błona pławna, ponieważ w trakcie rozwoju odnóża nie ma degeneracji komórek w obszarach międzypalcowych [62, 75]. Znane są mutacje myszy z nieprawidłowo wykształconymi odnóżami, jak oligosyndaktylizm (Os) czy syndaktylizm. Przy oligosyndaktylizmie dochodzi do zlania się drugiego i trzeciego palca we wszystkich czterech odnóżach. Homozygoty są letalne. U heterozygot (Os/+) pojawia się dodatkowy mały obszar nekrotyczny w mezodermie płyty zawiązka odnóża około 10 i 1/2 dnia rozwoju. Obszar ten łączy się z obszarem nekrotycznym występującym w rozwoju wszystkich myszy na końcu pierwszego promienia płyty, przez co ten ostatni powiększa się znacznie i obejmuje duży obszar mezenchymy. Następnie na skutek braku mezenchymy przeznaczonej dla rejonu między palcami 2 i 3, blastemy tych dwóch palców zlewają się razem. Jak wykazał Milaire [57], bezpośrednim powodem powstania tak rozległego obszaru nekrotycznego jest zaburzenie wzajemnego oddziaływania mezodermy i ektodermalnej czapeczki szczytowej w pączku odnóża. U tych mutantów obserwuje się nadmierny wzrost czapeczki szczytowej.

Podobne zwiększenia obszarów nekrotycznych występują w pewnych mutacjach u kur, jak Rumpless (bez odnóży) [75] czy Wingless (bezskrzydłe) [33]. Natomiast mutacja Talpid³ występująca u kur związana jest z brakiem obszarów nekrotycznych w zawiązkach odnóża odpowiadających PNZ, przedniej strefie nekrotycznej i obszarom nekrotycznym międzypalcowym [34]. Gen Talpid³ powoduje również wzmożone przyleganie do siebie komórek mezenchymy, skutkiem czego ogranicza ich ruchy. W mikroskopie elektronowym stwierdzono, że u mutantów tych komórki mezenchymatyczne mają mniej liczne i krótsze wypustki niż u zarodków normalnych. Stąd powstają większe przestrzenie międzykomórkowe i mniejszy jest kontakt mezodermy z ektodermą w pączku odnóża [34].

Klasyczne już dziś doświadczenia z przeszczepianiem i amputacją zawiązków odnóży u płazów i ptaków wykazały, że komórki nerwowe w obrębie centralnego układu nerwowego degenerują, jeżeli zwiątek narządu jaki mają obsługiwać zostanie usunięty przed wytworzeniem się połączeń nerwowych między centralnym układem nerwowym a zawiązkiem narządu obwodowego [30]. W normalnym rozwoju zarodków kręgowców w zwojach rdzeniowych i przednich kolumnach rdzenia kręgowego degenerują liczne neurony zwłaszcza w segmentach, które nie wchodzi w sploty barkowe i lędźwiowe. Degenerują te neurony, które nie wytwarzają zakończeń ruchowych na mięśniach kończyn. Alley [1] stwierdził, że w czasie rozwoju jądra pasma śródmózgowego nerwu trójdzielonego u chomika degenerują neurony przed wytworzeniem się synaps. Los każdego różnicującego się neuronu zależy od jego zdolności tworzenia

połączeń na obwodzie. Te, które nie są zdolne do utrzymania kontaktów szybko obumierają.

Obumieranie komórek może być spowodowane czynnikami mechanicznymi. Pexieder [63, 64] uważa, że ubytki komórek w czasie rozwoju serca związane są z lokalnymi zmianami kształtu narządu i przepływu krwi. Najwięcej obumarłych komórek obserwował w czasie zmiany kształtu poduszczyk opuszki serca w tych ich wypukłościach, które są najbardziej obciążone z punktu widzenia hemodynamicznego. Eksperymentalne zmiany przepływu krwi powodowały zmiany w rozmieszczeniu obszarów nekrotycznych w sercu zarodka kury [64].

Zapewne jest wiele innych czynników powodujących degenerację komórek w czasie rozwoju zarodkowego. Wspomnieć tu należy także degenerację wywołaną czynnikami hormonalnymi, jak zanik przewodów żeńskich (przewody Müllera), czy degenerację ogona i skrzelu u kijanek płazów bezogonowych pod wpływem tyroksyny.

IV. WPŁYW CZYNNIKÓW TERATOGENNYCH NA OBSZARY NEKROTYCZNE

Liczne badania, głównie embriologów rumuńskich [54], dowiodły, że zawiązki narządów, w których lokalizują się fizjologiczne obszary nekrotyczne w czasie rozwoju zarodkowego mają tendencję do częstego nieprawidłowego rozwoju. Co więcej, niektóre zaburzenia rozwojowe mają początek w obszarach nekrotycznych.

Wykazano również, że czynniki teratogenne zarówno endo-, jak i egzogenne, mogą powodować zjawiska degeneracji i procesy nekrotyczne jako następstwa zaburzenia procesów metabolicznych. Efekt działania tych czynników objawia się śmiercią komórek taką samą jak fizjologiczna nekrobioza, lecz o innej lokalizacji, intensywności i rozległości [40]. Efekt czynników teratogennych nakłada się często na obszary normalnej zaprogramowanej degeneracji u zarodka. Skutkiem tego powiększają się obszary nekrotyczne, dochodzi do wynaczynień i powstawania cyst hemoragicznych. Czynniki teratogenne są specjalnie silnie aktywne, gdy działają w okresie maksymalnej degeneracji danego obszaru. Zbyt duży ubytek komórek powoduje nienormalny rozwój danego narządu. U zarodków człowieka wirusy różyczki zwiększają obumieranie komórek w obszarach nekrotycznych rozwijającego się ucha, co powoduje daleko idące zmiany patologiczne i nieodwracalną głuchotę [39].

Czynniki teratogenne mogą również spowodować zahamowanie normalnej degeneracji, wtedy rozwój narządu nie przebiega też normalnie.

Okres maksymalnej degeneracji jest równocześnie okresem największej czułości zawiązka narządu na działanie czynników teratogennych.

Ilies [39, 42], Menkes [54] i inni [64] zwracają uwagę, że w wielu pracach z zakresu teratologii brano obszary nekrotyczne fizjologiczne za przejaw działania czynnika teratogennego. Na przykład obszary występujące w rozwijającym się sercu uznano za degenerację w wyniku teratogennego działania talidomidu [63]. Brak znajomości rozmieszczenia fizjologicznych obszarów nekrotycznych jest przyczyną mylnych interpretacji. Dlatego wydaje się, że konieczne jest sporządzenie dokładnych map przestrzennego i czasowego rozmieszczenia tych obszarów. Mapy te powinny być **konsultowane i studiowane przed rozpoczęciem badań teratologicznych**, a zwłaszcza eksperymentalnych.

LITERATURA

- [1] ALLEY K. E., Morphogenesis of the trigeminal mesencephalic nucleus in the hamster, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**: 99–121, 1974.
- [2] BAKER T. G., A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries, *Proc. Roy. Soc. B.*, **158**: 417–433, 1963.
- [3] —A quantitative and cytological study of oogenesis in the *Rhesus monkey*, *J. Anat.*, **100**: 761–776, 1966.
- [4] BAL A. K., Ultrastructural changes in the accessory - cells and oocyte surface of the sea urchin *Strongylocentrotus Dröbachiensis* during vitellogenesis, *Z. Zellforsch.*, **111**: 1–14, 1970.
- [5] BALLARD K. J., HOLT S. J., Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes, *J. Cell Sci.*, **3**: 245–262, 1968.
- [6] BEAUMONT H. M., MANDL A. M., A quantitative study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat, *Proc. Roy. Soc. B.*, **155**: 557–579, 1961.
- [7] BELLAIRS R., Cell death in chick embryos as studied by electron microscope, *J. Anat.*, **95**: 54–60, 1961.
- [8] BENGMARK S., FORSBERG J. G., Some remarks on degeneration granules in the genital sphere, *Z. Zellforsch.*, **49**: 694–698, 1959.
- [9] BIELAŃSKA - OSUCHOWSKA Z., Fagocytoza odżywcza komórek sznurów płciowych w jajnikach płodów i noworodków niektórych ssaków, III Naukowa Konferencja Sekcji Płodności i Niepłodności Pol. Tow. Ginekologicznego, Bia-łowieża, maj 1973, 31–34.
- [10] — Oogonia and oocytes degeneration and the nutritive macrophages in the processes of the development of the ovary in embryos of the domestic pig (*Sus scrofa dom. L.*), *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, **142**: 37–52, 1973.
- [11] — Histochemical studies on the development of the ovary in the embryos of the domestic pig (*Sus scrofa dom. L.*), *Folia Morphol. (Warszawa)*, **33**: 413–426, 1974.
- [12] BLACK J. L., ERICKSON B. H., Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig, *Anat. Rec.*, **161**: 45–56, 1965.
- [13] DANIEL J. C., OLSON J. D., Cell movement, proliferation and death in formation of the embryonic axis in rabbit, *Anat. Rec.*, **156**: 123–128, 1966.
- [14] DAWID D. S., HINCHLIFFE J. R., Cell death in the „opaque patch” in the

- central mesenchyme of developing chick limb: a cytological, cytochemical and electron microscopic analysis, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **26**: 401-424, 1971.
- [15] EL-SHERSHABY A. M., HINCHLIFFE J. R., Cell redundancy in the zona-intact preimplantation mouse blastocyst: a light and electron microscope study of dead cells and their fate, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**: 643-654, 1974.
- [16] ENDERS A. C., The fine structure of the blastocyst, [w] *The Biology of the Blastocyst*, Ed. Blandau R. J., The University Chicago Press 1971, 71-94.
- [17] ERICKSON B. H., Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary, *J. Reprod. Fert.*, **10**: 97-105, 1966.
- [18] — Development and senescence of the postnatal bovine ovary, *J. Animal Sci.*, **25**: 800-805, 1966.
- [19] ERNST M., Über Untergang von Zellen während der normalen Entwicklung bei Wirbeltieren, *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, **79**: 228-262, 1926.
- [20] FALLON J. F., BRUCKER R. F., HARRIS C., A re-examination of succinic dehydrogenase activity and its association with cell death in the interdigit of the chick foot, *J. Cell Sci.*, **15**: 17-29, 1974.
- [21] FALLON J. F., SAUNDERS J. W., In vitro analysis of the control of cell death in a zone of prospective necrosis from chick wing bud, *Develop. Biol.*, **18**: 553-570, 1968.
- [22] FELL H. B., The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl, *J. Morphol. a. Physiol.*, **40**: 417-459, 1925.
- [23] — The origin and developmental mechanics of the avian sternum, *Phil. Trans Roy. Soc. B. London*, **229**: 407-463, 1939.
- [24] FORSBERG J. G., KÄLLÉN B., Cell death during embryogenesis, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **5**: 91-102, 1968.
- [25] FORSBERG J. G., OLIVECRONA H., The activity of acid and alkaline phosphatase during the development of the vaginal anlage in rat and mouse, *Z. Zellforsch.*, **63**: 362-373, 1964.
- [26] GIANGUZZA M., MULNARD J., Quelques aspects ultrastructuraux de l'activité lysosomiale dans les premiers stades du développement de la souris, *Arch. Biol. (Liege)*, **83**: 499-512, 1972.
- [27] GLÜCKSMANN A., Cell death in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev.*, **26**: 59-86, 1951.
- [28] — Cell death in normal development, *Arch. Biol.*, **76**: 419-437, 1965.
- [29] GONDOS B., Cell degeneration: Light and electron microscopic study of ovarian germ cells, *Acta Cytol.*, **18**: 503-509, 1974.
- [30] HAMBURGER V., LEVI-MONTALCINI R., Proliferation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryos under normal and experimental conditions, *J. Exp. Zool.*, **111**: 457-502, 1949.
- [31] HAMMAR S. P., MOTTET N. K., Terazolium salt and electron microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb, *J. Cell Sci.*, **8**: 229-251, 1971.
- [32] HELD W. A., SAUNDERS J. W., Incorporation of tritiated thymidine by nuclei in a zone of prospectively necrotic cells in the wing bud of normal chick embryo, *Ann. Zool.*, **5**: 214, 1965.
- [33] HINCHLIFFE J. R., EDE D. A., Cell death and development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (ws) chick embryos, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **30**: 753-772, 1973.
- [34] HINCHLIFFE J. R., THOROGOOD P. V., Genetic inhibition of mesenchymal

- cell death and development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid³ (ta³) mutant chick embryo, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**: 747-760, 1974.
- [35] HOLLAND N. D., GIESE A. C., An autoradiographic investigation of the gonads of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*), *Biol. Bull.*, **128**: 241-258, 1965.
- [36] HUGHES A., The development of dorsal root ganglia and ventral horns in the opossum. A quantitative study, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **30**: 359-370, 1973.
- [37] HUGHES A., EGAR M., TURNER T., Degeneration of nerve fibres within the embryonic spinal cord, *Nature (London)*, **221**: 579-581, 1969.
- [38] ILIES A., La topographie et la dynamique des zones nécrotiques normales chez l'embryon humain, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **4**: 51-85, 1967.
- [39] — Modifications pathologiques a éthyologie rubéolique chez un embryon humain. *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **4**: 186-193, 1967.
- [40] — La topographie et la dynamique des zones nécrotiques normales chez l'embryon humain de 11-30 mm. Systeme nerveux central et périphérique. Etude histologique et histochemique, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **6**: 31-44, 1969.
- [41] — La topographie et la dynamique des zones nécrotiques normales des organes des sens chez l'embryon humain de 11-30 mm CR. III. Etude histologique et histochemique, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **7**: 59-69, 1970.
- [42] — La topographie et la dynamique des zones nécrotiques normales chez l'embryon humain de 11-30 mm CR. IV. Les zones nécrotiques des arcs branchiaux, des extrémités et des ébauches musculaire. Etude histologique et histochemique, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **7**: 117-130, 1970.
- [43] JOANNOU J. M., Oogenesis in the guinea pig, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **12**: 673-691, 1964.
- [44] KIENY M., Effects de la vinblastine sur la morphogenèse du pied de poulet. Aspect histologique, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **34**: 609-632, 1975.
- [45] KELLEY R. O., Fine structure of the apical rim - mesenchyme complex during limb morphogenesis in man, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **29**: 117-131, 1973.
- [46] KRISTIĆ R., PEXIEDER T., Elektronenmikroskopische Darstellung des Zelluntergangs in den Herzbulbuswülsten des Hühnerembryos, *Acta Anat.*, **82**: 470, 1972.
- [47] — Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Kuluminationsphase des Zelluntergangs in den Herzbulbuswülsten des Hühnerembryos, *Verh. Anat. Ges.*, **67**: 613-618, 1973.
- [48] LITVAC B., LITVAC E., Early ultrastructural changes during the morphogenetical necrosis of the mesenchyme in the interdigital membrane of chick embryo, *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **10**: 127-133, 1973.
- [49] McNAMARA N., BLACK W. H., Phagocytosis of the degenerating germ cells by follicle cells in fetal guinea pig ovaries, *Amer. J. Anat.*, **142**: 485-498, 1975.
- [50] MANASEK F. J., Myocardial cell death in the embryonic ventricle, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **21**: 271-284, 1969.
- [51] MATTANZA G. G., Zur Bedeutung des embryonalen Zelluntergangs im Vorderhirn. I. Untersuchungen am Menschen und bei der Maus, *Acta Anat.*, **85**: 96-107, 1973.
- [52] — Zur Bedeutung des embryonalen Zelluntergangs im Vorderhirn. II. Histochemische Untersuchungen bei der Maus, *Acta Anat.*, **85**: 206-215, 1973.

- [53] MAZANEC K., Submikroskopische Veränderungen während der Furchung eines Säugetieres, Arch. Biol., 76: 49–85, 1965.
- [54] MENKES B., Localized necrosis and necrosis in teratogenesis, Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol., 5: 139–149, 1968.
- [55] MILAIRE J., Etude morphologique et cytochimique du development des membres chez la souris et chez la toupe. Arch. Biol., 74: 129–317, 1963.
- [56] — Histochemical observations on the developing foot of normal, oligosyndactylous (Os/+) and syndactylous (sm/sm) mouse embryos, Arch. Biol., 78: 223–288, 1967.
- [57] — Evolution des processus dégénératifs dans la cape apicale au cours du developpement des membres chez le Rat et la Souris, C. R. Acad. Sc. Paris, 265: 137–140, 1967.
- [58] — Prodromes de la génèse du membre postérieur chez l'embryon de souris. Etude morphologique et histochimique, Arch. Biol., 86: 177–221, 1975.
- [59] MOTTET N. K., HAMMAR S. P., Ribosomes crystals in necrotizing cells from posterior zone of developing chick limb, J. Cell Sci., 11: 403–414, 1972.
- [60] O'CONNOR T. M., WYTTENBACH C. R., Cell death in the chick spinal cord, J. Cell Biol., 60: 448–459, 1974.
- [61] OJEDA J. L., HURLE J. M., Cell death during the formation of tubular heart of the chick embryo, J. Embryol. Exp. Morphol., 33: 523–534, 1975.
- [62] PAUTOU M. P., Morphog n se de l'autopode chez l'embryon de poulet. J. Embryol. Exp. Morphol., 34: 511–529, 1975.
- [63] PEXIEDER T., Beobachtungen  ber den lokalen Zelltodt während der Herzbulbusseptierung des Hühnerembryos, Anat. Anz. Ergz. H., 130: 279–286, 1972.
- [64] — The tissue dynamics of heart morphogenesis. I. The phenomena of cell death. B. Topography, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 138: 241–253, 1972.
- [65] POLLAK R. D., FALLON J. F., Protein synthesis in prospectively necrotic cells in the wing bud of the chick embryo, Ann. Zool., 708, 1972.
- [66] POTTS D., RACEY P., A light and electron microscope study of early development in the bat *Pipistrelus pipistrelus*, Micron, 2: 322–348, 1971.
- [67] R MERT P., GAUGIN J., The early development of the median thyroid gland of the mouse. A light -, electron - microscopic and histochemical study, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 139: 319–336, 1973.
- [68] SAUNDERS J. W., Death in embryonic systems, Science, 154: 604–612, 1966.
- [69] SAUNDERS J. W., GASSELING M. T., SAUNDERS L. C., Cellular death in morphogenesis of the avian wing, Develop. Biol. 5: 147–178, 1962.
- [70] SCHLÜTER G., Ultrastructure observations on cell necrosis during formation of the neural tube in mouse embryos, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 141: 251–264, 1973.
- [71] SCWEICHEL J. U., Das elektronenmikroskopische Bild des Abbaues der epithelialen Scheitelleiste während der Extremit tenentwicklung bei Rattenfeten, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 136: 192–203, 1972.
- [72] SEINSCH W., SCHWEICHEL J. U., Physiologic cell necrosis during the early development of muscles of the back in embryonic mice, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 145: 101–112, 1974.
- [73] SVAJGER A., Cell death as a normal biological phenomenon, Lijecni ki Vjestnik, 90: 843–856, 1968.
- [74] WILSON I. B., SMITH M. S., Primary trophoblastic invasion at the time of

nidation, [w] *Ovo - implantation*, eds. Hubinot P. O., Leroy F., Robyn C., and Leleux P., Karger, Basel, 1970.

[75] ZWILLING E., The development of the dominant rumplessness in chick embryos, *Genetics*, 27: 641-656, 1942.

[76] — Limb morphogenesis, *Adv. Morphog.*, 1: 301-330, 1961.

Otrzymano: 2 lutego 1977.

Przyjęto: 14 marca 1977.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166, 02 - 766 Warszawa.

W dniach 28-29 sierpnia 1978 r. odbędzie się w Paryżu Posiedzenie Międzynarodowej Federacji Klubów Tkanki Łącznej o następującej tematyce:

1. Molekularna morfologia makromolekuł tkanki łącznej.
 2. Interakcja między makromolekułami substancji podstawowej.
 3. Biosynteza makromolekuł.
 4. Degradacja makromolekuł w prawidłowej i patologicznej tkance.
 5. Struktura i metabolizm tkanki kostnej.
 6. Molekularne i komórkowe aspekty chorób tkanki łącznej.
- Ponadto przewidziane są posiedzenia 10 komisji roboczych.

Informacji udziela:

Secrétariat Général:
Laboratoire de Biochimie
du Tissue Conjonctif
Faculté de Médecine
Université Paris — Val de Marne
6, rue du Général Sarrail 94000 Creteil
Tel. 207 51-41 poste 95-01

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne, składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę**, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

R. FARBISZEWSKI, Białka powierzchni komórki związane z transformacją nowotworową	225
K. WOROWSKI, Proteoliza komórkowa i mechanizmy jej regulacji	243
B. GABARA, Kaloza w komórkach roślinnych w świetle nowych badań	279
Z. BIELAŃSKA - OSUCHOWSKA, Obumieranie komórek w czasie rozwoju zarodkowego	303