

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 5 - NR 1**

**1978 (1-92)**

**Postępy  
Biologii  
Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>



Kwartalnik  
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydany z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, 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 530 + 110 egz. Ark. wyd. 9,25; Ark. druk. 5<sup>7/8</sup> + 1,5 wkł. Papier druk. sat. III kl. 80 g,  
70 × 100 cm. Oddano do składania w listopadzie 1977 r. Podpisano do druku w lutym 1978 r.  
Druk ukończono w marcu 1978 r. Zam. 1606/77. — M-10. Cena zł 20.--

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## ROLA FOSFOLIPIDÓW W PROCESIE PRZEPUSZCZALNOŚCI BŁON

## THE ROLE OF PHOSPHOLIPIDS IN THE PERMEABILITY OF MEMBRANES

Joanna STROSZNAJDER

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk  
Zespół Neurochemii, Warszawa

*Streszczenie.* W pracy omówiono specyficzny i niespecyficzny udział łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz polarnych grup fosfolipidów w procesie transportu jonów i niektórych metabolitów. Zwrócono uwagę na rolę połączeń lipidowo-białkowych w błonie oraz wpływ cholesterolu na właściwości komponenty fosfolipidowej błony.

*Summary.* The specific and nonspecific role of fatty acid chains and polar-head groups of phospholipids on the transport of ions and some other metabolites is presented. Special attention is devoted to lipid-protein interactions in membranes and to the influence of cholesterol on the behaviour of the membrane phospholipids.

POŁĄCZENIA LIPIDOWO-BIAŁKOWE ORAZ ROLA CHOLESTEROLU  
W PROCESIE PRZEPUSZCZALNOŚCI BŁON

Złożona budowa biochemiczna błon biologicznych oraz ich funkcjonalna specjalizacja stanowią dużą przeszkodę w określeniu specyficznej roli każdej z komponent błony. Udział poszczególnych składników błony w jej funkcji na poziomie molekularnym nie jest całkiem jasny. Niemniej jednak odnośnie fosfolipidów wiadomo, że biorą one udział w procesie chemicznego i elektrycznego pobudzenia oraz w procesie aktywnego transportu jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ . Fosfolipidy odgrywają istotną rolę w procesach oksydacyjnej fosforylacji, selektywnej przepuszczalności, w procesach fagocytozy i pinocytozy oraz w innych bardziej ogólnych funkcjach błony warunkujących jej stabilność. Badania zmierzające do określenia zależności między strukturą komponenty fosfolipidowej



błón a funkcją prowadzono na modelowych błonach fosfolipidowych, na błonach biologicznych modyfikowanych działaniem enzymów lipolitycznych lub rozpuszczalników organicznych oraz na błonach biologicznych modyfikowanych naturalnie w okresie rozwoju ontogenetycznego.

Modelowe błony fosfolipidowe wykazują szereg właściwości analogicznych do właściwości błon biologicznych, takich jak: przepuszczalność dla wody, napięcie śródścienne i pojemność elektryczna. W przeciwieństwie do błon biologicznych są one słabo przepuszczalne dla jonów i innych rozpuszczalnych w wodzie metabolitów. Przepuszczalność ich wzrasta po połączeniu się z białkami, polipeptydami, dwuwartościowymi metalami itd. Możliwość modyfikowania przepuszczalności modelowych błon fosfolipidowych przez inne komponenty błon jest zagadnieniem bardzo ważnym. Jednowarstwowe błony fosfolipidowe używa się do badań procesu transportu. Dwuwarstwowe błony fosfolipidowe są idealne w badaniach parametrów elektrycznych. Liposomy, czyli dwuwarstwowe pęcherzyki fosfolipidowe, służą przeważnie do pomiaru współczynników dyfuzji. Oczywiście wyniki badań uzyskane na wszystkich rodzajach modelowych błon lipidowych uzupełniają się wzajemnie.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono termicznym przejściom fazowym lipidów w błonach biologicznych [1, 7]. W temperaturach fizjologicznych błony biologiczne znajdują się w stanie płynno-krystalicznym. Stan ten uzależniony jest od ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach błon. Przejście lipidów z postaci żelu do postaci płynno-krystalicznej i odwrotnie może wpływać na szereg właściwości błon. Stwierdzono, że bierny transport nieelektrolitów przez błony *Acholeplasma laidlawii* w temperaturach zakresu przejść fazowych lipidów zachodzi głównie w regionach błony pozostającej w stanie płynno-krystalicznym [7]. Błony *Acholeplasma laidlawii* i *E. coli*, w przypadku gdy wszystkie lipidy znajdują się w stanie żelu, wykazują znacznie niższy stopień wytrzymałości na działanie sił mechanicznych i osmotycznych. Przejście lipidów ze stanu żelu do stanu płynno-krystalicznego podlega silnym wpływom pH oraz jonów dwuwartościowych. Oddziaływanie ujemnie naładowanych polarnych grup fosfolipidów z dwuwartościowymi kationami ogranicza ruchliwość łańcuchów kwasów tłuszczowych. Podobny efekt obserwowano w przypadku oddziaływania fosfolipidów posiadających dodatni ładunek elektryczny z anionami oraz podczas wzajemnego oddziaływania fosfolipidów z ujemnym i dodatnim ładunkiem. Przejścia fazowe lipidów mogą wpływać na lipidowo-białkowe połączenia w błonie. Z drugiej strony, białka wywierają wpływ na temperaturę przejść fazowych lipidów [7, 9, 47]. Stwierdzono, że tylko białka, które mają dodatni ładunek w pH fizjologicznym wpływają na molekularną organizację lipidów, na temperaturę przejść fazowych oraz na wzrost prze-



puszczalności błon. Na właściwości błon biologicznych istotny wpływ wywiera również cholesterol. Jest on obecny w znacznych ilościach w większości błon komórkowych z wyjątkiem błon mitochondrialnych i błon bakterii. Rola cholesterolu w błonach biologicznych nie jest dokładnie znana. Na podstawie licznych prac wiadomo, że odgrywa on istotną rolę w przepuszczalności błon i w ich osmotycznej oporności. Dane uzyskane na podstawie badań prowadzonych na wszystkich trzech rodzajach modelowych błon lipidowych wykazują, że cholesterol wywiera silny wpływ na ułożenie cząsteczek fosfolipidów i na ruchliwość łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów [8]. Dodanie cholesterolu do fosfolipidów powoduje nowy stan błony, bardziej skondensowany powyżej ich temperatury przejścia w porównaniu do czystych fosfolipidów i bardziej płynny poniżej ich temperatury przejścia [18]. Reasumując można powiedzieć, że cholesterol wywołuje „pośredni stan płynności błon” [2, 18]. Obniża on przepuszczalność pęcherzyków fosfolipidowych dla jonów, wody i metabolitów. Powoduje wzrost elektrycznej pojemności i oporności. W wyniku jego działania błony wykazują zwiększoną stabilność i mogą wytrzymywać zmiany temperatury w szerszych granicach bez pojawiania się przejść fazowych [22, 30]. Błony synaptosomalne, podobnie jak inne błony biologiczne, wykazują zdolność termicznych przejść fazowych, podczas których łańcuchy kwasów tłuszczowych fosfolipidów przechodzą ze stanu  $\alpha$  - krystalicznego do stanu płynnych węglowodorów [44]. Wysoki poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błon utrzymuje ją w płynno - krystalicznym stanie i umożliwia translokację małych cząsteczek przez błonę [6].

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są bogato reprezentowane w fosfolipidach błon synaptosomalnych [43] i jak wynika z badań Sun [44], dynamiczny stan łańcuchów kwasów tłuszczowych odgrywa istotną rolę w transporcie norepinefryny w synaptosomach oraz w aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$  - azy (EC 3.6.1.4).

W mózgach ssaków aktywne wychwytywanie norepinefryny do presynaptycznych zakończeń jest ważnym procesem związanym bezpośrednio z jej fizjologicznym efektem. Sun badała wpływ fosfolipazy A (EC 3. 1.1.4) i fosfolipazy C (EC 3.1.4.3) na aktywne wychwytywanie norepinefryny we frakcji synaptosomalnej [41, 44]. Poza tym badała ona wpływ procesu peroksydacji kwasów tłuszczowych fosfolipidów na aktywność  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$  - azy [42]. Aktywność procesu wychwytywania norepinefryny przez synaptosomy w wyniku działania fosfolipazy A obniżała się o około 40% w porównaniu do wartości kontrolnych. Inhibycyjny efekt działania fosfolipazy A, jak wynika z badań doświadczalnych, nie jest wywołany działaniem uwalniających się w reakcji kwasów tłuszczowych. Egzogenne kwasy tłuszczowe pozostawały bez wpływu na



proces wychwytywania norepinefryny. Lizolecytyna hamowała ten proces podobnie jak inne detergenty. Mechanizm transportu norepinefryny nie jest w pełni wyjaśniony. Prawdopodobnie wchodzi ona w połączenia z białkiem transportującym. Fosfolipaza rozrywa wiązania lipid-białko i białko-białko w błonie i może powodować zmiany w strukturze białek transportujących. Zmiany konformacyjne białek błon plazmatycznych w wyniku działania fosfolipazy A były postulowane na podstawie zmian aktywności optycznej [12] oraz elektronowego rezonansu spinowego [40]. Działanie fosfolipazą A i fosfolipazą C powodowało hamowanie aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy w błonach synaptosomalnych. W wyniku działania fosfolipazą C nie obserwowano hamowania wychwytywania norepinefryny we frakcji synaptosomalnej. Efekt fosfolipazy A na proces transportu norepinefryny oraz na aktywność  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy ma ważne fizjologiczne znaczenie w ośrodkowym układzie nerwowym, bowiem występuje ona w białej i szarej substancji mózgu ssaków i człowieka [4]. Wzrost aktywności fosfolipazy A w mózgu w niektórych stanach patologicznych, m. in. w niektórych postaciach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, w ewidentny sposób może wpływać na przewodnictwo synaptyczne, a tym samym na wyższe funkcje psychiczne mózgu.

W badaniach Strosznajder i wsp. [34, 36, 38] oraz Majewskiej i wsp. [24, 25] stwierdzono, że w warunkach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego wzrasta poziom wolnych kwasów tłuszczowych oraz obniża się poziom fosfolipidów zarówno w niektórych częściach anatomicznych mózgu, jak również we frakcji mitochondrialnej i mikrosomowej homogenatu mózgu. Wyniki tych badań świadczą o wzroście aktywności fosfolipazy  $A_1$  i  $A_2$  w tym stanie. Równocześnie stwierdzono aktywację wolnorodnikowego utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon [25, 35, 38]. Procesy peroksydacji lipidów doprowadzają do obniżenia poziomu całej puli nienasyconych kwasów tłuszczowych. Procesy te, zachodzące w wyniku niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, mogą wpływać bezpośrednio na zaburzenia procesu transportu jonów, neurotransmitterów, szeregu metabolitów i mogą leżeć u podłoża zaburzeń funkcji ośrodkowego układu nerwowego w wyniku jego niedotlenienia.

#### WPLYW ŁAŃCUCHÓW KWASÓW TŁUSZCZOWYCH FOSFOLIPIDÓW NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON

Wpływ długości łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz stopnia ich nienasycenia na przepuszczalność błon fosfolipidowych badał po raz pierwszy Gier i wsp. [11]. Doświadczenia prowadzono z uwzględnieniem



różnych preparatów syntetycznej fosfatydylocholiny o różnej długości łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz różnej ilości nienasyconych wiązań. Stopień pęcznienia pęcherzyków fosfolipidowych służył za pomiar przepuszczalności. Na podstawie tych badań stwierdzono, że krótkie łańcuchy kwasów tłuszczowych, a także podwójne wiązania wyraźnie zwiększają przepuszczalność pęcherzyków fosfatydylocholinowych. Stwierdzono również, że na stopień przepuszczalności pęcherzyków fosfolipidowych ma istotny wpływ poziom „niezbędnych kwasów tłuszczowych”, mianowicie kwasu linolowego i linolenowego. Zagadnienie to opracowywano w następnych latach zarówno na modelowych błonach fosfolipidowych, jak również na błonach biologicznych. Boland i Martonosi [2] w badaniach zmian rozwojowych endoplazmatycznego retikulum stwierdzili ścisłą zależność między wzrostem transportu jonów wapnia a zmianami składnika lipidowego błon. Równocześnie badano ultrastrukturę tych błon [17]. Analizowano składniki białkowe i lipidowe błon oraz skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon endoplazmatycznego retikulum z mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego kurcząt w rozwoju ontogenetycznym. Stwierdzono, że wzrostowi aktywności ATP - az, wzrostowi aktywności transportu jonów wapnia oraz wzrostowi stężenia białek fosforylowanych towarzyszy obniżenie poziomu fosfolipidów i cholesterolu w błonach endoplazmatycznego retikulum. Równocześnie obserwowano zmiany w składzie kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon. Zwiększał się poziom kwasu linolowego i obniżał poziom nasyconych kwasów tłuszczowych. Zmiany w stopniu nienasycenia i długości łańcuchów kwasów tłuszczowych mikrosomalnych fosfolipidów są istotne w utrzymaniu właściwej płynności lipidowej składowej błony w temperaturach fizjologicznych. Widoczna jest korelacja między występowaniem i wzrostem aktywności cząsteczki białka enzymatycznego ATP - azy a składem kwasów tłuszczowych fosfolipidów w rozwoju [2]. Można przyjąć, że synteza podstawowych składowych błon zarówno lipidów, jak i białek zachodzi niezależnie, ale jest tak skorelowana, że np. skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon staje się optymalny w momencie, gdy ATP - aza zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  jest w pełni aktywna. Stworzone zostaje wówczas odpowiednie środowisko dla aktywności enzymu. Można sugerować, że sprzężenie aktywności ATP - azy z transportem jonów wapnia, jak również połączenie podjednostek enzymu w kompleks aktywnej ATP - azy lub przyłączenie białka enzymatycznego do błony wymaga udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych. Nie wydaje się bowiem prawdopodobne, żeby udział fosfolipidów w procesie transportu wapnia ograniczał się jedynie do prostej funkcji przepuszczalności. Fosfolipidy zawierające nasycone kwasy tłuszczowe stanowią barierę dla przepuszczalności jonów wapnia [2]. Stwierdzono, że przepuszczalność



błon mikrosomalnych dla wapnia była od 4 do 6 razy większa aniżeli sztucznych błon dwuwarstwowych z fosfolipidów uzyskanych z endoplazmatycznego retikulum. Doświadczenia prowadzono w temperaturze 25°C w buforze 10<sup>-2</sup> M Tris-HCl pH 8,0. Inne składowe błon decydują w dużej mierze o ich przepuszczalności dla jonów. Działanie fosfolipazami lub enzymami proteolitycznymi na naładowane wapniem mikrosomy wskazuje, że zarówno fosfolipidy, jak i białka odgrywają istotną rolę w regulacji przepuszczalności błon dla jonów wapnia. W celu dokładnego określenia roli fosfolipidów w tym procesie Boland i wsp. [3] badali szybkość uwalniania jonów wapnia z pęcherzyków lipidowych przygotowanych z czystej fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloseryny, fosfatydyloinozytolu, kardiolipidów oraz wyekstrahowanych lipidów mikrosomowych. Stwierdzili oni, że szybkość wypływu jonów była w granicach 10<sup>-15</sup>-10<sup>-18</sup> mol · cm<sup>-2</sup> · sek<sup>-1</sup>. Była ona kilkakrotnie niższa w porównaniu z pasywnym wypływem wapnia z izolowanych błon endoplazmatycznego retikulum. Na podstawie badań doświadczalnych stwierdzono, że przepuszczalność błon dla jonów wapnia uzależniona jest od składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów i że wyraźnie wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Dokonano pomiaru szybkości uwalniania jonów <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> z pęcherzyków fosfolipidowych o różnym składzie kwasów tłuszczowych. Okazało się, że pęcherzyki przygotowane z dwuoleilofosfatydylocholiny, składającej się w 100% z kwasu oleinowego (18:1), charakteryzują się wysoką przepuszczalnością dla jonów Ca<sup>++</sup>, szczególnie w wyższych temperaturach. Pęcherzyki fosfolipidowe przygotowane z fosfatydylocholiny mózgu wołu, a w szczególności z lecytyny jaja charakteryzuje znacznie niższa przepuszczalność dla jonów wapnia. Pasywny transport wapnia przez błony fosfolipidowe może zachodzić w wyniku jednego lub kilku możliwych mechanizmów, m. in. w wyniku procesu przenikania przez płynne błony lipidowe. Szybkość przenikania Ca<sup>++</sup> przez dwuwarstwową błonę lipidową wynosi 10<sup>-16</sup>-10<sup>-18</sup> mol · cm<sup>-2</sup> · sek<sup>-1</sup>. Szybkość przenikania Ca<sup>++</sup> w wodzie wynosi 7 × 10<sup>-6</sup> mol · cm<sup>-2</sup> · sek<sup>-1</sup>. Różnica ta uwarunkowana jest znacznie mniejszą rozpuszczalnością Ca<sup>++</sup> w fazie lipidowej aniżeli w fazie wodnej. Transport jonów Ca<sup>++</sup> w fazie lipidowej może zachodzić za pomocą ruchomych przenośników. W przypadku dwuwarstwowych błon fosfolipidowych rolę przenośników mogłyby spełniać cząsteczki fosfolipidu wchodzące w interakcję z jonami na jednej stronie błony i przenoszące je na drugą stronę błony [3]. Istnieje również możliwość przenikania jonów przez pory. W błonie fosfolipidowej mogłaby wytwarzać się zależna od temperatury równowaga między fazą dwuwarstwową a cylindrycznymi i sferycznymi micelami, które tworzą hydrofilne kanały przechodzące przez dwuwarstwową błonę. Stanowią one drogę dla przenika-



nia jonów. Badano również szybkość przenikania jonów wapnia z pęcherzyków przygotowanych z mikrosomalnych fosfolipidów ekstrahowanych acetonem-eterem oraz chloroformem-metanolem. Szybkość wypływu  $\text{Ca}^{++}$  z pęcherzyków lipidowych ekstrahowanych acetonem i eterem była znacznie większa aniżeli z pęcherzyków otrzymanych z lipidów po ekstrakcji chloroformem-metanolem. W tym ostatnim przypadku mniejsza szybkość przenikania jonów  $\text{Ca}^{++}$  spowodowana była ekstrakcją cholesterolu, który jak wiadomo obniża wypływ jonów poprzez ograniczenie ruchliwości łańcuchów kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon [21, 22]. Zgodnie z badaniami Fiehna i wsp. oraz Hasselbacha i wsp. [10, 13, 14] komponenta lipidowa endoplazmatycznego retikulum nie tylko jest konieczna w procesie translokacji jonów i hydrolizy ATP, lecz także odgrywa istotną rolę w procesie syntezy i hydrolizy białek fosforylowanych.

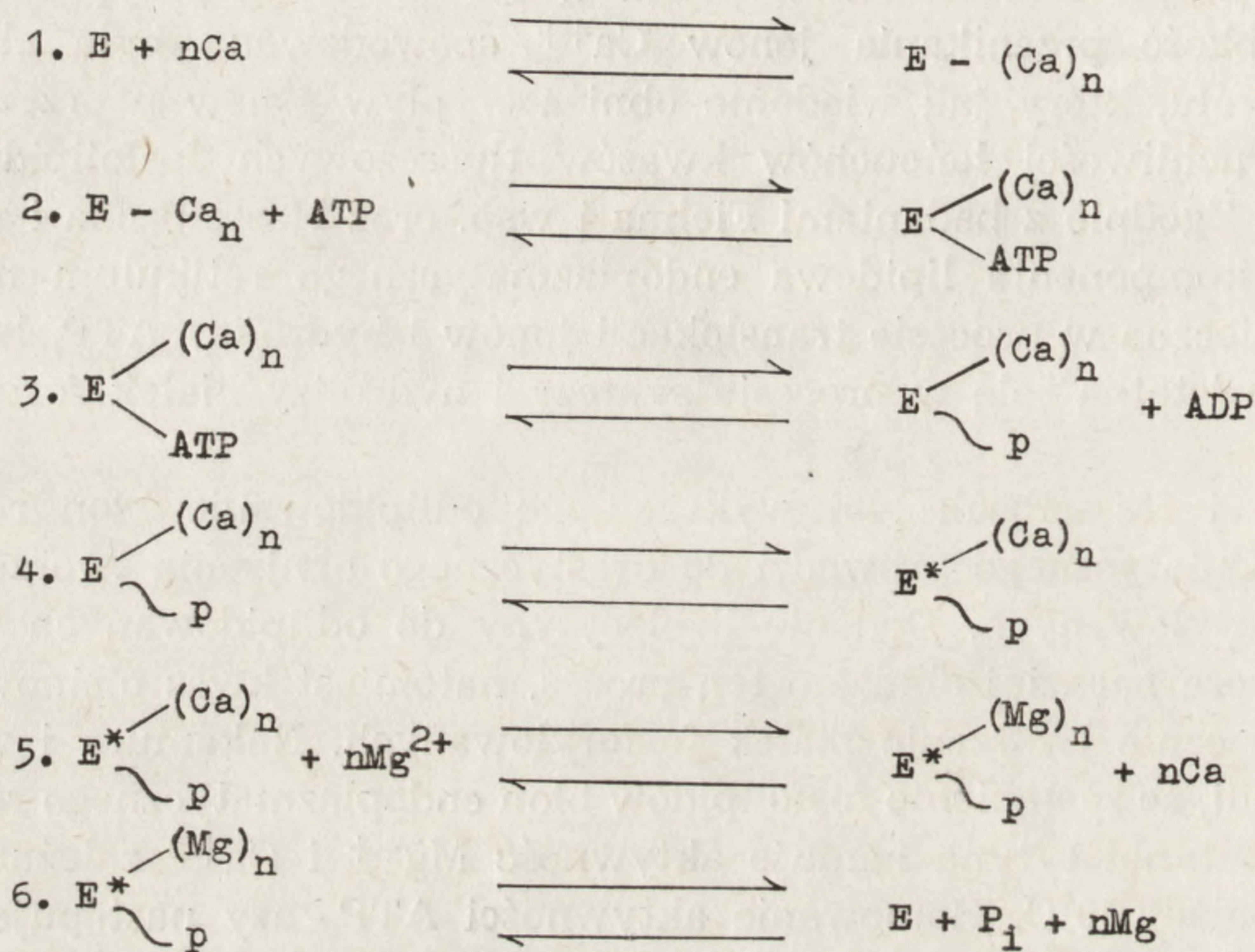
The i Hasselbach [46] wykazali, że odlipidowanie błon retikulum sarkoplazmatycznego prowadzi do drastycznego obniżenia tworzenia białek fosforylowanych. Dodanie lizolecytyny do odlipidowanych preparatów jeszcze bardziej obniżało ten proces, natomiast kwas oleinowy aktywuje znacznie tworzenie białek fosforylowanych. Nakamura i wsp. [31] stwierdzili, że zastąpienie fosfolipidów błon endoplazmatycznego retikulum dwupalmitynolecyną hamuje aktywność  $\text{Mg}^{++}$  i  $\text{Ca}^{++}$  zależnej ATP-azy poniżej  $40^{\circ}\text{C}$ . Hamowanie aktywności ATP-azy następuje w wyniku hamowania rozpadu kompleksu enzymu z fosforanem. Wskaźnik tworzenia białek fosforylowanych ulegał obniżeniu w znacznie mniejszym stopniu. Hamujący efekt dwupalmitynolecytyny na aktywność ATP-azy jest prawdopodobnie związany ze stopniem płynności węglowodorowych łańcuchów w błonie. Nasycone kwasy tłuszczowe hamują zmiany konformacyjne enzymu prowadzące do translokacji wapnia i rozpadu kompleksu enzymu z fosforanem.

Prawdopodobny mechanizm hydrolizy ATP w procesie transportu jonów wapnia i udziału w nim jonów magnezu obrazują reakcje przedstawione na schemacie 1. Translokacja wapnia zachodzi w wyniku zmian konformacyjnych enzymu, a uwolnienie jonów wapnia z kompleksu z enzymem zachodzi na zasadzie wymiany z jonami magnezu przy równoczesnej hydrolizie grupy fosforanowej enzymatycznego białka fosforylowanego.

Transport jonów wapnia przez błony sarkoplazmatyczne jest hamowany przez różne czynniki, które wchodzi w reakcję z komponentą lipidową błony. Hamowanie wychwytywania jonów wapnia przez izolowane pęcherzyki i hamowanie aktywności zależnej od wapnia ATP-azy stwierdzono w wyniku działania detergentów oraz fosfolipaz [5, 26–29]. Delikatne działanie eterem na błony endoplazmatycznego retikulum



wpływa tylko na proces gromadzenia jonów wapnia. Aktywność zależnej od wapnia ATP - azy pozostaje nie zmieniona. Podobny efekt wywołują kwasy tłuszczowe w niskich stężeniach. Fiehn i Hasselbach [10] w wyniku działania fosfolipazą A obserwowali hamowanie nagromadzania jonów  $\text{Ca}^{++}$  w błonach endoplazmatycznego retikulum prawdopodobnie



Schemat 1. Translokacja jonów wapnia w błonach endoplazmatycznego retikulum według Nakamury i wsp. [31]

E i E\* — dwie różne formy konformacyjne enzymu

w wyniku wzrostu przepuszczalności błon dla wapnia. Podobną obserwację uzyskano w wyniku działania fosfolipazy C. Intensywna degradacja fosfolipidów doprowadza do obniżenia i utraty aktywności zależnej od wapnia ATP - azy i do hamowania wychwytywania jonów wapnia w procesie aktywnego transportu.

W przypadku nadtrawienia błon fosfolipazą w niewielkim stopniu, usuwając produkty hydrolizy fosfolipidów poprzez związanie ich z albuminą bydlęcą, można przywrócić zdolność nagromadzania jonów wapnia. Dodanie obu produktów hydrolizy fosfolipidów do nietkniętych błon może spowodować naruszenie struktury błon, utworzenie się otworów oraz przecieków i obniżenie zdolności nagromadzania jonów wapnia. Przy wysokim stopniu nadtrawienia błon usuwanie produktów hydrolizy fosfolipidów nie wywiera już korzystnego efektu na obniżoną zdolność nagromadzania jonów wapnia.

Łazarewicz i wsp. [23] zaobserwowali, że kwas oleinowy w stężeniu 50 nmoli/mg białka mitochondrialnego hamuje nagromadzenie wapnia



w mitochondriach w procesie związanym z utlenianiem bursztynianu. Nagromadzenie jonów wapnia w mitochondriach w obecności bursztynianu i rotenonu jest silnie hamowane przez kwas oleinowy, podczas gdy ATP i  $Mg^{++}$  nie ulegają zmianie w obecności bursztynianu.

Użyte do badań *in vitro* stężenia kwasu oleinowego odpowiadały stężeniu wolnych kwasów tłuszczowych, stwierdzanych we frakcji mitochondrialnej z mózgu zwierząt poddanych 5 min ischemii podekapitacyjnej. Stwierdzono, że nagromadzenie jonów wapnia w mitochondriach, wyizolowanych z mózgu zwierząt poddanych ischemii, jest wyraźnie obniżone. Zmiany te zachodzą równolegle z rozprężeniem procesu oksydacyjnej fosforylacji. Równocześnie obserwowano obniżenie poziomu fosfolipidów błon mitochondrialnych z towarzyszącym temu zjawisku wzrostem poziomu wolnych kwasów tłuszczowych. Sugerowano, że wolne kwasy tłuszczowe, uwolnione w mitochondriach mózgu w wyniku wzrostu aktywności fosfolipazy  $A_2$  w warunkach ischemii, są prawdopodobnie inhibitorami oksydacyjnej fosforylacji i czynnikiem hamującym gromadzenie jonów wapnia w mitochondriach. Strosznajder [39] zaobserwowała obniżenie masywnego nagromadzenia jonów wapnia w mitochondriach z mózgu zwierząt poddanych zarówno ischemii podekapitacyjnej, jak i hipoksji (2 - godzinne niedotlenienie w atmosferze azotu z 8%  $O_2$ ). W tym ostatnim przypadku stopień hamowania procesu gromadzenia jonów wapnia był znacznie mniejszy.

TABELA 1

Wpływ ischemii i niedotlenienia na proces nagromadzania jonów wapnia w mitochondriach mózgu szczura

	Kontrola	Ischemia	Hipoksja
nmole $Ca^{2+}$ /mg białka	$1437 \pm 153$ (6)	$929 \pm 48$ (3)	$1184 \pm 42$ (3)
inhibicja w stosunku do wartości kontrolnej (%)		35,4	17,6

Mitochondria inkubowano w środowisku zawierającym 0,30 M sacharozę, 5 mM bufor tris-HCl pH 7,4, 2 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 5 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM bursztynian, 2,5  $\mu M$  rotenon, 3 mM Na-ATP, 1 mM  $CaCl_2$ , 0,3 mg białka. Czas inkubacji 2,5 min w temperaturze 37°C. W nawiasach liczba doświadczeń.

W celu wykazania zależności między zaburzonym procesem wychwytywania jonów wapnia w niedotlenieniu a stanem składowej fosfolipidowej błon, przebadano wpływ kwasu oleinowego, lizofosfatydyloetanoloaminy i fosfolipazy A i C na proces gromadzenia wapnia w mitochondriach. Okazało się, że wszystkie wymienione czynniki hamują ten proces. Obniżenie gromadzenia jonów wapnia obserwowano również po zadziałaniu detergentami, takimi jak dezoksyholan sodu i siarczan dodecyłu. Na podstawie uzyskanych wyników należy sądzić, że niespecyficzne zmiany komponenty fosfolipidowej błon oraz działanie obu



TABELA 2

Wpływ kwasu oleinowego, lizofosfatydyloetanoloaminy i detergentów na proces nagromadzenia jonów wapnia przez mitochondria z mózgu dorosłych szczurów

Warunki	Nagromadzenie jonów wapnia nmole/mg białka	Inhibicja %	Wartość kontrolna %
Kontrola	1485 ± 171 (4)		
+ kwas oleinowy 100 nmoli/mg białka	1093 ± 104 (4)	26,4	73,6
+ lizofosfatydyloetanoloamina 100 nmoli/mg białka	1153 ± 49 (4)	22,4	77,6
+ dezoksyholan sodu 0,05%	1306 ± 22 (2)	12,1	87,9
+ dezoksyholan sodu 0,1%	1132 ± 4 (2)	23,8	76,2
+ siarczan dodecyłu 0,125%	1211 ± 8 (2)	18,5	81,5
+ fosfolipaza A 2 µg/mg białka		47,0	53,0
+ fosfolipaza C 0,5 mg/mg białka		43,7	56,3

Warunki inkubacji i środowisko inkubacyjne jak w tabeli 1. Wartość kontroli dla doświadczeń z fosfolipazami; 967 ± 186 nmoli/mg białka.

produktów hydrolizy fosfolipidów na procesy oksydacyjne komórki i stan błon ogranicza proces gromadzenia jonów wapnia w mitochondriach.

Zależność procesu przenikania od składu kwasów tłuszczowych komponenty lipidowej błony obserwował również Klein i wsp. [19] w badaniach procesu wpływu aminokwasów z pęcherzyków lecytynowych. Aminokwasy przenikały znacznie szybciej z pęcherzyków utworzonych z lecytyny zawierającej wielonienasycone kwasy tłuszczowe, przy czym przenikały szybciej hydrofilne kwasy o małej cząsteczce i to według następującej kolejności:

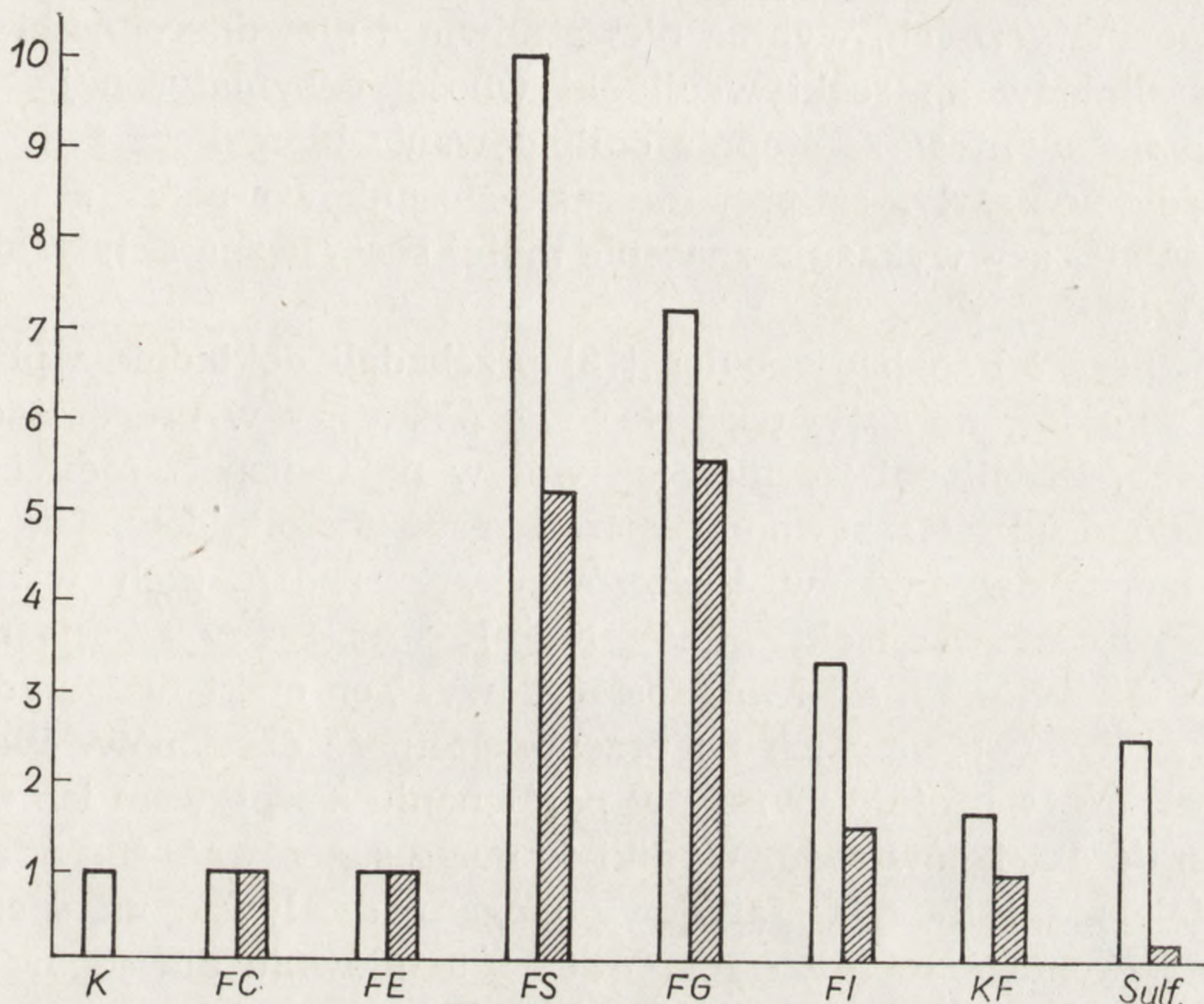
fenyloalanina } metionina } leucyny } lizoleucyny } norleucyna }  
alanina } glicyna } histydyna

#### ROLA POLARNYCH GRUP FOSFOLIPIDÓW W PROCESIE TRANSPORTU

Udział fosfolipidów w procesie transportu oraz w aktywności enzymów był stwierdzany przez szereg badaczy. Zagadnieniem nie rozwiązany pozostawała w wielu przypadkach specyficzność tego zapotrzebowania. Hokin L. E. i Hokin M. R. [15] wysunęli hipotezę, że w procesie transportu jonów sodu bierze udział kwas fosfatydowy. Kwas fosfatydowy miał pełnić funkcję przenośnika jonów. Hokin zmodyfikował jednak swoją hipotezę odnośnie do mechanizmu transportu jonów sodu. Przyjął, że sód wiąże się z komponentą białkową tworząc kompleks: kwas fosfatydowy-białko. Dwuglicerydy powstające w procesie defosforylacji kwasu



fosfatydowego zmieniałyby konformację białka, a co się z tym wiąże, powinowactwo jego do jonów sodu. Sód byłby wiązany i uwalniany przez kompleks lipidowo - białkowy w wyniku cyklicznych zmian kwasu fosfatydowego i dwuglicerydu. W kolejnej pracy analizowano udział fosfoli-



Wykres. Wpływ różnych lipidów na wskaźnik przepuszczalności  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  i na reaktywację  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$ . Kolumny białe przedstawiają aktywację  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$  wyrażoną jako stosunek aktywności enzymu po dodaniu lipidów do aktywności enzymu pozbawionego lipidów. Kolumny zakreskowane przedstawiają wskaźnik dyfuzji  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  przez pęcherzyki lipidowe

K — kontrolna aktywność odlipidowanej ATP-azy  $0,8 \mu\text{mola Pi/mg białka/godz.}$ , FC — fosfatydylocholina, FE — fosfatydyloetanoloamina, FS — fosfatydyloseryna, FG — fosfatydyloglicerol, FI — fosfatydyloinozytol, KF — kwas fosfatydowy, Sulf. — sulfatydy. (według Kimelberg, Papahadjopoulos [18])

pidów w aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$  [16]. Kimelberg i Papahadjopoulos [18, 33] postanowili określić specyficzność udziału fosfolipidów w aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$  i w transporcie jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Wcześniejsze badania wykazały, że fosfatydyloseryna powodowała wzrost aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$  w erytrocytach poddanych uprzednio działaniu fosfolipazy. Nie wykazywał tych właściwości ani fosfatydyloinozytol, ani fosfatydyloetanoloamina. Tanaka [45] stwierdził, że zdolność reaktywowania aktywności enzymu  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-azy}$  z frakcji mikrosomalnej mózgu poddanej uprzednio działaniu dezoksycholenu posiada fosfatydylocholina.

Ostatnie badania wskazują na specyficzną rolę fosfatydyloseryny,



niemniej jednak Noguchi [23] uważa, że kwas fosfatydowy i lizolecytyna mogą być równie aktywne jak fosfatydyloseryna, a nawet w pewnych warunkach może tę zdolność wykazywać cholesterol.

Wiele różnych danych, przytaczanych w literaturze odnośnie do aktywacji  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy przez fosfolipidy w odlipidowanych preparatach enzymatycznych, wynika niewątpliwie z niejednorodności używanych fosfolipidów do reaktywacji aktywności enzymatycznej. Niektóre różnice mogą wynikać ze stopnia odlipidowania błon. Poza tym badania Kimelberga wykazały, że preparaty ze stosunkowo niską aktywnością  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy wykazują znacznie mniej specyficzną aktywację przez fosfolipidy.

Kimelberg i Papahadjopoulos [18] przebadali dokładnie wpływ różnych fosfolipidów na aktywność  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy w preparatach odlipidowanych. Badali oni również ich wpływ na transport sodu i potasu. Uwzględniono udział zarówno polarnych grup fosfolipidów, jak również wpływ łańcuchów kwasów tłuszczowych. Z badań tych wynika, że w procesie reaktywacji aktywności  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy istotną rolę odgrywa fosfatydyloseryna i kwas fosfatydowy. Ten efekt fosfolipidów jest skorelowany z wpływem ich na przepuszczalność dla jonów. Dla jonów potasu jest on 10-krotnie wyższy w porównaniu z wpływem ich na przepuszczalność dla jonów sodu. Wyniki te mogą sugerować, że fosfatydyloseryna tak jak i kwas fosfatydowy mogą oddziaływać na specyficzne centrum kationowe  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy i to głównie dla jonów potasu.

Można z kolei uważać, że sulfatydy wykazują wpływ na przepuszczalność jonów sodu i mogą specyficznym sposobem wpływać na centrum kationowe w cząsteczce  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ -azy — w tym przypadku dla wiązania jonów sodu [18].

Kimelberg i Papahadjopoulos [18] zwrócili również uwagę na niezbędność łańcuchów kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon w aktywności enzymu. Stwarzają one w tym przypadku właściwe środowisko o niskiej stałej dielektrycznej i mogą umożliwiać zmiany topograficzne i konformacyjne enzymu.

Kogo i Aizawa [20] stwierdzili, że fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina wpływają na wzrost transportu nie ulegającej metabolizmowi 3 - O - methyl - [ $^{14}\text{C}$ ] - D - glukozy. W procesie transportu cukru w grę mógłby wchodzić specyficzny udział polarnych grup wymienionych fosfolipidów.

#### UWAGI KOŃCOWE

Specyficzny i niespecyficzny udział fosfolipidów w procesie przepuszczalności błon omówiono na podstawie wyników kilkudziesięciu prac eksperymentalnych z ostatnich lat. Aktualnie dostępne dane nie pozwa-



lają na wyciągnięcie ostatecznych wniosków i na bardziej syntetyczne omówienie zagadnienia. Prawidłowy skład biochemiczny błon warunkuje ich prawidłową funkcję biologiczną. W wyniku niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego stwierdzono zaburzenia metabolizmu fosfolipidów [24, 25, 35–38]. Zmiany składu ilościowego i jakościowego składowej lipidowej błon mogą wpływać na strukturę błon, na rodzaj i siłę oddziaływań wzajemnych między lipidami oraz między lipidami i białkami. Tego typu zaburzenia wywołane np. niedotlenieniem ośrodkowego układu nerwowego mogą z kolei zmieniać aktywność enzymów, wywierać wpływ na procesy transportu i przekaźnictwa synaptycznego.

#### LITERATURA

- [1] ASHE G. B., STEIM J. M., Membrane transitions in Gram-positive bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **233**: 810–814, 1971.
- [2] BOLAND R., MARTONOSI A., Developmental changes in the composition and function of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **249**: 612–623, 1974.
- [3] BOLAND A. R., JILKA R. L., MARTONOSI A. N., Passive  $Ca^{++}$  permeability of phospholipid vesicles and sarcoplasmic reticulum membranes, *J. Biol. Chem.*, **250**: 7501–7510, 1975.
- [4] COOPER M. F., WEBSTER G. R., The differentiation of phospholipase  $A_1$  and  $A_2$  in rat and human nervous tissues, *J. Neurochem.*, **17**: 1543–1554, 1970.
- [5] COLEMAN R., BRAMLEY T. A., Hydrolysis of erythrocyte membrane phospholipids by a preparation of phospholipase C from *Clostridium Welchii*. Deactivation of  $Ca^{++}$   $Mg^{++}$  ATP-ase and its reactivation by added lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **382**: 565–575, 1975.
- [6] DEENEN L. L. M. van, GIER J., In: "The Red Blood Cells": Chemical composition and metabolism of lipids in red cells of various animal species, Bishop Ch., Surgenor D. M., Academic Press, New York and London, 1964.
- [7] DEENEN L. L. M. van, GIER J., DEMEL R. A., de KRUYFF B., BLOK M. C., van der NEUT-Kok E. C. M., HAEST C. W. M., VERVERGAERT P. H. J. TH., VERKLEIJ A. J., Lipid-lipid and lipid protein interaction in model system of membranes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**: 124–141, 1975.
- [8] DEMEL R. A., van DEENEN L. L. M., PETHICA B. A., Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 11–19, 1967.
- [9] ELETR S., INESI G., Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes, *Biochim. Biophys. Acta*, **290**: 178–185, 1972.
- [10] FIEHN W., HASSELBACH W., The effect of phospholipase A on the calcium transport and the role of unsaturated fatty acids in ATP-ase activity of sarcoplasmic vesicles, *Eur. J. Biochem.*, **13**: 510–518, 1970.
- [11] BIER J., MANDERSLOOT J. G., van DEENEN L. L. M., Lipid composition and permeability of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**: 666–675, 1968.
- [12] GORDON A. S., WALLACH D. F. H., STRAUS J. H., The optical activity of plasma membranes and its modification by lysolecithin, phospholipase A and phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **183**: 405–416, 1969.



- [13] HASSELBACH W., SUKO J., STROMER M. H., Mechanism of calcium transport in sarcoplasmic reticulum, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**: 335-349, 1975.
- [14] HASSELBACH W., MAKINOSE M., ATP and active transport, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**: 132-136, 1962.
- [15] HOKIN L. E., HOKIN M. R., Studies on the Carrier. Function of phosphatidic acid in sodium transport I. The turnover of phosphatidic acid and phosphoinositide in the avian salt gland on stimulation of secretion, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 61-85, 1960.
- [16] HOKIN L. E., HEXRUM T. D., Studies on the characterization of the sodium - potassium transport adenosine triphosphatase. On the role of phospholipids in the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**: 453-463, 1972.
- [17] JILKA R. L., MARTONOSI A. N., TILLACK T. W., Effect of the purified  $[Mg^{++} + Ca^{++}]$ -activated ATP - ase of sarcoplasmic reticulum upon the passive  $Ca^{2+}$  permeability and ultrastructure of phospholipid vesicles, *J. Biol. Chem.*, **25**: 7511-7524, 1975.
- [18] KIMELBERG H. K., PAPAHAJDOPOULOS D., Phospholipid requirements for  $Na^{+} + K^{+}$  ATP - ase activity: head - group specificity and fatty acid fluidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 277-292, 1972.
- [19] KLEIN R. A., MOORE M. J., SMITH M. W., Selective diffusion of neutral amino acids across lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta.*, **233**: 420-433, 1971.
- [20] KOGO H., AIZAWA Y., Role of phospholipid in the effect of estradiol on sugar transport in rat uterus, *Japan J. Pharmac.*, **22**: 411-415, 1972.
- [21] KRUYFF B., GREFF W. J., van EYK R. V. M., DEMEL R. A., van DEENEN L. L. M., The effect of different fatty acid and sterol compositions on the erythritol flux through the cell membrane of *Acholeplasma laidlawii*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **298**: 479-499, 1973.
- [22] LAPPER R. D., PATERSON S. J., SMITH I. C. P., A spin label study of the influence of cholesterol on egg lecithin multi bilayers, *Can J. Biochem.*, **50**: 969-981, 1972.
- [23] ŁAZAREWICZ J. W., STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., Effect of cerebral ischemia on calcium transport in isolated brain mitochondria. VII International Congress of Neuropathology Budapeszt, Hungary 1-7 September 1974, *Experta Medica Akadémiac Kiado Amsterdam, Budapeszt*, 605-608, 1975.
- [24] MAJEWSKA D. M., ŁAZAREWICZ J. W., STROSZNAJDER J., Catabolism of mitochondrial membrane phospholipids in conditions of ischemia and barbiturate anesthesia, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **25**: 125-131, 1977.
- [25] — Free radical oxidation of mitochondrial membrane phospholipid in conditions of ischemia and barbiturate anesthesia, *Brain Res.*, in press.
- [26] MARTONOSI A., Role of phospholipids in ATP - ase activity and Ca transport of fragmented sarcoplasmic reticulum, *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **23**: 913-921, 1964.
- [27] — Solubilization of microsomal adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **243**: 71-81, 1968.
- [28] MARTONOSI A., DONLEY J., HALPIN R. A., Sarcoplasmic reticulum III. The role of phospholipids in the adenosine triphosphatase activity and  $Ca^{++}$  transport, *J. Biol. Chem.*, **243**: 61-70, 1968.
- [29] MARTONOSI A., DONLEY J. R., PUCCELL A. G., HALPIN R. A., Treatment of microsomes with phospholipase C of *Cl Welchii*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 529-540, 1971.



- [30] MINH - TAM B. D., SILBERT D. F., Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of *Escherichia coli* K - 12, *Biochim. Biophys. Acta*, **373**: 224-241, 1974.
- [31] NAKAMURA H., JILKA R. L., BOLAND R., MARTONOSI A. N., Mechanism of ATP hydrolysis by sarcoplasmic reticulum and the role of phospholipids, *J. Biol. Chem.*, **251**: 5414-5423, 1976.
- [32] NOGUCHI T., FREED S., Dissociation of lipid components and reconstitution at  $-75^{\circ}\text{C}$  of  $\text{Mg}^{2+}$  dependent  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{K}^{+}$  stimulated adenosine triphosphatase in rat brain, *Nat. New. Biol.*, **230**: 148-150, 1971.
- [33] PAPAHAJDOPOULOS D.,  $\text{Na}^{+}$  —  $\text{K}^{+}$  discrimination by "pure" phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**: 254-259, 1971.
- [34] STROSZNAJDER J., GROMEK A., ŁAZAREWICZ J., Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich, *Neuropat. Pol.*, **10**: 447-455, 1972.
- [35] STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., Peroxidation of fatty acids in microsomes prepared from normal and ischemic guinea pig brains, *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.*, **27**: 647-653, 1975.
- [36] STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., RADOMIŃSKA - PYREK A., Effect of hypoxia on enzymic synthesis of diacyl and ether types of choline and ethanolamine phosphoglycerides in rat brain microsomes. Proceedings of International Symposium "Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension" Warszawa 1975.
- [37] STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., Enzymic synthesis of ethanolamine plasmogens in the microsomal fraction of rat brain under oxygen deficiency, *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.*, **25**: 133-139, 1977.
- [38] — Effect of ischemic-anoxia and hypoxic-hypoxia on the lipid metabolism in the adult rat brain, *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.*, in press.
- [39] STROSZNAJDER J., Role of phospholipid in the active uptake of calcium by mitochondria from brain of adult rat submitted to ischemia and hypoxia, prepared for publication.
- [40] SIMPKINS H., TAY S., PANKO E., Changes in the molecular structure of axonal and red blood cell membranes following treatment with phospholipase  $\text{A}_2$ , *Biochem.*, **10**: 3579-3585, 1971.
- [41] SUN A. Y., SUN G. Y., SAMORAJSKI T., The effect of phospholipase C on the activity of adenosine triphosphatase and acetylcholinesterase in synaptic membranes isolated from cerebral cortex of Squirrel Monkey, *J. Neurochem.*, **18**: 1711-1718, 1971.
- [42] SUN A. Y., The effect of lipoxidation on synaptosomal  $\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}$  ATP - ase isolated from cerebral cortex of Squirrel Monkey, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 350-360, 1972.
- [43] SUN G. Y., SUN A. Y., Phospholipids and acyl groups of synaptosomal and myelin membranes isolated from the cerebral cortex of Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*), *Biochim. Biophys. Acta*, **280**: 306-315, 1972.
- [44] SUN A. Y., The effect of phospholipases on the active uptake of norepinephrine by synaptosomes isolated from the cerebral cortex of guinea pig, *J. Neurochem.*, **22**: 551-556, 1974.
- [45] TANAKA R., STRICKLAND K. P., Role of phospholipid in the activation of  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  activated adenosine triphosphatase of beef brain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**: 583-592, 1965.
- [46] THE R., HASSELBACH W., Properties of the sarcoplasmic ATP - ase recon-



stituted by oleate and lysolecithin after lipid depletion, *Eur. J. Biochem.*, 28: 357-363, 1972.

- [47] WALLACH D. F. H., BIERI V., VERMA S. P., SCHMIDT-ULLRICH R., Modes of lipid-protein interactions in biomembranes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 264: 142-160, 1975.

*Otrzymano: 2 lipca 1977.*

*Przyjęto: 5 października 1977.*

*Adres autorki: ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.*



APARAT GOLGIEGO  
IZOLOWANIE, CHARAKTERYSTYKA I FUNKCJA

THE GOLGI APPARATUS. ISOLATION, CHARACTERISTIC AND FUNCTION

Anna Maria KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

*Streszczenie.* W artykule porównano metody otrzymywania frakcji aparatu Golgiego z homogenatów komórek zwierzęcych. Podano przegląd najczęściej stosowanych kryteriów oceny czystości tej frakcji oraz badań dotyczących jej składu chemicznego. Omówiono poglądy na temat roli aparatu Golgiego w komórkach zwierzęcych oraz czynniki wpływające na jego aktywność i strukturę.

*Summary.* Methods for isolation of the Golgi apparatus from animal cells, in the form of a membrane-rich fraction, are compared. There is presented a review of some criteria of purity of the fraction and of experiments concerning its chemical composition. The function of the Golgi apparatus in animal cells as well as factors influencing its activity and structure are discussed.

**Wykaz stosowanych skrótów**

- 5' - AMP — adenozymonofosforan  
TPP — pirofosforan tiaminy  
NADPH — fosforan dwunukleotydu nikotynoadenilowego w formie zredukowanej  
NADH — dwunukleotyd nikotynoadenilowy w formie zredukowanej  
SDS — siarczan dodecyłu sodu  
TCA — kwas trójchlorooctowy  
GlcN — glukozaamina  
GalN — galaktozaamina  
GlcNAc — N - acetyloglukozaamina  
UDP - Gal — urydyldwufosfagalaktoza



NANA — kwas N - acetyloneuraminowy

BSM — glikoproteid gruczołów podszczękowych wołu

LDL — lipoproteidy o małej gęstości

VLDL — lipoproteidy o bardzo małej gęstości

AMP - aza — 5' - nukleotydaza

TPP - aza — pirofosfataza tiaminy

AG — aparat Golgiego

ER — siateczka śródplazmatyczna : SER — gładka, RER — szorstka,

PM — błona komórkowa, Mi — mitochondria.

## I. WSTĘP

Włoski cytolog Golgi [36, 37] badając komórki tkanki nerwowej sowy, opisał w 1898 r. strukturę cytoplazmatyczną widoczną w mikroskopie świetlnym jako siateczka otaczająca jądro, po impregnacji preparatów mieszaniną czterotlenku osmu i dwuchromianu rubidu, solami srebra albo osmu. Siateczkę tę nazwał „wewnętrznym retikularnym aparatem”. Analogiczne struktury komórek bezkręgowców i zarodków kręgowców, przyjmujące po impregnacji solami metali ciężkich wygląd izolowanych łusek, Perroncito [79] nazwał w 1910 r. „diktiosomami” (dictyon = sieć). W większości komórek roślin i zwierząt stwierdzono obecność takich form błoniastych, które ze względu na sposób ich uwidocznienia dosyć długo uważano nie za integralny składnik żywej komórki, ale za artefakty powstające podczas utrwalania i barwienia preparatów mikroskopowych. Dopiero badania cienkich skrawków komórek nabłonkowych najądrzy, przeprowadzone w mikroskopie elektronowym przez Daltona i Felixa [20] w latach 1954–1955, udowodniły obecność organelli komórkowej, nazwanej na cześć jej okrywcy aparatem Golgiego, i wykazały jej własną morfologiczną i fizjologiczną indywidualność w komórce.

Aparat Golgiego jest zbudowany z gładkich, pozbawionych rybosomów błon, grubości 7,5 nm i posiada różną postać w różnych typach komórek. Mimo to zwykle występują w nim trzy charakterystyczne elementy:

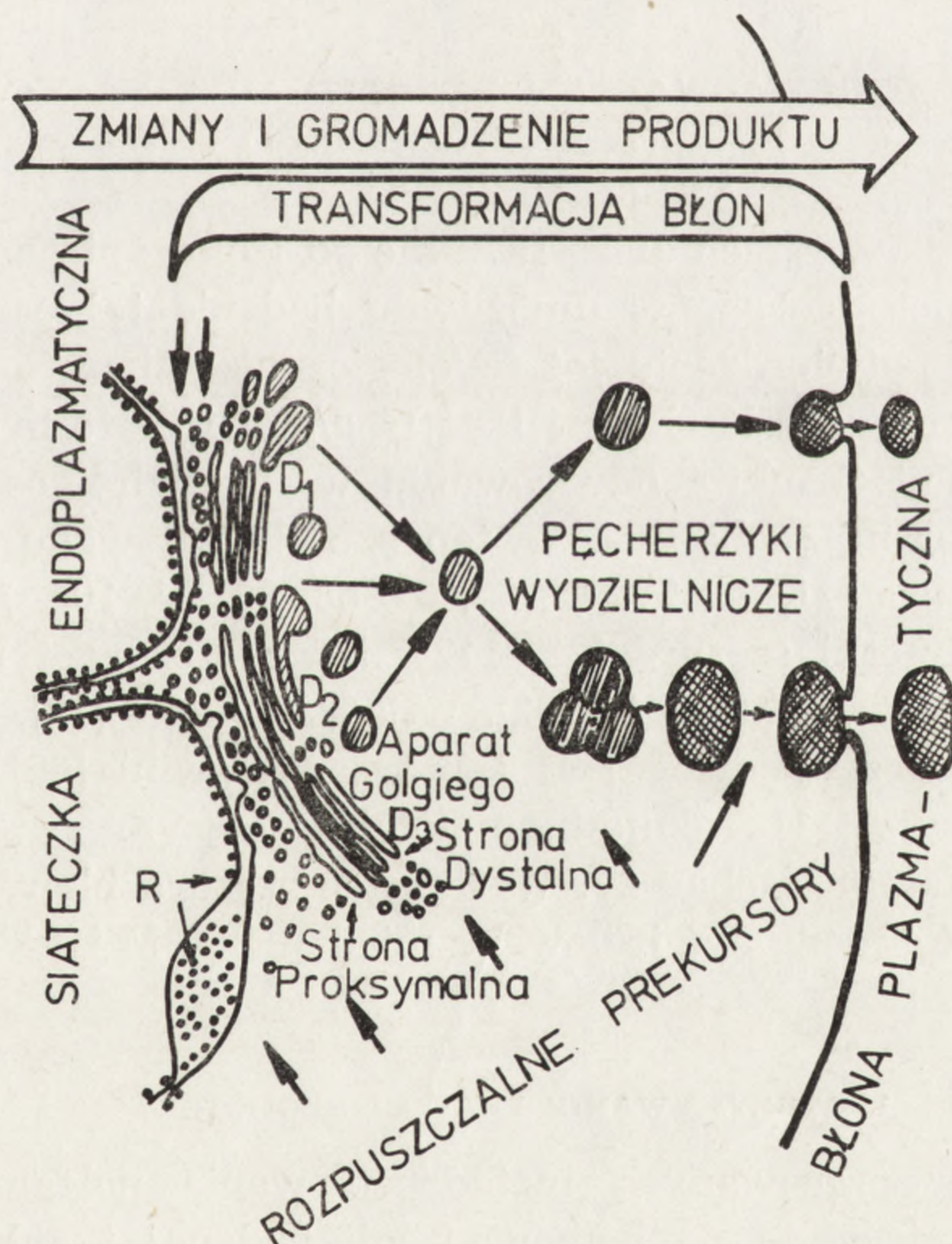
a) Wydłużone cysterny położone jedna nad drugą we wzajemnej odległości około 15–20 nm. Część centralna każdej cysterny jest płaska, natomiast jej części brzeżne są perforowane lub rozszerzone. Cysterny łączące tworzący sieć system rurek i kanalików o średnicy 30–50 nm. Równoległy układ cystern, zwany diktiosomem, jest morfologicznie charakterystycznym elementem aparatu Golgiego.

b) Drobne pęcherzyki o średnicy 30–50 nm.

c) Duże pęcherzyki wydzielnicze (wakuole) o średnicy 0,05–3,0  $\mu\text{m}$ .



Liczba diktiosomów oraz cystern tworzących diktiosom jest zmienna i zależy od typu komórki. Cechą diktiosomu jest polarność. Cysterny występujące po jednej jego stronie różnią się od cystern przeciwnej strony układem oraz połączeniem z innymi elementami błon wewnętrznych komórki. Każdy diktiosom z jednej strony łączy się z błoną jądrową lub z gładką siateczką śródplazmatyczną. Część tę określa się jako „proksymalną” lub „tworzącą” diktiosomu, a przez niektórych autorów nazywana jest też stroną „cis”. Błony cystern tej części, o grubości 4–6 nm, są histochemicznie i morfologicznie podobne do błon siateczki śródplazmatycznej gładkiej. W miarę przesuwania się ku części środkowej diktiosomu, rośnie grubość błony, która w części „dystalnej” zwanej też „dojrzałą”, a przez niektórych autorów „trans”, osiąga grubość 8–10 nm i wykazuje typową trójwarstwową strukturę oraz podobieństwo do błony komórkowej. Część dystalna diktiosomu bierze udział w tworzeniu pęcherzyków wydzielniczych, które są zdolne do fuzji z błoną



Rys. 1. Schemat funkcjonalnej i strukturalnej współzależności aparatu Golgiego i innych organelli komórkowych. Zmiany produktu dotyczą głównie dobudowywania części cukrowej do wydzielniczych glikoproteidów i glikolipidów. Za zgodą autorów D. J. Morré i wsp. [69]. D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> — diktiosomy, R — rybosomy



komórkową i do przenoszenia syntetyzowanych cząsteczek oraz wydzielania ich na zewnątrz komórki [69].

Aparat Golgiego uczestniczy w wydzielaniu białek i lipoproteidów, biosyntezie glikoproteidów i glikolipoproteidów oraz bierze udział w tworzeniu lizosomów i transformacji błon. Funkcjonalna i strukturalna ciągłość wewnętrznych błon komórki umożliwia syntezę i transport substancji wydzielniczych. Prócz tego aparat Golgiego odgrywa rolę w rozwoju i różnicowaniu błon wewnętrznych i błony komórkowej [5, 23, 69]. Najlepszy jak dotąd schemat struktury i funkcji aparatu Golgiego przedstawił Morr  i wsp. (rys. 1).

Ze względu na ważną rolę biologiczną aparatu Golgiego wzrasta zainteresowanie tą organellą i coraz więcej pracowni zajmuje się jej badaniem w warunkach fizjologicznych i pewnych stanach patologicznych, stosując metody morfologiczne, cyto- i histochemiczne oraz biochemiczne zarówno w badaniach *in situ*, jak i w postaci tzw. frakcji bogatej w błony Golgiego.

## II. METODY OTRZYMYWANIA I ROZDZIELANIA FRAKCJI BOGATEJ W BŁONY GOLGIEGO

Opracowanie w latach 1968–1976 metod izolowania aparatu Golgiego z różnych tkanek i organów umożliwiło badanie tej organelli *in vitro* i pozwoliło na potwierdzenie jej fizjologicznej roli w komórce. Frakcja błon Golgiego ma gęstość około 1,12–1,14 g/cm<sup>3</sup> i może być otrzymywana po homogenizacji tkanki i odwirowaniu w ultrawirówce między 0,5 M i 1,1 M roztworami sacharozy. W ten sposób izolowano błony Golgiego z wątroby szczura [21, 24, 27, 45, 63, 67, 68, 89, 94, 104, 106, 112] i wołu [26, 104, 111], nerki szczura [26, 112], jąder szczura i myszy [19, 55], rdzenia nadnerczy wołu [101, 102], najądrzy wołu [19], śluzówki jelita szczura [25], tarczycy owcy [14] i przysadki świni [60]. W gruczołach mlecznych szczura [11] frakcję błon Golgiego otrzymywano między 0,5 M i 1,25 M roztworami sacharozy. W trzustce szczura błony Golgiego mają większą gęstość i mogą być izolowane między 1,30 M i 1,35 M roztworami sacharozy [87].

### 1. OTRZYMYWANIE FRAKCJI BŁON GOLGIEGO

Większość opracowanych metod izolowania polega na wstępnym wirowaniu różnicowym po homogenizacji badanej tkanki w buforowanych roztworach sacharozy. Wszystkie etapy izolowania prowadzi się w temperaturze 0–4°C. Najczęściej do homogenizowania wątroby szczura lub wołu oraz śluzówki jelita szczura stosuje się 0,5 M roztwór sacharozy w 37,5 mM buforze Tris - maleinianowym z 1% dekstranem 250 lub



225 oraz 5 mM  $MgCl_2$  i 3 mM merkaptoetanołem (lub bez niego) o  $pH = 6,4$  [45, 63, 67, 68, 94, 106]; używa się też 0,25 M roztwór sacharozy w 0,1 M buforze Tris - HCl zawierającym 0,01 M  $MgCl_2$  i 1% dekstran o  $pH = 7,6$  albo 0,5 M lub 0,25 M roztwór sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym z 1% dekstranem 500 o  $pH = 7,2$  [24, 25, 27]. Trifaro i wsp. [101] zastosowali 0,3 M roztwór sacharozy o  $pH = 7,0$  jako płyn do homogenizacji rdzenia nadnerczy wołu, natomiast Ronzio [87] dla trzustki szczura użył 0,5 M roztwór sacharozy z 1% dekstranem 50 000 oraz 5 mM merkaptoetanołem w 50 mM buforze Tris - maleinianowym o  $pH = 6,4$ . Przy pominięciu wirowania różnicowego tkanekę homogenizuje się w 53%, tj. około 1,66 M roztworze sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym o  $pH = 7,1$  [24, 25, 27].

Homogenaty tkankowe po przesączeniu przez gazę lub jedwab wiruje się jednorazowo lub dwukrotnie. Oczyszczony wstępnie homogenat nakłada się na skokowy gradient sacharozy złożony z czterech [21, 89], pięciu [24, 25, 27, 45, 63, 106] lub sześciu [87, 101, 102] warstw sacharozy rozpuszczonej w środowisku użytym do homogenizacji tkanki. Niekiedy homogenat umieszcza się na dnie próbówki i na niego nakłada skokowy gradient sacharozy [24, 25, 27]. Schemat przedstawia rys. 2A. Stosuje się różne czasy wirowania i różną wielokrotność  $g$ , ( $g$  — przyspieszenie ziemskie) np. 30 min przy 71 000  $g$  [45], 30–40 min przy 100 000  $g$  [63, 67, 68, 94], 70 min przy 113 000  $g$  [101, 102], 2 godz. przy 147 000  $g$  [87] lub 3,5 godz. przy 63 000  $g$  [21]. Frakcja umieszczona między roztworami sacharozy o stężeniu 0,25 M i 1,15 M na podstawie kryteriów morfologicznych i biochemicznych jest uważana za frakcję bogatą w błony Golgiego.

B. Fleischer i S. Fleischer [24, 27] oraz Schachter i wsp. [89], wykorzystując charakterystyczną gęstość błon Golgiego, opracowali stosunkowo szybkie i wygodne metody izolowania frakcji bogatej w te błony z pominięciem czasochłonnego wirowania różnicowego. Rys. 2 B przedstawia schematy tych metod. Na podstawie wnikliwej charakterystyki morfologicznej i biochemicznej autorzy potwierdzili, że frakcja bogata w błony Golgiego otrzymywana przez nich nie różni się czystością od frakcji izolowanych w sposób klasyczny.

Należy podkreślić, że każdą z metod izolowania frakcji bogatej w błony Golgiego można zastosować używając rotora strefowego i zwiększając objętość nakładanych roztworów.

Przegląd metod izolowania frakcji bogatej w błony Golgiego pozwala przypuszczać, że ze względu na charakterystyczną, stosunkowo małą gęstość tej frakcji, lepsze są metody otrzymywania jej na zasadzie flotacji, tzn. gdy otrzymany homogenat umieszcza się na dnie próbówki, a na górę nakłada skokowy gradient sacharozy. W przypadku badań,







B

1. Wstępna homogenizacja tkanki w zbuforowanym środowisku pH 7,1

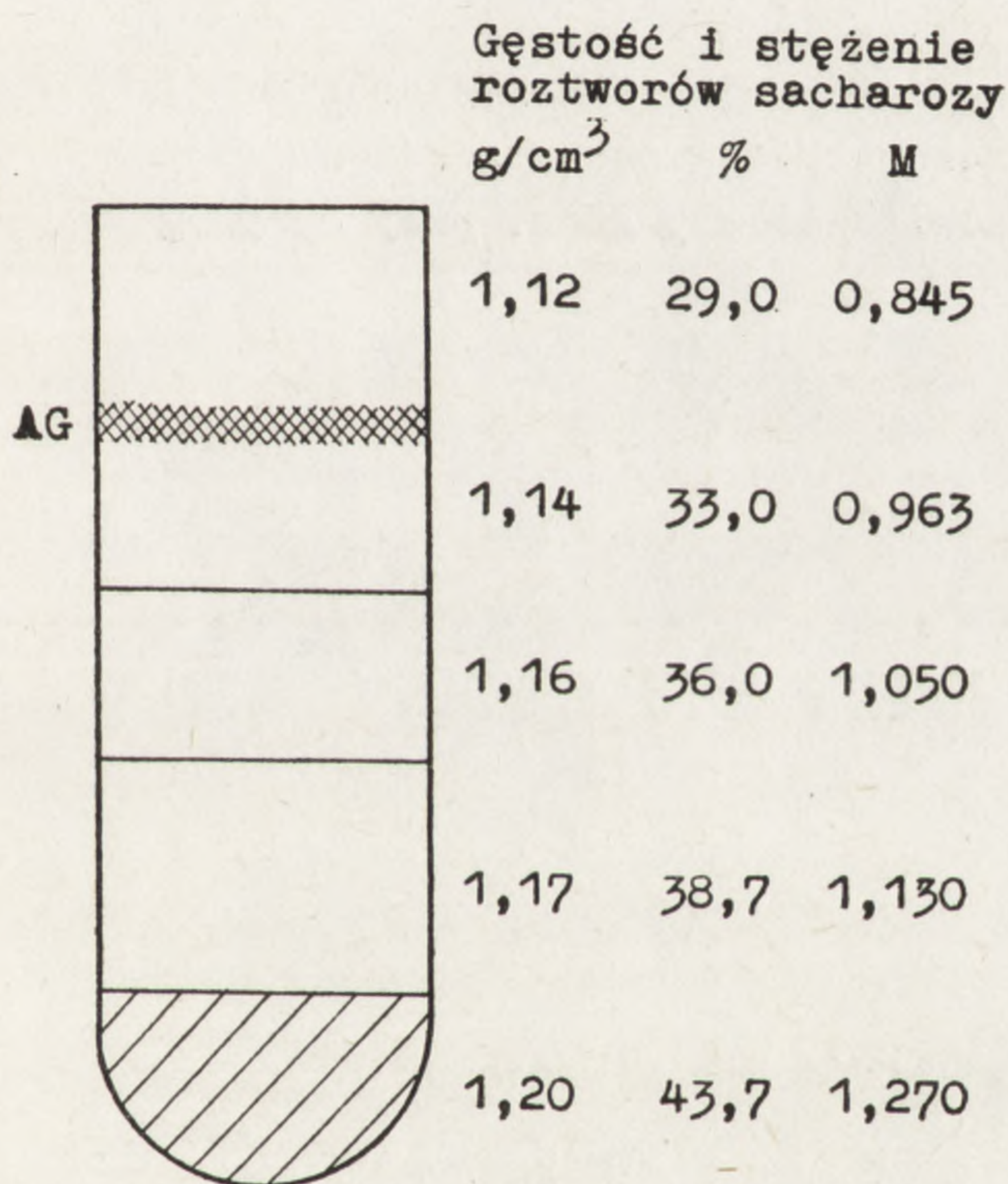
2. -

3. Wirowanie w skokowym gradiencie sacharozy doprowadzonej do pH 7,1. Frakcję AG izolowano przez flotację podczas wirowania 53 min przy 76 000g

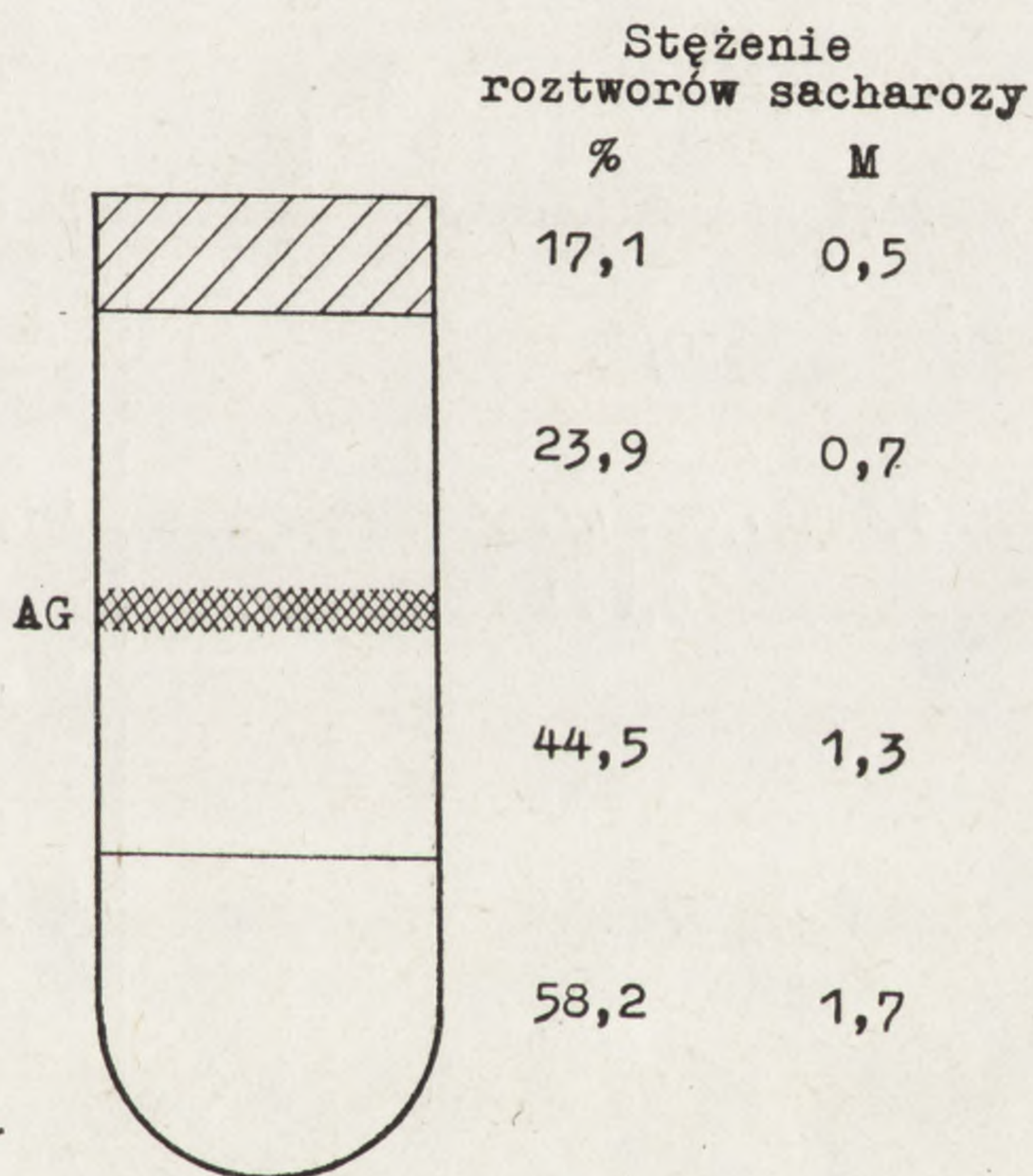
1. Wstępna homogenizacja tkanki w zbuforowanym środowisku pH 7,6

2. -

3. Wirowanie w skokowym gradiencie buforowanej sacharozy. Frakcję AG izolowano przez sedimentację podczas wirowania 45 min przy 80 000g



Według [24, 27]



Według [89]

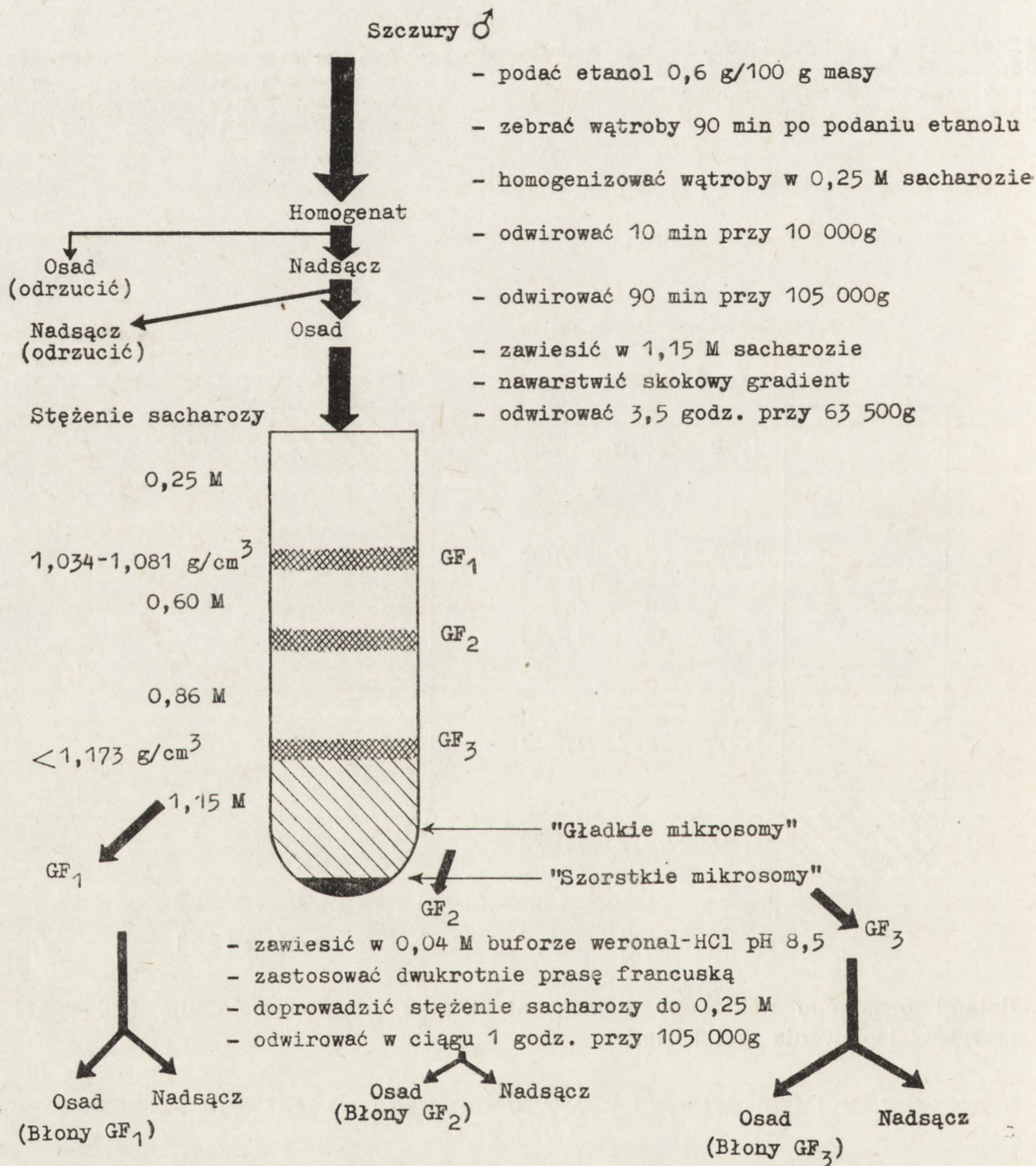
liniami oznaczono nakładany homogenat, kratka oznacza położenie izolowanej szczegóły izolowania w tekście

2. ROZDZIELANIE IZOLOWANEGO APARATU GOLGIEGO NA FRAKCJĘ PECHERZYKÓW I CYSTERN

Ze względu na morfologiczną i funkcjonalną niejednorodność aparatu Golgiego [23, 94] Ehrenreich i wsp. [21] oraz Merrit i Morré [61] opracowali metody rozdzielania izolowanej frakcji, bogatej w błony



Golgiego, otrzymanej z wątroby szczura. Autorzy obu metod wykorzystali obserwację, że etanol stymuluje syntezę kwasów tłuszczowych i produkcję wydzielanych lipoproteidów, które są gromadzone w pęcherzykach wydzielniczych aparatu Golgiego. Szczurom podaje się dożołądkowo 50% etanol w ilości 0,6 g/100 g masy ciała. Po otrzymaniu całej frakcji bogatej w błony Golgiego stosuje się dodatkowe frakcjonowanie w skoko-

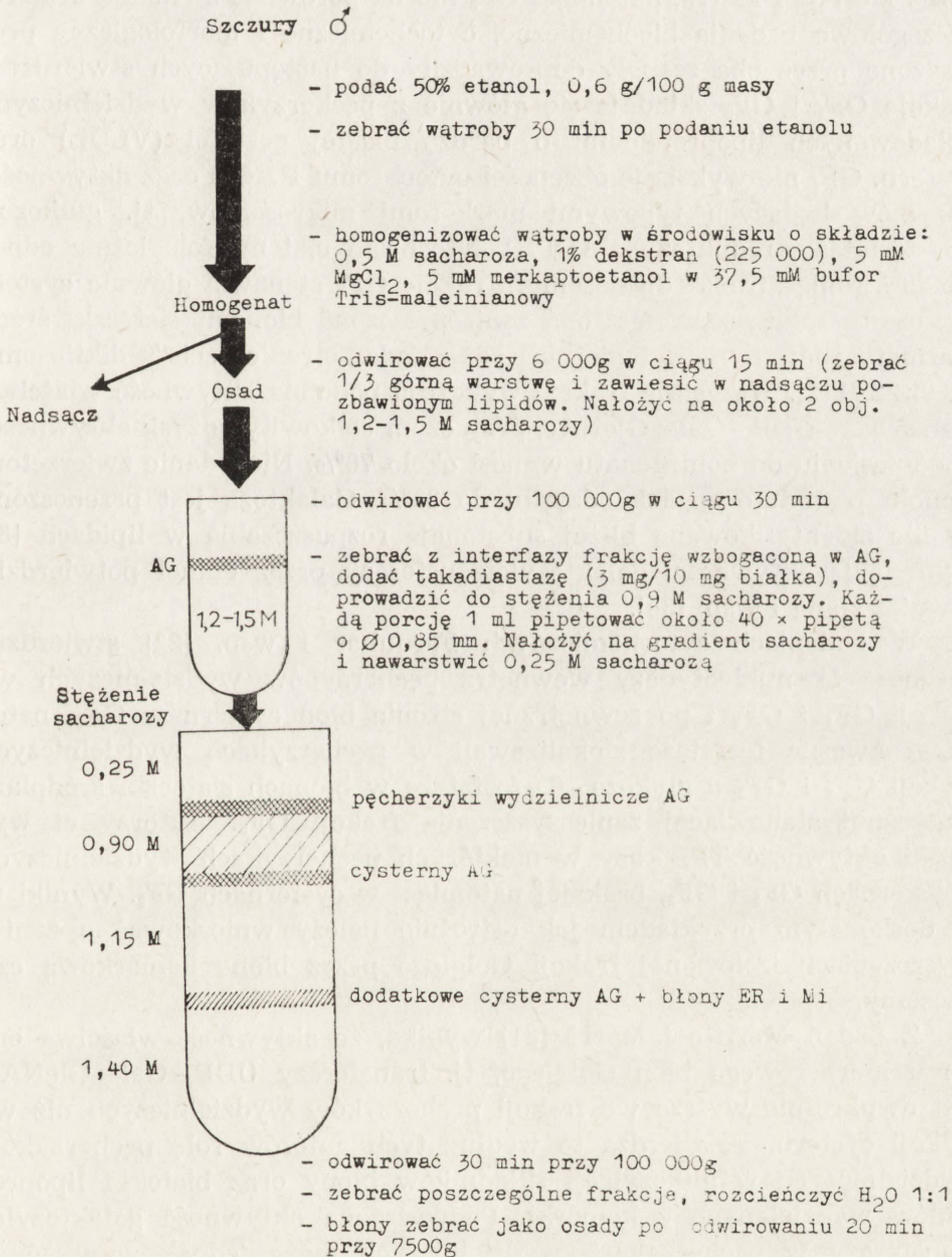


Rys. 3. Schemat otrzymywania i frakcjonowania błon aparatu Golgiego z wątroby szczura. Ehrenreich i wsp. [21]



wym gradiencie sacharozy. Schemat metody Ehrenreicha i wsp. [21] przedstawia rys. 3.

Merrit i Morr  [61] użyli dodatkowo takadiastazę, w ilości 3 mg/10 mg białka frakcji, która spowodowała rozluźnienie spistości aparatu Golgie-



Rys. 4. Schemat otrzymywania i frakcjonowania błon aparatu Golgiego z wątroby szczura. Merrit i Morr  [61]



go, co ułatwia następnie oddzielenie cystern aparatu Golgiego od pęcherzyków wydzielniczych. Schemat tej metody przedstawia rys. 4.

Fracje lekka i średnia ( $GF_1$  i  $GF_2$ ) otrzymane przez Ehrenreicha i wsp. odpowiadają frakcji pęcherzyków wydzielniczych uzyskanych przez Merrita i Morré, natomiast  $GF_3$  można porównać z frakcją cystern. Szczegółowe badania biochemiczne, cytochemiczne i morfologiczne prowadzone przez oba zespoły doprowadziły do następujących stwierdzeń: frakcje  $GF_1$  i  $GF_2$  składają się głównie z pęcherzyków wydzielniczych obciążonych lipoproteidami o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz cystern.  $GF_1$  nie wykazuje obecności cytochromu P - 450 oraz aktywności enzymów będących typowymi markerami mikrosomów, tj. glukozo - 6 - fosfatazy, reduktazy NADPH: cytochrom c, i morfologicznie odpowiada stronie „trans” diktiosomu. Frakcję  $GF_3$  stanowią głównie cysterny, często spłaszczone, jest ona zanieczyszczona błonami siateczki śródplazmatycznej i morfologicznie odpowiada stronie „cis” diktiosomu [8, 9, 22, 112]. Wszystkie frakcje wykazują podobną aktywność właściwą transferazy UDP - Gal→GlcNAc, przy czym całkowity odzysk aktywności w odniesieniu do homogenatu wynosi około 70%. Niepodanie zwierzętom etanolu powoduje spadek odzysku do 35%. Galaktoza jest przenoszona na nie zidentyfikowaną bliżej substancję rozpuszczalną w lipidach [8]. Stymulację aktywności galaktozylotransferazy przez etanol potwierdzili również Gang i wsp. [35].

W badaniach cytochemicznych Farquhar i wsp. [22] stwierdzili obecność 5' - nukleotydu wewnątrz pęcherzyków wydzielniczych we frakcji  $GF_1$  i  $GF_2$  i po zewnętrznej stronie błon cystern w  $GF_3$ , natomiast kwaśną fosfatazę zlokalizowali w pęcherzykach wydzielniczych frakcji  $GF_1$  i  $GF_2$  a glukozo - 6 - fosfatazę w błonach siateczki śródplazmatycznej stanowiącej zanieczyszczenia frakcji  $GF_3$ . Autorzy ci wykazali aktywność TPP - azy w niektórych pęcherzykach wydzielniczych i cysternach  $GF_1$  i  $GF_2$ , brak jej natomiast w cysternach  $GF_3$ . Wyniki te są doskonałym przykładem jak ostrożnie należy wnioskować o zanieczyszczeniach izolowanej frakcji Golgiego przez błonę komórkową czy lizosomy.

Z badań Merrita i Morré [61] wynika, że aktywność właściwa enzymu markerowego błon Golgiego, tj. transferazy UDP - Gal→GlcNAc, jest dwukrotnie wyższa we frakcji pęcherzyków wydzielniczych niż we frakcji cystern. Potwierdza to według tych autorów rolę pęcherzyków wydzielniczych w glikozylacji składników błony oraz białek i lipoproteidów wydzielanych z komórki. Podwyższona aktywność galaktozylotransferazy w pęcherzykach wydzielniczych może jednak wynikać ze stymulacji aktywności tego enzymu przez etanol [35], który jest w nich wybiórczo akumulowany.



### 3. FRAKCJONOWANIE IZOLOWANEGO APARATU GOLGIEGO NA MATERIAŁ NIEROZPUSZCZALNY I ROZPUSZCZALNY W KWASACH

Katona [45] oraz Sturgess i wsp. [95] zastosowali rozdzielanie izolowanych frakcji wzbogaconych w błony Golgiego na materiał wytrącalny i rozpuszczalny w  $\text{HClO}_4$  [95] lub w 5% TCA oraz mieszaninie chloroform–metanol (2 : 1, v/v) [45]. Sturgess i wsp. [95] stwierdzili pojawienie się  $^3\text{H}$ -glukoaminy po 20 min od dożylniej iniekcji, we frakcji wytrącanej 1,2 N  $\text{HClO}_4$  i ekstrahowanej mieszaniną chloroform–metanol–eter (2 : 1 : 1, v/v/v), po 40 min we frakcji rozpuszczalnej w tym układzie, a następnie w surowicy. Doświadczenia te potwierdzają według autorów rolę aparatu Golgiego w procesie glikozylacji białek i lipidów produkowanych w wątrobie i wydzielanych do surowicy.

Katona [45] przeprowadził podobne doświadczenie, podając dożylnie  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ . Po 15 min większość  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , absorbowanego przez wątrobę, pojawia się we frakcji Golgiego. Po jej rozdzieleniu na materiał rozpuszczalny i nierozpuszczalny w 5% TCA stwierdzono, że 85% izotopu znajduje się w części frakcji rozpuszczalnej w kwasie, natomiast 15% jest w części nierozpuszczalnej. Według autora jest to dowód na rolę aparatu Golgiego w procesie sulfonowania związków, np. sulfomukopolisacharydów lub w procesie metabolizmu siarczanów.

### III. BADANIE CZYSTOŚCI IZOLOWANEJ FRAKCJI BOGATEJ W BŁONY GOLGIEGO

Czystość izolowanej frakcji należy sprawdzić morfologicznie oraz biochemicznie przez oznaczenie aktywności tzw. enzymów markerowych.

#### 1. METODY MORFOLOGICZNE

W badaniach morfologicznych aparatu Golgiego w mikroskopie elektronowym konieczne jest utrwalenie wstępne badanej tkanki lub izolowanej frakcji najczęściej w 1–4% buforowanym roztworze aldehydu glutarowego o  $\text{pH} \sim 7,4$ , a następnie w 1%  $\text{OsO}_4$  o tym samym  $\text{pH}$ . Następnie stosuje się odwodnienie materiału, np. w etanolu o wzrastających stężeniach, i utwardzenie przez zatopienie w żywicach epoksydowych, np. Araldicie lub Eponie. Po pokrojeniu na ultracienkie skrawki często stosuje się kontrastowanie skrawków octanem uranylu lub cytrynianem, lub wodorotlenkiem ołowiu [21, 34, 93, 94].

Strukturę izolowanej frakcji bogatej w błony Golgiego można sprawdzić w mikroskopie elektronowym trzema sposobami:

1. W ultracienkich skrawkach z frakcji — po utrwaleniu jej i utwardzeniu w sposób analogiczny jak w przypadku tkanki.

2. Bez wstępnego utrwalenia i utwardzenia materiału — po kon-





Rys. 5. Typowe obrazy w mikroskopie elektronowym frakcji bogatej w błony Golgiego, izolowanej z jąder szczura. Według Cunninghama i wsp. [19] za zgodą autorów

1 — replika mrozeniowa, 2 — ultracienki skrawek z osadu izolowanej frakcji, 3 — kontrastowanie negatywowe kwasem fosforowolframowym



trastowaniu negatywowym. Najczęściej używanym „barwnikiem” jest 1–2% kwas fosforowolframowy lub krzemowowolframowy, 1% molibdenian amonu lub 1% octan uranylu.

3. Po zamrożeniu i odpowiednim rozłupaniu badanego osadu — jako tzw. repliki mrozeniowe.

Typowe obrazy frakcji bogatej w błony Golgiego izolowanej z jąder szczura przez Cunninghama i wsp. [19], otrzymane w sposób poprzednio opisany, przedstawia rys. 5.

## 2. METODY BIOCHEMICZNE

Biochemiczną kontrolę czystości uzyskanego preparatu przeprowadza się oznaczając aktywność enzymów markerowych oraz zawartość RNA i białka w badanej frakcji. Do najczęściej oznaczanych enzymów w badaniu biochemicznej czystości izolowanej frakcji Golgiego należą: 5'-nukleotydaza EC 3.1.3.5 [3, 5, 8, 14, 24, 25, 34, 39, 68, 94, 101, 102], ATP-aza stymulowana  $Mg^{2+}$  EC 3.6.1.3 [8, 25, 27, 34, 87, 94], kwaśna fosfataza EC 3.1.3.19 lub EC 3.1.3.2 [3, 8, 14, 24, 25, 27, 34, 45, 89, 94], glukozo-6-fosfataza EC 3.1.3.9 [3, 5, 8, 17, 24, 25, 27, 34, 68, 89, 101]. Rzadziej oznaczane są monoaminooksydaza EC 1.4.3.4 [34, 93], oksydoreduktaza NADH: cytochrom c EC 1.6.2.1 [3, 8, 24, 25, 27, 34] i oksydoreduktaza NADPH: cytochrom c [8, 24, 25, 89] oraz reduktaza bursztynian: cytochrom c [8, 25, 27, 94], TPP-aza EC 3.6.1. — [24, 25, 45, 46], arylsulfataza A i B EC 3.1.6.1 [27, 45, 46], galaktozydaza EC 3.2.1.23 [24, 25, 27], fosfataza zasadowa EC 3.1.3.1 [45, 46],  $\beta$ -glukuronidaza EC 3.2.1.31 [101, 102] i oksydaza mocznikowa EC 1.7.3.3 [17, 46]. Aktywność właściwa tych enzymów we frakcji błon Golgiego powinna być mała, co świadczy o dobrym oddzieleniu od innych organelli komórkowych, np. błony komórkowej, siateczki śródplazmatycznej, lizosomów lub mitochondriów. Białko badanej frakcji oznacza się zwykle metodą Lowry'ego i wsp. [5, 8, 14, 17, 24, 25, 27, 45, 87, 89, 101, 102, 106] lub biuretową [34]. Zawartość DNA [14, 89] i RNA [14, 25, 34, 87, 89, 101] po ekstrakcji frakcji, np. metodą Schneidera [90], oznacza się odpowiednio metodą dwufenyloaminową lub orcynową.

Swoistym enzymem markerowym aparatu Golgiego jest galaktozylotransferaza, której aktywność właściwa jest kilkanaście do kilkadziesiąt razy większa w odniesieniu do homogenatu, co potwierdzono w badaniach frakcji Golgiego pochodzącej z wątroby wołu [25, 111] i szczura [24, 27, 63, 68, 89, 106], nerek szczura [26, 112] jąder szczura i myszy [55], najądrzy wołu [25] śluzówki jelita szczura [34], tarczycy owcy [14], przysadki świni [60], gruczołów mlecznych szczura [11] oraz trzustki szczura [87]. Enzym ten oznacza się metodą izotopową. Donorem reszty



galaktozylowej jest UDP -  $^{14}\text{C}$  - galaktoza, akceptorem — albo N - acetylglukozaamina [3, 8, 24, 27, 34, 68, 101], albo glikoproteid pozbawiony reszt kwasu sialowego i galaktozy [34, 45, 46, 63], np. desjalylowane i degalaktozylowane  $\alpha_1$  - kwaśny glikoproteid [89], fetuina [14] lub glikoproteid gruczołów podszczękowych wołu [87].

#### IV. SKŁAD FRAKCJI BOGATEJ W BŁONY GOLGIEGO

Oprócz badań fizjologicznej roli aparatu Golgiego, dotyczących przede wszystkim oznaczeń aktywności enzymatycznej izolowanej frakcji bogatej w błony Golgiego, podjęto szereg oznaczeń składu białkowego tej frakcji oraz ilości lipidów i cukrowców wchodzących w skład błon aparatu Golgiego.

##### 1. SKŁAD BIAŁKOWY

Oznaczenie składu białek frakcji wzbogaconej w błony Golgiego wykonuje się w dwu układach przy użyciu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym.

Pierwszy sposób polega na rozdzieleniu białek w formie kationowej, po rozpuszczeniu błon w mieszaninie fenol-kwas octowy-mocznik (2 : 1 : 1, v/v/v) według Takayama i wsp. [98], w modyfikacji Zahler i wsp. [111]. Elektroforezę wykonuje się w 7,5% żelu poliakryloamidowym spolimerizowanym z 5 M mocznikiem i 35% kwasem octowym. Jako roztwór do naczyń elektrodowych używa się 10% kwas octowy. Białka barwi się błękitem Coomassie.

Stosując tą metodę Fleischer i wsp. [24, 27, 111] otrzymali kilkanaście pasm polipeptydowych dla błon Golgiego komórek wątroby szczura. Układ pasm polipeptydowych był charakterystyczny dla tej frakcji i różny od składu błon mitochondriów, gładkich i szorstkich mikrosomów i błony komórkowej. Zastosowana metoda może być zdaniem autorów dodatkowym wskaźnikiem oddzielenia błon aparatu Golgiego od innych błon komórki.

Drugi sposób analizowania białek błon Golgiego polega na rozpuszczeniu frakcji w buforze zawierającym SDS, mocznik i zazwyczaj 2 - merkaptetanol. Najczęściej używa się 0,01 M bufor fosforanowy o pH = 7,0 z 1% SDS, 1% merkaptetanolem oraz 6 M mocznikiem [108]. Stosuje się też 5 mM bufor Tris - HCl o pH = 8,8 z dodatkiem 0,1% SDS i 0,1% merkaptetanolu [19] lub 0,1 M bufor fosforanowy o pH = 7,1 z 1,7  $\mu\text{M}$  SDS i 18  $\mu\text{M}$  merkaptetanolem [5]. W tych warunkach rozdzielane białka mają formę anionową. Elektroforezę wykonuje się najczęściej zgodnie z metodą Weber i Osborn [108] w 6-10% żelu



poliakryloamidowym, spolimeryzowanym z dodatkiem SDS w płytkach lub rurkach [5, 9, 19, 87, 102].

Stosując tą metodę Cunningham i wsp. [19] porównali skład białek całej frakcji wzbogaconej w błony Golgiego z białkami tej frakcji, które można ekstrahować kwasem fosforowolframowym albo wodą. Wyniki ich wskazują, że kwas fosforowolframowy powoduje przejście do roztworu pewnych białek błon, które nie są usuwane wodą. Trifaro i wsp. [102] stwierdzili pewne różnice w składzie polipeptydowym błon frakcji Golgiego oraz błon chromochłonnych ziarnistości pochodzących z rdzenia nadnerczy wołu. Bergeron wsp. [9] porównali skład polipeptydowy podfrakcji GF<sub>1</sub>, GF<sub>2</sub> i GF<sub>3</sub> aparatu Golgiego ze składem polipeptydowym gładkich mikrosomów i błony komórkowej wątroby szczura, oceniając jednocześnie ich masę cząsteczkową. Bauer i wsp. [5] stwierdzili w 6 godz. po podaniu D - galaktozoaminy zmniejszenie lub brak kilku pasm polipeptydowych frakcji Golgiego, a szczególnie tego, które ruchliwością odpowiada albuminie. Zmiany te korelowały ze zmienioną szybkością biosyntezy pewnych białek. Ronzio [87] stwierdził nieznaczne różnice między białkami błon aparatu Golgiego i gładkich mikrosomów trzustki, natomiast zupełnie odmienny skład białkowy błon ziaren zymogenu. Kordowiak i Sarnecka - Keller [51] stwierdziły zmiany składu białek frakcji Golgiego izolowanej z wątroby szczurów z cukrzycą wywołaną podaniem streptozotocyny. Natomiast długotrwałe podawanie insuliny innej grupie szczurów nie powodowało żadnych zmian składu białek izolowanej frakcji bogatej w błony Golgiego w odniesieniu do kontroli. Wyniki te były zgodne z brakiem różnicy w aktywności galaktozylotransferazy tych frakcji [41].

## 2. SKŁAD LIPIDOWY

Porównanie składu lipidów aparatu Golgiego i innych organelli komórkowych oraz surowicy przeprowadzili Nestruck i Rubinstein [74], Zambrano i wsp. [112] oraz Bizzi i Marsii [12]. W celu wyizolowania lipidów [112], frakcje organelli komórkowych (4-12 mg białka w 0,25 M sacharozie) ekstrahuje się 20 objętościami mieszaniny chloroform-metanol (2 : 1, v/v) w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Pozostałość zebraną na szklanym sączku ponownie ekstrahuje się 10 objętościami tej samej mieszaniny i sączy jak poprzednio. Połączone ekstrakty po zagęszczeniu do małej objętości oczyszcza się od nielipidowych związków przez chromatografię na Sefadexie G - 25. Frakcje eluowane mieszaniną chloroform-metanol (19 : 1 v/v) wysycane są wodą i użyte do dalszych badań jako ekstrakt wszystkich lipidów. Dalsze badanie wykonuje się zgodnie ze schematem na rys. 6.



TABELA 1

Porównanie składu lipidowego organelli komórkowych pochodzących z nerki i wątroby szczura, zmodyfikowane według Zambrano i wsp. [112]

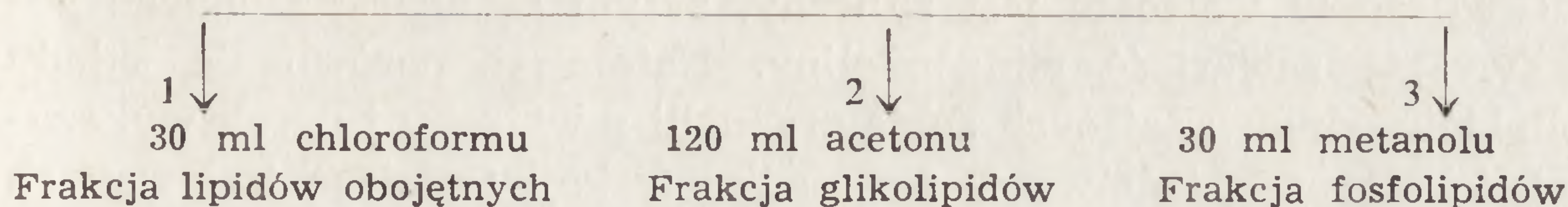
Frakcja komórkowa	Lipidy obojętne (N)	Fosfolipidy	Lipidy całkowite (L)	N/L × 100	Cholesterol		Ubichinon	Glikolipidy	Sulfa-tydy (S)	S/L × 100	Fosfor lipidowy
					wolny	% zestryfikowany					
Mitochondria	0,027	0,175	0,202	13,4	—	0,003	1,3	—	—	—	6,9
W	0,040	0,215	0,286	14,0	97	0,008	2,3	0,012	0,016	5,6	9,9
Szorstkie	0,051	0,374	0,425	13,6	—	0,014	—	—	—	—	13,8
N	0,116	0,395	0,587	19,8	90	0,053	0,2	0,020	0,022	3,7	18,2
Frakcja bo-	0,335	0,670	1,005	33,3	64	0,071	4,7	—	—	—	20,8
gata w błony	0,162	0,537	0,859	18,9	63	0,071	1,1	0,147	0,117	13,6	22,5
Golgiego											
Błony	0,341	0,825	1,166	29,3	86	0,078	6,2	—	—	—	30,1
N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21,1
Błona	0,322	0,672	0,994	32,4	92	0,128	0,18	—	—	—	23,4
komórkowa	0,253	0,694	1,067	23,8	92	0,091	0,80	0,056	0,045	4,2	24,3
N											

Wszystkie wartości wyrażono jako mg/mg białka, ubichinon w µg/mg białka (W — wątroba, N — nerki).



Nałożenie ekstraktu wszystkich lipidów na kolumnę o wymiarach 1,2 cm średnicy i 3 cm wysokości wypełnionej kwasem krzemowym o ziarnistości 100 - 200.

Kolejne elucje



Rys. 6. Schemat rozdzielania ekstraktu lipidów na lipidy obojętne, glikolipidy i fosfolipidy. Zambrano i wsp. [112]

Otrzymane frakcje lipidów obojętnych, glikolipidów i fosfolipidów poddaje się dalszym badaniom stosując np. dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową w kwasie krzemowym. Otrzymane przez Zambrano i wsp. [112] wyniki przedstawiają tabele 1 i 2.

TABELA 2

Fosfolipidy organelli komórkowych otrzymywanych z nerki i wątroby szczura, zmodyfikowane według Zambrano i wsp. [112]

		Fosfatydylo- etanoloamina	Fosfatydylocho- lina	Sfingomielina	Dwufosfatydylo- glicerol	Fosfatydyloino- zytol	Fosfatydylose- ryna	Lizofosfatydylo- etanoloamina	Lizofosfatydylo- cholina	Kwas fosfaty- dowy
Nerki	Mi	36,9	36,0	0,9	20,2	2,5	1,1	0,6	0,8	0,0
	RER	24,2	37,7	17,3	2,4	1,8	9,8	1,5	3,6	0,6
	AG	24,2	50,6	6,2	1,8	6,7	5,0	0,4	3,4	0,6
	PM	32,4	33,7	13,8	3,6	1,9	8,3	0,5	3,9	0,5
Wątroba	Mi	34,6	40,3	0,5	17,8	4,6	0,7	0,6	n.o.	n.o.
	RER	21,8	58,4	2,5	1,1	10,1	2,9	1,1	9,5	0,7
	AG	23,5	54,0	7,8	1,0	8,6	3,0	0,3	0,4	0,4
	G	19,6	49,6	7,6	1,2	12,2	5,6	1,6	1,4	0,4
	PM	23,3	39,3	16,0	1,0	7,7	9,0	1,3	1,0	0,5

Podane wartości wyrażają procent całkowitego fosforu fosfolipidów.

Mi — mitochondria, RER — szorstka siateczka endoplazmatyczna, AG — izolowana frakcja bogata w błony Golgiego, G — błony aparatu Golgiego, PM — błona komórkowa, n. o. — wartości nieoznaczalne.

Po porównaniu składu lipidów mitochondriów, szorstkich mikrośomów, aparatu Golgiego i błony komórkowej, izolowanych z wątroby i nerek szczurzych, można stwierdzić, że aparat Golgiego w obu narządach posiada najwięcej lipidów obojętnych o dużej zawartości zestryfikowanego cholesterolu i ubichinonu. Pozbawienie aparatu Golgiego zawartości cystern powoduje zmniejszenie ilości estrów cholesterolu nie wpływając na zawartość ubichinonu. Nerkowy aparat Golgiego w odniesieniu do



mitochondriów, błony komórkowej i szorstkich mikrosomów posiada najwyższą zawartość sulfatydów i glikolipidów (tabela 1).

Skład fosfolipidowy szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego w wątrobie jest zbliżony, z tym że aparat Golgiego posiada wyższą zawartość sfingomieliny. Natomiast porównanie składu fosfolipidów odpowiadających sobie organelli z wątroby i nerek wykazuje największe podobieństwo w przypadku frakcji Golgiego izolowanych z tych dwóch organów (tabela 2).

### 3. CUKRY ZWIĄZANE Z BŁONAMI GOLGIEGO

Badania cukrów związanych z błonami mikrosomów i aparatu Golgiego, pochodzących z wątroby szczurzej, przeprowadzili ostatnio Bergman i Dallner [10]. W przeciwieństwie do dobrze znanej roli glikoproteidów błony komórkowej erytrocytów czy innych komórek, funkcja mikrosomowych białek związanych z cukrami nie jest w pełni poznana, a ilość cukrów zbyt duża, aby ją można tłumaczyć wyłącznie obecnością glikoproteidów z grupy enzymów, np. pirofosfatazą nukleotydów, AMP - azą czy  $\beta$  - glukuronidazą. Badania glikoproteidów są utrudnione, gdyż poza dokładnym oczyszczeniem frakcji Golgiego czy mikrosomów od innych błon konieczne jest pozbycie się białek wydzielniczych, które w większości są glikoproteidami. Zastosowane przez Bergmana i Dallnera [10] kolejne odmywanie frakcji 0,15 M buforem Tris - HCl o pH = 8,0, a następnie zimną wodą destylowaną, po której stosuje się inkubację w 30°C w ciągu 15 min i gwałtowne oziębienie do 0°C, powodują uwolnienie zawartości pęcherzyków wydzielniczych. Błony Golgiego przemywa się 0,15 M buforem Tris - HCl o pH = 7,5 i zbiera przez odwirowanie. Zabiegi te są zdaniem autorów dobrym sposobem uzyskiwa-

TABELA 3

Skład cukrowy błon mikrosomów i aparatu Golgiego pochodzących z wątroby szczura, zmodyfikowane według Bergmana i Dallnera [10]

Frakcja komórki	Białko mg/g wątroby	Fosfolipidy (F) mg/g wątroby	Mannoza		Galaktoza		Man Gal	GlcN $\frac{\mu\text{g}}{\text{mgF}}$	GalN $\frac{\mu\text{g}}{\text{mgF}}$	NA-NA $\frac{\mu\text{g}}{\text{mgF}}$
			$\frac{\mu\text{g/g}}{\text{wątroby}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\text{mgF}}$	$\frac{\mu\text{g/g}}{\text{wątroby}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\text{mgF}}$				
Mikrosomy										
całość	11,0	5,28	60,2	11,4	22,2	4,20	2,71	11,6	0,5-1	7,22
szorstkie	5,85	2,65	27,3	10,4	8,69	3,28	3,14	8,9	0,5	4,92
gładkie	3,92	1,40	15,7	11,2	8,30	5,95	1,88	12,1	0,5-1	11,30
Błony aparatu Golgiego	0,30	0,28	1,9	6,7	2,83	10,10	0,66	23,3	1-2	8,26



nia czystych błon pozbawianych glikoproteidów wydzielniczych. Wyniki oznaczeń cukrów obojętnych i aminocukrów w tak przygotowanych błonach gładkich i szorstkich mikrosomów oraz aparatu Golgiego przedstawia tabela 3.

Stosunek mannozy do galaktozy jest najwyższy w błonach szorstkich mikrosomów, maleje w gładkich i osiąga najmniejszą wartość dla błon Golgiego. W porównaniu z błonami szorstkich mikrosomów, błony Golgiego zawierają stosunkowo dużo glukozaaminy i kwasów sjałowych w przeliczeniu na mg fosfolipidów. Glikoproteidy wszystkich błon zawierają bardzo drobne ilości galaktozaaminy. Autorzy [10] sugerują typ wiązania N-glikozydowego między asparaginą i N-acetyloglukozaaminą. Biorąc pod uwagę zewnętrzne położenie glikoproteidów w błonie komórkowej, należało przypuszczać, że w siateczce śródplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego powinny one być wewnątrz pęcherzyków i cystern. Tymczasem wprowadzenie trypsyny do światła pęcherzyków powoduje uwolnienie mannozy pozostając bez wpływu na galaktozę. Podobnie trawienie neuraminidazą nie powoduje uwalniania związanego z glikoproteidami kwasu N-acetyloneuraminowego. Być może zatem większość mikrosomowych glikoproteidów nie leży po stronie wewnętrznej, lecz ma mniej lub bardziej symetryczny rozkład w błonie. Jest także możliwe, że pewne glikoproteidy błon zmieniają miejsce podczas biosyntezy, gdy zachodzi uzupełnianie oligosacharydowego łańcucha. Taka zmiana położenia zachodzi dla pewnych białek wydzielniczych, które podczas biosyntezy występują w formie związanej z błonami [10].

#### V. BADANIE FUNKCJI APARATU GOLGIEGO W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

Aparat Golgiego pełni ważną i swoistą rolę w komórce, uczestnicząc zarówno w biosyntezie, jak i kontroli transportu wydzielanych produktów. Zastosowanie związków znakowanych izotopami w autoradiografii i biochemii udokumentowało biosyntetyczną i wydzielniczą funkcję aparatu Golgiego. Neutra i Leblond [75, 76] użyli  $^3\text{H}$  glukozę i  $^3\text{H}$  galaktozę wprowadzając je dootrzewnowo szczurom i wykazali udział aparatu Golgiego w biosyntezie glikoproteidów wydzielanych przez komórki jelita tych zwierząt. Flickinger [28] stosował  $^3\text{H}$  mannozę i  $^3\text{H}$  galaktozę podając je pojedynczym amebom i udowodnił rolę aparatu Golgiego w biosyntezie części cukrowej powierzchniowej warstwy glyco-calix. Ten sam autor [29, 30] użył  $^3\text{H}$  leucynę, którą wprowadził dootrzewnowo szczurom, i wykazał udział aparatu Golgiego w syn-



tezie, wewnątrzkomórkowym transporcie i wydzielaniu białek w pęcherzykach nasiennych i gruczołach płciowych szczurów. Innymi znakowanymi związkami zastosowanymi w badaniach autoradiograficznych były:  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$  [109],  $^{14}\text{C}$  leucyna [23],  $^3\text{H}$  fukoza [62]. W badaniach biochemicznych użyto:  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$  [45],  $^{14}\text{C}$  glukozaminę [48, 49],  $^3\text{H}$  glukozaminę [52, 53, 95]  $^{125}\text{I}$  insulinę [9], 7- $^3\text{H}$  cholesterol i 1- $^{14}\text{C}$  palmitylo CoA [3] oraz  $^{14}\text{C}$  leucynę [5] i  $^3\text{H}$  leucynę [74].

Użycie metod cytochemicznych i histochemicznych w modyfikacji do mikroskopu elektronowego umożliwiło lokalizację pewnych enzymów w obrębie organelli komórkowych, w tym również w aparacie Golgiego. Badania wykonano *in situ* lub po izolowaniu frakcji bogatej w błony tej organelli.

Farquhar i wsp. [22] zbadali rozkład AMP-azy, TPP-azy, glukozo-6-fosfatazy oraz kwaśnej fosfatazy zarówno *in situ* w skrawkach wątroby, jak i w podfrakcjach izolowanego aparatu Golgiego. W celu przeprowadzenia reakcji *in situ*, wątrobę przemywali metodą perfuzji przez żyłę wrotną kolejno 0,1 M buforem kakodylanowym o  $\text{pH} = 7,4$ , 2% aldehydem glutarowym w tym samym buforze i ponownie samym buforem. Następnie pobierali skrawki o wymiarach  $1 \times 1 \times 3$  mm i przechowywali w 0,2 M roztworze sacharozy w buforze w ciągu nocy, po czym przenieśli je do 5 ml odpowiedniego substratu. Inkubację wykonywali w ciągu 45–90 min w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ , po czym skrawki przemywali 0,2 M roztworem sacharozy w 0,1 M buforze weronalowo-octanowym o  $\text{pH} = 7,2$  i utrwalali 1%  $\text{OsO}_4$  w tym samym buforze, a następnie w 0,5% octanie uranylu w ciągu 45 min, odwadniali w etanolu i zatapiali w Eponie.

We frakcji wzbogaconej w błony Golgiego, Farquhar i wsp. [22] oznaczali cytochemicznie rozkład tych samych enzymów albo po utrwaleniu i odwirowaniu jako osad, albo w nieutrwalonych zawiesinach. Osad frakcji otrzymywali po dodaniu do zawiesiny błon 1% aldehyd glutarowy w 0,1 M buforze kakodylanowym o  $\text{pH} = 7,4$  i temperaturze  $0^\circ\text{C}$ . Po 10 min utrwalania próbki rozcieńczyli 0,2 M roztworem sacharozy w tym samym buforze i umieszczali w odpowiednim medium kontynuując inkubację 60–90 min w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  lub  $37^\circ\text{C}$ . Reakcję enzymatyczną przerywali przemywając osad trzykrotnie 0,2 M roztworem sacharozy w 0,1 M buforze weronalowym i zbierając go przez odwirowanie. Na końcu osad utrwalali kolejno w  $\text{OsO}_4$  i octanie uranylu, odwadniali w 70%, 90% i absolutnym etanolu, po czym próbki kroili na kawałki  $1 \times 3$  mm i zatapiali w Eponie. Natomiast w przypadku zawiesiny błon Golgiego, autorzy ci inkubowali frakcję w odpowiednim medium w ciągu 30 min w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  wstrząsając całość mechanicznie, po czym przerywali reakcję enzymatyczną przez dodanie



1% roztworu aldehydu glutarowego i oziębienie do 0°C. Całość odwirowali, osad utrwalali OsO<sub>4</sub> i w dalszym ciągu postępowali jak poprzednio z utrwalonymi osadami.

Podobnie Iijima i Imai [42, 43] oznaczyli lokalizację TPP - azy, fosforylasy alfa glukonowej, heksokinazy, dehydrogenazy glukozo - 6 - fosforanu, aldoazy, dehydrogenazy mleczanowej i dehydrogenazy bursztynianowej w ultracienkich skrawkach śródmózgowia szczura. Gros i wsp. [40] zastosowali technikę histochemiczną w celu lokalizacji glikoproteidów w aparacie Golgiego komórek zarodków myszy.

Przeprowadzono szereg badań potwierdzających rolę aparatu Golgiego w rozwoju i różnicowaniu błony komórkowej. Palade [78] badając trzustkę stwierdził, że część błony komórkowej może pochodzić z błony aparatu Golgiego, a szczególnie z pęcherzyków wydzielniczych, które ulegają fuzji z błoną komórkową, podczas gdy ziarna zymogenu są przenoszone na zewnątrz komórki. Podobny mechanizm potwierdzili Bergeron i wsp. [9], badając pochodzenie receptora insuliny w błonie komórkowej wątroby, oraz McKeel i Jarett [60] w badaniach cykazy adenylowej błony komórkowej i aparatu Golgiego w przednim płacie przysadki wieprza. Rambourg i wsp. [81, 82] wykazali, że kompleksy białko - polisacharydowe glyocalix są syntetyzowane w aparacie Golgiego i następnie przenoszone na powierzchnię komórki przez wakuole pochodzące z aparatu Golgiego. Badania przeprowadzone w latach 1974–1976 przez Bingham i Farrella [11], Baumrucker i Keenana [6] oraz Kuhna i White [54] nad rolą aparatu Golgiego w gruczołach mlecznych szczura i krowy wykazały ciągłość szorstkiej i gładkiej siateczki śródplazmatycznej z aparatem Golgiego oraz jego rolę w kumulacji jonów Ca<sup>2+</sup> i fosforylacji białek, a szczególnie kazeiny. Jest ona gromadzona i w formie micelli wydzielana przez wakuole aparatu Golgiego. Potwierdzono również zdolność fuzji wakuoli Golgiego z błoną komórkową po wydzieleniu zawartości na zewnątrz komórki w komórkach nerwowych [38], wątrobie [39] oraz fibroblastach kurzych [77], a także rolę aparatu Golgiego w biogenezie lizosomów [50] i biosyntezie glikoaminoglikanów [6, 32].

## VI. WPŁYW RÓŻNYCH SUBSTANCJI NA MORFOLOGIĘ I FUNKCJĘ APARATU GOLGIEGO

Jak wynika z badań licznych autorów, aparat Golgiego jest organelą wrażliwą na działanie czynników zewnętrznych, zarówno fizycznych, jak chemicznych, które powodują jej zmiany morfologiczne i biochemiczne. Stockem i Korohoda [92] stwierdzili zmniejszenie ilości di-



ktiosomów, jak również zmniejszenie ilości cystern w diktiosomie w komórkach *Amoeba proteus* pod wpływem pinocytozy indukowanej 0,5% roztworem albuminy, a także w wyniku obniżenia do 0°C lub podwyższenia do 30°C temperatury hodowli. Wakuolizacja aparatu Golgiego oraz innych błon w kulturach komórkowych, pochodzących z różnych narządów kurczęcia i świnki morskiej, następowała [97] po podaniu antybiotyku X 537 A — produktu fermentacji *Streptomyces*. Badania Ravazzoli [83] nad przytarczycami potwierdziły wpływ tego antybiotyku na morfologię aparatu Golgiego, powodując po 60 min inkubacji pęcznienie i dezorganizację cystern i pęcherzyków. Proliferacja aparatu Golgiego oraz siateczki śródplazmatycznej w wątrobie płaza *Xenopus laevis* zachodziła po podaniu 17  $\beta$  estradiolu [56].

Moskalewski i wsp. [70, 71] wykazali, że pod wpływem kolchicyny i vinblastyny w hodowlach chondrocytów oraz izolowanych wysepek trzustki świnek morskich następowało zanikanie mikrokanalików oraz dysocjacja, jak również zmniejszenie ilości cystern w diktiosomach. Badania Treloar i wsp. [100], Mitranic i wsp. [64] oraz Sturgess i wsp. [96] wykazały hamowanie aktywności transferazy galaktozyłowej aparatu Golgiego wątroby szczurów pod wpływem cykloheksimidu i puromycyny, co powodowało również zmiany ultrastruktury tej organelli. Cysterny były nieregularne, przy czym zmiany nasilały się szczególnie po stronie bocznej. Obserwowano również nieregularność kanalików oraz akumulację lipoproteidów o dużej gęstości (LDL) i wakuolizację aparatu Golgiego. Zdaniem autorów, zmiany te są skorelowane z hamowaniem syntezy białka przez puromycynę i wynikają z wpływu tego związku na błony wewnątrzkomórkowe.

Sam aminonukleozyd puromycyny [96] powoduje około dwukrotny wzrost objętości i powierzchni aparatu Golgiego, ale przede wszystkim wzrost proliferacji sieci drobnych kanalików otaczających cysterny oraz zwiększenie średnicy cystern i wzrost dużych pęcherzyków wydzielniczych. Maksimum zmian strukturalnych następuje po 10 godz. od dożylnego podania aminonukleozydu, czemu towarzyszy równoczesny wzrost aktywności galaktozylotransferazy błon Golgiego i surowiczej.

Według Katony i Moscarella [44, 47] podanie tego związku minimalnie zmienia aktywność galaktozylotransferazy błon Golgiego, natomiast stymuluje aktywność kwaśnej i zasadowej fosfatazy oraz TPP-azy i arylosulfatazy A, a zmniejszenie aktywności arylosulfatazy B. Zmiany te zanikają po 5–24 godz. od momentu podania aminonukleozydu puromycyny.

Romijn i Gelsema [86] stwierdzili stymulację aktywności wydzielniczej aparatu Golgiego w szyszynce królików pod wpływem noradrenaliny. Opierając się na znanym wpływie fenobarbitalu na wzrost ilości



błon cytoplazmatycznych w hepatocytach, któremu towarzyszy wzrost aktywności enzymów metabolizujących leki, Bolender i Weibel [13] stwierdzili zwiększenie powierzchni aparatu Golgiego w hepatocytach przy równoczesnym wzroście objętości jąder, bez zmian objętości mitochondriów i peroksysomów.

Stymulujący wpływ lizolecytyny na glikozylotransferazy potwierdził Shier i Trotter [91] dla sjałylotransferazy mikrosomów, Mookerjea i Yung [65, 66] dla galaktozylotransferazy aparatu Golgiego wątroby szczurów, a Anttinen [2] dla galaktozylotransferazy zarodków kurzych. Young i wsp. [110] wykazali również stymulację aktywności transferazy UDP - Gal  $\rightarrow$  GlcNAc po związaniu izolowanych błon aparatu Golgiego z konkanawaliną A, co według nich wynika ze zmian struktury błon po związaniu z lektynami.

Zmiany morfologii wewnątrzkomórkowych organelli zachodzą również w pewnych stanach chorobowych, np. cukrzyca. Zmiany morfologii mitochondriów serca i wątroby [57] oraz siateczki śródplazmatycznej, rybosomów i błony komórkowej [1, 15, 16, 84, 85] stwierdzono w cukrzyca doświadczalnej wywołanej podaniem alloksanu i streptozotocyny. Badania przeprowadzone przez Sarnecką - Keller i Kordowiak [51, 88] wskazują, że do organelli zmieniających swą strukturę pod wpływem cukrzyca streptozotocynowej należy również aparat Golgiego.

#### VII. PRÓBY IZOLOWANIA GALAKTOZYLOTRANSFERAZY, ENZYMU MARKEROWEGO BŁON GOLGIEGO

Galaktozylotransferaza, podobnie jak inne glikozylotransferazy, występuje w formie wolnej, tzw. rozpuszczalnej w surowicy [31], płynie owodni [73], moczu [18], ślinie [72], kolostrum bydlęcym [80], mleku bydlęcym [4, 59, 80] oraz fibroblastach kurzych i komórkach aorty [7, 33]. W błonach organelli komórkowych, tj. głównie w błonach aparatu Golgiego, enzym ten występuje w ścisłym związku z nimi w formie tzw. nierozpuszczalnej [58, 66, 87, 88, 89, 107, 109].

Gdy próby izolowania rozpuszczalnej galaktozylotransferazy z surowicy, mleka i kolostrum bydlęcego [31, 59, 80, 99, 103] powiodły się, otrzymanie czystego enzymu związanego z błonami przysparzało wiele trudności. W 1976 r. ukazały się prace dotyczące izolowania galaktozylotransferazy z błon mikrosomów śledziony [58] oraz wątroby [31].

Martin i wsp. [58] otrzymali frakcję mikrosomów śledziony szczura i poddali ją działaniu detergentów, tj. Tritonu X - 100 lub Tweenu 20, 40, 60, 80. Po odwirowaniu zawiesiny w nadsączu autorzy uzyskali 7-16% aktywności całkowitej transferazy galaktozylowej po działaniu



Tritonu X-100 oraz 10%, 6%, 6% i 4% odpowiednio dla pozostałych detergentów.

Fraser i Mookerjea [31] zastosowali ekstrakcję mikrosomów wątroby 0,25 M roztworem sacharozy w 35 mM buforze Tris-HCl o pH = 7,4 z 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> i 200 mM NaCl. Po 30 min inkubowania w temperaturze 0°C lub 30°C odwirowali zawiesinę przy 100 000 g w czasie 1 godz. W nadsączu uzyskali 17% aktywności galaktozylotransferazy. Po oddzieleniu nadsączu autorzy ci stosowali oczyszczenie enzymu przez chromatografię kolumnową na Sephadex G-200. Kolumnę o wymiarach 2,5 × 100 cm kalibrowali 0,1 M buforem Tris-HCl o pH = 7,5 zawierającym 0,1 M NaCl i 0,02% NaN<sub>3</sub>. Zbierali porcje co 30 min, przy szybkości przepływu 15–20 ml/godz. Następnie frakcje o największej aktywności transferazy galaktozylowej poddawali elektroforezie dyskowej w żelu poliakryloamidowym. Otrzymali pasmo białkowe, które ruchliwością odpowiada położeniu pasma o największej aktywności transferazy galaktozylowej i jest porównywalne z oczyszczoną surowiczą galaktozylotransferazą.

Według Frasera i Mookerjea [31] badania ich mają znaczenie kliniczne, gdyż surowicza galaktozylotransferaza może pochodzić z nierozpuszczalnej, związanej z błonami mikrosomów i posiadającej dużą masę cząsteczkową, formy tego enzymu i ulegać zmianie w różnych schorzeniach wątroby u ludzi.

#### VIII. UWAGI KOŃCOWE

Zastosowanie nowoczesnych metod morfologicznych i biochemicznych do badania aparatu Golgiego in vivo i in vitro pozwala na coraz lepsze poznanie organizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórki i jej współzależności w badanym narządzie czy tkance. Zebranie wyników pochodzących z różnych zastosowanych w badaniach metod umożliwia próby uogólnienia roli jaką aparat Golgiego odgrywa w różnych narządach prawidłowych oraz stanach chorobowych, np. nowotworowych czy cukrzycy. Badania zmian tej organelli pod wpływem różnych czynników przyczynią się być może do poznania podłoża molekularnego pewnych stanów patologicznych.

#### PODZIĘKOWANIE

Dziękuję serdecznie prof. dr hab. Marii Sarneckiej-Keller za cenne uwagi i wskazówki podczas przygotowania maszynopisu. Profesorom: W. P. Cunninghamowi, D. J. Morré, J. Reinertowi oraz Redakcji Springer Verlag w Heidelbergu uprzejmie dziękuję za wyrażenie zgody na wykorzystanie Ich materiałów w tym artykule.



## LITERATURA

- [1] ALFORD E. P., MILLEA M. E., REAVEN E. P., SHORNSTEIN R. G., REAVEN G. M., Effect of duration of insulin deficiency on membrane bound and free ribosome from livers of diabetic rats, *Diabetologia*, **11**: 191-203, 1975.
- [2] ANTTINEN H., Stimulation of collagen galactosyltransferase and glucosyltransferase activities by lysophosphatidylcholine, *Biochem. J.*, **160**: 29-35, 1976.
- [3] ASSMANN G., MAHLEY R. W., DAVIS B. D., HOLCOMBE K. S., Cholesterol esterification by the rat liver Golgi apparatus, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **33**: 23-28, 1974.
- [4] BARKER R., OLSEN K. W., SHAPER J. H., HILL R., Agarose derivatives of uridine diphosphate and N-acetylglucosamine for the purification of a galactosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **247**: 7135-7147, 1972.
- [5] BAUER C. H., LUKASCHEK R., REUTTER W. G., Studies on the Golgi apparatus. Cumulative inhibition of protein and glycoprotein secretion by D-galactosamine, *Biochem. J.*, **142**: 221-234, 1974.
- [6] BAUMRUCKER C. R., KEENAN T. W., Membranes of mammary gland X. Adenosine triphosphate - dependent calcium accumulation by Golgi apparatus - rich fractions from bovine mammary gland, *Expt. Cell Res.*, **90**: 253-261, 1975.
- [7] BELON P., LOUISOT P., Glycoprotein biosynthesis in the aortic wall. III. Study of soluble galactosyl transferase in intimal cells, *Int. J. Biochem.*, **5**: 409-415, 1974.
- [8] BERGERON J. J. M., EHRENREICH J. H., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. II. Biochemical characterization, *J. Cell Biol.*, **59**: 73-88, 1973.
- [9] BERGERON J. J. M., EVANS W. H., GESCHWIND J. J., Insulin binding to rat liver Golgi fractions, *J. Cell Biol.*, **59**: 771-776, 1973.
- [10] BERGMAN A., DALLNER G., Distribution of protein - bound sugar residues in microsomal subfractions and Golgi membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 496-508, 1976.
- [11] BINGHAM E. W., FARRELL H. M., Jr, Casein kinase from the Golgi apparatus of lactating mammary gland, *J. Biol. Chem.*, **249**: 3647-3651, 1974.
- [12] BIZZI A., MARSII J. B., Further observations on the attachment of carbohydrate to lipoproteins by rat liver Golgi membranes, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **144**: 762-765, 1973.
- [13] BOLENDER R. P., WEIBEL E. R., A morphometric study of the removal of phenobarbital - induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment, *J. Cell Biol.*, **56**: 746-761, 1973.
- [14] CHABAUD O., BOUCHILLOUX S., RONIN C., FERRAND M., Localization in a Golgi - rich thyroid fraction of sialyl -, galactosyl -, and N - acetylglucosaminyltransferases, *Biochimie*, **56**: 119-130, 1974.
- [15] CHANDRAMOULI V., CARTER J. R., Cell membrane changes in chronically diabetic rats, *Diabetes*, **24**: 257-262, 1975.
- [16] CHANDRAMOULI V., WILLIAMS S., MARSHALL J. S., CARTER J. R., Cell surface changes in diabetic rats. Studies of lectin binding to liver cell plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **465**: 19-34, 1977.
- [17] CHEETHAM R. D., MORRÉ D. J., YUNGHANS W. N., Isolation of Golgi apparatus - rich fraction from rat liver. II. Enzymic characterization and comparison with other cell fractions, *J. Cell Biol.*, **44**: 492-500, 1970.



- [18] CHESTER M. A., The occurrence of a  $\beta$  - galactosyltransferase in normal human urine, *FEBS Lett.*, **46**: 59-62, 1974.
- [19] CUNNINGHAM W. P., STAEHELIN L. A., RUBIN R. W., WILKINS R., BONNEVILLE M., Effects of phosphotungstate negative staining on the morphology of the isolated Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **62**: 491-504, 1974.
- [20] DALTON A. J., FELIX M. D., Cytological and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis in situ, in homogenates and after isolation, *Amer. J. Anat.*, **94**: 171-184, 1954.
- [21] EHRENREICH J. H., BERGERON J. J. M., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. I. Isolation procedure and morphological characterization, *J. Cell Biol.*, **59**: 45-72, 1973.
- [22] FARQUHAR M. G., BERGERON J. J. M., PALADE G. E., Cytochemistry of Golgi fractions prepared from rat liver, *J. Cell Biol.*, **60**: 8-25, 1974.
- [23] FAVARD P., The Golgi apparatus, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima, De Faria, Nordt Holland Publ. Comp. Amsterdam London 1969, 1131-1155.
- [24] FLEISCHER B., FLEISCHER S., Preparation and characterization of Golgi membranes from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**: 301-319, 1970.
- [25] FLEISCHER B., FLEISCHER S., OZAWA H., Isolation and characterization of Golgi membranes from bovine liver, *J. Cell Biol.*, **43**: 59-79, 1969.
- [26] FLEISCHER B., ZAMBRANO F., Localization of cerebroside - sulfotransferase activity in the Golgi apparatus of rat kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 951-959, 1973.
- [27] FLEISCHER B., Isolation and characterization of Golgi apparatus and membranes from rat liver, [w] *Methods in Enzymology*, red. S. Fleischer. L. Packer, Acad. Press Inc. N. York, 1974, vol. **31** cz. A: 180-191.
- [28] FLICKINGER C. J., Radioactive labeling of the Golgi apparatus by microinjection of individual amebae, *Exptl. Cell Res.*, **88**: 415-418, 1974.
- [29] — Synthesis, intracellular transport and release of secretory protein in the seminal vesicle of the rat, as studied by electron microscope radioautography, *Anat. Rec.*, **180**: 407-426, 1974.
- [30] — Protein secretion in the rat ventral prostate and the relation of Golgi vesicles, cisternae and vacuoles, as studied by electron microscope radioautography, *Anat. Rec.*, **180**: 427-448, 1974.
- [31] FRASER I. H., MOOKERJEA S., Studies on the purification and properties of UDP - galactose - glycoprotein galactosyltransferase from rat liver and serum, *Biochem. J.*, **156**: 347-355, 1976.
- [32] FREILICH L. S., LEWIS R. G., REPPUCCI A. G., SILBERT J., Glycasaminoglycan - synthesizing activity of an isolated Golgi preparation from cultured mast cells, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **63**: 663-669, 1975.
- [33] FROGER C., LOUISOT P., Glycoprotein biosynthesis in Arbovirus infected cells, *Int. J. Biochem.*, **5**: 585-589, 1974.
- [34] FROT-COUTAZ J., DUBOIS P., BERTHILLIER B., GOT R., Essai de localisation subcellulaire de trois glycosyltransferases microsomiques de la muqueuse intestinale de rat, *Exptl. Cell Res.*, **77**: 223-231, 1973.
- [35] GANG H., LIEBER C. S., RUBIN E., Ethanol increases glycosyl transferase activity in the hepatic Golgi apparatus, *Nat. New Biol.*, **244**: 123-125, 1973.
- [36] GOLGI C., Sur la structure des cellules nerveuses, *Arch. Ital. Biol.*, **30**: 60-73, 1898.



- [37] — Sur la structure des cellules nerveuses des ganglions spinaux, *Arch. Ital. Biol.*, **30**: 278–285, 1898.
- [38] GONATES N. K., STEIBER A., KIM S. V., GRAHAM D. I., AVRAMEAS S., Internalization of neuronal plasma membrane ricin receptors into the Golgi apparatus, *Expt. Cell Res.*, **94**: 426–431, 1975.
- [39] GRATZL M., DAHL G.,  $Ca^{2+}$ -induced fusion of Golgi derived secretory vesicles isolated from rat liver, *FEBS Letters*, **62**: 142–145, 1976.
- [40] GROS D., CHALLICE C. E., SCHREVEL J., Detection de glycoproteines dans l'appareil de Golgi des cellules myocardiques et endocardiques du cœur embryonnaire de souris, *J. Microscopie*, **20**: 303–304, 1974.
- [41] GUZDEK A., KORDOWIAK A., SARNECKA - KELLER M., The level and composition of seromuroid and nondialysable serum sugar - peptide fraction compared with the activity of galactosyltransferase (EC 2.4.1.38) of liver Golgi membranes in insulin treated rats, *Clin. Chim. Acta*, **72**: 393–399, 1976.
- [42] IIJIMA K., On the morphology of the Golgi apparatus in the various nuclei of the rat mesencephalon, *Histochem.*, **46**: 61–75, 1975.
- [43] IIJIMA K., IMAI K., Histochemical studies on the morphology of the Golgi apparatus and on the enzymes of carbohydrate metabolism in various nuclei of the rat mesencephalon, *Histochem.*, **46**: 209–227, 1976.
- [44] KATONA E., Very early effects of aminonucleoside on some rat liver enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, **23**: 2199–2202, 1974.
- [45] — Incorporation of inorganic sulphate in rat liver Golgi, *Eur. J. Biochem.*, **63**: 583–590, 1976.
- [46] KATONA E., MOSCARELLO M. A., The association of enzymic activities in subfractions of isolated rat liver Golgi, *Experientia*, **37**: 412–413, 1975.
- [47] — Early effects of aminonucleoside on enzymes in the Golgi apparatus of rat liver, *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **53**: 549–554, 1975.
- [48] KIM Y. S., PERDOMO J. M., Membrane glycoproteins of the rat small intestine. Chemical composition of membrane glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **342**: 111–124, 1974.
- [49] — Biosynthesis of membrane glycoproteins in the rat small intestine, *FEBS - Letters*, **44**: 309–312, 1974.
- [50] KISHORE G. S., TULSIANI D. R. P., BHAVANANDAN V. P., CARUBELLI R., Membrane - bound neuraminidases of rat liver - neuraminidase activity in Golgi apparatus, *J. Biol. Chem.*, **250**: 2655–2659, 1975.
- [51] KORDOWIAK A., SARNECKA - KELLER M., The protein patterns of Golgi - rich membrane preparations from the livers of control, insulin treated and streptozotocin diabetic rats, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **25**: 205–209, 1977.
- [52] KUBASOVA T., VARGA L., KÖTELES G. J., Macromolecular synthesis and radiosensitivity of the Golgi complex, *Studia Biophys.*, **53**: 157–160, 1975.
- [53] — Studies on the radiosensitivity of the function of the Golgi complex, *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**: 533–540, 1976.
- [54] KUHN N. J., WHITE A., Evidence for specific transport uridine diphosphate galactose across the Golgi membrane of rat mammary gland, *Biochem. J.*, **154**: 243–244, 1976.
- [55] LETTS P. J., PINTERIC L., SCHACHTER H., Localization of glycoprotein glycosyltransferases in the Golgi apparatus of rat and mouse testis, *Biochim. Biophys. Acta*, **372**: 304–320, 1974.
- [56] LEWIS J. A., CLEMENS M. J., TATA J. R., Morphological and biochemical changes in the hepatic endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of male



- Xenopus laevis* after induction of Egg - Yolk protein synthesis by Oestradiol — 17 $\beta$ , Molec. Cell. Endocrinol., 4: 311-329, 1976.
- [57] MARINARI U. M., COTTALASSO D., MONACELLI R., NOVELLI A., Effects of alloxan diabetes and insulin on morphology and certain functional activities of mitochondria of the rat liver and heart, Acta Diabet. Lat **11**: 296-314, 1974.
- [58] MARTIN A., RICHARD M., LOUISOT P., Glycoprotein biosynthesis in splenic cells, purification of a microsomal galactosyltransferase, Experientia, **32**: 844-845, 1976.
- [59] MAWAL R., MORRISON J. F., EBNER K. E., Studies on galactosyltransferase. Detection of enzyme reactant complexes by means of affinity chromatography, J. Biol. Chem., **246**: 7106-7109, 1971.
- [60] McKEEL D. W. Jr. JARETT L., The enrichment of adenylate cyclase in the plasma membrane and Golgi subcellular fraction of porcine adenohypophysis, J. Cell Biol., **62**: 231, 1974.
- [61] MERRIT W. D., MORRÉ D. J., A glycosyl transferase of high specific activity in secretory vesicles from isolated Golgi apparatus of rat liver, Biochim. Biophys. Acta, **304**: 397-407, 1973.
- [62] MICHAELS J. E., LEBLOND C. P., Transport of glycoprotein from Golgi apparatus to cell surface by means of carrier vesicles, as shown by radioautography of mouse colonic epithelium after injection of <sup>3</sup>H fucose, J. Microscopie Biol. Cell., **25**: 243-248, 1976.
- [63] MITRANIC M. M., STURGESS J. M., MOSCARELLO M. A., Recovery of galactosyl transferase activity from sucrose gradients during isolation of Golgi membranes, J. Membrane Biol., **19**: 397-408, 1974.
- [64] — The effect of cycloheximide on galactosyl transferase of rat liver Golgi membranes, Biochim. Biophys. Acta, **421**: 272-279, 1976.
- [65] MOOKERJEA S., YUNG J. W. M., Stimulation of galactosyltransferase in liver microsomes by lysolecithin, Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**: 815-822, 1974.
- [66] — A study on the effect of lysolecithin and phospholipase A on membrane bound galactosyltransferase, Canad. J. Biochem., **52**: 1053-1066, 1974.
- [67] MORRÉ D. J., HAMILTON R. L., MOLLENHAUER H. H., MAHLEY D. W., CUNNINGHAM W. P., CHEETHAM R. D., LeQUIRE V. S., Isolation of a Golgi apparatus - rich fraction from rat liver, I. Method and morphology, J. Cell Biol., **44**: 484-491, 1970.
- [68] MORRÉ D. J., MERLIN L. M., KEENAN T. W., Localization of glucosyl transferase activities in Golgi apparatus - rich fraction isolated from rat liver, Biochim. Biophys. Res. Commun., **37**: 813-819, 1969.
- [69] MORRÉ D. J., MOLLENHAUER H. H., BRACKER C. E., Origin and continuity of Golgi apparatus, [w] Origin and continuity of cell organelles, red. J. Reinert, H. Ursprung, Berlin, Heidelberg, N. York, Springer, 1971, 82-126.
- [70] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., FRIBERG U., In vivo influence of colchicine on the Golgi complex in A and B cells of guinea pig pancreatic islets, J. Ultrastruct. Res., **54**: 304-317, 1976.
- [71] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., LOHMANDER S., FRIBERG V. Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates, Exptl. cell Res., **95**: 440-454, 1975.
- [72] NAKAMURA R., WATANABE T., YASUTAKE A., TSUNEMITSU A., The



- presence of uridine 5'diphosphogalactose: Nacetylglucosamine galactosyltransferase in human saliva, *J. Dent. Res.*, **53**: 937-938, 1974.
- [73] NELSON J., JATO - RODRIGUEZ J. J. MOOKERJEA S., The occurrence and properties of soluble UDP-galactose: glycoprotein galactosyltransferase in human amniotic fluid, *Canad. J. Biochem.*, **52**: 42-50, 1974.
- [74] NESTRUCK A. C., RUBINSTEIN D., The synthesis apoproteins of very low density lipoproteins isolated from the Golgi apparatus of rat liver, *Canad. J. Biochem.*, **54**: 617-628, 1976.
- [75] NEUTRA M., LEBLOND C. P., Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose - H<sup>3</sup>, *J. Cell Biol.*, **30**: 119-137, 1966.
- [76] — Radioautographic comparison of the uptake of galactose H<sup>3</sup> and glucose H<sup>3</sup> in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolisacharides, *J. Cell Biol.*, **30**: 137-150, 1966.
- [77] OLSEN B. R., PROCOP D. J., Ferritin - conjugated antibodies used for labeling of organelles involved in the cellular synthesis and transport of procollagen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 2033-2037, 1974.
- [78] PALADE G. E., Functional changes in the structure of cell components, [w] *Subcellular Particles*, red. T. Hayashi, New York, Ronald Press 1959, 64-83.
- [79] PERRONCITO A., Contribution a l'etude de la biologie cellulaire. Mitochondries, chromidies et appareil reticulaire interne dans les cellules spermatiques, *Arch. Ital. Biol.*, **54**: 307-311, 1910.
- [80] POWELL J. T., BREW K., The preparation and characterization of two forms of bovine galactosyl transferase, *Eur. J. Biochem.*, **48**: 217-228, 1974.
- [81] RAMBOURG A., CLERMONT Y. C., MARRAUD A., Three - dimensional structure of osmium impregnated Golgi apparatus as seen in the high voltage electron microscope, *Amer. J. Anat.*, **140**: 27-45, 1974.
- [82] RAMBOURG A., HERNANDEZ W., LEBLOND C. F., Detection of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells, *J. Cell Biol.*, **40**: 395-414, 1969.
- [83] RAVAZZOLA M., Golgi complex alterations induced by X 537 A in chief cells of rat parathyroid gland, *Lab. Invest.*, **35**: 425-430, 1976.
- [84] REAVEN E. P., PETERSON D. T., REAVEN G. M., The effect of experimental diabetes mellitus and insulin replacement on hepatic ultrastructure and protein synthesis, *J. Clin. Invest.*, **52**: 248-262, 1973.
- [85] REAVEN E. P., REAVEN G. M., Mechanism for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin treated rats, *J. Clin. Invest.*, **54**: 1167-1178, 1974.
- [86] ROMIJN H. J., GELSEMA A. J., Electron microscopy of the rabbit pineal organ in vitro. Evidence of norepinephrine - stimulated secretory activity of the Golgi apparatus, *Cell Tiss. Res.*, **172**: 365-377, 1976.
- [87] RONZIO R. A., Glycoprotein synthesis in the adult rat pancreas. II. Characterization of Golgi - rich fractions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**: 777-784, 1973.
- [88] SARNECKA - KELLER M., KORDOWIAK A., The activity of Golgi membrane galactosyl transferase in the livers of streptozotocin diabetic rats, *Acta Biochim. Polon.*, **24**: 179-185, 1977.
- [89] SCHACHTER H., JABBAL I., HUDGIN R. L., PINTERIC L., McGUIRE E. J., ROSEMAN S., Intracellular localization of liver sugar nucleotide glycoprotein



- glycosyltransferases in a Golgi - rich fraction, *J. Biol. Chem.*, **245**: 1090-1100, 1970.
- [90] SCHNEIDER W., Determination of nucleic acid in tissues by pentose analysis, [w] *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Acad. Press N. York, 1957, vol. 3, 680-684.
- [91] SHLIER W. T., TROTTER J. T., Stimulation of liver microsomal sialyltransferase activity by lysolecithin, *FEBS Letters*, **62**: 165-168, 1976.
- [92] STOCKEM W., KOROHODA W., Effects of induced pinocytotic activity and ekstreme temperatures on the morphology of Golgi bodies in *Amoeba proteus*, *Cell Tiss. Res.*, **157**: 541-552, 1975.
- [93] STURGESS J. M., de la IGLESIA F. A., MINAKER E., MITRANIC M., MOSCARELLO M. A., The Golgi complex. II. The effects of aminonucleoside on ultrastructure and glycoprotein biosynthesis, *Lab. Invest.*, **31**: 6-14, 1974.
- [94] STURGESS J. M., KATONA E., MOSCARELLO M. A., The Golgi complex. I. Isolation and ultrastructure in normal rat liver, *J. Membrane Biol.* **12**: 367-384, 1973.
- [95] STURGESS J. M., MITRANIC M., MOSCARELLO M. A., The incorporation of D - glucosamine <sup>3</sup>H into the Golgi complex from rat liver and into serum glycoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 1270-1277, 1972.
- [96] — The Golgi complex. III. The effects of puromycin on ultrastructure and glycoprotein synthesis, *Chem. Biol. Interact.*, **11**: 207-224, 1975.
- [97] SOMLYO A. P., GARFIELD R. E., CHACKO S., SOMLYO A. V., Golgi organelle reponse to the antibiotic X 537 A, *J. Cell Biol.*, **66**: 425-443, 1975.
- [98] TAKAYAMA K., Mac LENNAN D. H., TZAGALOFF A., STONER C. D., Studies on the electron transfer system. LXVII. Polyacrylamide gel electrophoresis of the mitochondrial electron transfer complexes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**: 223-230, 1966.
- [99] TRAYER I. P., HILL R. L., The purification and properties of the A protein of lactose synthetase, *J. Biol. Chem.*, **246**: 6666-6675, 1971.
- [100] TRELOAR M., STURGESS J. M., MOSCARELLO M. A., An effect of puromycin on galactosyl transferase of Golgi - rich fractions from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **249**: 6628-6632, 1974.
- [101] TRIFARO J. M., DUERR A. C., Isolation and characterization of a Golgi - rich fraction from adrenal medula, *Biochim. Biophys. Acta*, **421**: 153-167, 1976.
- [102] TRIFARO J. M., DUERR A. C., PINTO J. E. B., Membranes of adrenal medula: a comparison between the membranes of the Golgi apparatus and chromaffin granules, *Molec. Pharmacol.*, **12**: 536-545, 1976.
- [103] TSOPANAKIS A. D., HERRIES D. G., Galactosyl transferase, the role of manganese ions in the mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 1102-1108, 1976.
- [104] VanGOLDE L. M., FLEISCHER B., FLEISCHER S., Some studies on the metabolism phospholipids in Golgi complex from bovine and rat liver in comparison to other subcellular fractions, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**: 318-330, 1971.
- [105] WAGNER R. R., CYNKIN M. A., Enzymatic transfer of <sup>14</sup>C - glucosamine from UDP - N - acetyl - <sup>14</sup>C - glucosamine to endogenous acceptors in a Golgi apparatus - rich fraction from liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**: 139-143, 1969.
- [106] — Glycoprotein biosynthesis. Incorporation of glycosyl groups into endogenous



- acceptors in a Golgi apparatus - rich fraction of liver, *J. Biol. Chem.*, **246**: 143-151, 1971.
- [107] WARBURTON M., WYNN C. H., The effect of intralysosomal sucrase storage on the turnover of hamster fibroblast lysosomal and Golgi apparatus enzymes, *Biochem. J.* **158**: 401-407, 1976.
- [108] WEBER K., OSBORN M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406-4412, 1969.
- [109] YOUNG R. W., The role of the Golgi complex in sulfate metabolism, *J. Cell Biol.*, **57**: 175-189, 1973.
- [110] YOUNG M. E., MOSCARELLO M., RIORDAN J. R., Concanavalin A binding to membranes of the Golgi apparatus and resultant modification of galactosyl-transferase activity, *J. Biol. Chem.*, **251**: 5860-5865, 1976.
- [111] ZAHLER W. L., FLEISCHER B., FLEISCHER S., Gel electrophoresis patterns of the proteins of organelles isolated from bovine liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **203**: 283-290, 1970.
- [112] ZAMBRANO F., FLEISCHER S., FLEISCHER B., Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles, *Biochim. Biophys. Acta*, **380**: 357-369, 1975.

*Otrzymano: 16 września 1977.*

*Przyjęto: 5 października 1977.*

*Adres autorki: ul. Grodzka 53, 31 - 001 Kraków.*







LECTINS AS STRUCTURAL AND MOLECULAR PROBES  
IN BIOLOGICAL MEMBRANE RESEARCH,  
HISTOCHEMISTRY AND ULTRAHISTOCHEMISTRY

Jürgen ROTH

Institute of Pathology, Friedrich - Schiller University Jena, DDR - 69 Jena, German Democratic Republic

*Summary.* In recent years a marked increase has been witnessed in the knowledge on the structure, dynamics and function of biological membranes. Among other agents, lectins have been used successfully as probes for the study of the number, arrangement, mobility and turnover of cell surface glycocomponents. A comprehensive survey is given on recent results in biological membrane research leading to the formulation of the concept of the fluid mosaic model of the organization of membranes. Some aspects of the use of lectins as structural probes for investigations on cell surface topography (number and arrangement of lectin-binding sites, correlation between lectin-binding sites and intramembraneous particles, ligand-induced redistribution of binding sites and transmembrane control over lectin-binding site mobility) are reported. Furthermore, the use of labeled lectins for light and electron microscopic visualization of saccharide residues on various cell types and different tissues is reviewed.

COMPOSITION AND ARCHITECTURE OF THE CELL SURFACE

The surface of the eukaryotic cell is a very complex and highly dynamic structural and functional entity (Fig. 1). A detailed elucidation of the chemistry and structure of the cell surface is still far from complete. At present the term cell surface is used to designate a structure which forms the cells outer semipermeable barrier, the plasma membrane (integral component), but which also contains peripheral components such as glycocomponents at the outer surface of the plasma membrane and intracellular contractile components such as microfilaments and microtubules (cytoskeleton) which transiently and temporarily interact with the plasma membrane (membrane-associated components). Biolo-



gical membranes have been subjected to investigation for more than 50 years and have been the subject of a number of recent reviews [19, 27, 56, 58-60, 75, 82, 88, 89, 98, 109, 110, 119, 175-178, 205]. The methodical basis for formulation of the concept of the fluid mosaic

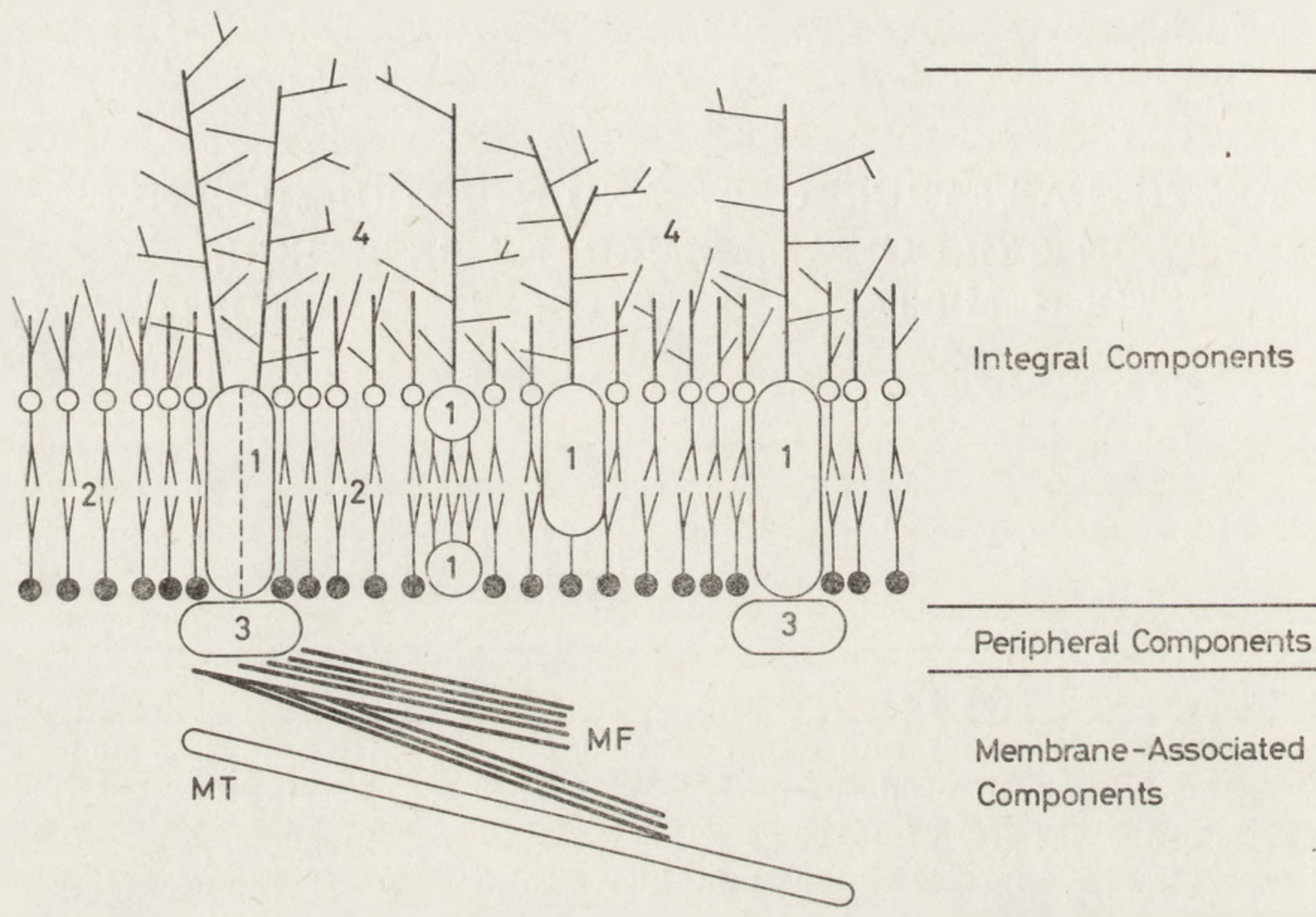


Fig. 1. Schematic version of the cell surface on the basis of the fluid mosaic model of the membrane structure

1 — integral proteins, 2 — lipid bilayer, 3 — peripheral proteins, 4 — oligosaccharides, MF — microfilaments, MT — microtubules. For details see text. (From Roth, J., *Exp. Path. Suppl.*, 3, 1977)

model for the organization of biological membranes [178] is the development of new electron microscopic techniques such as freeze-etching [11, 112, 113, 188] and lectin-ultrahistochemistry as well as the utilization of biophysical techniques in membrane research [13, 61, 89, 129, 171] as X-ray diffraction [95], electron spin resonance [74, 79], nuclear magnetic resonance [90], fluorescent probes [146], photodichroism, infrared and Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. In the fluid mosaic model the structure and thermodynamics of membrane components are considered. Neither hydrophobic nor hydrophilic interactions are maximized by this model in contrast to earlier model concepts. The lipids form the matrix of the mosaic, and since the membrane lipids are generally rather fluid than crystalline under physiological conditions, the mosaic is expected to be a dynamic one. Thus, the membrane appears to be a two-dimensional viscous solution, with its components capable of undergoing translational diffusion in the plane of



the membrane. The nonpolar fatty acid residues of the membrane lipids are sequestered inside the hydrophobic portions of the membrane, while the ionic and polar groups of the lipids are in contact with the bulk aqueous phase, in order to maximize hydrophobic and hydrophilic interactions in the membranes. Thus, in respect to the arrangement of the integral proteins, the phospholipids are arranged in an interrupted bilayer [10, 11, 43, 57, 67, 74, 85, 132, 170, 190, 200, 213]. In some plasma membranes, as for instance the erythrocyte membrane the lipids appear to be asymmetrically distributed across the two halves of the lipid bilayer [17, 18, 76, 206]. The outer layer of the human erythrocyte membrane consists mainly of phosphatidylcholine and sphingomyelin, whereas phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine are predominantly in the inner half of the bilayer.

The asymmetric distribution of the phospholipids could imply that the inner and outer leaflet markedly differ in the unsaturation of their phospholipid hydrocarbon chains. Since unsaturation is a parameter of lipid fluidity [23, 128], this could mean that the two leaflets differ in their fluidity. Recent results of Tanaka and Ohnishi [194] suggest asymmetric fluidity in erythrocyte membrane: a more rigid outer layer and a more fluid inner layer. It was concluded that the heterogeneity in the fluidity of intact erythrocyte membranes arises from interactions between lipids and proteins, from interactions between the membrane constituents and the inner proteins (spectrin), and from the concentration of cholesterol in the outer layer. In general, the location and effect of cholesterol in the bilayer should be considered. There exists evidence that cholesterol is concentrated in the outer leaflet of the plasma membrane [30]. Cholesterol has been shown to interact with the hydrocarbon chains of phospholipids and it is apparent that the effects of cholesterol on membranes depend on whether the membrane phospholipids are above or below their transition temperature [128, 131]. Cholesterol may possibly have a dual role in different regions of the same membrane, preventing the formation of crystalline, gel-like areas in some regions while simultaneously inhibiting the movement of relatively unsaturated phospholipids in more fluid, liquid-crystalline regions [128, 136]. A cholesterol-containing outer leaflet and a more fluid inner leaflet of the phospholipid bilayer may be characteristic features of the plasma membrane and may have organizational and functional significance (see for recent review [120]). In biological membranes containing low concentrations of cholesterol, therefore, the cholesterol will not be randomly distributed when both gel and liquid crystalline phases are present in the membrane, but will preferentially be associated with the lipids which are in liquid crystalline phase [34,



136]. The transition between gel and liquid crystalline phases in lipids is also dependent on temperature. In biological membranes, the interpretation of the effects of changes in temperature which can lead to lipid segregation, phase transitions, lipid cluster formation or conformational changes in proteins is difficult.

There is strong evidence for the diffusion of lipid molecules in the plane of the bilayer [37, 92, 201]. Estimates have also been made of the rate of lateral diffusion of lipid molecules in biological membranes. The rate of lateral diffusion of lipids in sarcoplasmic reticulum membranes was estimated to be  $7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  [170] or  $6 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  [92] in dependence on temperature; values of  $11 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  at  $30^\circ\text{C}$  and  $3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  at  $40^\circ\text{C}$  were estimated for liver microsomal membranes [192] and *E. coli* membranes [168], respectively. In other systems estimates of phospholipid planar diffusion are also in the range of  $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  [74a, 85, 170]. The translational freedom of motion for at least some of the lipids in biological membranes suggests that some membrane proteins may also diffuse freely [169]. The only accurate measurements of protein diffusion rate in the surface of a membrane are those for rhodopsin in the retinal rod membrane [142] and for fluorescein labeled integral membrane proteins in cultured cells [41]. A high rate of lateral diffusion has also been estimated for antigens in the cell surface [33, 35, 39, 40, 52, 97, 135, 195, 203, 217]. Evidence for translation of membrane proteins comes from experiments showing reversible particle aggregation. The particles appearing in freeze-fractured erythrocyte ghosts undergo a reversible pH-dependent aggregation [110, 138] and a temperature-dependent aggregation has been observed for the alveolar membrane of *Tetrahymena* [182]. Little is known on the nature of the lipid-protein interaction in membranes, although there is quite strong evidence for a shell of "immobilized" lipid around the membrane proteins [74a]. There is a possibility that membrane proteins require particular lipids for activity [81].

It could be shown for isolated and purified membrane integral proteins and glycoproteins that they have distinct hydrophilic and hydrophobic regions [55, 69, 114, 216, 220]. The major sialoglycoprotein (glycophorin) of the human erythrocyte membrane is an integral glycoprotein which penetrates the membrane [14-16, 115, 215]. Glycophorin seems to be organized into three distinct domains which include (a) a glycosylated segment of approximately 64 residues from the  $\text{NH}_2$ -terminus, (b) a hydrophobic segment of approximately 32 nonpolar residues and (c) a  $\text{COOH}$ -terminal segment, composed of approximately 35 residues [19, 102, 115, 151, 172, 173, 199]. It is evident from the amino acid sequence and the location of the glycosylated



segment that human erythrocyte glycoporphin spans the plane of the membrane. The glycosylated segment carries blood group antigens, lectin-binding sites and influenza virus receptors [103] and is exposed to the external milieu of the cell. The hydrophobic segment spans the lipophilic core of the membrane [172], serving thereby to anchor the molecule by hydrophobic interactions to the membrane lipids. The C-terminal segment is exposed to the cytoplasmic interior of the cell [19] and contains a large number of acidic amino acids. Thus, it is well suited for binding cations or electrostatic interaction with basic peptides. There exist other major integral membrane proteins in human erythrocytes called component a [14] or band 3 component [185, 186] which has been shown to traverse the membrane [14, 15, 54, 66, 72, 116, 137, 189]. Band 3 is the protomer of a membrane-spanning dimer to which two tetramers of Band 6 (2 glyceraldehyde-3P-dehydrogenase) can bind at the cytoplasmic surface [219]. Band 4.2, another inner surface protein also seems to form complexes with Band 3 at the inner membrane surface. The peptide may form a loop in the membrane with two distinct and discontinuous regions exposed at the cytoplasmic surface and separated by a segment of the peptide chain, that is exposed at the external surface. Thus, band 3 may have a S-shaped structure which traverses the membrane twice and contains a duplicated set of sites [72]. Suggestions for the function of the protein include the anion transport [18, 26, 29, 93] and a site for binding of intracellular enzymes [77]. In contrast to the integral membrane proteins the peripheral ones are attached to the membrane either through divalent cation bridges or through specific integral membrane proteins [42, 60, 73, 122]. The human erythrocyte membrane spectrin is an example of a peripheral membrane protein [100, 101, 124, 187] which is located at the cytoplasmic membrane surface. In association with actin-like molecules it is probably responsible for the cell shape and deformability [187]. At the inside of other cell types an analogous system composed of microfilaments and microtubules is present [108, 134]. It differs from peripheral membrane proteins mainly because of its transient nature and temporary association with the plasma membrane. Thus, it is a membrane-associated component. There is some evidence for the presence of contractile protein components at the outer surface of the plasma membrane of cultured cells [214].

#### LECTINS AS STRUCTURAL PROBES FOR CELL SURFACE TOPOGRAPHY

Many aspects of the use of lectins as structural probes in membrane research have been recently reviewed by Nicolson [119]. The structure



and properties of lectins and techniques for electron microscopic visualization of lectin receptors have also been reviewed [156a]. Therefore, in this chapter some of the more recent developments in the study of cell surface topography by use of lectins will be discussed.

For studies concerning the arrangement and distribution of the cell surface lectin-binding sites as well as their numerical relationship to intramembraneous structures it is important to have data on the number of the lectin-binding sites. The use of radioactively labeled lectins can provide information on both the number of binding sites and strength of binding to cells. However, it should be taken into account that the values obtained are averages for the whole cell population tested and it is possible that individual cells differ in the actual number of binding sites. For example, investigations on age-dependent variations in the number of sialic acid residues in human erythrocytes have demonstrated a strong decrease of cell surface sialic acid in older cells as compared with its content in younger cells. Most numerous data for lectin-binding site numbers are available for the human erythrocyte membrane.

From all of these data some generalizations can be made. For human erythrocytes the number of binding sites for the different lectins, either blood group specific or not, is of the order of magnitude of  $10^5$  per cell, whereas the values for association constant often differ in a relatively wide range. Other types of cells, such as lymphocytes of different origins and somatic cells have a higher number of lectin binding-sites usually in the range of  $10^6$ – $10^7$  [3, 62, 99, 125, 126, 144, 151, 210]. Studies of the effect of one lectin on the binding of another provide information on the relative disposition of binding sites on the cell surface. The competition between concanavalin A - (Con A) and wheat germ agglutinin - (WGA) - binding - sites was investigated for the first time by Ozanne and Sambrook [130] on monolayer cultures of transformed 3T3 cells. It was found that agglutination by Con A did not affect the amount of  $^{125}\text{I}$  - WGA bound subsequently; conversely, the amount of  $^{125}\text{I}$  - Con A bound to the cells was the same whether or not the cells had been exposed to WGA. In consequence, it was concluded that WGA and Con A bind to topologically distinct sites on the cell surface, and that there is no or little competition between the two lectins.

Roos and Temmink [153] investigated by cytochemical methods the reported absence of competition for binding sites between Con A and WGA, by reacting the 3T3 cells first with one lectin, with following addition of the ferritin complex of the other. The cytochemical investigation only partly confirmed the absence of competition. Precoating with Con A had no influence on subsequent binding of ferritin-labeled



WGA. However, precoating with WGA appreciably reduces subsequent binding of ferritin-labeled Con A. Among other possibilities it is probable that the large ferritin lectin conjugate reaches some of its sites less easily on WGA-covered membrane.

Results of competitive binding studies on human erythrocytes indicate that *Phaseolus vulgaris* lectin can bind to virtually all the *Robinia pseudoaccacia*-binding sites [94]. In contrast *Robinia pseudoaccacia* lectin could only inhibit *Phaseolus vulgaris* lectin binding to erythrocytes in 50%. This finding indicates that approximately one half of the *Phaseolus vulgaris*-binding sites are shared with *Robinia pseudoaccacia* lectin while the other half are inaccessible to it. The same result was reported by Kornfeld et al. [87], for the competitive binding of *Lens culinaris* lectin and *Phaseolus vulgaris* lectin to human erythrocytes. Between the lectins from *Agaricus bisporus* and from *Phaseolus vulgaris* no competition for binding to human erythrocytes could be observed [144].

Adair and Kornfeld [2] investigated the relationship of the binding sites for WGA and RcA on human erythrocytes. With normal erythrocytes no competition could be observed. However, after neuraminidase treatment of the cells *Agaricus bisporus* lectin almost completely blocked the binding of ricin to the newly exposed binding sites. In addition, the binding of *Agaricus bisporus* lectin was inhibited by ricin when desialized erythrocytes were used. All these data obtained by the use of radioactively labeled lectins mediate only indirect information. Only in electron microscopic investigations visualizing the lectin-binding sites by the above mentioned techniques, is direct observation of the localization and distribution of these specific cell surface sites possible. Using the Con A-peroxidase technique [8], Roth et al. [158] observed a discontinuous cell surface label on the unfixed treated Ehrlich ascites carcinoma cells. The arrangement of the cell surface label was interpreted to be due to irregular distribution of the Con A-binding sites. Similar results were reported by Wagner and Wagner [208] for the binding sites of protectin from *Helix pomatia* on Ehrlich ascites carcinoma cells. However, conclusions as to the two-dimensional arrangement of macromolecules as lectin-binding sites or antigens at the cell surface by examination of single ultrathin sections are problematic. On the other hand, reconstruction of the topographical distribution of cell surface antigens by serial sectioning of single cells [183] is laborious even when only single cells are to be investigated. The preparation of membranes by lysis at an air-water interface for studies of the two-dimensional distribution of lectin-binding sites [121] is a more effective method. However, in hypotonic medium detachment of lectin binding sites



can take place [24] and it is not certain that the cell surface organization corresponds exactly to that of intact cells. Using membrane preparation by lysis at an air-water interface Nicolson and Singer [123] found in a variety of mammalian plasma membranes that the saccharide residues (visualized by ferritin-labeled lectins) were localized exclusively on the exterior face of the membranes, indicating the asymmetry of plasma membrane oligosaccharides. For example Irimura et al. [70] used membrane preparation by lysis to investigate the distribution of lectin-binding sites on sialidase treated human erythrocytes. The ferritin-labeled Con A and Ricinus communis lectin A (RcA) were found in clusters, whereas the ferritin-labeled *Bauhinia purpurea* lectin and *Arachis hypogaea* lectin were random distributed. Labeling of erythrocyte membranes with native Con A followed by ferritin-labeled *Bauhinia purpurea* lectin resulted in a clustered arrangement of the latter, indicating that the *Bauhinia purpurea*-binding sites were forced to move together with those for Con A. A further methodical possibility is the use of scanning electron microscopy [22, 64]. However, there are some limitations due to resolution. Among these techniques the freeze-etching technique is a mild method for preparation of large regions of the cell surface with sufficient resolution. After cell surface labeling and freeze-etching it is possible to investigate the topographical distribution of lectin-binding sites as well as their relationship to the intramembraneous particles. In extension of earlier investigations Roth et al. [160] reported a clustered arrangement of the Con A-cell surface binding sites on Ehrlich ascites carcinoma cells, whereas the intramembraneous particles were distributed homogeneously. The lack of correlation between the number of lectin-binding sites and intramembraneous particles in Ehrlich ascites carcinoma cells was also found for Lens culinaris lectin [162]. In contrast to the findings on Ehrlich ascites carcinoma cells for the isolated human erythrocyte membrane a similar pattern in distribution of both intramembraneous particles and binding sites for *Phaseolus vulgaris* lectin was reported [103, 198]. Furthermore, a one-to-one correlation and a structural linkage were suggested to exist between the lectin binding sites and the intramembraneous particles (which represent integral proteins in the case of human erythrocytes [44, 110, 138]). For human erythrocytes the only protein components found to bear lectin-binding sites are integral proteins [83, 84, 86, 87, 172]. The actual biochemical nature of the intramembraneous particles in eukaryotic cells is unknown. Thus, the question arises of the existence of a structural linkage between surface lectin-binding sites and intramembraneous particles. By freeze-fracture, freeze-etch and lectin labeling techniques the binding sites for Con A, WGA, RcA, *Agaricus bisporus* and *Phaseolus vulgaris* lectins could be localized on the intra-





Fig. 2. Immuno freeze - etching by use of lectins. Demonstration of the two-dimensional distribution of Con A - binding sites by ferritin - labeled lectin at the cell surface of an Ehrlich ascites tumor cell (a). Localization of the A antigen sites of a human AB erythrocyte by gold - labeled anti - A<sub>He1</sub> (b) (+) — inner membrane fracture face, S — cell surface, I — ice. The direction of shadowing is indicated by encircled arrowhead. 62,000 × (a), 76,000 × (b). (From Roth, J., Exp. Path. Suppl. 3, 1978)



membraneous particles of human erythrocyte ghosts [102, 140, 198, 202]. However, evidence exists that some surface lectin-binding sites (for RcA) are not solely associated with intramembraneous particles [202]. In close correlation with this problem is the question of the existence of a one-to-one correlation between intramembraneous particles and lectin-binding sites. For isolated erythrocyte membranes there exists some experimental evidence of a possible one-to-one correlation [102, 140, 198]. Conversely, investigations on intact erythrocytes have suggested no close correlation between the number of intramembraneous particles and Con A-binding sites [6, 163, 207] or the binding sites for protectin from *Helix pomatia*.

McDonald and McDonald [107] incorporated the major sialoglycoprotein (glycophorin) of the human erythrocyte membrane into phospholipid vesicles. The outward orientation of liposome-bound glycophorin could be clearly demonstrated insofar as neuraminidase released vesicle-associated sialic acid and the WGA mediated hemagglutination was inhibited by the vesicles. However, by freeze-fracturing only small particles and a few 80 Å intramembraneous particles could be observed. In conjunction with the observation of Irimura et al. [70] on the common movement of Con A-binding sites (born by band 3) and *Bauhinia pur-*

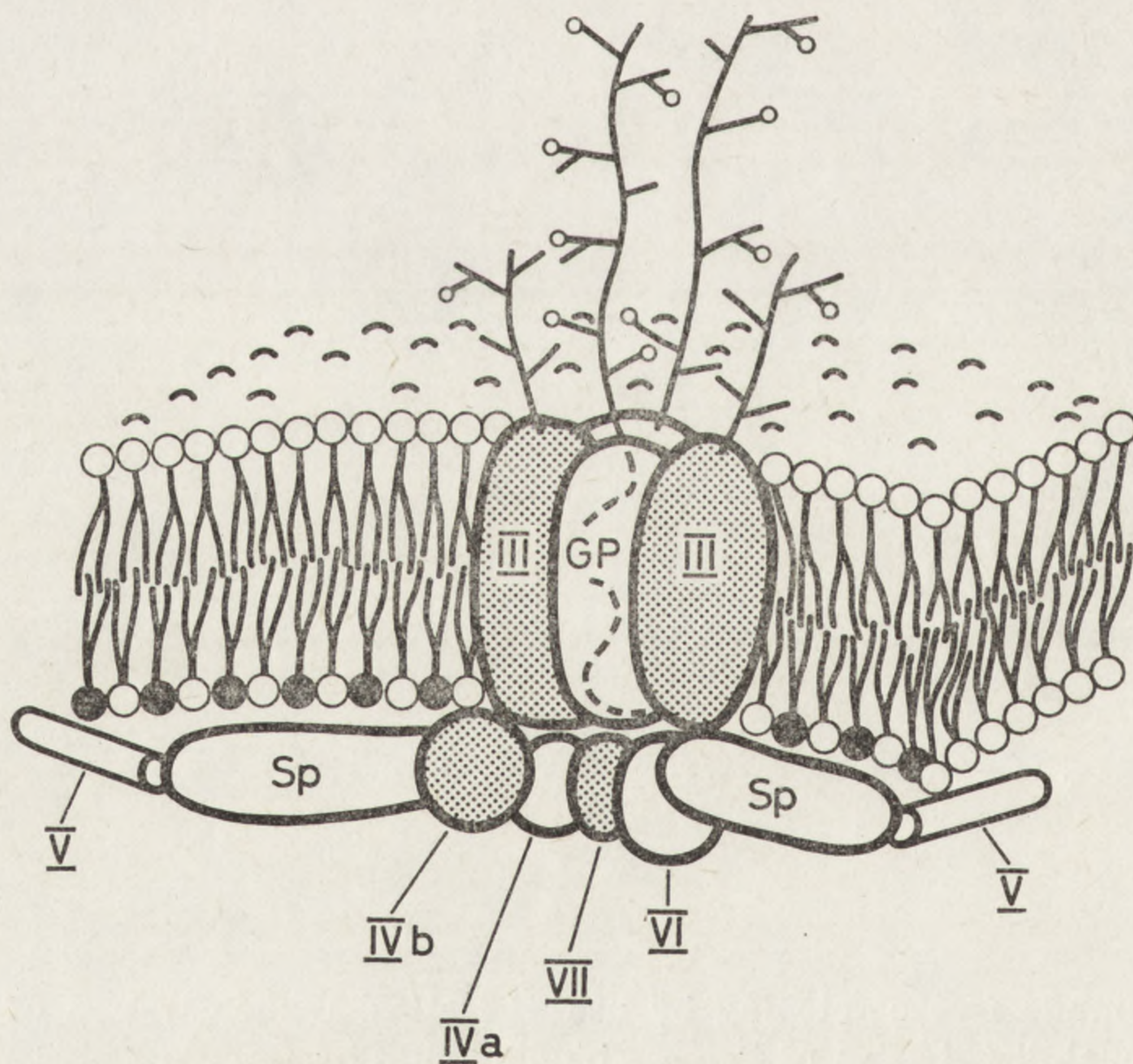


Fig. 3. Hypothetical model of the human erythrocyte "permeaphore". GP — glycophorin, III — component 3, Sp — spectrin, VI — glycerophosphate - 3 - dehydrogenase, V — actin. After [120]



*purea* lectin-binding sites (born by the major sialoglycoprotein) the results can be interpreted as evidence for an oligomeric structure of the intramembraneous particles containing the major sialoglycoprotein and band 3 glycoprotein [60]. This suggestion has received support from the findings of Pinto da Silva and Nicolson [140] that Con A-binding sites are associated with intramembraneous particles. The suggested role of this oligomeric complex in transport processes [5, 25] and water movement [139] led to the proposal that this membrane penetrating structure be called a "permeaphore" [140].

As already mentioned evidence has accumulated during the last years indicating that the cell surface of animal cells is sufficiently fluid to allow rotational and translational movements of membrane lipids and proteins. Cell surface glycoproteins are diffusely and randomly distributed in the unperturbed fluid membrane of cells. Multivalent ligands can cross-link membrane macromolecules and thus induce them to redistribute in the plane of the membrane. Fundamental to the development of this concept were the experiments of Frye and Edidin [52].

Two-dimensional redistribution of cell surface molecules induced by binding with multivalent antibodies or lectins has been demonstrated in lymphocytes [35, 36, 78, 97, 147, 184, 195, 203] fibroblasts [31, 39] and epithelial cells [155, 193]. Thus, ligand-induced redistribution of cell surface macromolecules is not only associated with some immunological functions of lymphoid cells but also occurs on most, if not all, cells [193]. Furthermore, the concept of relatively stable, long-lived, fixed receptors should be replaced by that of a dynamic state of these receptors. It was first noted by Taylor et al. [195] that after B cell binding of anti-Ig, the surface-Ig receptors aggregated into "clusters" and "patches" and subsequently into "caps" at one pole of the cell. Cap and patch formation is interpreted as due to aggregation by the reagent, followed by confluence of the aggregates in one or a few areas of the cell surface under the action of membrane flow [31, 32, 39]. Recent experiments with the use of ferritin-labeled Con A to label isolated fibroblastic plasma membranes were interpreted as indicative of a spon-

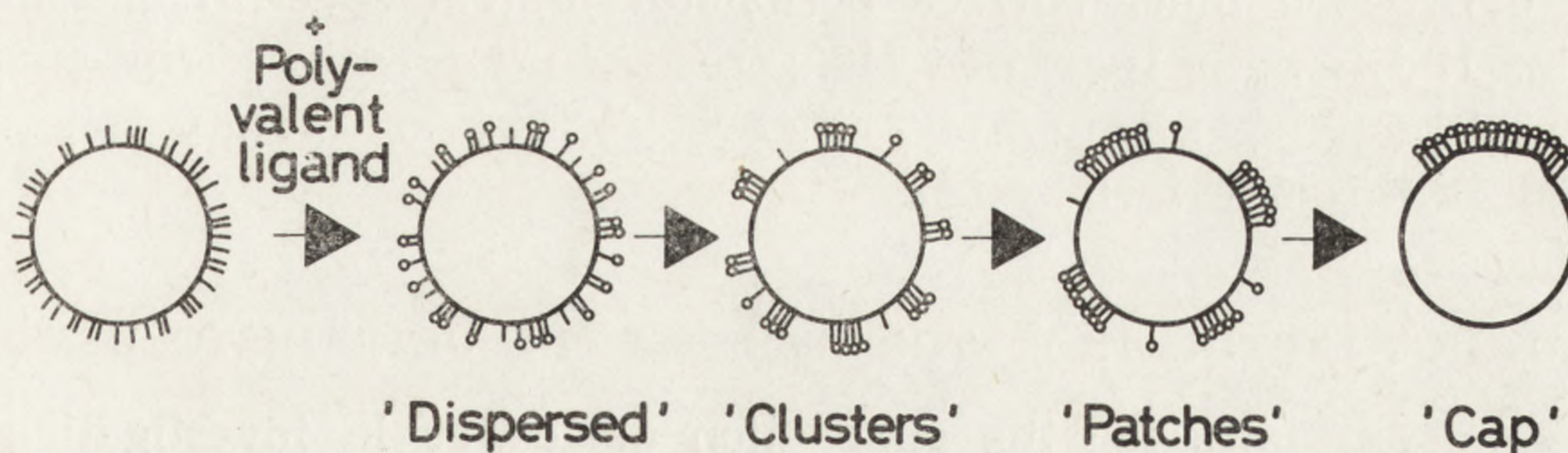


Fig. 4. Different steps leading to lymphoid cell capping (for details see text). After [120]



taneous or inherent aggregation of Con A - binding sites [117]. In view of the studies mentioned above, it seemed more likely that the observed clustering of Con A - binding sites was induced by the binding of the multivalent ferritin - labeled Con A. The inherent distribution of the Con A binding sites, investigated on prefixed cells, in order to immobilize the membrane proteins, consists in a random dispersed arrangement. Other experiments confirmed the prediction that clustering of lectin - binding sites is induced by the binding of the multivalent lectin [21, 53, 68, 105, 159, 160, 162, 164-166, 181].

A convincing example for the different degree of relative mobility of the RcA - binding sites on one and the same cell is reported by Nicolson and Yanagimachi [123]. The relative mobility of lectin - binding sites on rabbit spermatozoa was higher on postacrosomal regions than in acrosomal and tail regions. Only in the postacrosomal region could a lectin - induced clustering be demonstrated.

A temperature - dependent mobility of Con A - binding sites visualized by fluorescent labeled Con A was demonstrated by Nicolson [113]. Labeling of transformed 3T3 cells with FITC - anti Con A at 0°C followed by incubation at 22°C resulted in a patchy fluorescence. Incubation only at 0°C or followed by formaldehyde fixation before incubation at 22°C prevented the patchy fluorescence and resulted in a uniform fluorescence as observed for the normal 3T3 cells.

Events occurring exclusively on one side of the membrane which perturb the membrane topographic organization are termed cis - membrane perturbation [178]. The trans - membrane perturbations are defined as events occurring across the membrane, involving components on both sides. Direct experimental evidence for such a trans - membrane perturbation is reported by Yi and Nicolson [73]. Binding of RcA<sub>I</sub> to the outer surface of resealed human erythrocyte ghosts resulted in an organizational perturbation of peripheral membrane protein at the inner surface (spectrin), detected by an enhancement in the chemical cross - linking by dimethyl malonimidate. From another type of experiments further evidence was obtained for a structural transmembrane linkage between inner surface peripheral protein spectrin and glycoporphin. Nicolson and Painter [122] reported an antispectrin - induced transmembrane aggregation of sialic acid residues of the glycoporphin of human erythrocyte membranes.

#### THE USE OF LECTINS IN HISTOCHEMISTRY AND ULTRAHISTOCHEMISTRY

Some examples for the application of lectins in investigations on the presence, localization and topographical distribution of certain sugar residues are given.



Pratt and Gibson [143] used an indirect fluorescent antibody technique for visualization of Con A-binding sites in the embryonic rat head with particular attention to the secondary palate. The Con A-binding sites on the secondary palate of a 15-day embryonic rat are localized mainly extracellularly and most abundant in the basement lamina. The most intense fluorescence in the rat oral-facial tissue was seen in cartilaginous structures such as the nasal septum.

For the study of differentiative events, the intestinal epithelium is an ideal system because of the spatial segregation of the epithelial cells according to their degree of differentiation [71]. The surface glycoproteins of the differentiated villus cell membranes are "complete", but those of the crypt cells are "incomplete". Such a difference in surface properties between crypt cells and villus cells could also be detected in agglutination experiments with Con A [212]. Etzler and Branstrator [46] and Etzler [45] used different fluorescent labeled lectins for examination and characterization of cell surface and secretory components of rat intestinal epithelium. Differences in the reactivity with various lectins were found between the microvilli of the crypt cells and the cells of the villi. WGA, RcA and *Lotus tetragonolobus* lectins reacted with the microvillar portion of the epithelial cells lining the crypts and villi in the intestine adjacent to the pylorus. This pattern of reactivity was sharply altered along the first 15 cm of the intestine: only the luminal surfaces of the epithelial cells in the crypts and at the base of the villi reacted with *Lotus tetragonolobus* lectin and RcA whereas WGA reacted with the surfaces of the cells lining the villi. In the distal end of the small intestine all the three lectins reacted with the surfaces of cells only at the base of the villi and in the crypts. Regional differences in reactivity of goblet cell secretory material to the various lectins were also noted. On the whole, the data suggest that: (a) changes occur in the carbohydrate portion of the microvillar surface of epithelial cells as they differentiate and move up the villi; (b) these changes are related to the region of the intestine; and (c) the carbohydrate nature of the secretory material of the goblet cells varies in different regions of the small intestine. These morphological results extend the biochemical data on membrane glycoproteins of the rat small intestine [80] and on the chemical composition of goblet-cell mucin of the rat small intestine [51].

The outer segments of photoreceptors contain stacks of membranous disks bounded by a plasma membrane. The rod outer segment disk membrane consists of protein and lipid with the visual pigment glycoprotein, rhodopsin [63, 152]. Steinemann and Stoyer [192] observed that FITC-labeled Con A binds to the disk membrane with a dissociation constant of  $2 \times 10^{-7}$  M. At saturation one Con A monomer is



bound per one rhodopsin molecule. Bleaching of rhodopsin in disk membranes has little effect on the binding of Con A. The accessibility of the carbohydrate portion of rhodopsin to Con A suggests that this part is located on the surface of the disk membrane. These findings support the proposal that the carbohydrate portion acts as a hydrophilic surface marker to orient rhodopsin in the rod disk membrane. The surface density of saccharide ligands for Con A on the outer surface of retinal rod disc membranes was calculated to be one ligand per  $5 \times 10^4 \text{ \AA}^2$  by the use of  $^{60}\text{Co}$  - Con A [218].

Up till now mainly fluorescent labeled lectins have been used in histochemical investigations. Roth and Thoss [157] reported detailed methodical investigations of various FITC-labeled lectins for light microscopic demonstration of sugar moieties. On their basis systematic histotopochemical investigations with FITC-labeled lectins were performed [196, 197]. In various tissues and organs from different animal species positive results could be obtained. In general, connective tissue structures were stained and in a varying degree cell surface components and cytoplasmic as well as secretory components. To sum up, the light-microscopic results speak in favour of the general presence of lectin-binding sites in normal animal tissues and lend support to the concept of a carbohydrate-rich cell coat [7, 149, 150].

The main aspect of use of various lectins in ultrahistochemistry is their application to examine the distribution of specific saccharide residues on the surface of cellular membranes [121]. From these experiments most important results speaking in favour of a dynamic and mosaic structure of biological membranes were obtained. However, as already mentioned, application of the electron microscopic lectin techniques to tissues is limited because of the problem of penetration [8]. By use of cryostat sections or tissue chopper sections this problem could be partially resolved [4, 23, 49]. The successful utilization of the Con A-peroxidase technique for ultrahistochemical investigations in lung tissue was first reported by Roth [154]. Signs of function-conditioned variations of the glycocalyx were found in the alveolar epithelium. In contrast to the membranous pneumocytes which exhibit only a faint reaction at their luminal plasma membrane, a staining layer of about two- to three-fold thickness was visible on the granular pneumocytes. Positive results could also be obtained on the pleural mesothelial cells. Additional demonstration of alveolar hypophase components of the surfactant system was also possible. These results could be extended in a later investigation [157]. By morphological investigations using lectins the presence of various sugar residues in the hypophase of the alveolar surfactant system [158, 159, 204, 211] could be clearly demonstrated. Bret-



ton and Bariety [23] reported the ultrastructural localization of Con A - binding sites in rat kidney. Beside plasma membranes, membranes of the perinuclear space and endoplasmic membranes, mature collagen, basement membranes of Bowman's capsule and of the glomerular tuft and the mesangial matrix showed a positive staining.

The basement membrane of the ovarian sheath of *Galleria mellonella* has been shown to possess Con A - binding sites [145]. Under circumstances of hormonal deficiency (after decapitation within the first two days after larval - pupal ecdysis) which led to disturbances in the normal development of the ovariole, the ability of Con A binding in the basement membrane was abolished. In contrast, the negative results observed in the basal lamina of mouse pleura [156] may be due to insufficient penetration.

In synaptic transmission and memory function the participation of sialoglycomacromolecules is obvious [148]. Both Con A and RcA - binding sites could be demonstrated in synaptic membranes [9, 106]. In unfixed synaptosomes the lectin - binding sites visualized by ferritin labeled lectins are dispersed and mobile in synaptosome membranes and can be redistributed. In fixed synaptosomes, on the contrary, the lectin - binding sites were diffusely and evenly distributed over the surface, but absent in the synaptic clefts. As expected from biochemical analyses [50, 141] the major glycoprotein of nerve myelin can bind Con A [106, 216a]. The electron microscopic findings indicate clearly that the glycoprotein is located at the outer surface of myelin and at the interperiod line, and is capable of lateral movement.

Cell differentiation is associated with modifications in the structural and chemical organization of the cell surface [12]. During erythropoiesis for example, changes in plasma membrane proteins were detected [47]. The surface characteristics of hemopoietic cells in normal human bone marrow have been explored by Ackerman and Wakśal [1] using the Con A - peroxidase technique. A marked change occurs on the cell surface during normal differentiation which includes a significant reduction in the capacity of the plasma membrane of erythrocytic and neutrophilic cells to bind Con A. Similar results were reported in the course of erythropoiesis by Skutelsky [180], whereas Parmeley et al. [133] was not able to detect such differences in Con A - binding to the cell surface during maturation. Wagner and Wagner [207, 209] using ferritin and gold - labeled protectin from *Helix pomatia* observed a focal distribution of A antigen sites on human erythrocytes of groups A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>1</sub>B. Furthermore it could be demonstrated that A<sub>1</sub> and A<sub>1</sub>B - erythrocytes have an A antigen concentration about 4 times higher than have A<sub>2</sub> erythrocytes.



As already mentioned lectin-binding sites are also present in intracellular membranes. The presence of RcA-binding sites on the outer surface of azurophilic and specific granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes has been demonstrated by Feigenson et al. [48]. The unexpected localization at the outer membrane surface is probably related with the fusion of the granules with endocytic vacuoles. In investigations on the distribution of Con A-binding sites on chromaffine granules [38] no labeling in the outer surface of the granule membrane could be observed. However, an asymmetric distribution of ferritin-labeled Con A in isolated granule membranes indicated the presence of Con A-binding sites at the inner membrane surface. Thus, the membrane-bound dopamine- $\beta$ -hydroxylase can be considered as the Con A-binding site [167].

#### LEKTYNY JAKO ODCZYNNIKI W BADANIACH BŁON BIOLOGICZNYCH, HISTOCHEMII I ULTRAHISTOCHEMII

##### Streszczenie

W ostatnich latach zaznaczył się znaczny postęp w zrozumieniu struktury, dynamiki oraz funkcji błon biologicznych. W artykule przedstawiono krótki przegląd ostatnich wyników badań nad błonami komórkowymi, które przyczyniły się do zaproponowania modelu płynnej mozaiki. W modelu tym uwzględniono strukturę oraz ruchliwość składników błony. Lipidy błon tworzą macierz mozaiki, a ponieważ w fizjologicznych warunkach są one raczej płynne niż krystaliczne, przeto można oczekiwać, że mozaika jest płynna. Błona jest dwuwymiarowym lepkiem roztworem, którego składniki mogą przemieszczać się w płaszczyźnie błony. Lipidy są asymetrycznie rozdzielone między dwie połowy podwójnej warstwy lipidów. Dla błony komórkowej charakterystyczna jest powierzchniowa warstwa zawierająca cholesterol oraz cytoplazmatyczna — bardziej płynna. Białka błon można podzielić na dwie grupy zależnie od tego czy wykazują, czy też nie hydrofobowe oddziaływanie z lipidami błon. Postuluje się, że integralne białka przechodzące przez błonę posiadają strukturę umożliwiającą posiadanie przez część cząsteczki własności hydrofilnych, a przez część — hydrofobowych. Obwodowe białka, które nie przechodzą przez błonę, przyłączone są do niej albo za pomocą specyficznych integralnych białek, albo też przez dwuwartościowe mostki kationowe. Lektyny obok różnych innych sposobów używano z pozytywnym wynikiem do badania architektury i dynamiki błon biologicznych. Użycie tych roślinnych białek wiążących się z resztami cukrowcowymi pozwala ocenić liczbę tych reszt na powierzchni komórki oraz ich lokalizację. Stwierdzono, że reszty cukrowcowe wykrywane na powierzchni komórki są zlokalizowane wyłącznie na powierzchniowej warstwie błony komórkowej. Połączenie techniki immunologicznej z techniką freeze-etching pozwala badać zarówno rozmieszczenie miejsc wiążących lektynę w płaszczyźnie błony (w dwu wymiarach), jak i ich korelację do śródbłonowych cząstek, które reprezentują integralne białka błon. Nieznana jest jak dotąd biochemia cząstek śródbłono-



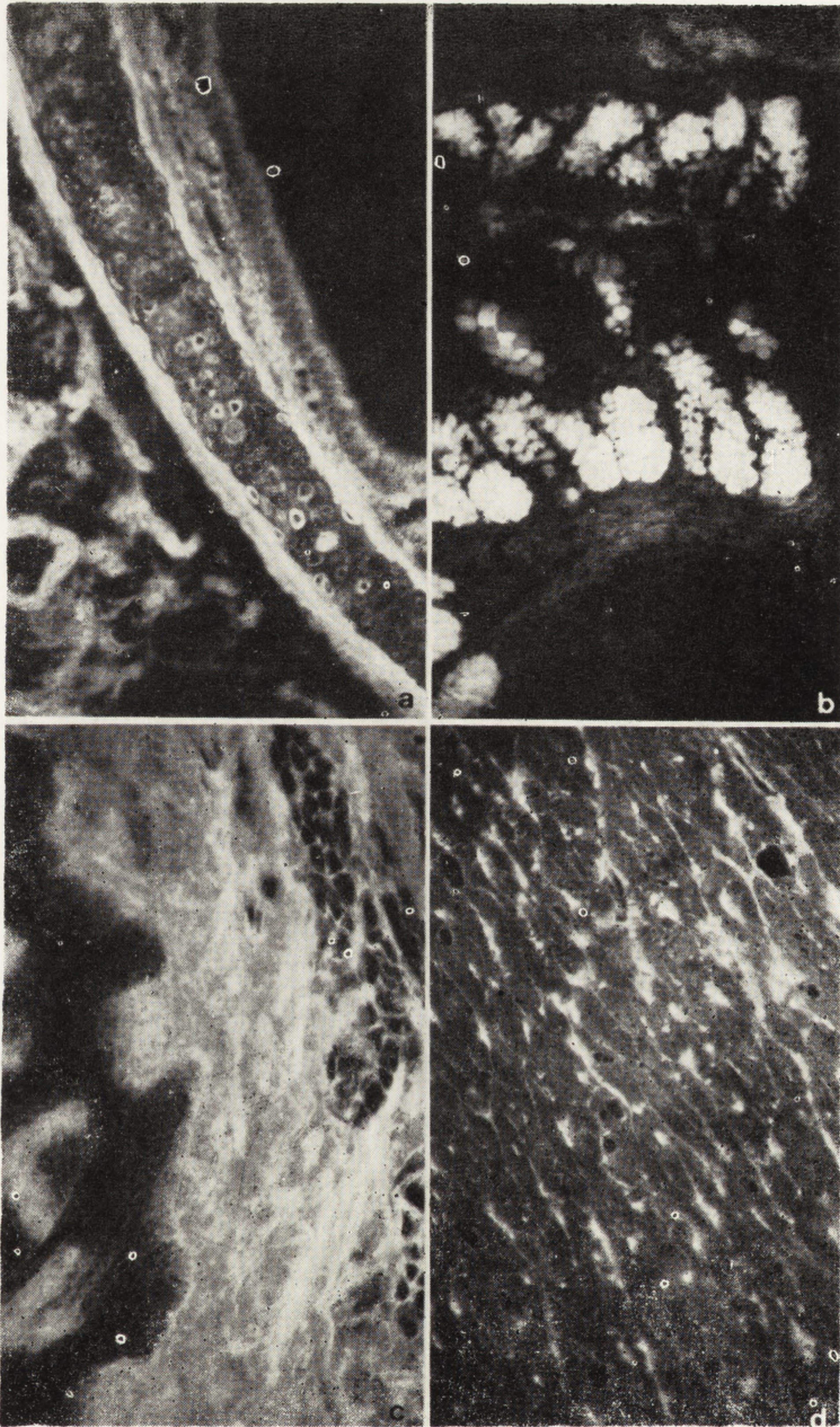


Fig. 5. Immunohistochemical demonstration of lectin - binding sites by fluorescent - labeled lectins: (a) Con A - binding sites in the rat trachea, (b) WGA - binding sites in rat large intestine (c) RcA - binding sites in epithelial, interstitial and muscle cells of human tongue, (d) RcA - binding sites in rat myocardium as visualized by fluorescent - labeled serum protein in a two - step affinity technique.  $300\times$  (a - d). (from Roth, Exp. Path. Suppl. 3, 1978)



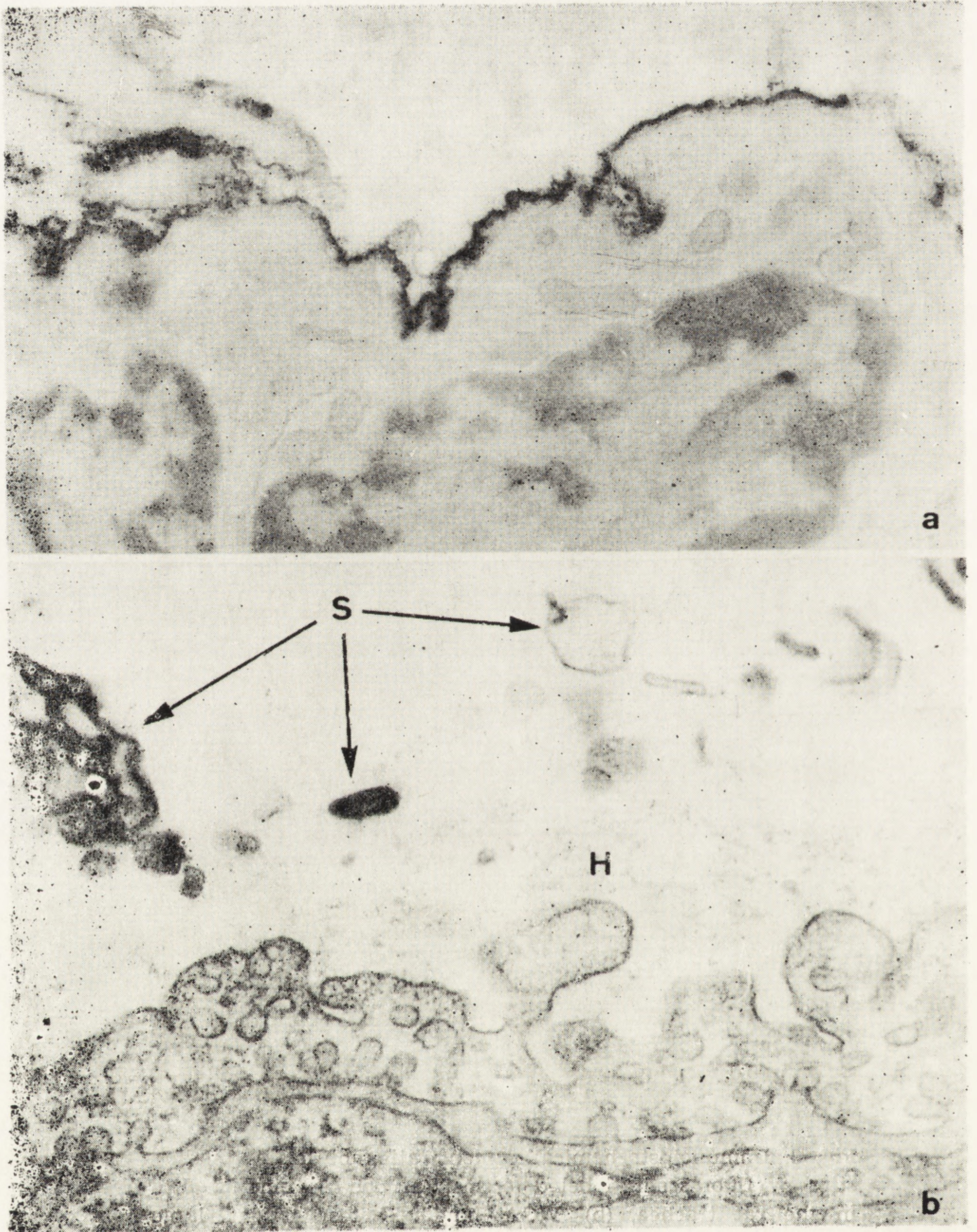


Fig. 6. Con A - peroxidase technique for specific visualization of cell surface glycocomponents of pneumocytes (a) and LcL - ferritin for demonstration of glycocomponents in the hypophase of the alveolar surfactant (b) of the mouse. 20,000  $\times$  (a), 70,000  $\times$  (b). (from Roth, Exp. Path. Suppl. 3, 1978)



wych w komórkach eukariotycznych. Stąd wynikają wątpliwości co do istnienia strukturalnego połączenia między miejscami wiążącymi lektynę na powierzchni i cząstkami śródbłonowymi oraz co do istnienia powiązania: jeden do jednego między nimi. W artykule przedyskutowano pewne aspekty przemieszczania się makrocząsteczek na powierzchni komórki następującego na skutek wiązania się wielowartościowego ligandu. Podano także pewne przykłady zastosowania lektyn w mikroskopie świetlnym i elektronowym dla lokalizacji specyficznych reszt cukrowcowych. Badania w mikroskopie świetlnym, przeprowadzone z użyciem znakowanych fluoresceiną lektyn, sugerowały zmiany w części cukrowcowej powierzchni mikrokosmków komórek nabłonkowych jelita podczas różnicowania. Podobne zmiany zaobserwowano na powierzchni komórek szeregu krwiotwórczego. Przedstawiono także badania prowadzące do wykazania miejsc wiążących lektyny w błonach śródplazmatycznych.

## LITERATURE

- [1] ACKERMAN G. A., WAKSAL S. D., Ultrastructural localization of Concanavalin A binding sites on the surface of differentiating hemopoetic cells, *Cell Tiss. Res.*, **150**: 331-342, 1974.
- [2] ADAIR W. L., KORNFELD S., Isolation of the receptors for wheat germ agglutinin and the *Ricinus communis* lectins from human erythrocytes using affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4696-4704, 1974.
- [3] AHMAN G. B., SAGE H. J., Binding of purified lectins to guinea pig lymphocytes. Studies of the number, binding constant, and distribution of *Lens culinaris* lectin A and *Agaricus bisporus* lectin molecules on lymphocyte surfaces, *Cell Immunol.*, **13**: 407-415, 1974.
- [4] AMHERDT M., ROTH J., MALLAISSE - LAGAE F., RAVAZOLLA M., PERRELET A., ORCI L., Ultrastructural detection of saccharide moieties in the B - cell of pancreatic islets by means of Concanavalin A. *Diabetologia* submitted for publication 1976.
- [5] AVRUCH J., FAIRBANKS J., Demonstration of a phosphopeptide intermediate in the  $Mg^{++}$  - dependent,  $Na^{+}$  - and  $K^{+}$  -stimulated adenosine triphosphatase reaction of the erythrocyte membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**: 1216-1220 (1972).
- [6] BÄCHI T., SCHNEBLI H. P., Reaction of lectins with human erythrocytes. II. Mapping of Con A receptors by freeze - etching electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **91**: 285-295, 1975.
- [7] BENNETT M. S., Morphological aspects of extracellular polysaccharides, *J. Histochem. Cytochem.*, **11**: 14-23, 1963.
- [8] BERNHARD W., AVRAMEAS S., Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A, *Exp. Cell Res.*, **64**: 232-236, 1971.
- [9] BITTIGER H., SCHNEBLI H. P., Binding of Concanavalin A and ricin to synaptic junctions of rat brain, *Nature*, **249**: 370-371, 1974.
- [10] BLAUROCK A. E., Structure of the nerve myelin membrane: proof of the low - resolution profile, *J. Mol. Biol.*, **56**: 35-52, 1971.
- [11] BLASIE J. K., WORTHINGTON C. R., Planar liquid - like arrangement of photopigment molecules in frog retinal receptor disc membrane, *J. Mol. Biol.*, **39**: 417-439, 1969.



- [12] BOYSE E. A., OLD L. J., Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann. Rev. Genet.*, **3**: 269-290, 1969.
- [13] BRANTON D., DAEMER D. W., Membrane structure. *Protoplasmatologia II/E/1*, Springer Verlag Wien, New York 1972.
- [14] BRETSCHER M. S., Human erythrocyte membranes: specific labeling of surface proteins, *J. Mol. Biol.*, **58**: 775-781, 1971a.
- [15] — Major protein which spans the human erythrocyte membrane, *J. Mol. Biol.*, **59**: 351-357, 1971b.
- [16] — Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane, *Nature New Biol.*, **231**: 229-232, 1971 c.
- [17] — Phosphatidyl - ethanolamine: Differential labeling in intact cells of human erythrocytes by a membrane impermeable reagent, *J. Mol. Biol.*, **71**: 523-528, 1972.
- [18] — Membrane structure: Some general principles. Membranes are asymmetric lipid bilayers in which cytoplasmically synthesized proteins are dissolved, *Science*, **181**: 622-629, 1973.
- [19] — C - terminal region of the major erythrocyte sialoglycoprotein is on the cytoplasmic side of the membrane, *J. Mol. Biol.*, **98**: 831-833, 1975.
- [21] BRETTON R., WICKER R., BERNHARD W., Ultrastructural localization of Concanavalin A receptors in normal and SV 40 - transformed hamster and rat cells, *Int. J. Cancer*, **10**: 397-410, 1972.
- [22] BRETTON R., CLARK D. A., NATHANSON L., The cytochemical detection of Concanavalin - A binding on cell surface by scanning electron microscopy, *J. Micr.*, **17**: 93-96, 1973.
- [23] BRETTON R., BARIETY J., Ultrastructural localization of Concanavalin A in normal rat kidney glomeruli and arterioles, *J. Ultrastruct. Res.*, **48**: 396-403, 1974.
- [24] BURGER M., A difference in the architecture of normal and virally transformed cells., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **62**: 994-1001, 1969
- [25] CABANTCHIK Z. I., ROTHSTEIN A., The nature of membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives, *J. Membrane Biol.*, **10**: 311-330, 1972.
- [27] CAPALDI R. A., GREEN D. E., Membrane proteins and membrane structure, *FEBS Letters*, **25**: 205-209, 1972.
- [28] CHAPMAN D., in *Biological Membranes* (eds. D. Chapman, and D. F. M. Wallach) vol. **2**: 91-144, Academic Press New York, 1973.
- [29] CARTER J. R., jr., AVRUCH J., MARTIN D. B., Glucose transport by trypsin - treated red blood cell ghosts, *Biochim. Biophys. Acta*, **291**: 506-518, 1973.
- [30] CASPAR D. L. O., KIRSCHNER D. A., Myelin membrane structure at 10 Å resolution, *Nature New Biol.*, **231**: 46-52, 1971.
- [31] COMOGLIO P. M., GUGLIELMONE R., Two - dimensional distribution of Concanavalin A receptor molecules on fibroblasts and lymphocyte plasma membrane, *FEBS Letters*, **27**: 256-258, 1972.
- [32] COMOGLIO P. M., FILOGAMO G., Plasma membrane fluidity and surface motility of mouse C - 1300 neuroblastoma cells. *J. Cell Sci.*, **13**: 415-420, 1973.
- [33] DAVIS W. C., H - 2 antigen on cell membranes: An explanation for the alteration of distribution by indirect labeling techniques, *Science*, **175**: 1006-1008, 1972.



- [34] De KRUYFF B., DEMEL R. A., SLOTBLOOM A. J., van DEENEN L. L. M., ROSENTHAL A. F., The effect of the polar headgroup on the lipid - cholesterol interaction: a monolayer and differential scanning calorimetry study, *Biochim. Biophys. Acta*, **307**: 1-19, 1973.
- [35] De PETRIS S., RAFF M. C., Distribution of immunoglobulin on the surface of mouse lymphoid cells as determined by immunoferritin electron microscopy. Antibody - induced, temperaturedependent redistribution and its amplifications for membrane structure, *Eur. J. Immunol.*, **2**: 523-535, 1972.
- [36] — Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy, *Nature New Biol.*, **241**: 257-259, 1973.
- [37] DEVAUX P., Mc CONNEL H. M., Lateral diffusion in spin - labeled phosphatidylcholine multilayers, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**: 4475, 1972.
- [38] EAGLES P. A. M., JOHNSON L. N., van HORN C., The distribution of Concanavalin A receptor sites on the membrane of chromaffine granules, *J. Cell Sci.*, **19**, 33-54, 1975.
- [39] EDIDIN M., WEISS A., Antigen cap formation in cultured fibroblasts: A reflection of membrane fluidity and of cell motility, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**: 2456-2359, 1972.
- [40] EDIDIN M., FAMBROUGH D., Fluidity of the surface of cultured cell muscle fibers. Rapid lateral diffusion of marked surface antigens, *J. Cell. Biol.*, **57**: 27-37, 1973.
- [41] EDIDIN M., ZAGYANSKY Y., LARDNER T. J., Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells, *Science*, **191**: 466-468, 1976.
- [42] ELGSAETER A., SHOTTON D. M., BRANTON D., Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. II. The influence of spectrin aggregation, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 101-122, 1976.
- [43] ENGELMANN D. F., X - ray diffraction studies of phase transitions in the membrane of *Mycoplasma laidlawii*, *J. Mol. Biol.*, **47**: 115-117, 1970.
- [44] ENGSTROM L. H., Structure in the erythrocyte membrane. Ph. D. dissertation, University of California, Bekely; cit. D. Branton: *Phil. Trans. Roy. Soc. (London)*, B **261**: 133-138, 1970.
- [45] ETZLER M. E., Use of plant agglutinins in characterization of glycoproteins and glycolipids from mammalian cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**: 260-275, 1974.
- [46] ETZLER M. E., BRANSTRATOR M. L., Differential localization of cell surface and secretory components in rat intestinal epithelium by use of lectins, *J. Cell Biol.*, **62**: 329-343, 1974.
- [47] FEHLMAN M., LAFLEUR L., MARCEAU N., Major changes in surface membrane proteins during erythropoiesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**: 322-327, 1975.
- [48] FEIGENSON M. E., SCHNEBLI H. - P., BAGGIOLINI M., Demonstration of ricin - binding sites on the outer face of azurophil and specific granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes, *J. Cell Biol.*, **66**: 183-188, 1975.
- [49] FELDMAN G., GUILLOUZO A., Localisation intracellulaire des sites recepteurs de la concanvaline A dans les hépatocytes de Rat, *C. R. Acad. Sci.*, **282**: 191-193, 1976.
- [50] FONG J. W., LEDEEN R. W., KUNDU S. K., BROSTOFF S. W., Gangliosides of peripheral nerve myelin, *J. Neurochem.*, **26**: 157-162, 1976.



- [51] FORSTNER J. F., JABBAL I., FORSTNER G. G., Goblet cell mucin of rat small intestine. Chemical and physical characterization, *Canad. J. Biochem.*, **51**: 1154-1166, 1973.
- [52] FRYE L. D., EDIDIN M., The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse human heterokaryons, *J. Cell Sci.*, **7**: 319-333, 1970.
- [53] GARRIDO J., BURGLEN M. - J., SAMOLYK D., WICKER R., BERNHARD W., Ultrastructural comparison between the distribution of Concanavalin A and wheat germ agglutinin cell surface receptors of normal and transformed hamster and rat cells, *Cancer Res.*, **34**: 230-243, 1974.
- [54] GAHMBER C. G., unpublished 1976.
- [55] GAHMBERG C. G., UTERMANN G., SIMONS K., The membrane proteins of Semliki Forest virus have a hydrophobic part attached to the viral membrane, *FEBS Letters*, **28**: 179-182, 1972.
- [56] GITLER C., Plasticity of biological membranes, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**: 51-92, 1972.
- [57] GLASER M., SIMPKINS H., SINGER S. J., SHEETZ M., CHAN S. L., On the interaction of lipids and proteins in the red blood cell membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **65**: 721-725, 1970.
- [58] GREEN D. E., BRUCKER R. F., The molecular principles of biological membrane construction and function, *Bio. Science*, **22**: 13-19, 1972.
- [59] GREEN D. E., JI S., BRUCKER R. F., Structure - function unitization model of biological membranes, *Bioenergetics*, **4**: 253-284, 1973.
- [60] GUIDOTTI G., Membrane proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**: 731-752, 1972.
- [61] GULIK - KRZYWICKI T., Structural studies of the associations between biological membrane components, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**: 1-28, 1975.
- [62] GÜRTLER L. G., HORSTMANN H. J., Subunits of toxin and agglutinin from *Ricinus communis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **295**: 582-594, 1973.
- [63] HEITZMANN H., Rhodopsin is the predominant protein of rod outer segment membranes, *Nature New Biol.*, **235**: 114, 1972.
- [64] HORISBERGER M., ROSSET J., BAUER H., Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope, *Experientia (Basel)*, **31**: 1147-1148, 1975.
- [65] HORWITZ A. F., Nuclear magnetic resonance studies on phospholipids and membranes, [in] *Membrane Molecular biology* (eds. C. F. Fox and A. D. Keith), Sinauer Assoc., Stamford, 1972.
- [66] HUBBARD A. L., COHN Z., Enzymatic iodination of the red cell membrane, *J. Cell Biol.*, **55**: 390-405, 1972.
- [67] HUBBELL W. L., McCONNELL H. M., Spin - label studies of the excitable membranes of nerve and muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **61**: 12-16 1968.
- [68] HUET Ch., BERNADAC A., Peroxidase binding to cell-bound Concanavalin A, *Exp. Cell Res.*, **89**: 429-431, 1974.
- [69] ITO A., SATO R., Purification by means of detergents and properties of cytochrome b<sub>5</sub> from liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **243**: 4922-4923, 1968.
- [70] IRIMURA T., NAKAJIAMA M., HIRANO H., OSAWA T., Distribution of ferritin - conjugated lectins on sialidase - treated membranes of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **413**: 192-201, 1975.
- [71] ISSELBACHER K., The intestinal cell surface: Some properties of normal, undifferentiated, and malignant cells, *Ann. Intern. Med.*, **81**: 681-686, 1974.
- [72] JENKINS R. E., TANNER M. J. A., The major human erythrocyte membrane



- protein. Evidence for an S-shaped structure which traverses the membrane twice and contains a duplicated set of sites, *Biochem. J.*, **147**: 393-399, 1975.
- [73] JI T. H., NICOLSON G. L., Lectin binding and perturbation of the outer surface of the cell membrane induces a transmembrane organizational alteration at the inner surface, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**: 2212-2216, 1974.
- [74] JOST P., WAGGONER A. S., GRIFFITH O. H., Spin labeling and membrane structure, [in] *Structure and Function of Biological Membranes* (ed. L. I. Rothfield), Academic Press, New York, 1971.
- [74a] JOST P. C., GRIFFITH O. H., CAPALDI R. A., VANDERKOOI G., Evidence for boundary lipid in membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**: 480-484, 1973.
- [75] JULIANO R. L., The proteins of the erythrocyte membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **300**: 341-378, 1973.
- [76] KAHLENBERG A., WALKER C., ROHRLICK R., Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the human erythrocyte membrane, *Canad. J. Biochem.*, **52**: 803-806, 1974.
- [77] KANT J. A., STECK T. L., Specificity in the associations of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes, *J. Biol. Chem.*, **248**: 8457-8464, 1973.
- [78] KARNOVSKY M. J., UNANUE E. R., LEVENTHAL M., Ligand - induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. II. Mapping of surface moieties, *J. Exp. Med.*, **136**: 907-930, 1972.
- [79] KEITH A. D., SHARNOFF M., COHN G. E., A summary and evaluation of spin labels used as probes for biological membrane structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **300**: 379-419, 1973.
- [80] KIM Y. S., PERDOMO J. M., Membrane glycoproteins of the rat small intestine. Chemical composition of membrane glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **342**: 111-124, 1974.
- [81] KIMELBERG H. K., PAPAHA DJOPOULOS D., Phospholipid requirements for  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  ase activity: head group specificity and fatty acid fluidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **282**: 277-292, 1972.
- [82] KORN E. D., Cell membranes: structure and synthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**: 263-288, 1969.
- [83] KORNFELD S., KORNFELD R., Solubilization and partial characterization of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **63**: 1439-1446, 1969.
- [84] — The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* **245**: 2536-2545, 1970.
- [85] KORNBURG R. D., McCONNELL H. M., Lateral diffusion of phospholipid in a vesicle membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **68**: 2564-2568, 1971.
- [86] KORNFELD R., KORNFELD S., Structure of membrane receptors for plant lectins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**: 276-298, 1974.
- [87] KORNFELD S., ROGERS J., GREGORY W., The nature of the cell surface receptor site for *Lens culinaris* phytohemagglutinin, *J. Biol. Chem.*, **246**: 5481-6586, 1971.
- [88] KREUTZ W., Strukturprinzipien in Bio - Membranen, *Angew. Chemie*, **84**: 597-614, 1972.
- [89] LEE A. G., Functional properties of biological membranes: a physical chemical approach, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **29**: 3-56, 1975.
- [90] LEE A. G., BIRDSALL N. J. M., METCALFE J. C., Nuclear magnetic re-



- laxation and the biological membrane, [in] *Methods in Membrane Biology* (ed. E. Korn), Plenum Press, New York 1974.
- [92] — Measurement of fast lateral diffusion of lipids in vesicles and in biological membranes by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance, *Biochemistry*, **12**: 1650–1658, 1973.
- [93] LEE A. G., Functional properties of biological membranes: a physical chemical approach, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **29**: 3–56, 1975.
- [94] LESENY A. M., BOURRILLON R., KORNFELD S., The nature of the erythrocyte receptor site for *Robinia pseudoacacia* phytohemagglutinin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**: 831–836, 1972.
- [95] LEVINE Y. K. LEE A. G., BIRDSALL N. J. M., METCALFE J. C., ROBINSON J. D., The interaction of paramagnetic ions and spin labels with lecithin bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **291**: 592–607, 1973.
- [96] LINSS W., GEYER G., RICHTER H., HELMKE U., Quantitative Untersuchungen über die Verteilung saurer Bindungsstelle an menschlichen Erythrozytenschatten, *Acta biol. med. germ.*, **28**: 7–12, 1972.
- [97] LOOR F., FORNI L., PERNIS G., The dynamic state of the lymphocyte membrane: factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins, *Eur. J. Immunol.*, **2**: 203–212, 1972.
- [98] LUCY J. A., Lipids and membranes, *FEBS Letters*, **40**: 105–111, 1974.
- [99] MAJERUS P. W., BRODIE G. N., The binding of phytohemagglutinins to human platelet plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4253–4257, 1972.
- [100] MARCHESI V. T., STEERS E., jr., Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane, *Science*, **159**: 203–204, 1968.
- [101] MARCHESI S., L., STEERS E., MARCHESI V. T., TILLACK T. W., Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes, *Biochemistry*, **9**: 50–57, 1969.
- [102] MARCHESI V. T., TILLACK T. W., JACKSON R. L., SEGREST J. P., SCOTT R. E., Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**: 1445–1449, 1972.
- [103] MARCHESI V. T., JACKSON R. L., SEGREST J. P., KAHANE L. Molecular features of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane, *Fed. Proc.*, **32**: 1833–1837, 1973.
- [105] MARTINEZ - PALOMO A., WICKER R., BERNHARD W., Ultrastructural detection of Concanavalin A surface receptors in normal and polyoma transformed cells, *Int. J. Cancer*, **9**: 676–684, 1972.
- [106] MATUS A., de PETRIS S., RAFF M. C., Mobility of Concanavalin A receptors in myelin and synaptic membranes, *Nature New Biol.*, **244**: 278–279, 1973.
- [107] McDONOUGH J., LILIEN J., Spontaneous and lectin - induced redistribution of cell surface receptors on embryonic chick neural retina cells, *J. Cell Sci.*, **19**: 357–368, 1975.
- [108] McNUTT N. S., CULP L. A., BLACK P. H., Contact - inhibited revertant cell lines isolated from SV - 40 transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape in untransformed, transformed, and revertant 3T3 cells, *J. Cell Biol.*, **56**: 412–428, 1973.
- [109] MEYER H. W., WINKELMANN H., Die Gefrierätzung und die Struktur biologischer Membranen, *Protoplasma*, **68**: 253–270, 1969.
- [110] — Über die Anordnung der Membranproteine nach Untersuchungen mit der



- Gefrierätzung an isolierter Erythrozytenmembranen, *Protoplasma*, **75**: 255-284, 1972.
- [111] MOOR H., Freeze - etching, *Int. Rev. Cytol.*, **25**: 391-412, 1969.
- [112] MOOR H., MÜHLETHALER K., Fine structure in frozen - etched yeast cells, *J. Cell Biol.*, **17**: 609-628, 1963.
- [113] MOOR H., WALDNER H., FREY - WYSSLING A., A new freezing ultra-microtome, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**: 1-13, 1961.
- [114] MORAWIECKI A., Dissociation of M - and N - group mucoproteins into subunits in detergent solution, *Biochim. Biophys. Acta*, **83**: 339-347, 1964.
- [115] MORRISON M., MUELLER T. J., HUBER C. T., Transmembrane orientation of the glycoproteins in normal human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2658-2660, 1974.
- [116] MUELLER T. J., MORRISON M., The transmembrane proteins in the plasma membrane of normal human erythrocytes. Evaluation employing lactoperoxidase and proteases, *Biochemistry*, **14**: 5512-5516, 1975.
- [117] NICOLSON G. L., Difference in topology of normal and tumour cell membranes shown by different surface distributions of ferritin - conjugated Concanavalin A, *Nature New Biol.*, **233**: 244-246, 1971.
- [118] — Temperature - dependent mobility of Concanavalin A sites on tumour cell surfaces, *Nature New Biol.*, **243**: 218-220, 1973.
- [119] — The interactions of lectins with animal cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **39**: 89-190, 1974.
- [120] — Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**: 57-108, 1976.
- [121] NICOLSON G. L., SINGER S. J., Ferritin - conjugated plant agglutinin as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharides bound to cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **68**: 942-945, 1971.
- [122] NICOLSON G. L., PAINTER R. G., Anionic sites of human erythrocyte membranes. II. Transmembrane effects of anti - spectrin on the topography of bound positively charged colloidal particles, *J. Cell Biol.*, **59**: 395-406, 1973.
- [123] NICOLSON G. L., YANAGIMACHI R., Mobility and the restriction of mobility of plasma membrane lectin - binding components, *Science*, **184**: 1294-1296, 1974.
- [124] NICOLSON G. L., MARCHESI T. V., SINGER S. J., The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membrane with ferritin - conjugated antibodies, *J. Cell. Biol.*, **51**, 265-272, 1971.
- [125] NOVOGRODSKY A., BINIAMINOV M., RANNOT G., KATCHALSKI E., Binding of concanavalin A to rat, normal human and chronic lymphatic leukemia lymphocytes, *Blood*, **40**: 311-316, 1972.
- [126] NOVOGRODSKY A., KATCHALSKI E., Transformation of neuraminidase - treated lymphocytes by soybean agglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**: 2515-2518, 1973.
- [127] OLDFIELD E., CHAPMAN D., Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol, *FEBS Letters*, **23**: 285-297, 1972.
- [128] OLDFIELD E., KEOUG K. M., CHAPMAN, D., The study of hydrocarbon chain mobility in membrane systems using spin - label probes, *FEBS Letters*, **20**, 344, 1972.
- [129] OSEROFF A. R., ROBBINS P. W., BURGER M. M., The cell surface



- membrane: biochemical aspects and biophysical probes, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**: 647-682, 1973.
- [130] OZANNE B., SAMBROOK, J., Binding of radioactively labelled Concanavalin A and wheat germ agglutinin to normal and virus-transformed cells, *Nature New Biol.*, **232**: 194-196, 1971.
- [131] PAPAHOJPOULOS D., NIR S., OHKI S., Permeability properties of phospholipid-membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 561-583, 1972.
- [132] PAPAHOJPOULOS D., POSTE G., SCHAEFFER B. E., Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles: Influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta*, **322**: 23-42, 1973.
- [133] PARMLEY R. T., MARTIN V. J., SPICER S. S., Staining of blood cell surfaces with a lectin-horseradish peroxidase method, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 912-922, 1973.
- [134] PERDUE J. F., The distribution, ultrastructure and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **58**: 265-283, 1973.
- [135] PETIT V. A., EDIDIN M., Lateral phase separation of lipids in plasma membranes: effect of temperature on the mobility of membrane antigens, *Science*, **184**: 1183-1185, 1974.
- [136] PHILLIPS M. C., The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers and membranes, [in] *Progress in Surface and Membrane Science* (eds. J. F. Danielli, M. D. Rosenberg and D. A. Cadenhead), Academic Press, New York vol. 5, 1972.
- [137] PHILLIPS D. R., MORRISON M., Exposed protein on the intact human erythrocyte, *Biochemistry*, **10**: 1766-1771, 1971.
- [138] PINTO DA SILVA P., Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts, pH-dependent, reversible aggregation, *J. Cell Biol.*, **53**: 777-787, 1972.
- [139] — Membrane intercalated particles in human erythrocyte ghosts: Sites of preferred passage of water molecules at low temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**: 1339-1343, 1973.
- [140] PINTO da SILVA P., MARTINEZ-PALOMO A., Induced redistribution of membrane particles, anionic sites and Con A receptors in *Entamoeba histolytica*, *Nature*, **249**: 170-171, 1974.
- [141] PODULSO J. F., QUARLES R. H., BRADY R. O., External labeling of galactose in surface membrane glycoproteins of the intact myelin sheath, *J. Biol. Chem.*, **251**: 153-158, 1976.
- [142] POO M.-M., CONE R. A., Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane, *Nature*, **247**: 438, 1974.
- [143] PRATT R. M., GIBBSON W. A., An immunofluorescent technique for observing the binding of Concanavalin A to frozen-tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **23**: 229-232, 1973.
- [144] PRESANT C. A., KORNFELD S., Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin, *J. Biol. Chem.*, **247**: 6937-6945, 1972.
- [145] PRZEŁĘCKA, A., DUTKOWSKI A. B., The affinity of the basement membrane in the ovarian sheath of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) for Concanavalin A under normal and hormonally changed conditions, *J. Micr.*, **23**: 229-236, 1975.
- [146] RADDA G. K., VANDERKOOI J., Can fluorescent probes tell us anything about membranes? *Biochim. Biophys. Acta*, **265**: 509, 1972.



- [147] RAFF M. C., de PETRIS S., Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: the fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance, *Fed. Proc.*, **32**: 48-54, 1973.
- [148] RAHMANN H., RÖSNER H., BREER H., A functional model of sialo-glycomacromolecules in synaptic transmission and memory function, *J. Theoret. Biol.*, **57**: 231-237, 1976.
- [149] RAMBOURG A., An improved silver methenamine technique for the detection of periodic acid-reactive complex carbohydrates with the electron microscope, *J. Histochem. Cytochem.*, **15**: 409-412, 1967.
- [150] RAMBOURG A., NEUTRA M., LEBLOND C. P. Presence of a "cell coat" rich in carbohydrates at the surface of cells in the rat, *Anat. Rec.*, **154**: 41-72, 1966.
- [151] REICHSTEIN E., BLOSTEIN R., Arrangement of human erythrocyte membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**: 6256-6263, 1975.
- [152] ROBINSON W. E., GORDON-WALKER A., BOWNDS D., Molecular weight of frog rhodopsin, *Nature New Biol.*, **235**: 112-114, 1972.
- [153] ROOS, E., TEMMINK J. H. M., Cytochemical comparison between wheat germ agglutinin and Concanavalin A bound to mouse fibroblasts in vitro, *Exp. Cell Res.*, **94**: 140-146, 1975.
- [154] ROTH J., Ultrahistochemical demonstration of saccharide components of complex carbohydrates at the alveolar cell surface and at the mesothelial cell surface of the pleura visceralis of mice by means of Concanavalin A, *Exp. Path.*, **8**: 157-167, 1973.
- [155] — Distribution of Concanavalin A receptors on normal liver cells and on Zajdela ascites hepatoma cells, *Int. J. Cancer*, **14**: 762-770, 1974.
- [156] — Ultrahistochemical studies in the basal lamina of the visceral pleura of mice, *Exp. Path.*, **9**: 1-8, 1974.
- [156a] — Lectins as molecular probes in morphological investigations on architecture and dynamics of cell surfaces, *Post. Biologii Komórki*, **3**: 235-264, 1976.
- [157] ROTH J., THOSS K., Fluorescein isothiocyanate coupled lectins for immunohistologic demonstration of saccharides. I. Methodical investigations by means of Concanavalin A, *Lens culinaris* lectin and *Ricinus communis* lectin, *Exp. Path.*, **11**: 155-161, 1975.
- [158] ROTH J., MEYER H. W., BOLCK F., STILLER D., Electron microscopic visualization of complex carbohydrates at the cell surface of tumour cells using Concanavalin A, *Exp. Path.*, **6**: 189-191, 1972.
- [159] ROTH J., WINKELMANN H., MEYER H. W., Electron microscopic studies in mammalian lungs by freeze-etching. IV. Formation of the superficial layer of the surfactant system by lamellar bodies, *Exp. Path.*, **8**: 354-362, 1973.
- [160] ROTH J., WAGNER M., MEYER H. W., Topography of Concanavalin A receptors on Ehrlich ascites tumour cells as demonstrated by thin sections and freeze etching, *Path. Europ.*, **9**: 31-42, 1974.
- [161] ROTH J., WAGNER M., THOSS K., Wheat germ agglutinin and *Ricinus communis* agglutinin as specific saccharide stains in light and electron microscopy, *Exp. Path.*, **11**: 67-72, 1975a.
- [162] ROTH J., THOSS K., WAGNER M., MEYER H. W., Electron microscopic demonstration of cell surface carbohydrates by means of peroxidase and ferritin complexes of the *Lens culinaris* lectin, *Histochemistry*, **43**: 275-282, 1975.
- [163] ROTH J., MEYER H. W., WAGNER M., Untersuchungen über die Concanava-



- lin A - Rezeptoren von Kaninchenerythrozyten und von Erythrozytenschatten mit der Immun - Elektronenmikroskopie, *Blut*, **30**: 31-38, 1975.
- [164] ROTH J., NEUPERT G., BOLCK F., Concanavalin A receptors in the plasma membrane of rat liver cells: comparative electron microscopic investigations on normal cells and on cells, in vivo transformed by diethylnitrosamine, *Exp. Path.*, **10**: 143-155, 1975.
- [165] ROSENBLITH J. Z., UKENA T. E., YIN H. H., BERLIN, R. D., KARNOVSKY M. J., A comparative evaluation of the distribution of Concanavalin A - binding sites on the surfaces of normal, virally - transformed, and protease - treated fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**: 1625-2629, 1973.
- [166] ROWLAT C., WICKER R., BERNHARD W., Ultrastructural distribution of Concanavalin A receptors on hamster embryo and adenovirus tumor cell cultures, *Int. J. Cancer*, **11**: 314-326, 1973.
- [167] RUSH R. A., THOMAS P. E., KINDLER S. H., UDENFRIED S., The interaction of dopamine -  $\beta$  - hydroxylase with Concanavalin A and its use in enzyme purification, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**: 1301-1305, 1974.
- [168] SACKMANN E., TRAUBLE, H., GALLA H. - J., OVERATH P., Lateral diffusion, protein mobility, and phase transitions in *Escherichia coli* membranes. A spin label study, *Biochem.*, **17**: 5360, 1973.
- [169] SAFFMAN P. G., DELBRÜCK, M., Brownian motion in biological membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **72**: 3111-3113, 1975.
- [170] SCANDELLA C. J., DEVAUX, P., McCONNELL H. M., Rapid lateral diffusion of phospholipids in rabbit sarcoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**: 2056-2060, 1972.
- [171] SEELIG J., Magnetic resonance methods in membrane research, *Experientia*, **29**: 509-516, 1973.
- [172] SEGREST J. P., JACKSON R. L., MARCHESI V. T., Red cell membrane glycoprotein: amino acid sequence of an intramembraneous region, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 964-969, 1972.
- [173] SEGREST J. P., FELDMAN R. J., Membrane proteins: amino acid sequence and membrane penetration, *J. Mol. Biol.*, **87**: 853-854, 1974.
- [175] SIEKEVITZ P., PALADE G. E., DALLNER G., OHAD I., OMURA T., The biogenesis of intracellular membranes, [in] *Organizational Biosynthesis* (eds. H. J. Vogel, J. O. Lampen and V. Bryson), pp. 331-362, Academic Press, New York, London, 1967.
- [176] SINGER S. J., A fluid lipid - globular protein mosaic model of membrane structure, *Ann. NY. Acad. Sci.*, **195**: 16-23, 1972.
- [177] — The molecular organization of membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 805-813, 1974.
- [178] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- [179] SITTE P., Biomembranen: Struktur und Funktion, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **82**: 329-383, 1969.
- [180] SKUTELSKY E., Concanavalin A receptor sites and anionic group density on differentiating erythroid cells, *J. Cell Biol.*, **59**: 324, 1973.
- [181] SMITH S. B., REVEL J. P., Mapping of Concanavalin A binding sites on the surface of several cell types, *Develop. Biol.*, **27**: 434-441, 1972.
- [182] SPETH V., WUNDERLICH F., Membranes of Tetrahymena. II. Direct visualization of reversible transitions in biomembrane structure induced by temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, **291**: 621-628, 1973.



- [183] STACKPOLE C. W., AOKI T., BOYSE E. A., OLD J. L. LUMLEY - FRANK J., de HARVEN E., Cell surface antigens: serial sectioning of single cells as an approach to topographical analysis, *Science*, **172**: 472-474, 1971.
- [184] STACKPOLE C. W., MILIO L. T. de, HÄMMERLING U., JACOBSON J. B., LARDIS M. P., Hybrid antibody - induced topographical redistribution of surface immunoglobulins, alloantigens, and Concanavalin A receptors on mouse lymphoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**: 932-936, 1974.
- [185] STECK T. L., The organization of proteins in human erythrocyte membranes, [in] *Membrane Research* (ed. C. F. Fox), pp. 71-93, Academic Press, New York, 1972.
- [186] — Cross - linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane, *J. Molec. Biol.*, **66**: 295-305, 1972.
- [187] — The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review, *J. Cell Biol.*, **62**: 1-19, 1974.
- [188] STEERE R. L., Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**: 45-59, 1957.
- [189] STEIN M. D., SAGE H. J., Studies on a phytohemagglutinin from the Lentil. V. Binding of *Lens culinaris* hemagglutinin to lymphocytes and erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**: 412-420, 1972.
- [190] STEIM J. M., TOURTELLOTTE M. E., REINERT J. C., McELHANEY R. N., RADER R. L., Calorimetric evidence for the liquid - crystalline state of lipids in biomembrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **63**: 104-190, 1969.
- [191] STEIN M. D., SAGE H. J., LEON M. A., Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. V. Binding of *Lens culinaris* hemagglutinin to lymphocytes and erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**: 412-420, 1972.
- [192] STEINEMAN A., STRYER L., Accessibility of the carbohydrate moiety of rhodopsin, *Biochemistry*, **12**: 1499-1502, 1973.
- [193] SUNDQUIST K. G., Redistribution of surface antigens — a general property of animal cells, *Nature New Biol.*, **239**: 147-149, 1972.
- [194] TANAKA K. - J., OHNISHI S. - J., Heterogeneity in the fluidity of intact erythrocyte membrane and its homogenization upon hemolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 218-231, 1976.
- [195] TAYLOR R. B., DUFFUS W. P. H., RAFF M. C., de PETRIS S., Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti - immunoglobulin antibody, *Nature New Biol.*, **233**: 225-229, 1971.
- [196] THOSS K., ROTH J. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von menschlichen und tierischen Bindegewebsstrukturen mit FITC - markiertem Linsenagglutinin, *Acta histochem. Suppl.*, **15**: 225-258, 1975.
- [197] — The use of fluorescein isothiocyanate labelled lectins for immunohistochemical demonstration of saccharides II. Studies by use of Concanavalin A and *Lens culinaris* lectin, *Exp. Path.*, **11**: 155-161, 1975.
- [198] TILLACK T. W., SCOTT R. E., MARCHESI V. T. The structure of erythrocyte membranes. II. Localization of receptors for phytohemagglutinin and Influenza virus to the intramembraneous particles, *J. Exp. Med.*, **135**: 1209-1227, 1972.
- [199] TOMITA M., MARCHESI V. T., Amino - acid sequence and oligosaccharide attachment sides of human erythrocyte glycoporphin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **72**: 2964-2968, 1975.
- [200] TOURTELLOTTE M. E., BRANTON D., KEITH A., Membrane structure: spin labeling and freeze - etching of *Mycoplasma laidlawii*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **66**: 909-916, 1970.



- [201] TRÄUBLE H., SACKMAN E., Studies of the crystalline - liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. III. Structure of a steroid - lecithin system below and above the lipid phase transition, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**: 4499, 1972.
- [202] TRICHE T. J., TILLACK T. W., KORNFELD S., Localization of the binding sites for the *Ricinus communis*, *Agaricus bisporus* and wheat germ lectins on human erythrocyte membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**: 540-549, 1975.
- [203] UNANUE E. R., PERKINS W. D., KARNOVSKY M. J., Ligand - induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography, *J. Exp. Med.*, **136**: 885-906, 1972.
- [204] UNTERSEE P., GIL J., WEIBEL E. R., Visualization of extracellular lining layer of lung alveoli by freeze - etching, *Respir. Physiol.*, **13**: 171-185, 1971.
- [205] VANDERKOOI G., Models of membrane structure. Molecular architecture of biological membranes, *Ann. NY. Acad. Sci.* **195**: 6-15, 1972.
- [206] VERKLEIJ A. J., ZWAAL R. F. A., ROELOFSEN B., COMFURIUS P., KASTELIJN D., van DEENEN L. L. M., The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze - etch electron microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **323**: 178-193, 1973.
- [207] WAGNER M., WAGNER B., Elektronenmikroskopischer Nachweis der Blutgruppensubstanz A auf menschlichen Erythrozyten mit ferritin- und goldmarkiertem Protektin von *Helix pomatia*, *Z. Immun. - Forsch.*, **151**: 117-125, 1976.
- [208] — Glutaraldehyd als Kupplungsreagens für die Herstellung ferritinmarkierter Antikörper, *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*, **A 221**, 100-105, 1972.
- [209] WAGNER M., ROTH J., WAGNER B., Gold - labeled protectin from *Helix pomatia* for the localization of blood group A antigen of human erythrocytes by immuno freeze - etching. *Exp. Path.*, in press 1976.
- [210] WEBER T., Kinetics of the reaction of kidney - bean leucoagglutinin with human lymphocytes, *Experientia*, **29**: 863-865, 1973.
- [211] WEIBEL E. R., GIL J., Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of alveoli, *Respir. Physiol.*, **4**: 42-57, 1968.
- [212] WEISER M. M., Concanavalin A agglutination of intestinal cells from the human fetus, *Science*, **177**: 525-526, 1972.
- [213] WILKINS M. H. F., BLAUROCK A. E., ENGELMAN D. M., Bilayer structures in membranes, *Nature New Biol.*, **230**: 72-76, 1971.
- [214] WILLINGHAM M. C., OSTLUND R. E., PASTAN I., Myosin is a component of the cell surface of cultured cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **71**: 4144-4148, 1974.
- [215] WINZLER R. J., HARRIS E. D., PEKAS D. J., JOHNSON C. A., WEBER P., Studies on glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes, *Biochemistry*, **6**: 2195-2202, 1967.
- [216] WINZLER R. J., Carbohydrates in cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **29**: 77-102, 1970.
- [216a] WOOD J. G., McLANGHLIN B. J., The visualization of Concanavalin - A binding sites in the interperiod line of rat sciatic nerve myelin, *J. Neurochem.*, **24**: 233-235, 1975.
- [217] YAHARA I., EDELMAN, G. M., Restriction of the mobility of lymphocyte



- immunoglobulin receptors by Concanavalin A, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 608-612, 1972.
- [218] YARIV J., KALB A. J., GIBERMAN E., A saccharide ligand on the outer surface of retinal rod disc membranes, J. Mol. Biol., 85: 183-186, 1974.
- [219] ZWAAL R. F. A., ROELOFSEN B., COLLEY C. M., Localization of red cell membrane constituents, Biochim. Biophys. Acta, 300: 159-182, 1973.
- [220] ZUBRZYCKA E., Solubilizacja i rekonstytucja błon biologicznych, Post. Biologii Komórki, 2: 233-248, 1975.

*Received: September 12th, 1977.*

*Accepted: October 8th, 1977.*

*Author's address: Ziegelmuehlenweg 1, 69 Jena, DDR.*







## OOGENEZA U *GALLERIA MELLONELLA* — BADANIA CYTOCHEMICZNE I ULTRASTRUKTURALNE

### OOGENESIS IN *GALLERIA MELLONELLA* — CYTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES

Aleksandra PRZEŁĘCKA

Pracownia Cytochemii Zakładu Biologii Komórki,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

*Profesorowi Włodzimierzowi Niemierko — mo-  
jemu Mistrzowi i serdecznemu Opiekunowi —  
pracę tę z głęboką wdzięcznością ofiarowuję*

**Streszczenie.** Śledzenie rozwoju oocytów owadzych, jak to widać na przykładzie przedstawionej oogenezy u *Galleria mellonella*, daje biologowi okazję obserwowania szeregu procesów cytologicznych występujących tu ze szczególną intensywnością. Obejmują one takie zjawiska, jak wybiórczą i okresowo trwającą amplifikację genów, transport substancji przez błonę komórkową i pinocytozę, regulację poziomu jonów wapnia w komórce, gromadzenie w cytoplazmie substancji zapasowych, interakcje między komórkami, a także między różnymi narządami. Procesy te, jak również towarzyszące im głębokie przemiany biochemiczne, podlegają precyzyjnej regulacji kierowanej przez układ neurohormonalny owada. Omówienie tego ostatniego zjawiska wykracza jednak poza z góry zamierzone ramy artykułu.

**Summary.** Investigations on the development and maturation of insect oocytes give the cell biologist an opportunity to study different cytological phenomena, e. g. selective gene amplification, cellular membrane transport, pinocytosis, regulation of the intracellular level of calcium ions, storage of metaplastic substances, cell and tissue interactions. All these processes are expressed in developing oocytes with particular intensity. In the paper results of some studies — performed on the ovariole of *Galleria mellonella* — are presented, illustrating the above mentioned phenomena.



## RODZAJE PĘCHERZYKÓW JAJOWYCH OWADÓW

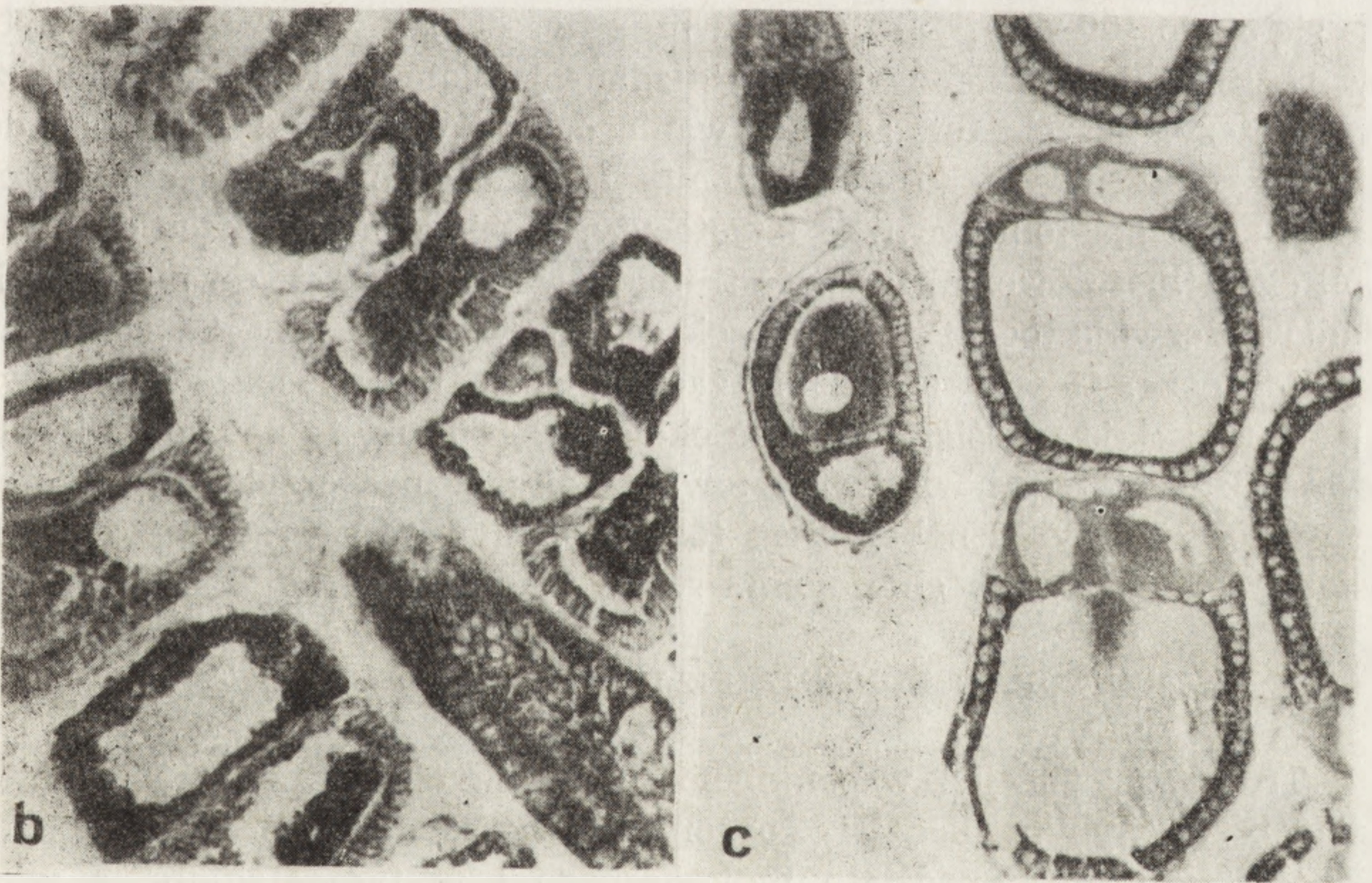
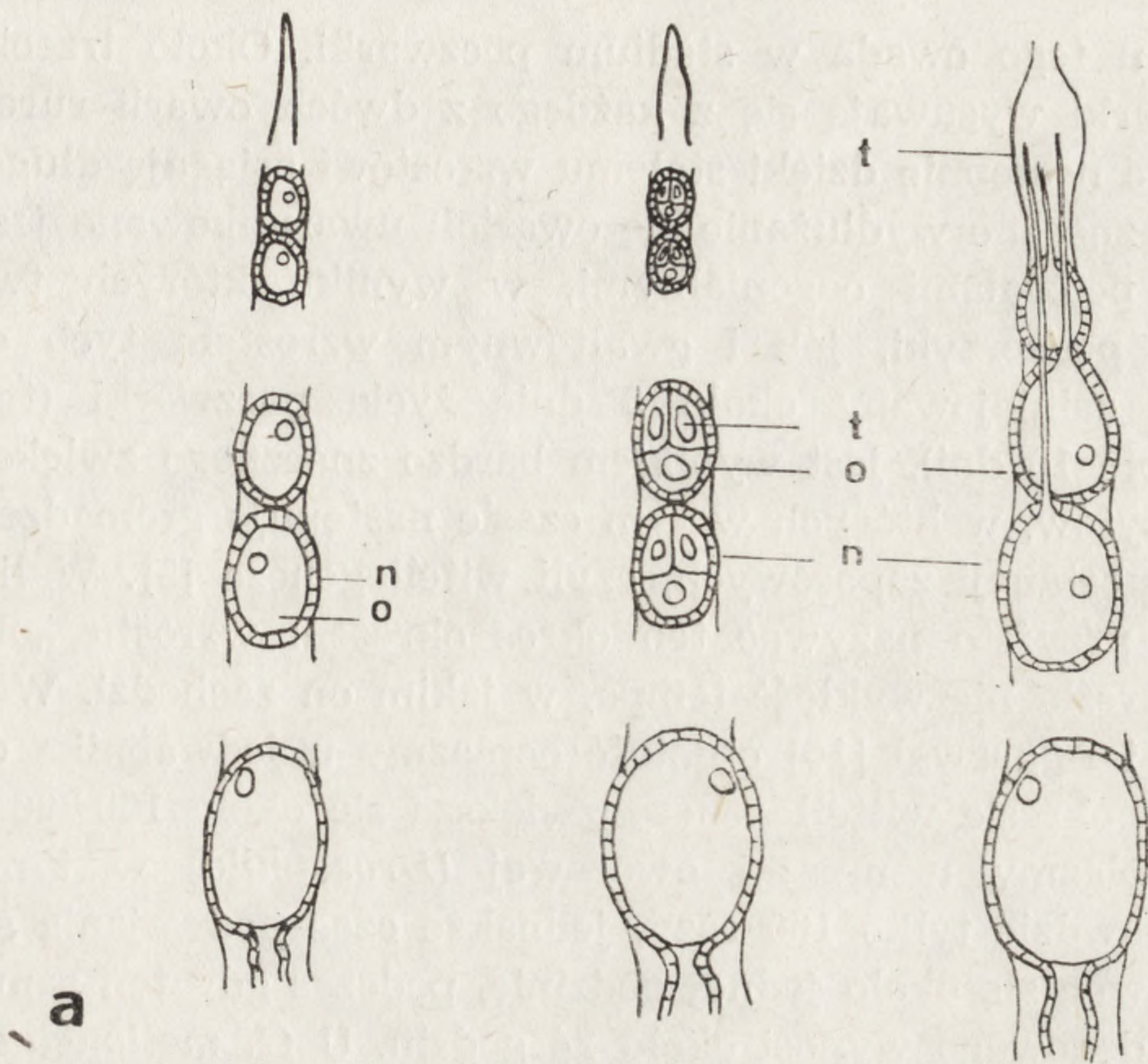
Oocyty owadów rozwijają się w owarioli, w pęcherzykach jajowych tworzących ściśle powiązane ze sobą zespoły komórek. Zależnie od rodzajów i rozmieszczenia komórek towarzyszących oocytowi pęcherzyki określa się jako panoistyczne, gdzie komórkami towarzyszącymi są jedynie komórki nabłonka folikularnego, i meroistyczne, gdzie oprócz nabłonka folikularnego występują specjalne komórki — trofocyty. Komórki te mogą być umieszczone w grupie, w części apikalnej owarioli, stamtąd zaś za pośrednictwem specjalnych sznurów łączą się z poszczególnymi pęcherzykami; trofocyty mogą też przylegać bezpośrednio do oocytu tworząc tzw. pęcherzyki politroficzne (rys. 1a). Pęcherzyki panoistyczne występują u przedstawicieli *Orthoptera*, *Isoptera*, *Odonata* i *Aphaniptera*. Pęcherzyki telotroficzne występują u *Coleoptera* — *Polyphaga* i u *Hemiptera*, pęcherzyki politroficzne — u *Coleoptera* — *Adephaga*, *Neuroptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera* i *Diptera* [15]. *Galleria mellonella*, jako przedstawiciel *Lepidoptera*, posiada pęcherzyki jajowe typu politroficznego (rys. 1 b, c).

FORMOWANIE I GŁÓWNE ETAPY ROZWOJU OWARIOLI  
*G. MELLONELLA*

W stadium gąsienicy u *G. mellonella* żeńskie gonady mają postać małych, elipsoidalnych pęcherzyków położonych symetrycznie po obu stronach ciała owada, w tylnej części jego odwłoka. W każdym z nich wśród masy tkanki nabłonkowej i łącznej wyróżnić można łatwo cztery grupy intensywnie dzielących się komórek oogonialnych, o typowym wyglądzie tkanki zarodkowej (rys. 2b). Na przełomie stadium larwalnego i poczwarki, u tzw. larwy snującej, podziały oogoniów przyjmują charakter różnicujący, w wyniku czego powstają preoocyty i towarzyszące im trofocyty. Preoocyty wchodzą wówczas w okres mejozy, o czym świadczą spotykane w ich jądrach kompleksy synaptemalne (rys. 2a) będące morfologicznym obrazem zachodzącego w pierwszych stadiach mejozy crossing over [28].

Proces różnicowania przyszłej komórki jajowej jest jednym z najciekawszych zjawisk w biologii i od dawna intrygował on wielu badaczy. U przedstawicieli *Dytiscidae* odrębny rozwój preoocytu od pozostałych trzech jego komórek siostrzanych determinuje pojawienie się w nim poza chromosomalnego DNA, tzw. ciała Giardiniego [36]. U *G. mellonella* nie prowadzono szczegółowych badań nad tym okresem rozwoju. Prawdopodobnie i w tym przypadku warunkują go jakieś zjawiska zachodzące na poziomie genomu komórki. Formowanie i rozwój owarioli





Rys. 1. a — Schemat budowy różnych typów owarioli występujących u owadów, przedstawione kolejno: owariola panoistyczna, politroficzna i telotroficzna; b, c — pęcherzyki jajowe *G. mellonella* barwione zieloną metylową i pyroniną: b — z okresu prewitellogenezy  $\times 400$ , c — z okresu witellogenezy,  $\times 200$   
o — oocyt, t — trofocyt, n — nabłonek folikularny



odbywa się u tego owada w stadium poczwarki. Około trzeciego dnia życia poczwarki wysuwają się z każdego z dwóch owarii rurczki jajnikowe, które następnie dzięki stałemu wzrostowi osiągają długość około 30 mm. Tak znaczne wydłużanie się owarioli uwarunkowane jest zarówno stałymi podziałami oogonialnymi, w wyniku których tworzą się wciąż nowe pęcherzyki, jak i gwałtownym wzrostem tych ostatnich. Wzrost ten, zainicjowany około 5 dnia życia poczwarki (trwającego w sumie około 10 dni), jest wynikiem bardzo znacznego zwiększania się objętości oocytów, w których w tym czasie następuje gromadzenie wielkich ilości substancji zapasowych, czyli witellogeneza [5]. W literaturze anglosaskiej przyjęto nazywać ten okres okresem wzrostu „olbrzymiego”, co podkreśla niezwykłość tempa, w jakim on zachodzi. Według danych Kinga i Aggarwal [16] objętość ooplazmy u jedwabnika dębowego (*Cecropia*) w okresie witellogenezy zwiększa się około 100 000 - krotnie. Objętość ooplazmy u muszki owocowej (*Drosophila*) w tym okresie wzrasta wprawdzie tylko 100 razy, jednakże czas podwajania się u niej ooplazmy równa się około jednej godzinie, podczas gdy ten sam czas dla jedwabnika dębowego wynosi około 24 godzin. U *G. mellonella* w okresie witellogenezy trwającej mniej więcej pięć dni objętość oocytu zwiększa się około 100 razy. Tak intensywny przyrost, jak się wydaje, nie byłby możliwy, gdyby komórka ta była zdana jedynie na własne mechanizmy syntezy. Tę rolę też, zaopatrywania oocytu w związki potrzebne do spełnienia jego fizjologicznej funkcji, przejmują towarzyszące mu komórki nabłonka folikularnego i trofocyty, a także przylegające do owarioli ciało tłuszczowe. Aktywność trofocytów ogranicza się do pierwszych stadiów rozwoju oocytu, tj. do okresu prewitellogenezy i początków witellogenezy. Gdy w ooplazmie zaczynają się pojawiać kule żółtkowe i pęcherzyk jajowy osiąga długość około 200–250  $\mu\text{m}$ , to następuje gwałtowna liza całej komory trofocytowej. Dojrzały pęcherzyk jajowy otoczony jest już tylko nabłonkiem folikularnym i wytworzoną przez ten ostatni ścianką zwaną chorionem.

#### STRUKTURA I FUNKCJA FIZJOLOGICZNA TROFOCYTÓW

Trofocyty, jak już wspomniano, powstają obok przyszłej komórki jajowej w wyniku podziału oogonii. Utworzona komórka preoocytu wchodzi w profazę podziału mejotycznego i w tym stadium, a więc z tetraploidalną zawartością materiału genetycznego, przechodzi cały okres wzrostu i witellogenezy. Natomiast wzrostowi trofocytów towarzyszy, albo raczej warunkuje go, endomitotyczny podział ich jąder. Charakterystyczny amebowaty kształt i duża objętość jąder trofocytów w pęcherzykach jajowych *Lepidoptera* od dawna sugerowały różnym



autorom, że komórki te odznaczają się dużym natężeniem przemian, w których jądro może brać udział. U *G. mellonella* jądra trofocytów osiągnęły objętość około  $100\,000\ \mu\text{m}^3$ , przy objętości jąder diploidalnych komórek nabłonka folikularnego równej kilkudziesięciu mikrometrom sześciennym [23]. Badania autoradiograficzne wykazały, że istotnie jądra trofocytów są głównym miejscem produkcji RNA w całym pęcherzyku (rys. 3a, b). Metodą ilościowej oceny autoradiogramów owarioli inkubowanych uprzednio w środowisku zawierającym  $\text{H}^3$ -urydynę wykazano, że u *G. mellonella* w okresie witellogenezy, gdy trofocyty osiągnęły maksymalną objętość, ilość syntetyzowanych przez ich jądra (łącznie) RNA przewyższa ponad 100-krotnie ilość RNA syntetyzowanych przez jądra wszystkich komórek nabłonka folikularnego. Jednocześnie synteza RNA w jądrze oocytu jest ledwie wykrywalna, natomiast w ooplazmie występuje wyraźny przyrost jego zawartości [24]. Wyniki te wskazują na to, że w pęcherzykach jajowych *G. mellonella*, podobnie jak u przedstawicieli innych owadów posiadających owariole typu politroficznego [2, 38], jądra trofocytów są miejscem intensywnej syntezy RNA przekazywanego następnie do oocytu. Stwierdzenie to znalazło poparcie w obrazach uzyskanych za pomocą mikroskopu elektronowego. Jądra trofocytów w mikroskopie elektronowym wykazują obecność bardzo licznych, delikatnych wypustek, co zwiększa znakomicie powierzchnię kontaktu tych jąder z otaczającą je cytoplazmą (rys. 4a, b). Gęsto rozmieszczone w ich otocze jądrowej pory zapewniają ułatwione przedostawanie się przez nie różnych substancji. Duża ilość struktur zawierających RNA, zarówno na terenie samych jąder, jak i przylegającej do nich cytoplazmy, wyraźnie wskazuje na to, że aktywność fizjologiczna jąder trofocytów przejawia się głównie w produkcji RNA. Substancja ta przedostaje się następnie do oocytu, co ułatwione jest dzięki zachowaniu między komorą trofocytową i oocytem połączenia za pośrednictwem mostka cytoplazmatycznego (rys. 5).

U *G. mellonella*, podobnie jak u *Hyalophora cecropia* [16], w oocytach gotowych do podziału redukcyjnego RNA wykryć można metodami cytochemicznymi jedynie w kulach żółtkowych. Z punktu widzenia organizacji morfologicznej dojrzałego oocytu substancja ta wchodzi zatem w skład utworów metaplazmatycznych — kul żółtkowych, które są magazynem materiałów zapasowych dla rozwijającego się przyszłego zarodka. Przez długi czas znaczenie biologiczne tego faktu było jedynie przedmiotem spekulacji naukowych. W pęcherzykach jajowych owadów, które mają owariole typu panoistycznego, wzmożona w okresie witellogenezy synteza RNA zachodzi w jądrze oocytu [20]. Dzięki zastosowaniu testu hybrydyzacji molekularnej wykazano, że produkowane przez nie dodatkowe porcje RNA mają charakter RNA rybosomalnego [10, 14, 19].



Wydaje się bardzo prawdopodobne, że w politroficznych pęcherzykach jajowych RNA dostarczany do oocyty przez trofocyty również ma charakter RNA rybosomalnego. Świadczą o tym badania przeprowadzone ostatnio na muszce owocowej. Wykazano mianowicie, że w politroficznych pęcherzykach jajowych tego owada, na wszystkich etapach oogenezy, zachodzi stale synteza rRNA, 5S RNA i tRNA. Produkcja rRNA jest jednakże procesem dominującym, czemu odpowiada wzrost ilości genów rybosomalnych i co autorzy wiążą z procesem poliploidyzacji jąder trofocytów [21]. Badania prowadzone na tak różnorodnym materiale, jak omawiane tutaj oocyty owadów, oocyty jeżowców [13] i oocyty płazów [4], wskazują zatem, że z jedną z charakterystycznych cech rozwojowych przyszłej komórki jajowej, przynajmniej u wymienionych grup zwierząt, jest gromadzenie rybosomalnego RNA zabezpieczającego możliwość zachodzenia intensywnej syntezy białka w pierwszych stadiach embriogenezy. Mechanizmy tego zabezpieczenia mogą być różne: synteza zwiększonych ilości rRNA może zachodzić w samym oocycie lub/i w związanych z nim komórkach troficznych. Zawsze jednak sprowadzają się one do zwielokrotnienia odpowiednich odcinków genomu, z okolicy tzw. organizatora jąderkowego, na których synteza rRNA może zachodzić [22]. Tego typu amplifikacja genów w przyszłej komórce jajowej jest przejściowa, a nagromadzony w określonym stadium oogenezy dodatkowy materiał jąderkowy (rDNA) po pewnym czasie na ogół zanika [36]. Można przypuszczać, że wzrost i następnie liza jąder trofocytów są przejawem podobnego układu regulacyjnego.

Z przytoczonych danych wynika, że silnie poliploidalne jądra trofocytów w politroficznych pęcherzykach jajowych *G. mellonella* (jak i u innych owadów) powinny zawierać głównie cistrony rDNA. Zachodząca w nich endomitoza musiałaby zatem mieć charakter wybiórczej amplifikacji określonego odcinka genomu. Badania za pomocą odpowiedniej hybrydyzacji molekularnej przeprowadzonej na wyizolowanym DNA trofocytów lub na jądrach *in situ* prawdopodobnie odpowiedziałyby na pytanie, czy przypuszczenie to jest słuszne.

#### ZMIANY ROZWOJOWE W ULTRASTRUKTURZE OOCYTU

Owariole świeżo wyklutego motyla *G. mellonella* zawierają łącznie około 300 pęcherzyków jajowych, reprezentujących kolejne właściwe im stadia rozwojowe. Ustalenie głównych etapów rozwoju według kryteriów wielkości pęcherzyka jest dość trudne, natomiast zastosowanie prostych testów cytochemicznych na całych owariolach pozwala na wyznaczenie ostrej granicy między pęcherzykami należącymi do trzech klas: pęcherzyków z etapu prewitellogenezy, witellogenezy i postwitellogenezy.



nezy. Różnią się one wyraźnie odpowiedzią na testy używane do wykrywania w komórkach enzymów, jak np. fosfatazy alkalicznej, szeregu dehydrogenaz, a także RNA, glikoproteidów i fosfolipidów [1, 24, 26].

Przynależność oocytów do wymienionych klas można także ustalić na podstawie ich kształtu oraz położenia jądra komórkowego. To ostatnie w komórce oogonialnej i w młodym, prewitellogenetycznym oocycie ułożone jest centralnie, w miarę zaś postępującej witellogenezy spychane jest do cytoplazmy peryferyjnej. W jądrze młodego, prewitellogenetycznego oocyta *G. mellonella* — jak i w oocytach innych owadów — nie można wybarwić chromatyny za pomocą reakcji Feulgena, natomiast zwraca uwagę występowanie dużej, kulistej struktury, wykazującej obecność RNA i fosfolipidów [27] (rys. 6a). Struktura ta oglądana w mikroskopie elektronowym przypomina skupienie chromatyny pozachromosomalnej, która występuje w młodych oocytach u *Dytiscidae* [36]. U przedstawicieli tej rodziny chrząszczy kilkadziesiąt lat temu wykryto pojawianie się tej struktury podczas ostatnich, różnicujących podziałów oogonialnych [11] i uznano jej obecność za rodzaj determinanty genetycznej, decydującej o różnych drogach rozwoju powstałego w wyniku tych podziałów oocyta i siostrzanych względem niego trofocytów [37].

W oocytach *G. mellonella*, podobnie jak u *Dytiscidae*, omawiana struktura występuje tylko w młodych oocytach i zanika w miarę przesuwania się jądra z pozycji centralnej ku brzeżnej. Jej zasadniczy zrąb ma charakter sieciowaty, o włóknach grubości około 100 m $\mu$ . W miarę rozwoju sieć ta staje się luźniejsza, następuje jakby jej wakuolizacja (rys. 6e, 7). Najbardziej wzrasta objętość wakuoli położonej centralnie, aż w końcu cała ta struktura przyjmuje postać dużego, koncentrycznie ułożonego w jądrze pierścienia, odcinającego się wyraźnie od pozostałej karioplazmy (rys. 8). Struktura ta, po usunięciu fosfolipidów, daje się częściowo zabarwić kwaśną hemateiną, co potwierdza jej chromatynowy charakter (rys. 6b). Poza tym w jądrze oocyta — właśnie jedynie w tej strukturze — można stwierdzić metodą autoradiografii zachodzenie syntezy lipidów, RNA oraz obecność białek bogatych w argininę [24, 25] (rys. 6c, d). Nie prowadzono jednak badań, które pozwoliłyby na bliższe scharakteryzowanie, jaki rodzaj RNA jest tu produkowany. Przytoczone obserwacje pozwalają przypuszczać, że (podobnie jak u wspomnianych chrząszczy [36]) w oocytach *G. mellonella* struktura ta jest szczególną formą olbrzymiego jąderka, charakterystycznego dla pierwszych faz rozwoju oocyta. Możliwe, że pojawianie się olbrzymiego jąderka jest formą przejściowej, stosunkowo krótkotrwałej amplifikacji genów, niezależnej od podobnego procesu zachodzącego — jak już omówiono — w jądrach trofocytów. Potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga jednak dalszych, szczegółowych badań. Mechanizmy regulujące uformo-



wanie, a potem lizę takiego jąderka również pozostają nadal niejasne. Być może też, że jest to zjawisko bardziej powszechne, niż przypuszczano dotychczas, właściwe wczesnym stadiom rozwoju oocytów różnych owadów o politroficznych pęcherzykach jajowych. Jednoznaczną identyfikację tej struktury dają dopiero badania prowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego, wiadomo zaś, jak nie łatwo jest trafić na odpowiedni przekrój przez jądro tak dużej komórki, jaką jest oocyt. Stąd też, być może, obserwacje dotyczące obecności w nim „jąderka olbrzymiego”, lub według terminologii badaczy włoskich „ciałka Giardiniego”, mają jedynie wyrywkowy charakter.

Jak już zaznaczono, jąderko olbrzymie stopniowo zanika w miarę postępującej witellogenezy. W oocycie zaczyna się wówczas gromadzić RNA produkowany przez trofocyty oraz substancje zapasowe odkładane w ooplazmie, tworzące żółtko. Żółtko to występuje w postaci kul różnie reagujących z zastosowanymi utrwalaczami, a więc zróżnicowanych pod względem składu chemicznego (rys. 9). Obok białka i lipidów występują w nim także węglowodany, odkładane regularnymi kręgami w brzeżnej części kuli (rys. 10a, b). Niektóre z kul żółtkowych wykazują regularną organizację ultrastrukturalną, co prawdopodobnie związane jest z rodzajem zawartego w nich materiału. Te utwory metaplazmatyczne stopniowo wypełniają szczelnie całą komórkę, tak że cytoplazma i jej organelle stanowią znikomą jej część. W przypadku mitochondriów zmniejszenie się ich ilości na jednostkę masy ooplazmy znajduje odbicie w drastycznym spadku współczynnika aktywności metabolicznej oocytów (wyrażonego ilością tlenu zużytego przez jednostkę masy w jednostce czasu, mierzoną metodą mikrorespirometryczną) podczas witellogenezy [17].

W pęcherzykach jajowych *G. mellonella* prowadzono również pomiary zawartości niektórych pierwiastków za pomocą mikrosondy rentgenowskiej. W wyniku tych pomiarów okazało się, że oocyty — zarówno ze stadium wczesnej witellogenezy, jak i po jej zakończeniu — charakteryzują się bardzo dużą zawartością wapnia; podczas gdy w cytoplazmie trofocytów i komórek nabłonka folikularnego  $\text{Ca}^{2+}$  występuje w stężeniu 3 mM, w ooplazmie stężenie tego pierwiastka dochodzi do 10 mM [34]. Dane te obejmują zarówno jony wapnia rozpuszczone w cytosolu, jak i występujące w powiązaniu z innymi cząsteczkami. Być może, tak duża zawartość tego pierwiastka w ooplazmie wiąże się m. in. z gromadzeniem w żółtku znacznych ilości fosfolipidów, które ulegają pod wpływem wapnia stabilizacji [18]. Wiadomo również, że jony wapnia pełnią w komórce także szereg innych ważnych funkcji fizjologicznych i że utrzymanie określonego poziomu homeostazy wapniowej ma dla komórki zasadnicze znaczenie. Jednym z mechanizmów zapewniających utrzymanie tej homeostazy jest — być może — zaobserwowana na błonie



oocytów *G. mellonella* zdolność wiązania przez nią jonów wapnia (rys. 11). Zjawisko to występuje jedynie w okresie witellogenezy wówczas, gdy poprzez błonę oocytu od strony nabłonka folikularnego zachodzi stały napływ do ooplazmy różnych substancji [33]. Błona oocytu — oolemma — charakteryzuje się wówczas bardzo dużą aktywnością pinocytotyczną [30]. Zastosowanie kwasu taninowego przy utrwalaniu pęcherzyków jajowych z tego okresu daje obrazy wyraźnie wykazujące, że zarówno kanaliki, jak i pęcherzyki pinocytotyczne pełne są jakichś substancji reagujących z tym odczynnikiem (rys. 12). Nie wykluczone, że łatwość wiązania wapnia przez błonę tych kanalików związana jest także z niezwykłą jej ruchliwością, częstymi lokalnymi zmianami kształtu warunkującymi niezwykłą aktywność pinocytotyczną oolemmy. Pod koniec okresu witellogenezy aktywność ta ustaje i zanika też zdolność specyficznego wiązania przez nią jonów wapnia. Oocyt wypełnia się wówczas szczelnie kulami żółtka; w cytoplazmie obwodowej, tuż przy błonie, zaczyna się pojawiać warstwa tzw. błony żółtkowej (rys. 13a, b). Warstwa ta dochodzi do grubości równej około 1  $\mu\text{m}$ . Jest to gęsta, siateczkowata struktura, łatwo przepuszczalna dla związków o małej cząsteczce, jak np. sole strontu [33]. Widoczne są również biegnące przez całą tę warstwę prostopadle do jej obwodu kanaliki o średnicy dochodzącej do kilkudziesięciu milimikronów. Obecność ich wskazuje na to, że nawet w końcowej fazie rozwoju oocyt nie jest całkowicie odcięty od ewentualnego dopływu substancji o większych cząsteczkach.

#### STRUKTURA I FUNKCJA FIZJOLOGICZNA NABŁONKA FOLIKULARNEGO

Komórki jednowarstwowego nabłonka otaczającego pęcherzyk jajowy przez stosunkowo długi okres zachowują zdolność podziałów mitotycznych (rys. 14), co zapewnia utworzenie przez nie zwartej okrywy rosnącego oocytu. Kształt i wzajemne ułożenie komórek nabłonka ulega w miarę rozwoju pęcherzyka charakterystycznym zmianom. W bardzo młodych oocytach przylegają one ściśle do siebie (rys. 15, 16), natomiast w miarę ich wzrostu ulegają znacznemu wydłużeniu i pojawiają się między nimi wyraźne, stale zwiększające się przestrzenie. Przestrzenie te służą zapewne swobodnemu przepływowi różnych substancji do powierzchni oocytu. W następnych etapach dojrzewania oocytu komórki nabłonka tracą swój wydłużony kształt, ich oś pionowa staje się krótsza od osi poprzecznej, pozostają jednak między nimi nadal bardzo duże przestrzenie międzykomórkowe. Pod koniec rozwoju oocytu komórki te wytwarzają otoczkę okalającą cały pęcherzyk, zwaną chorionem.

Na ogół przyjmuje się, że osłona oocytu i utworzenie chorionu jest



główną funkcją nabłonka folikularnego. Bliższe przyjrzenie się strukturze tych komórek nasuwa jednak przypuszczenie, że spełniają one wobec oocytu także jakieś funkcje troficzne. Stale zachodząca synteza RNA w ich jądrach, bogato wykształcone endoplazmatyczne retikulum, duża ilość mitochondriów, obecność kulistych utworów metaplazmatycznych zawierających glikoproteidy (podobnych do niektórych kul żółtka oocytu) świadczą o tym, że są to komórki o dużym natężeniu procesów metabolicznych (rys. 17a, b). Trudno jednakże na razie powiedzieć, które z produktów tego metabolizmu, jeżeli w ogóle tak jest, przekazywane są do oocytu. Przyjmuje się, że odkładane w żółtku białka dostarczane są przez hemolimfę w postaci wysoko zorganizowanych cząstek. Świadczą o tym wyniki badań, w których wykazano identyczność serologiczną i taką samą ruchliwość elektroforetyczną białek hemolimfy i białek ooplazmy, w fazie jej intensywnego wzrostu [3, 12, 35]. Drugi ważny składnik kul żółtkowych — lipidy — również wydaje się być doprowadzany do oocytu przez hemolimfę. Źródłem jego jest ciało tłuszczowe owada pozostające w okresie witellogenezy w ścisłym kontakcie morfologicznym z owariolą [31]. Krzywa prezentująca przyrost masy lipidów w owarioli *G. mellonella* w okresie witellogenezy jest lustrzanym odbiciem krzywej prezentującej spadek zawartości tych substancji w jej ciele tłuszczowym [8]. Jednocześnie w ciele tłuszczowym obserwuje się wzrost aktywności lipolitycznej ściśle związany z obecnością rozwijającej się owarioli [9]. Dane te sugerują, że lipidy ulegają przed uwolnieniem ich z ciała tłuszczowego degradacji i formą transportową w hemolimfie są produkty ich hydrolizy [6]. Wyniki wcześniejszych badań świadczą o tym, że wolne kwasy tłuszczowe występujące w środowisku mogą ulegać bardzo szybkiemu wbudowaniu w różne frakcje lipidów występujących w owarioli [7], przy czym najintensywniej (sądząc po zaczerpieniu uzyskanych autoradiogramów) synteza lipidów wydaje się zachodzić w nabłonku folikularnym [25]. Nie można zatem wykluczyć, że re-synteza (być może tylko częściowa) hydrolizowanych w ciele tłuszczowym lipidów odbywa się w komórkach nabłonka folikularnego. Lipidy te dopiero stąd mogłyby przedostawać się do oocytu. Sugestia ta wymaga dokładniejszego sprawdzenia, w każdym bądź razie pozostaje faktem, że palmitynian sodu ulega już po 5 minutach wbudowaniu w nabłonek folikularny, w związku pozostające w komórce przy procedurze histologicznej pozwalającej na zachowanie lipidów.

Bliższego wyjaśnienia wymaga też sprawa pojawiania się w komórkach nabłonka folikularnego wspomnianych już utworów metaplazmatycznych — kul zawierających glikoproteidy (rys. 17b). Struktur takich nie spotyka się nigdy w trofocytach, występują one jedynie w nabłonku



folikularnym i w oocycie. Za pomocą reakcji cytochemicznych — na poziomie mikroskopu świetlnego — obecność glikogenu można wykazać w pęcherzykach młodych, prewitellogenetycznych i pod koniec witellogenety, czy jednak jest on syntetyzowany bezpośrednio na terenie cytoplazmy oocytu, czy w nabłonku folikularnym — pozostaje sprawą niewyjaśnioną.

#### STRUKTURA I FUNKCJA FIZJOLOGICZNA ŚCIANY OWARIOLI

Ściana owarioli *G. mellonella* przylega szczelnie do zawartych w niej pęcherzyków, dzięki czemu wzdłuż całej owarioli zaznaczają się wyraźnie ich kształty. Na preparatach histologicznych widoczna jest ona zwykle w postaci nieregularnej warstwy, grubości paru mikronów, ściśle związanej z pęcherzykami, zwłaszcza w ich strefie „równikowej”. Na odcinkach leżących naprzeciw połączeń dwóch kolejnych pęcherzyków ściana ta ulega lekkiemu wklęsnięciu, w utworzonych zaś przestrzeniach widoczne są często pojedyncze komórki hemolimfy (rys. 18). Zbudowana jest ona z komórek mioepitelialnych, silnie wydłużonych (w kierunku osi długiej owarioli), pozazębianych między sobą, ale tworzących też liczne przestrzenie międzykomórkowe. W komórkach tych widoczne są pęki dobrze wykształconych włókienek mięśniowych, w których na przekrojach poprzecznych widać grube filamenty regularnie otoczone cienkimi, zapewne odpowiadające miozynowym i aktynowym filamentom (rys. 19). Włókna te biegną zarówno wzdłuż, jak i w poprzek owarioli. Oprócz tego zwraca uwagę bardzo duża ilość komórek tchawkowych przylegających do zewnętrznej powierzchni ściany owarioli, jak również występujących w jej głębszych warstwach (rys. 20).

Powierzchnia całej ściany owarioli, tak zewnętrzna, jak i wewnętrzna, wyłożona jest warstwą błony podstawnej o grubości równej kilkuset mikrom. Warstwa ta, o typowej sieciowatej strukturze, zbudowana jest z glikoproteidów o polianionowym charakterze. Świadczą o tym wyniki testów cytochemicznych, takich jak reakcja Thierry'ego, barwienie czerwienią rutenową, wiązanie konkanawaliny A, wiązanie zasadowej formy żelaza koloidalnego [29, 31, 32], stosowanych powszechnie do wykrywania tzw. glikokaliksu (inaczej warstwy powierzchniowej) pojedynczych komórek (rys. 21a, b, 22, 23). Brak reakcji z czerwienią rutenową obserwowany przez nas po uprzednim trawieniu neuramindazą świadczy o obecności kwasu sjałowego. Wyniki te sugerują, że opisywana błona podstawna charakteryzuje się podobną budową chemiczną, jak glikokaliks. Z jednej strony, zapewnia ona całej rurce jajnikowej zwartą, sprężystą osłonę, z drugiej — działa prawdopodobnie jak



sito molekularne umożliwiające swobodny przepływ metabolitów do jej wnętrza. Zarówno cząsteczki niewielkich rozmiarów, jak i duże cząsteczki — np. białka — wszystko, co potrzebne jest do rozwoju pęcherzyków i odkładane jest bezpośrednio albo po odpowiednim przekształceniu w cytoplazmie dojrzewającego oocytu, musi przejść przez barierę, jaką stanowi ściana owarioli. Prawdopodobnie bogata w ładunki ujemne i posiadająca zdolność łatwego wiązania białek (o czym świadczy chociażby wiązanie konkanawaliny A) błona podstawna tej ściany odgrywa dużą rolę w kumulowaniu przy powierzchni owarioli dostarczanych przez hemolimfę substancji. Licznie występujące w ścianie owarioli przestrzenie międzykomórkowe bez wątpienia ułatwiają dalszy ich przepływ. Obecność wspomnianych włókienek mięśniowych w komórkach, z których zbudowana jest ta ściana, umożliwia ruchy całej owarioli, dobrze widoczne przy preparowaniu tego narządu pod mikroskopem stereoskopowym. Zapewne ma to duże znaczenie dla dopływu ku powierzchni owarioli substancji zawartych w hemolimfie i transportowanych następnie do leżących wewnątrz owarioli pęcherzyków jajowych.

## LITERATURA

- [1] BARAŃSKA J., PRZEŁĘCKA A., Lokalizacja cytochemiczna fosfolipidów i fosfatazy alkalicznej w oocytach *Galleria mellonella*, Fol. Morph., **12**: 353–357, 1962.
- [2] BIER K., Synthese, intercellulares Transport und Abbau von Ribonukleinsäure im Ovar des Stubenfliege *Musca domestica*, J. Cell Biol., **16**: 436–440, 1963.
- [3] BOWNES M., HAMES B. D., Accumulation and degradation of three major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*, J. Expl Zool., **200**: 149–157, 1977.
- [4] BROWN D., DAVID I., Specific gene amplification in oocytes, Science, **160**: 272, 1968.
- [5] DUTKOWSKI A., The development of female gonads of *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*), Zoologica Pol., **19**: 115–131, 1969.
- [6] — Współzależność między ciałem tłuszczowym a owariami owadów, Post. Biol. Kom., **2**: 181–221, 1975.
- [7] DUTKOWSKI A., SKANGIEL - KRAMSKA J., PRZEŁĘCKA A., Incorporation of 1 - C<sup>14</sup> - sodium palmitate into lipids of the ovariole of *Galleria mellonella*, Folia Histochem. Cytochem., **6**: 185–194, 1968.
- [8] DUTKOWSKI A., ZIAJKA B., Sexual dimorphism in the content of lipid in fat body of *Galleria mellonella* L. and utilization of these lipids by developing oocytes for vitellogenesis, Zool. Pol., **20**: 55–70, 1970.
- [9] — Synthesis and degradation of glycerides in fat body of normal and ovario-tectomized females of *Galleria mellonella*, J. Insect Physiol., **18**: 1351–1367, 1972.
- [10] GALL J., MacGREGOR H. C., KIDSTON E., Gene amplification in the oocytes of Dytiscid water beetles, Chromosoma, **26**: 169, 1969.



- [11] GIARDINA A., Origine dell'oocite e delle cellule nutrici nel *Dytiscus*, Int. Mschr. Anat. Physiol., **18**: 417-484 1901.
- [12] GIORGI F., JACOB J., Recent findings on oogenesis of *Drosophila melanogaster*. II. Further evidence on the origin of yolk platelets, J. Embryol. Expl Morph., **38**: 125-138, 1977.
- [13] GROSS P., COUSINEAU G. H., Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development, Expl. Cell Res., **33**: 368-395, 1964.
- [14] HANSEN - DELKESKAMP E., Sateliten Desoxyribonucleinsäure in Gonaden und somatischen Geweben von *Acheta domestica* L., Z. Natur. (Tübingen), **24b**: 1331, 1969.
- [15] IMMS A. D., Textbook of entomology, Methuen, London, 1948.
- [16] KING R. C., AGGARWAL S. K., Oogenesis in *Hyalophora cecropia*, Growth, **29**: 17-83, 1965.
- [17] KLEKOWSKI R. Z., CZAJA - TOPIŃSKA J., PRZEŁĘCKA A., Developmental changes in the rate of oxygen consumption in egg vesicles of *Galleria mellonella*, Fol. Histochem. Cytochem., **10**: 213-226, 1972.
- [18] LEATHES J. B., Lancet, **1**: 957, cyt. według BAKER J. R., Principles of biological microtechnique, Methuen, London, 1958.
- [19] LIMA - DE - FARIA A., BIRNSTIEL M., JAWORSKA H., Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of *Acheta*, Genetics, **61**: 145, 1969.
- [20] MATUSZEWSKI B., HOSER P., HOSER G., MICHALAK M., Organization of the oocyte nucleus in Silphid beetles (*Silphidae*, *Coleoptera-Polyphaga*), Experientia, **33**: 883-887, 1977.
- [21] MERMOD J - J., JACOBS - LORENA M., CRIPPA M., Changes in rate of synthesis and ribosomal gene number during oogenesis of *Drosophila melanogaster*, Develop. Biol., **57**: 393-402, 1977.
- [22] PERKOWSKA E., MacGREGOR H. C., BIRNSTIEL M. L., Gene amplification in the oocyte nucleus of mutant and wild - type *Xenopus laevis*, Nature, London, **217**: 649-650, 1968.
- [23] PRZEŁĘCKA A., Zmiany strukturalne i biologiczne jąder komórkowych w pęcherzykach folikularnych *Galleria mellonella* L., Zesz. Nauk. UJ, **66**: 17-28, 1965.
- [24] — Nucleic acids metabolism and cell interaction in the ovariole of *Galleria mellonella*, Fol. Histochem. Cytochem., **4**: 223-236, 1966.
- [25] — Incorporation of 14 - C - sodium palmitate into lipids and cell interaction in ovarioles of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), Ann. Histochem., **11**: 403-411, 1966.
- [26] — Developmental changes in the cellular distribution pattern of some dehydrogenases in the ovarioles of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), Fol. Histochem. Cytochem., **5**: 27-32, 1967.
- [27] — Phospholipids and nuclear structure, [w] Cell structure and its interpretation, red. S. M. McGee - Russel, K. F. A. Ross, E. Arnold, London 1968, 157-167.
- [28] — Synaptonemal complexes in the ovaries of *Galleria mellonella*, Experientia, **28**: 445-446, 1972.
- [29] — Glycoproteins in the basement membranes of the ovarial tube in *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), Ann. Med. Sect. Pol. Sci., **20**: 117-118, 1975.
- [30] PRZEŁĘCKA A., DUTKOWSKI A. B., Morphological basis of follicle cells -



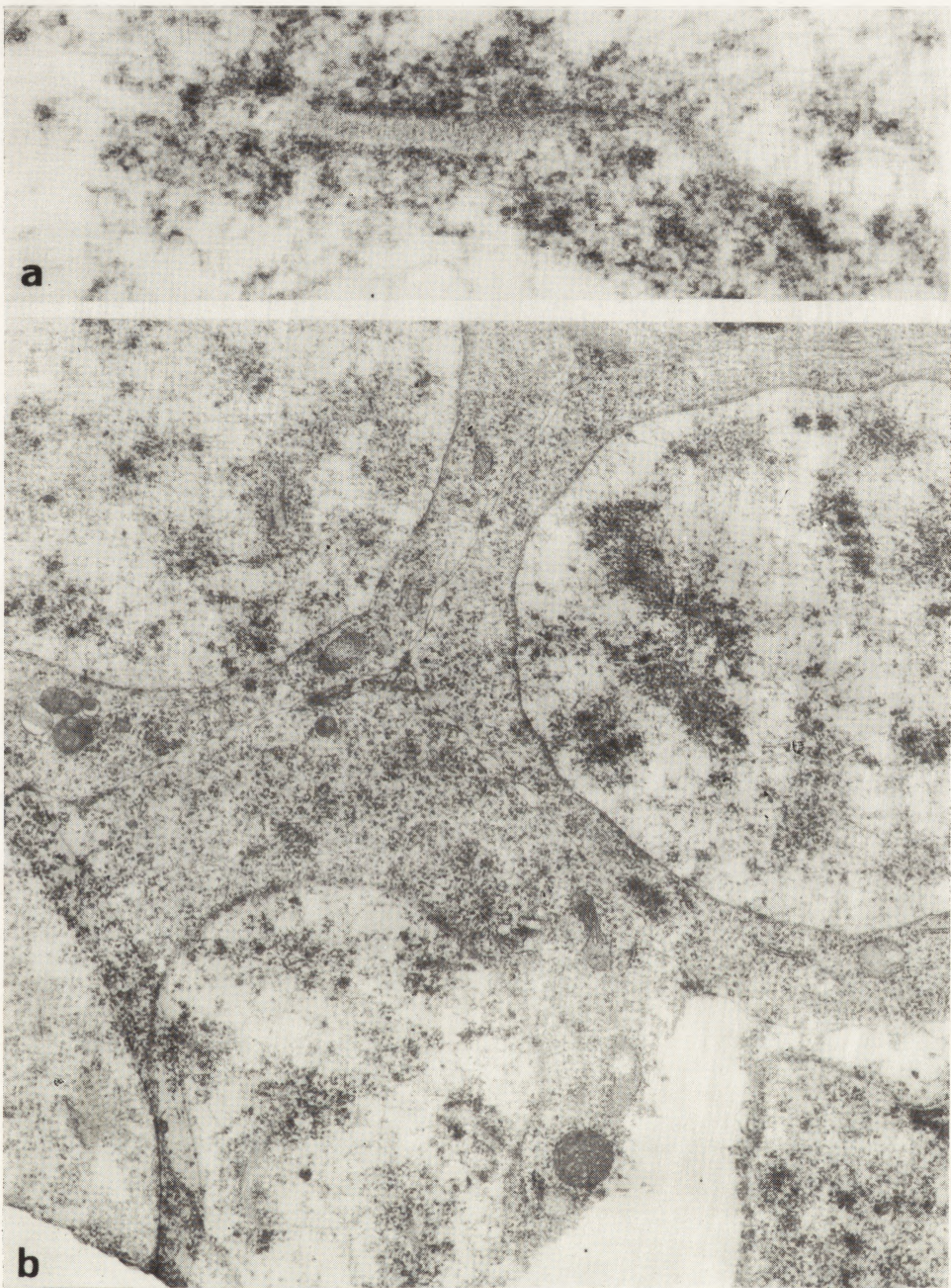
- oocyte interaction in normal pupae and isolated pupal abdomina of *Galleria mellonella* L., *Experientia*, **28**: 556-558, 1972.
- [31] — The structure of the ovariole wall in *Galleria mellonella*, *Fol. Histochem. Cytochem.*, **11**: 269-174, 1973.
- [32] — The affinity of the basement membrane in the ovarian sheath of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*) for Concanavalin A under normal and hormonally changed conditions, *J. Microscopie Biol. Cell.*, **23**: 229-236, 1975.
- [33] PRZEŁĘCKA A., SOBOTA A., Calcium dependent deposits at the plasma membrane during development of the oocyte of *Galleria mellonella*, *Cytobiologia*, **13**: 182-190, 1976.
- [34] SOBOTA A., BUROVINA I. V., PRZEŁĘCKA A., ZAHOROWSKI W., Analysis of calcium distribution in insect ovarian follicle, *Abstr. Vth Intern. Congr. Histochem. Cytochem.*, Bucharest 1976.
- [35] TELFER W. H., The rout of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moth, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**: 747-759, 1961.
- [36] URBANI E., Cytochemical and ultrastructural studies of oogenesis in the *Dytiscidae*, *Monitore Zool. Ital.*, **3**: 55-87, 1969.
- [37] WILSON E. B., *The cell in development and heredity*, 3ed. Macmillan, New York 1928.
- [38] ZALOKAR M., Sites of RNA and protein synthesis in *Drosophila*, *Expl Cell Res.*, **19**: 184-186, 1960.

Otrzymano: 3 października 1977.

Przyjęto: 8 października 1977.

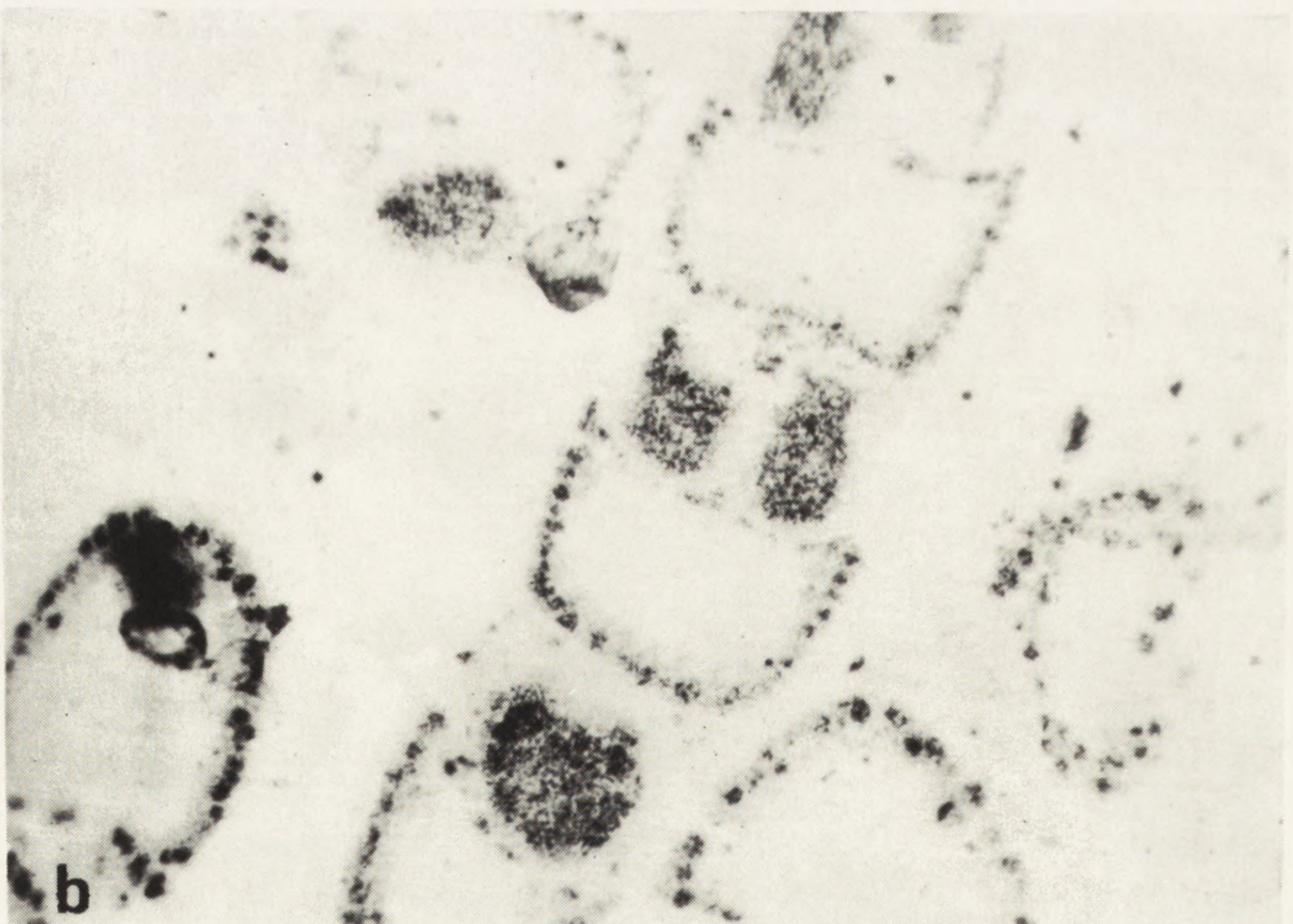
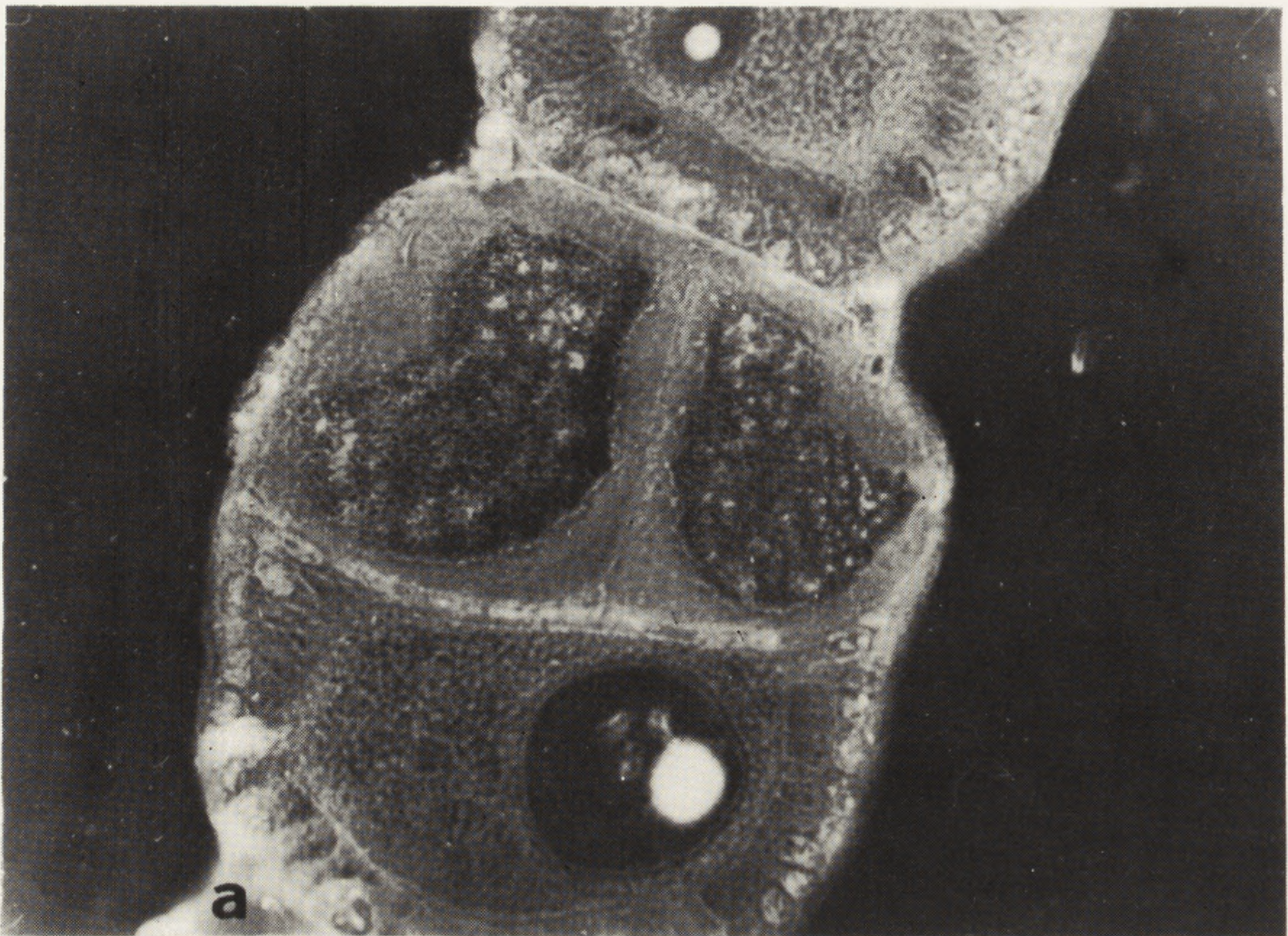
Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02 - 093 Warszawa.





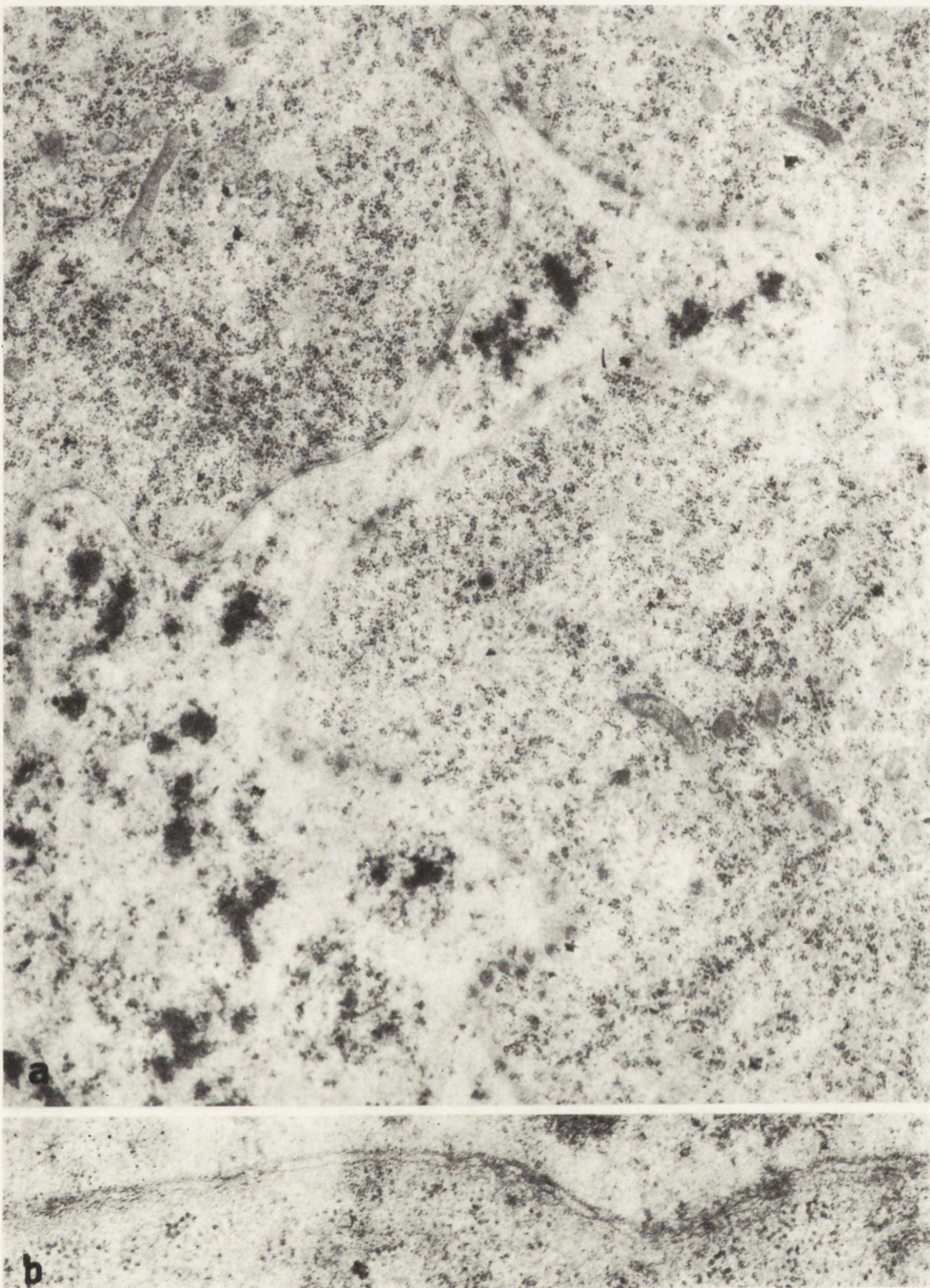
Rys. 2. Owaria gąsienic *G. mellonella* z ostatniego stadium rozwojowego larwy  
a — fragment jądra z kompleksem synaptemalnym,  $\times 50\ 000$ , b — grupa komórek oögonialnych,  $\times 9\ 000$





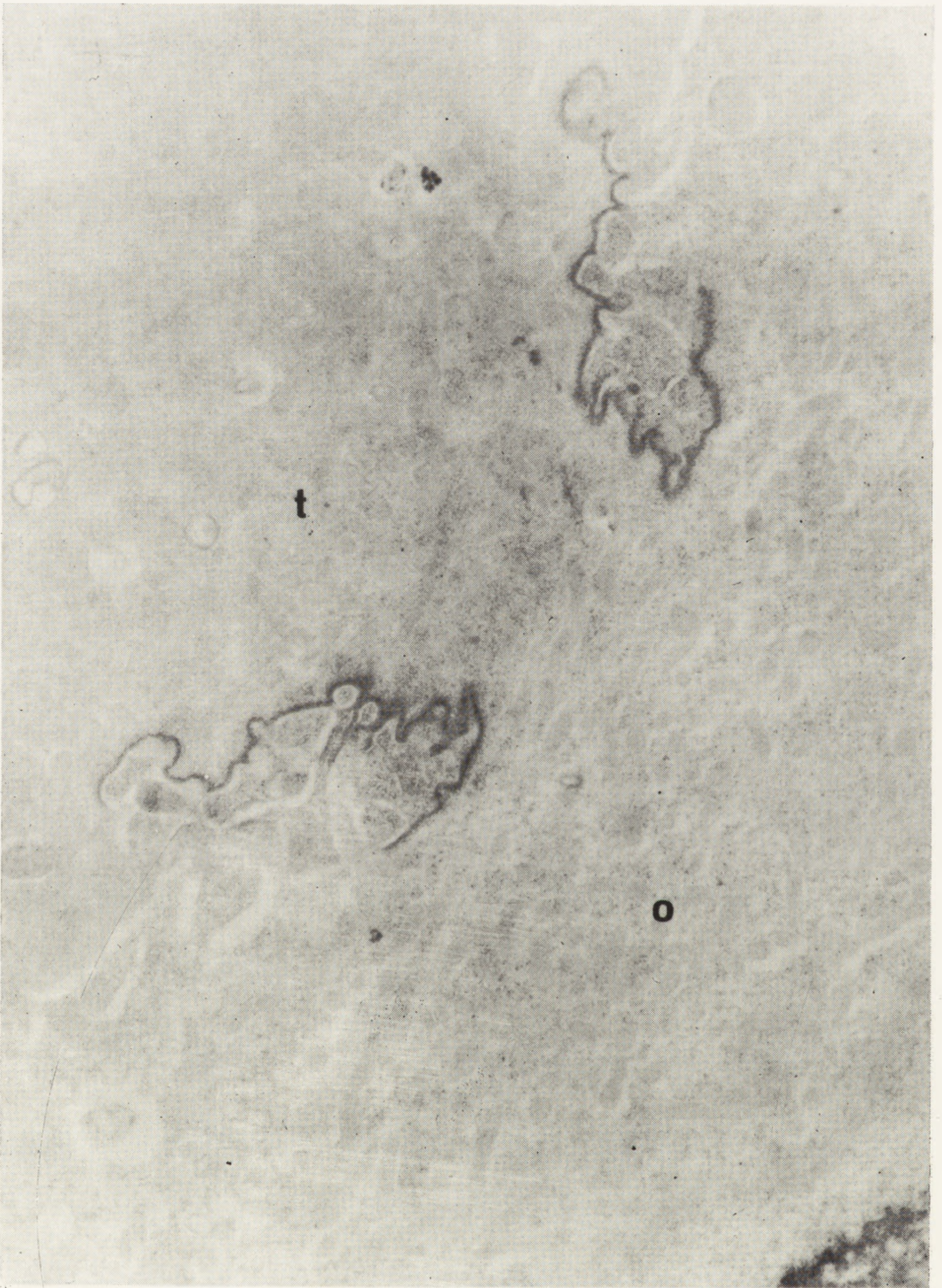
Rys. 3. *a* — pęcherzyki jajowe *G. mellonella* z okresu prewitellogenezy  $\times 600$ , *b* — autoradiogram owarioli z okresu witellogenezy, materiał uprzednio inkubowany w  $^3\text{H}$ -urydynie ( $2 \mu\text{Ci}/0,0002 \mu\text{m}/\text{ml}$ , 60 min),  $\times 200$





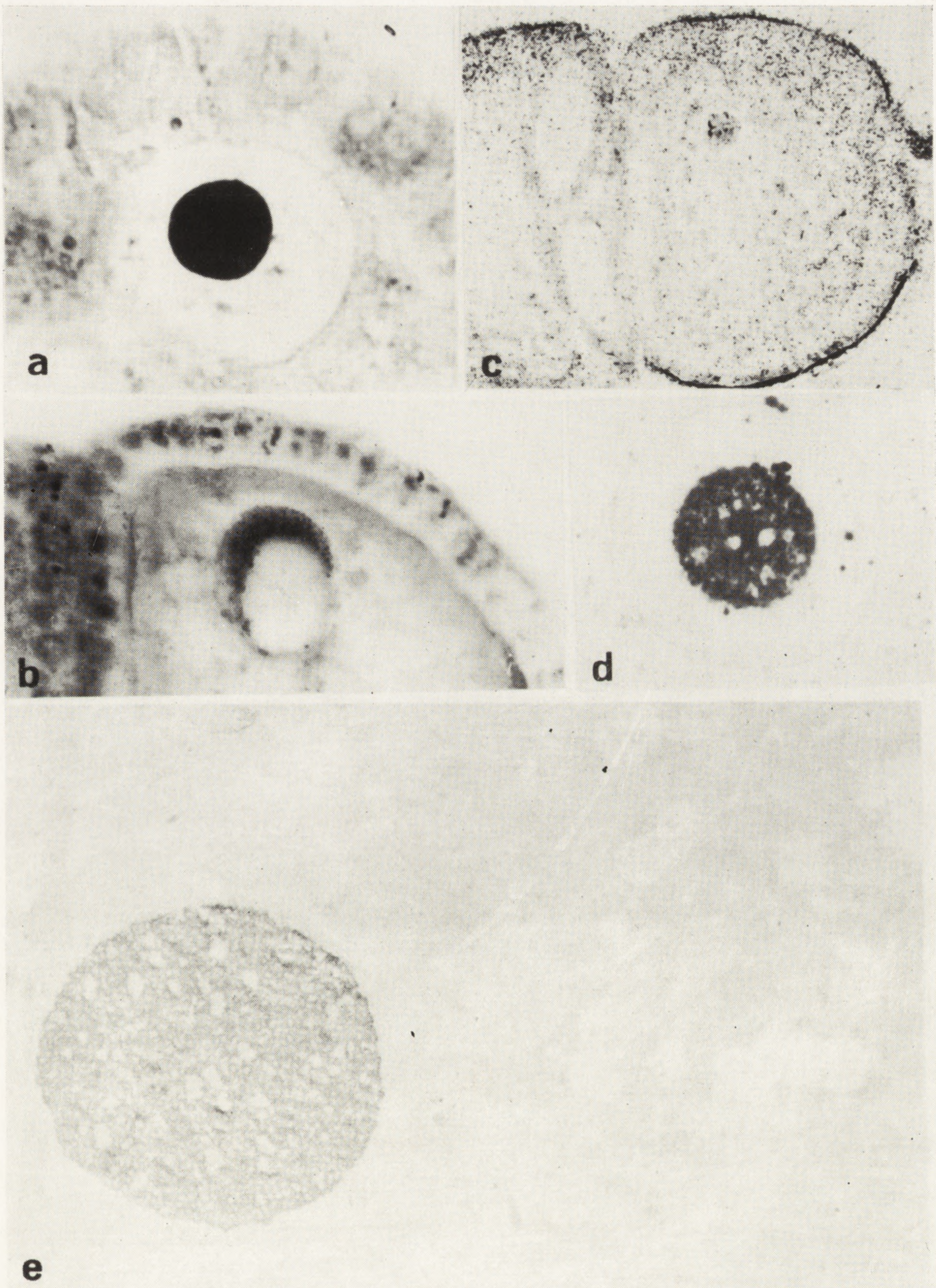
Rys. 4. Fragmenty jąder trofocytów, a —  $\times 32000$ , b —  $\times 64000$





Rys. 5. Mostek cytoplazmatyczny łączący komorę trofocytową z oocytem,  $\times 18000$   
o — oocyt, t — trofocyt

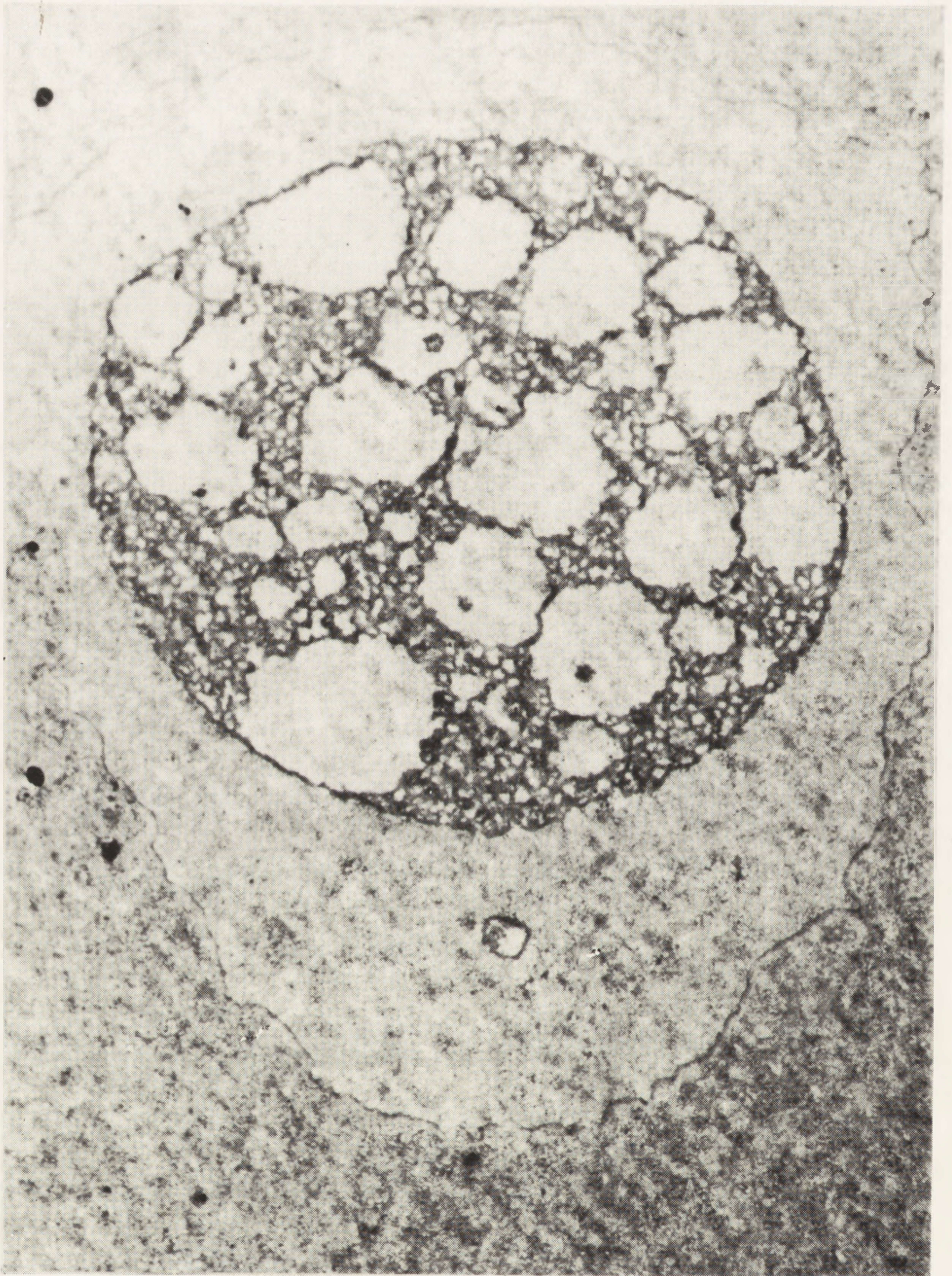




Rys. 6. Jąderko „olbrzymie” w młodych oocytach *G. mellonella*

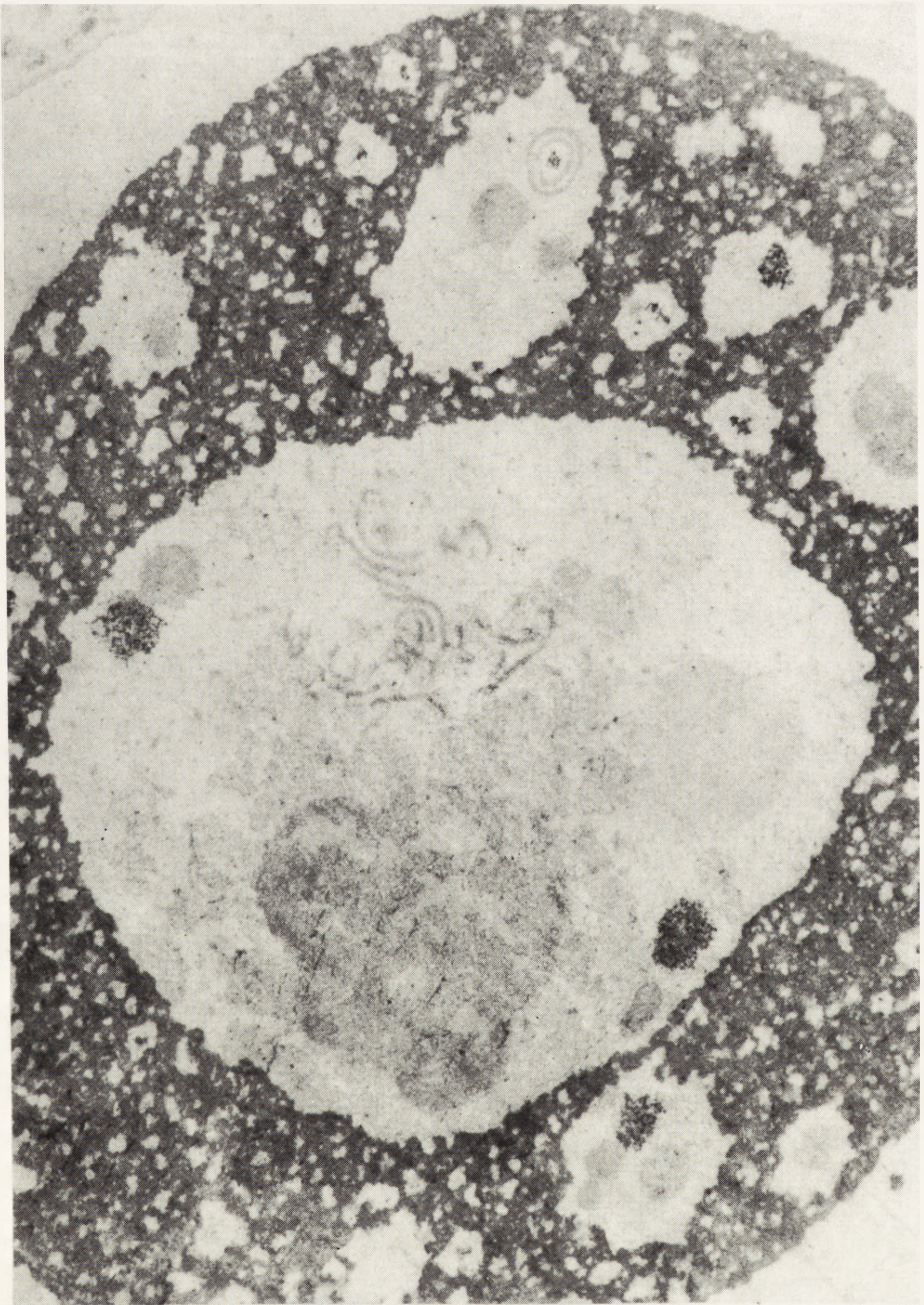
a — po wybarwieniu fosfolipidów kwaśną hemateiną według testu Bakera,  $\times 1600$ , b — po wyekstrahowaniu fosfolipidów, wybarwione częściowo kwaśną hemateiną, podobnie jak chromatyna w jądrach nabłonka folikularnego, c — autoradiogram uzyskany po inkubacji w  $C^{14}$ -palmitynie sodu ( $5 \mu Ci / 0,21 \mu M/ml$ , 15 min),  $\times 600$ , d — autoradiogram uzyskany po inkubacji pęcherzyka w środowisku zawierającym  $H^3$ -argininę ( $10 \mu Ci / 0,008 mg/ml$ , 60 min),  $\times 1800$ , e — zdjęcie z mikroskopu elektronowego,  $\times 5400$





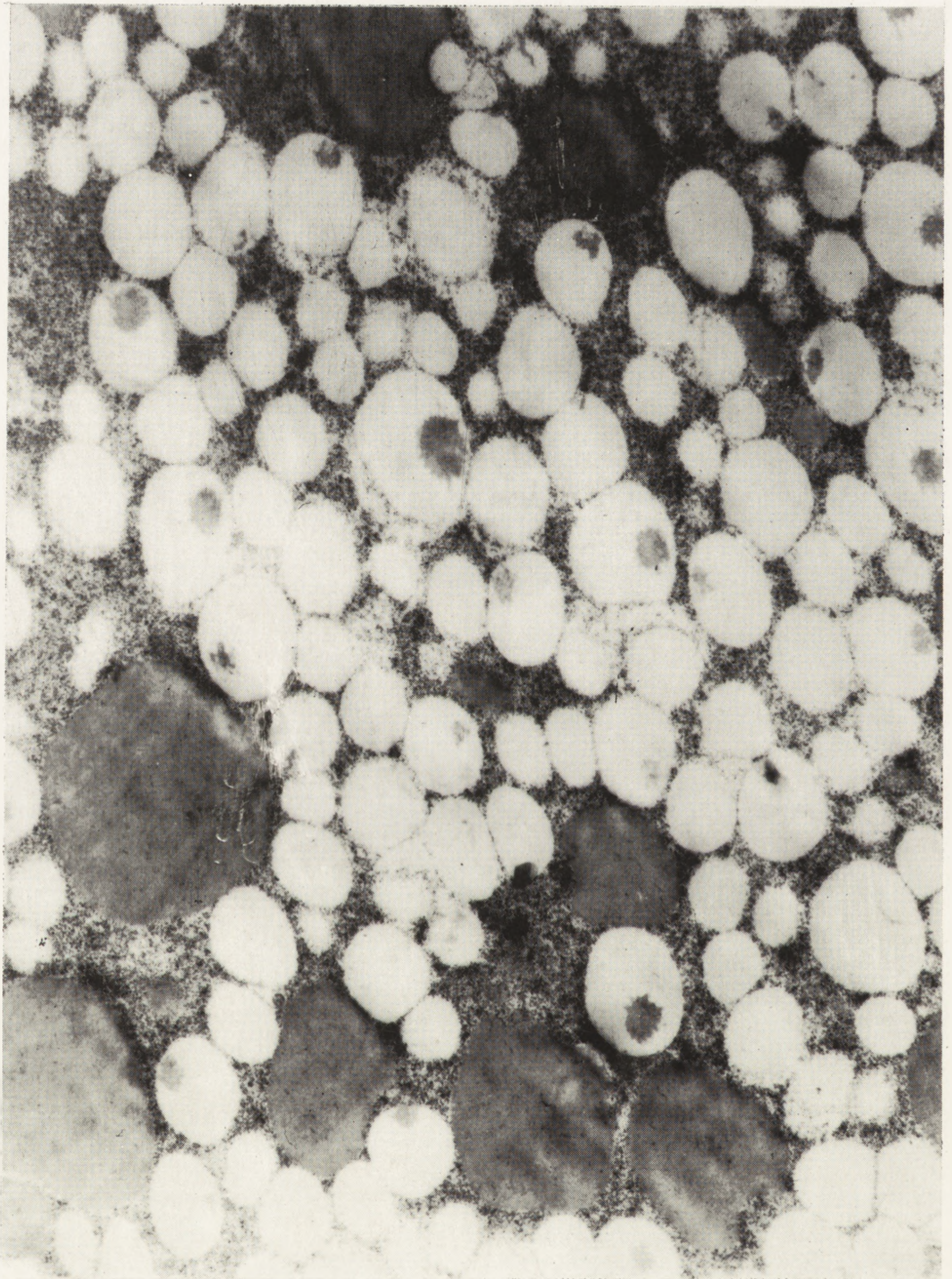
Rys. 7. Jąderko olbrzymie w młodym oocycie *G. mellonella*,  $\times 7200$





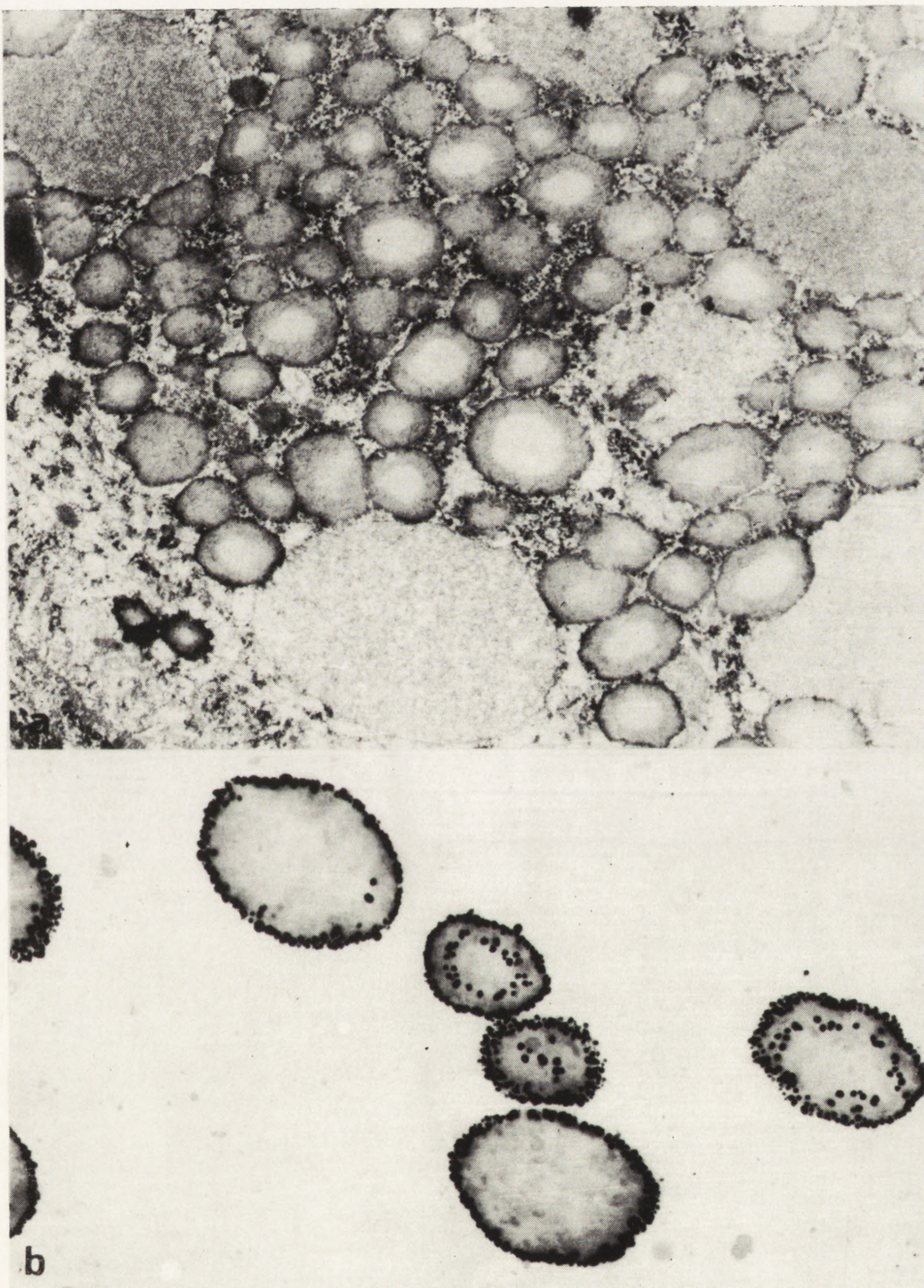
Rys. 8. Jąderko olbrzymie w oocyte *G. mellonella* trochę starszym niż przedstawiony na rys. 7,  $\times 10500$





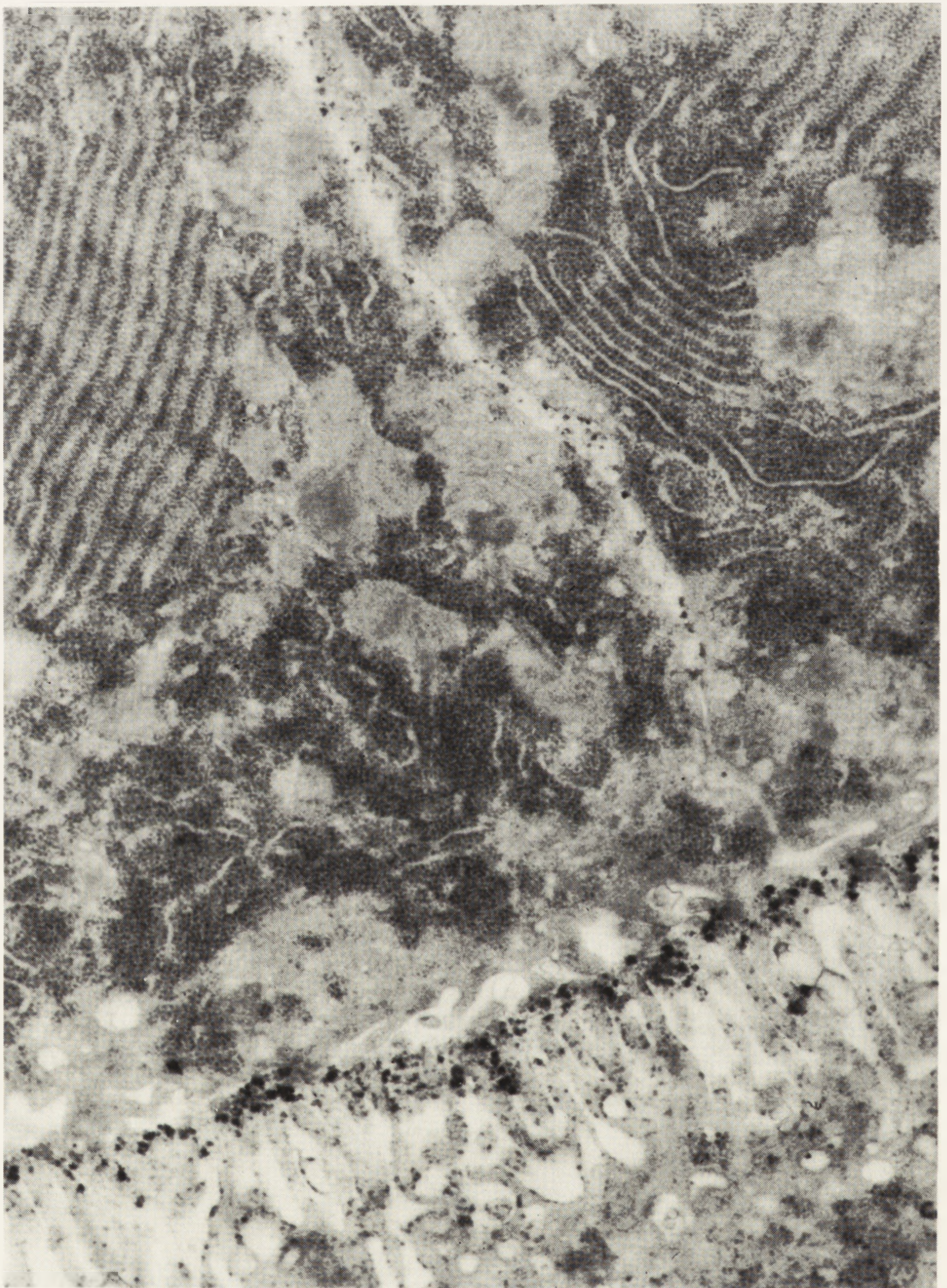
Rys. 9. Fragment wypełnionej kulami żółtka ooplazmy pęcherzyka jajowego *G. mellonella* z okresu witellogenezy, utrwalanie i kontrastowanie materiału według metody konwencjonalnej (ald. glutarowy, sole ołowiu i uranu),  $\times 12500$





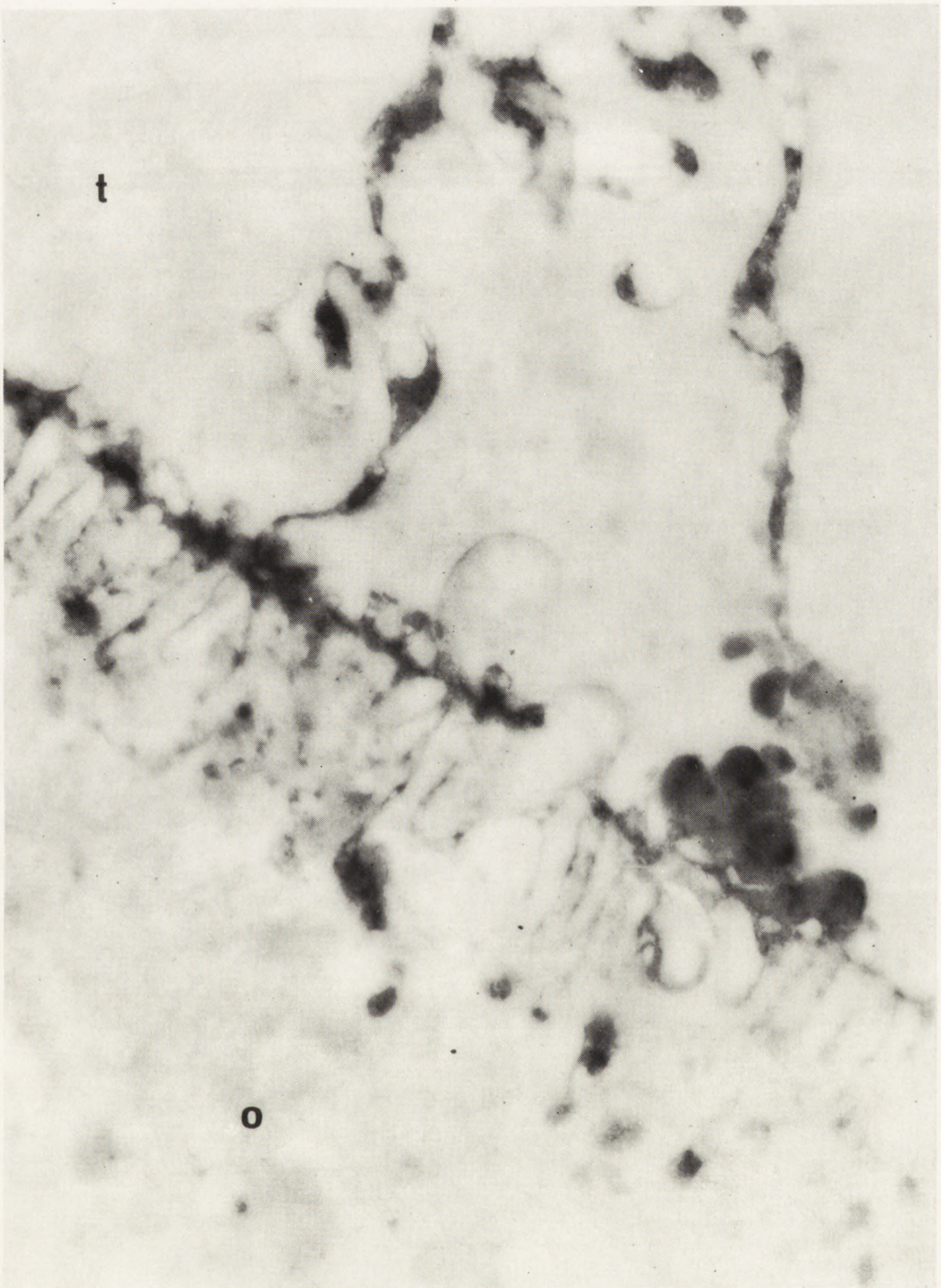
Rys. 10. Kule żółtkowe w oocytach *G. mellonella*, materiał po przeprowadzeniu reakcji Thierry'ego pozwalającej na uwidocznienie glikoproteidów, *a* —  $\times 18000$ ,  
*b* —  $\times 30000$





Rys. 11. Fragment pęcherzyka jajowego *G. Mellonella* z okresu witellogenezy; na błonie komórkowej oocytu widoczne liczne elektronowo gęste ziarnistości powstałe w wyniku utrwalania materiału w aldehydzie glutarowym z dodatkiem jonów wapnia,  $\times 24000$

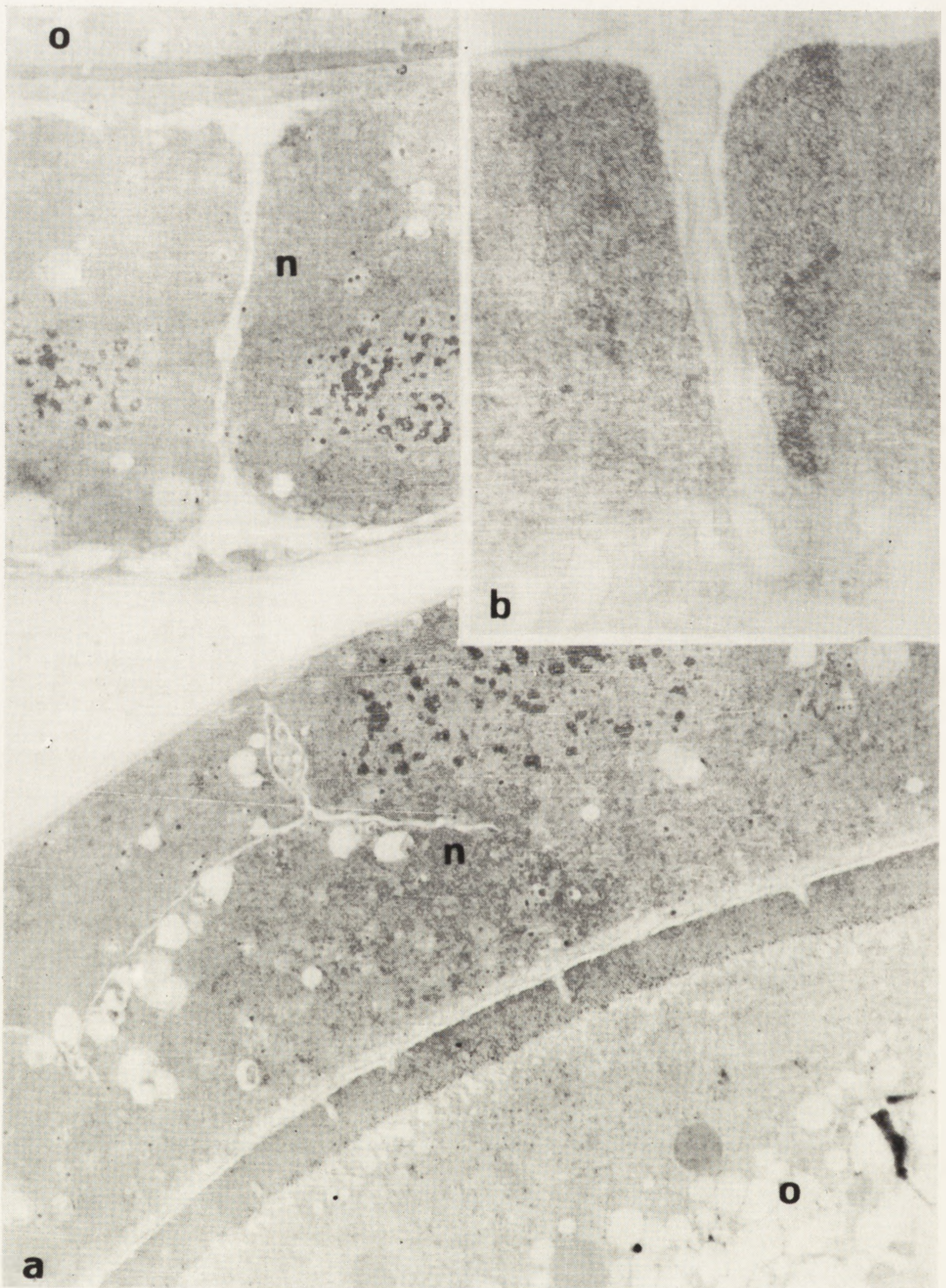




Rys. 12. Fragment pęcherzyka jajowego *G. mellonella* z okresu witellogenezy, silne wykontrastowanie błon komórkowych, substancji wypełniających przestrzenie między komórkami nabłonka foliularnego oraz wewnątrz kanalików i pęcherzyków pinocytotycznych uzyskane w wyniku zastosowania przy utrwalaniu materiału kwasu taninowego,  $\times 36000$

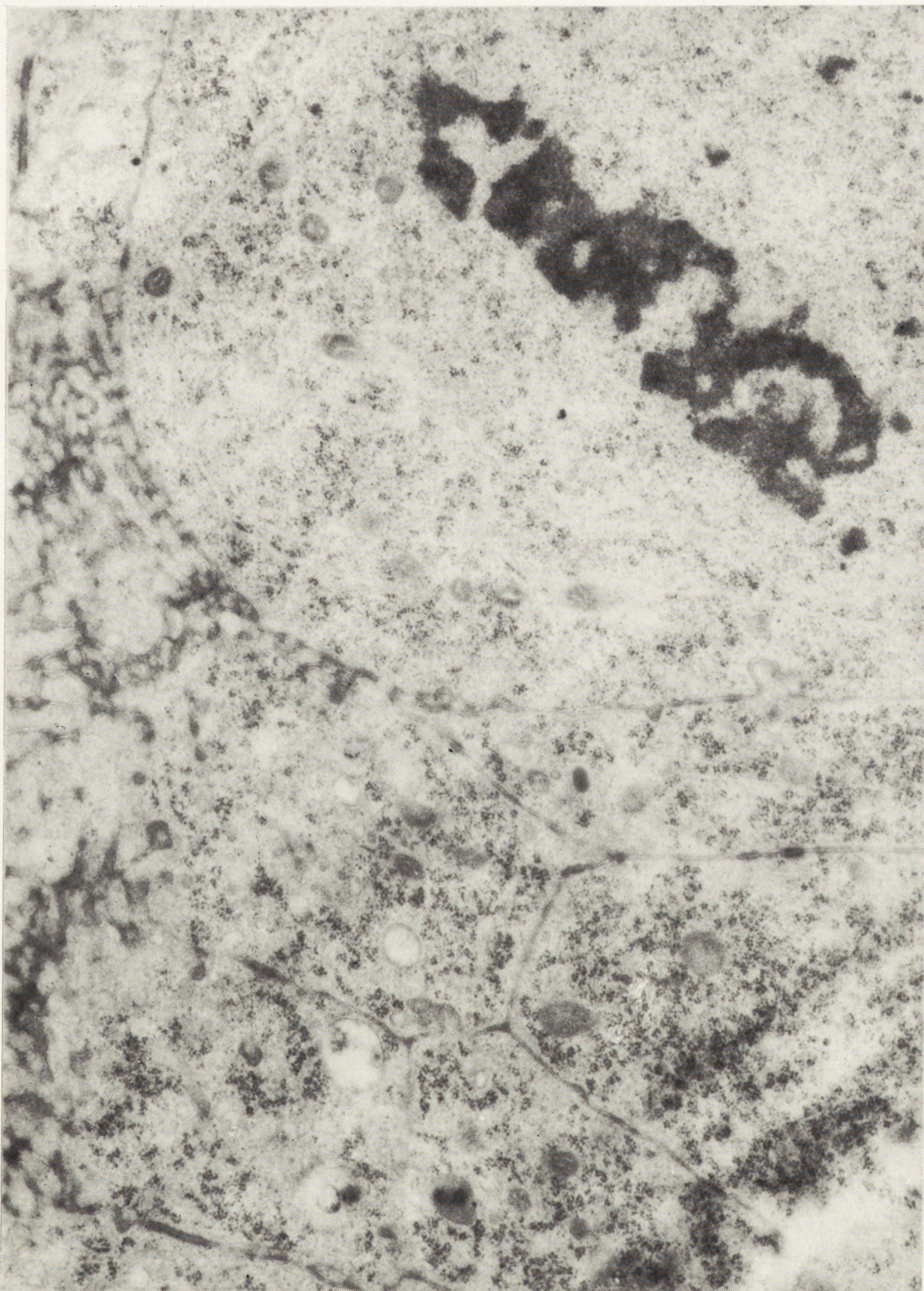
o — oocyt





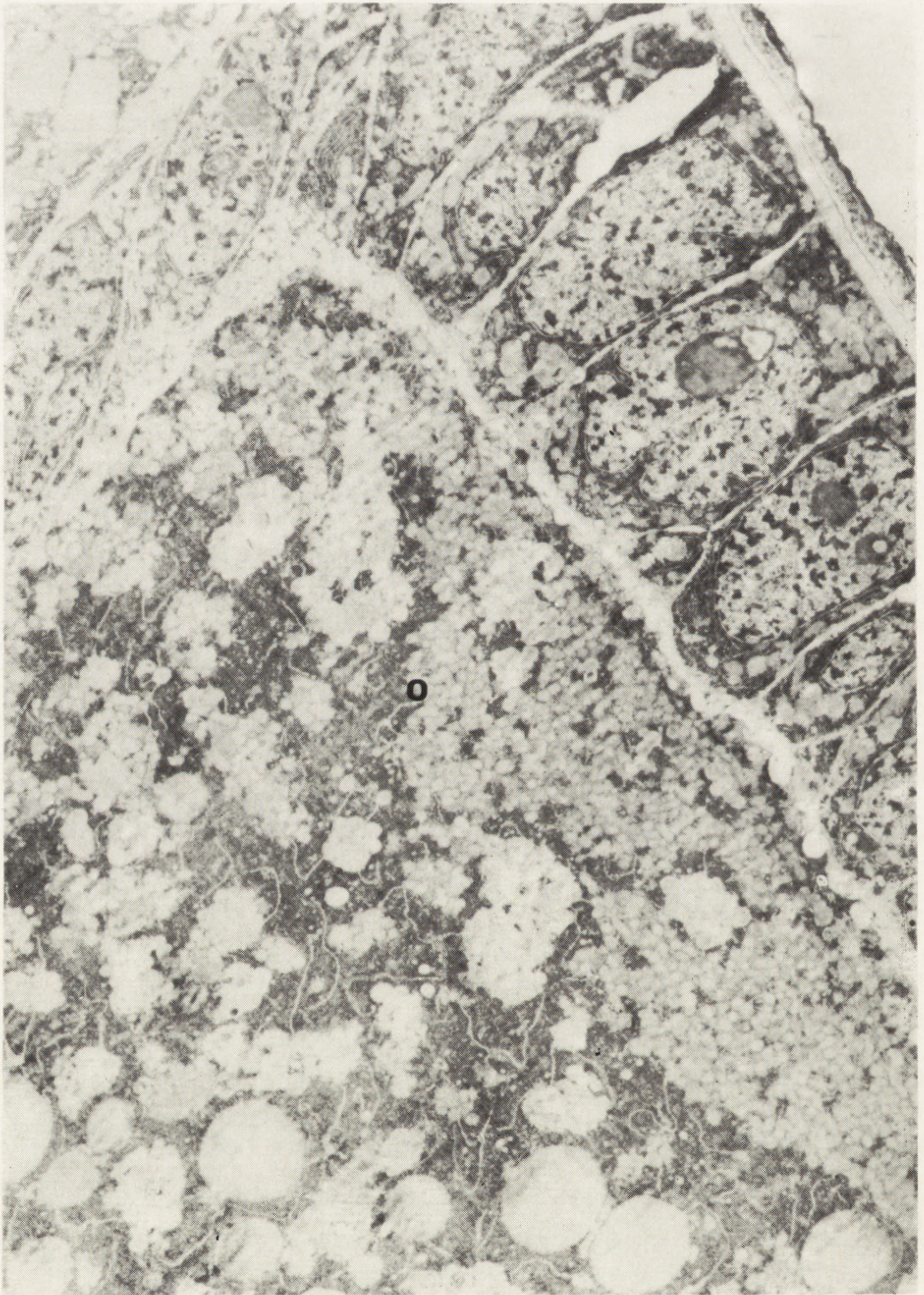
Rys. 13. Fragmenty pęcherzyków jajowych *G. mellonella* z okresu późnej witellogenezy, widoczna gruba warstwa błony żółtkowej poprzecinanej kanalikami  
a —  $\times 3500$ , b — 27 000; o — oocyt, n — nabłonek foliularny





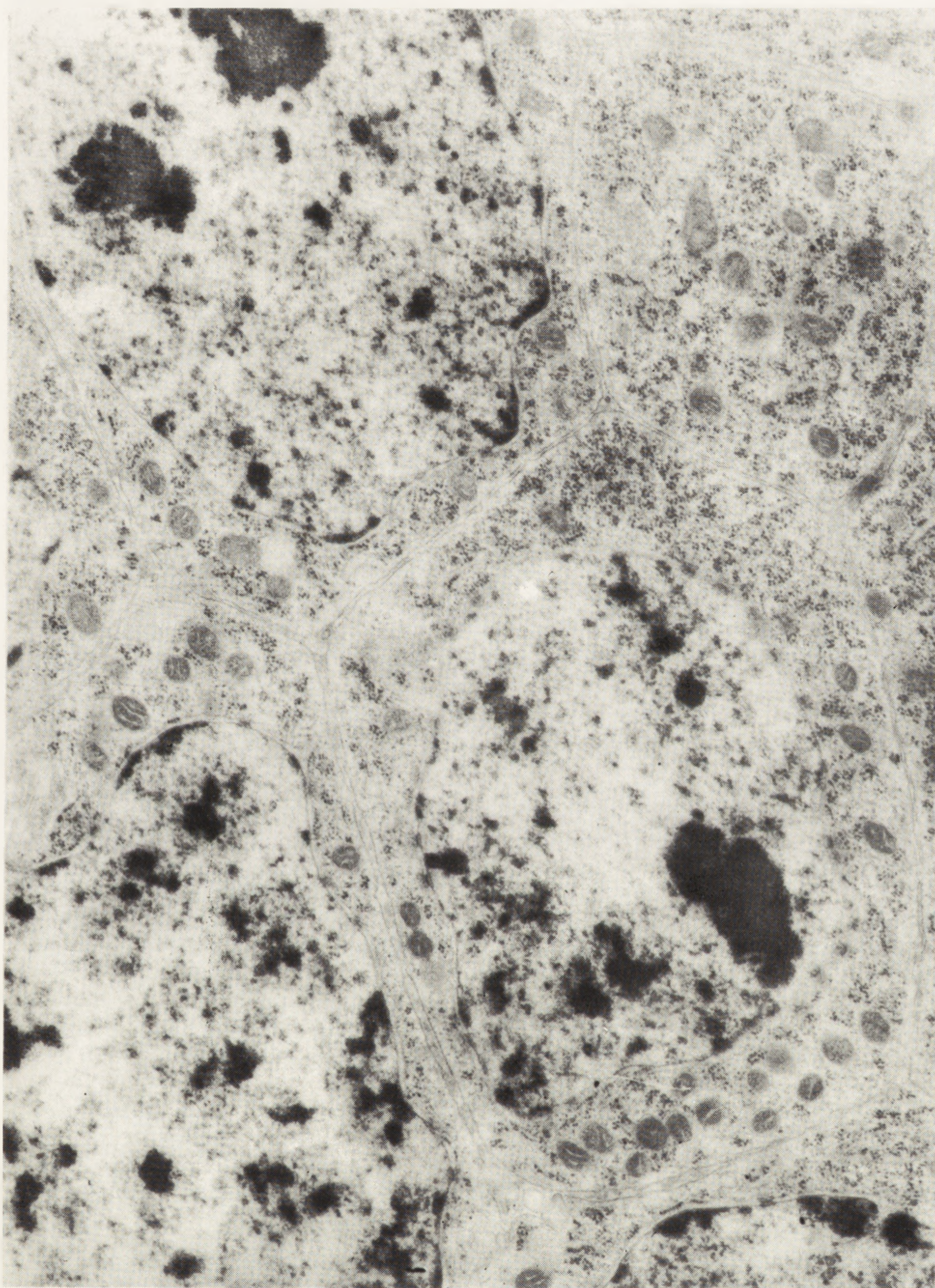
Rys. 14. Komórka nabłonka foliularnego młodego pęcherzyka jajowego *G. mellonella* w stadium metafazy podziału mitotycznego,  $\times 22000$





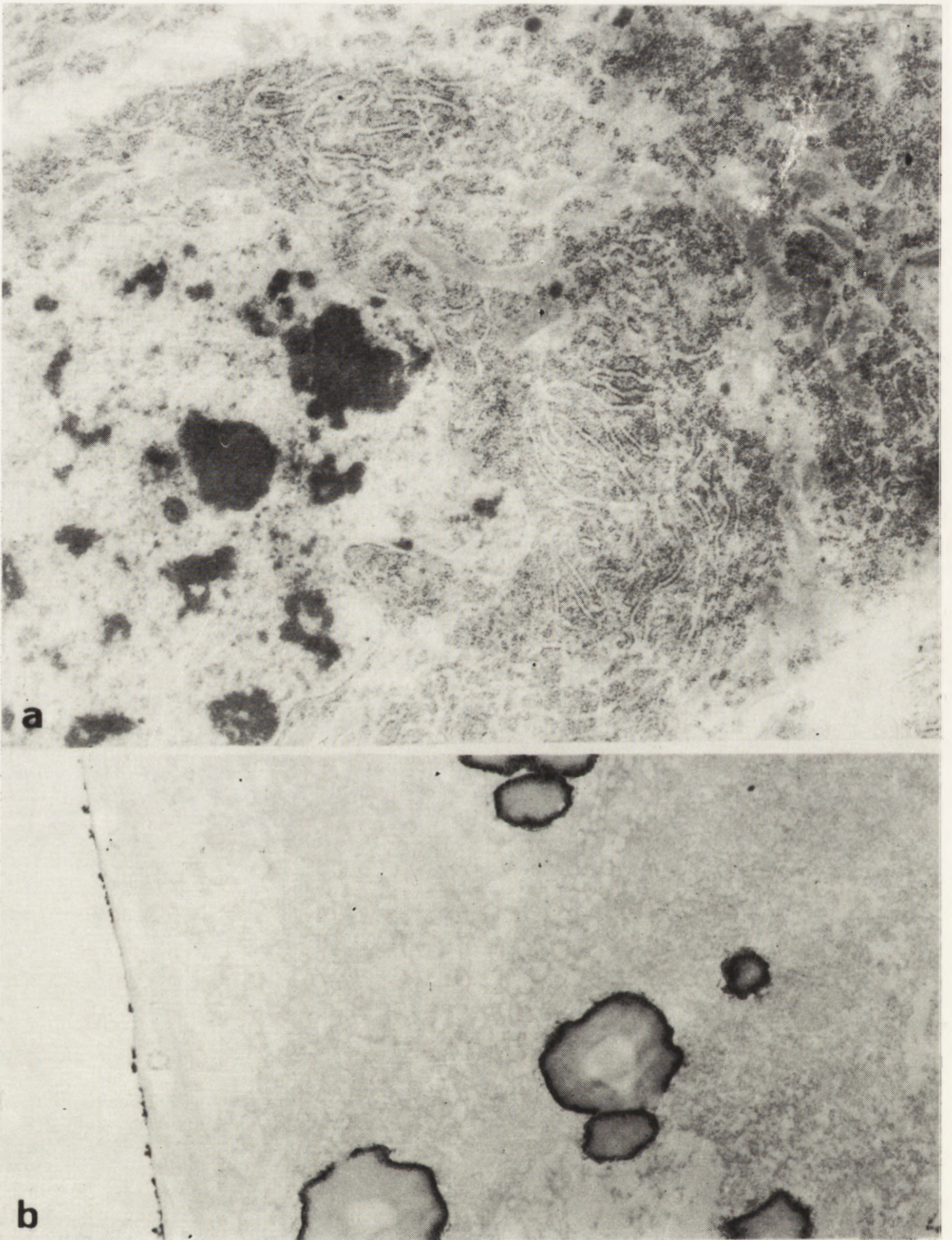
Rys. 15. Fragment pęcherzyka jajowego *G. mellonella* z okresu prewitellogenezy, widoczne ściśle ułożenie komórek nabłonka foliularnego,  $\times 10500$ ; o — oocyt





Rys. 16. Przekrój poprzeczny komórek nabłonka folikularnego pęcherzyka jajowego *G. mellonella* z okresu prewitellogenezy,  $\times 25000$ . Zdjęcie udostępnione przez doc. A. Dutkowskiego

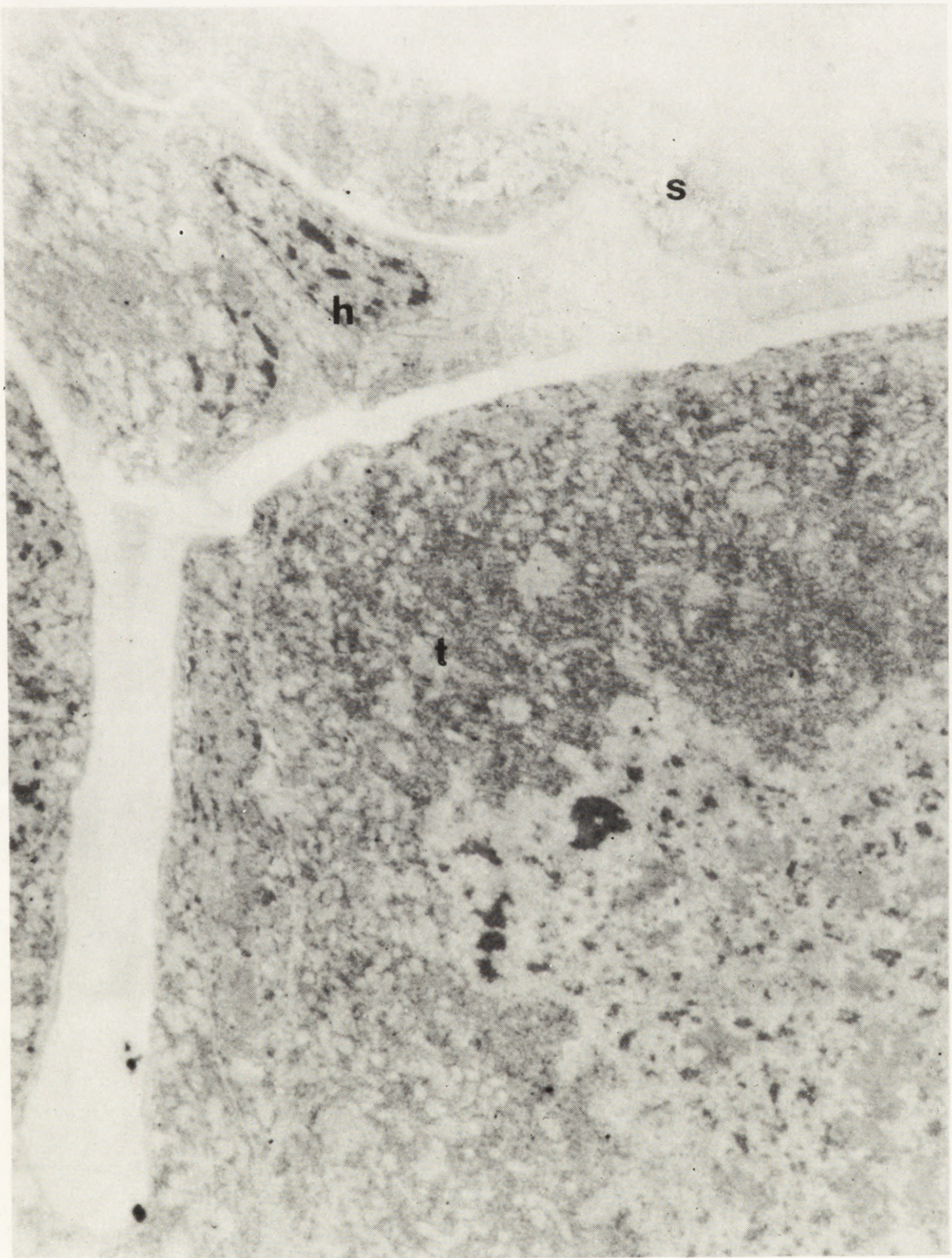




Rys. 17. Komórki nabłonka foliularnego pęcherzyka jajowego *G. mellonella* z okresu witellogenezy

a — widoczne jądro o nieregularnych konturach i dobrze wykształcone endoplazmatyczne retikulum,  $\times 36\ 000$ , zdjęcie udostępnione przez doc. A. Dutkowskiego, b — widoczne w cytoplazmie kule, podobne do kul żółtkowych, zawierające glikoproteidy silnie wykontrastowane dzięki zastosowaniu reakcji Thierry'ego,  $\times 14\ 000$

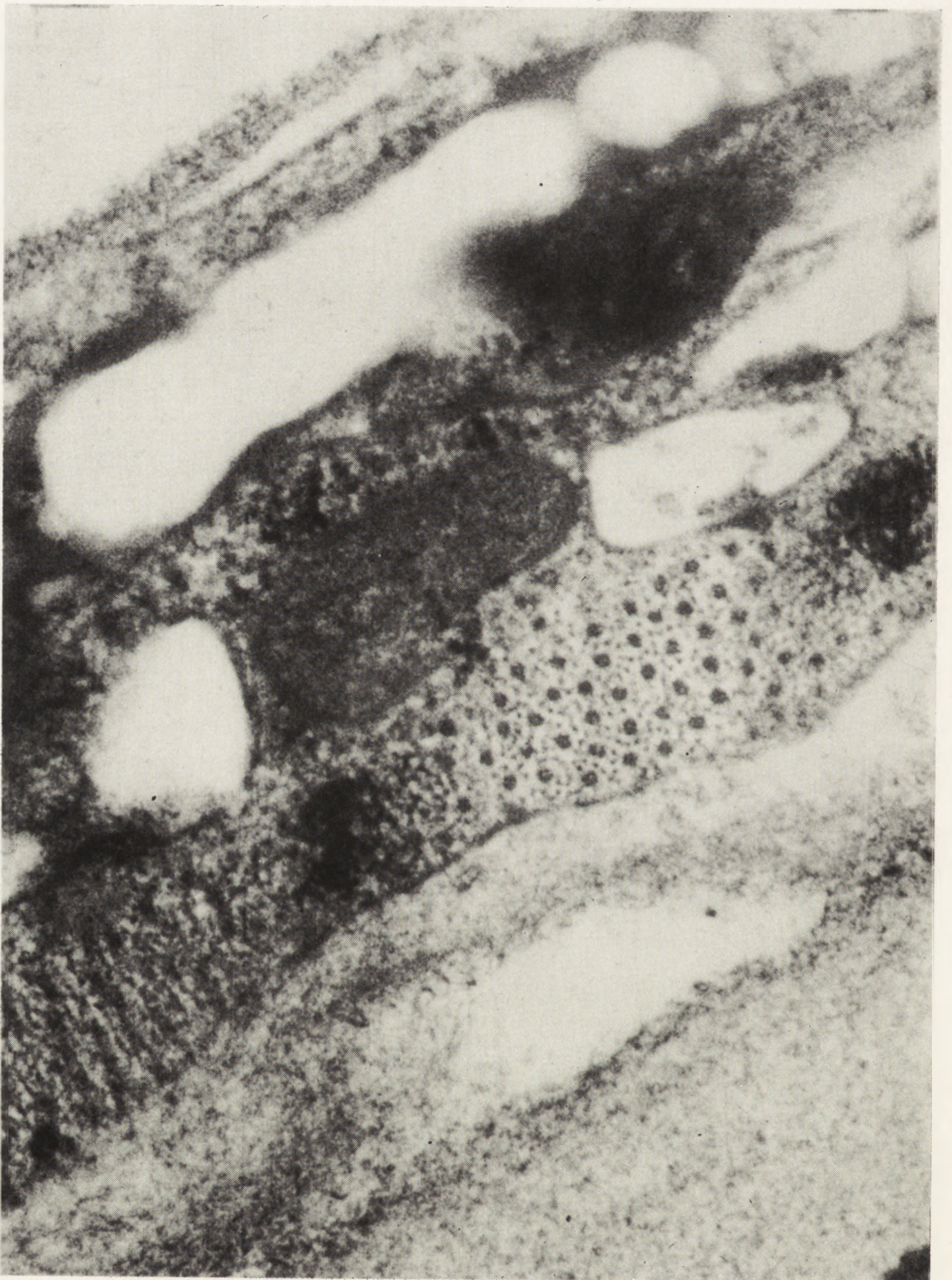




Rys. 18. Fragment owarioli *G. mellonella*, z okresu prewitellogenezy obejmujący połączenie dwóch kolejnych pęcherzyków,  $\times 9000$

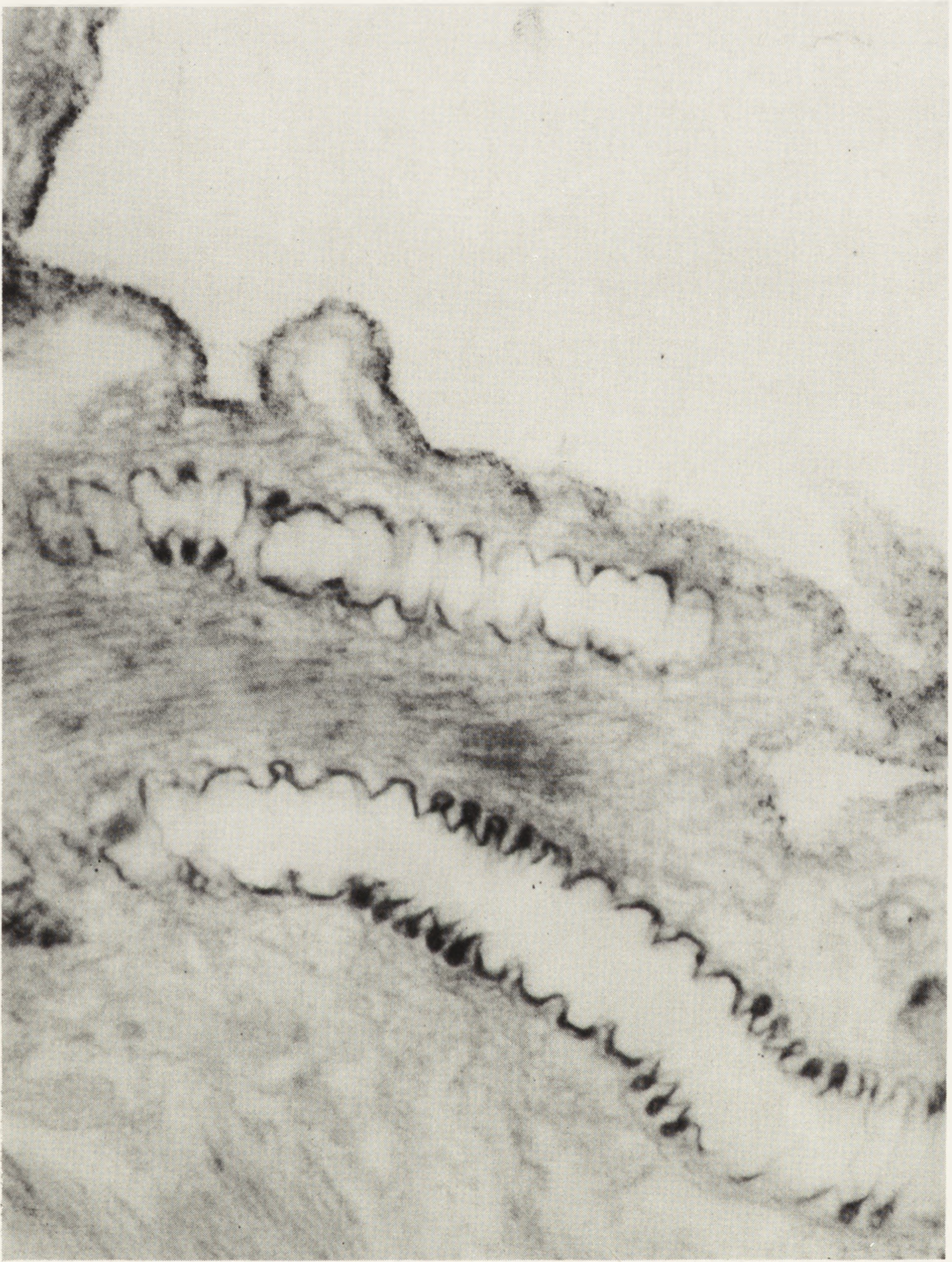
s — ściana owarioli, h — komórki hemolimfy, t — trofocyt





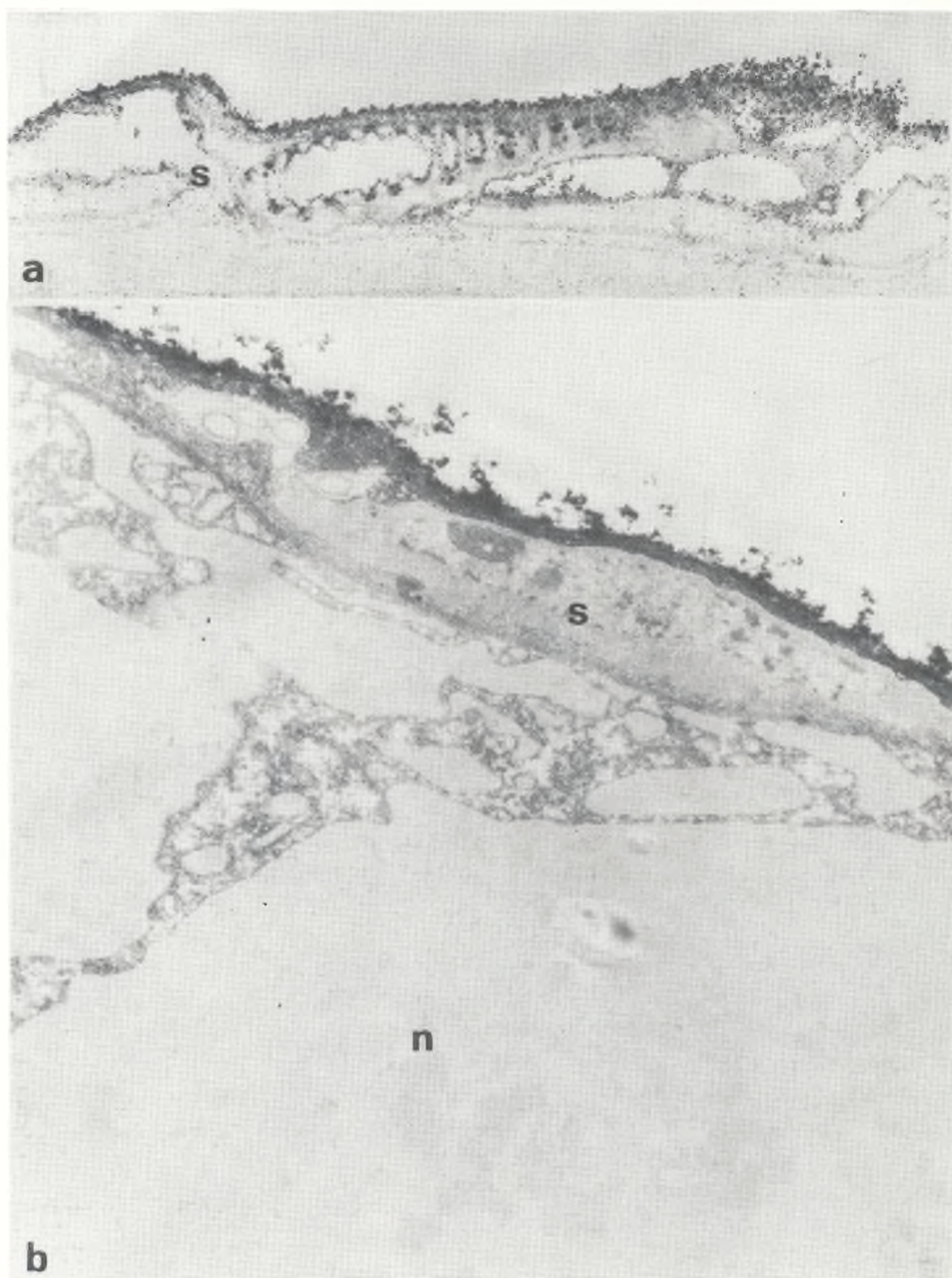
Rys. 19. Ściana owarioli *G. mellonella*, widoczne komórki mioepitelialne oraz liczne przestrzenie międzykomórkowe,  $\times 145000$





Rys. 20. Ściana owarioli *G. mellonella*, widoczne komórki tchawkowe,  $\times$  90000





Rys. 21. Ściana owarioli *G. mellonella* z silnie wykontrastowaną błoną podstawną  
a -- po zastosowaniu reakcji Thierry'ego na glikoproteidy,  $\times 45\,000$ , b -- po zastosowaniu  
barwienia czerwienią rutenową,  $\times 14\,000$ ; s -- ściana owarioli, n -- nabłonek folikularny



## 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:

— od 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 10001, 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

J. STROSZNAJDER, Rola fosfolipidów w procesie przepuszczalności błon . . . . .	1
A. M. KORDOWIAK, Aparat Golgiego. Izolowanie, charakterystyka i funkcja . . . . .	17
J. ROTH, Lectins as structural and molecular probes in biological membrane research, histochemistry and ultrahistochemistry . . . . .	49
A. PRZEŁĘCKA, Oogeneza u <i>Galleria mellonella</i> — badania cytochemiczne i ultrastrukturalne . . . . .	79