

PL ISSN 0324 - 833

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 6 - NR 1  
1979 (1-56)**

# **Postępy Biologii Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>



Kwartalnik

Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydawany z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

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 552 + 116 egz. Ark. wyd. 4,75. Ark. druk. 3,5 + 3/8 wkł. Papier druk. sat. III kl., 80 g,  
70 × 100 cm. Oddano do składania 20 X 1978 r. Podpisano do druku w lutym 1979 r. Druk  
ukończono w lutym 1979 r. Zam. 516/78 — M-17. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## BUDOWA I POWSTAWANIE KRZEMIONKOWYCH PANCERZYKÓW OKRZEMEK

### STRUCTURE AND FORMATION OF DIATOM FRUSTULE

Irena KACZMARSKA

Instytut Botaniki Polskiej Akademii Nauk, Kraków

*Streszczenie.* Młode komórki okrzemek, bezpośrednio po podziale komórkowym lub po wyjściu z auktospory, ale zanim wytworzy się nowy pancerzyk, otoczone są, jak wszystkie inne komórki, plazmolemą. Bardzo szybko jednak, zanim jeszcze komórki potomne oddziela się od siebie, tuż pod plazmolemą, prawdopodobnie głównie dzięki aparatowi Golgiego, powstaje specjalna wakuola odkładająca kwas krzemowy, niemal chemicznie czysty. Po wytworzeniu pancerzyka, leżąca pod nim plazmolema i część silikolemy złączają się lub (ulegając dekompozycji) stają się m. in. materiałem budującym otoczkę. Natomiast wewnętrzna część silikolemy przejmuje funkcje plazmolemy. Pancerzyk powstaje wewnątrzkomórkowo, nie jest więc produktem jej sekrecji, tak jak ściana komórkowa roślin wyższych, pomimo iż u dorosłych osobników leży ona poza protoplastem.

Krzem okazał się elementem odżywczym niezbędnym dla normalnego przebiegu cyklu życiowego komórki okrzemki. Jego brak w środowisku życia powoduje szybkie i swoiste zmiany procesów metabolicznych. Zahamowane zostają syntezy białek, DNA, karotenoidów i chlorofilu. Jedynie synteza tłuszczów może mieć miejsce w takich warunkach.

*Summary.* Juvenile diatom cells, just after mitosis or leaving the auxospore, are covered by plasma membrane before the formation of a new hypotheca. Very soon, however, close to the plasmalemma, separate vesicles — probably of Golgi apparatus origin — a silica deposited vacuole is formed, delimited by the silica-lemma. Inside this vacuole, characteristic of each diatom taxon, a silica frustule is deposited. The frustule consists of silicon acid with a high degree of chemical purity. When the frustule is fully formed, the plasmalemma and external silica-lemma are sloughed off or decompose, depending on the species of diatom. This decomposed part of the cell and in some diatoms other secondary added elements, as well, form a skin. Internal silicalemma change their silicon depositing function to that of the plasmalemma.

In a normal diatom cell cycle silicon acid plays an important role. When an environment lacks silicon cell growth is impossible and nearly all of the most important biochemical syntheses, with the exception of that of lipids, are inhibited.



## ŚCIANA KOMÓRKOWA OKRZEMEK

Ściana komórkowa glonów ma budowę z reguły znacznie bardziej zróżnicowaną niż jej odpowiednik w komórkach roślin wyższych. Niewątpliwie jednym z jej najciekawszych przypadków jest ściana komórkowa okrzemek. Możemy u nich wyróżnić dwa lub trzy typy ściany komórkowej, w zależności od zastosowanej definicji. Pierwszy znany jest u niemal wszystkich wegetatywnych komórek okrzemek i przede wszystkim o tym typie ściany komórkowej będzie mowa w niniejszym artykule. Drugi stanowi ściana komórkowa zygoty. Trzecią strukturą, którą można identyfikować ze ścianą komórkową, jest ściana perizonium. Powstaje ono u gatunków z podgromady *Pennatae* w czasie formowania auksospor [45].

Wyniki intensywne badań, jakie notujemy w ciągu ostatnich lat [8–11, 47, 48], wskazują na to, że ściana komórkowa okrzemek ma wiele specyficznych właściwości, które zdecydowanie odróżniają ją od ścian komórkowych innych roślin. Spełnia ona m. in. taką samą funkcję jak u roślin wyższych, powstaje jednak w zupełnie odmienny sposób.

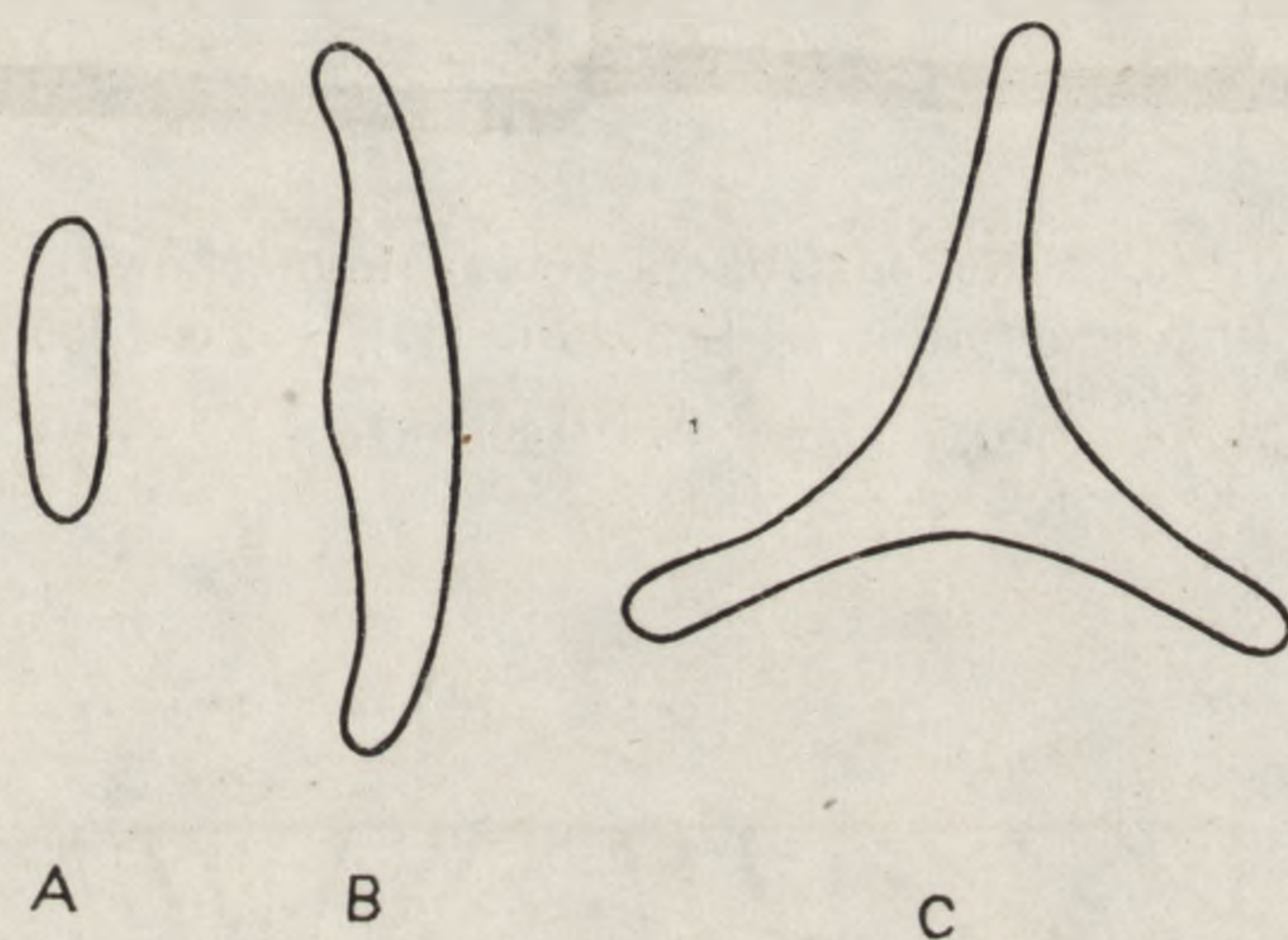
Pancerzyki okrzemek złożone są zawsze z dwóch elementów, z wieczka i denka, które u różnych gatunków są bardzo zróżnicowane tak pod względem kształtu, jak i ornamentacji. Podobny do pudełeczka pancerzyk okrzemki macierzystej zostaje w wyniku podziału komórki tak rozdzielony pomiędzy komórki potomne, że każda z nich dobudowuje sobie na nagiej części protoplastu zawsze mniejszą (tylko niekiedy taką samą) część pancerzyka, tj. denko. Jak to zaobserwowali Reimann i wsp. [36], nowe denko może być całkowicie utworzone już w ciągu 10–20 min. Jest to więc bardzo krótki okres w cyklu życiowym komórki okrzemki, nawet dla tych o bardzo krótkim czasie generacji jakimi są np. *Chaetoceros gracilis* (czas generacji 4,4 godz.) czy *Cyclotella cryptica* (czas generacji 5 godz.). Po oddzieleniu się komórek potomnych, opatrzonych nowymi denkami, energię życiową zużytkowuje komórka na zwiększenie organicznej syntezy i przygotowania do nowego podziału.

Pancerzyk okrzemek jest traktowany jako część ściany komórkowej, która składa się z dwóch warstw: organicznej i nieorganicznej. Warstwą nieorganiczną jest krzemionkowy pancerzyk, którego cechy fizyczne i chemiczne zostaną omówione w dalszym ciągu artykułu. Warstwę organiczną, która może otaczać pancerzyk zewsząd, ale też tylko od wewnątrz, tworzy kompleks cukrów, lipidów, aminokwasów i kwasu uronowego [10]. Spośród aminokwasów najwięcej jest seryny, treoniny i glicyny [14]. Skład cukrów natomiast zależy od gatunku okrzemki. Nieorganiczna i organiczna warstwa ściany komórkowej nie przenikają



się wzajemnie, chociaż warstwa organiczna niekiedy bardzo ściśle przylega do pancerzyka. Można je jednak oddzielić od siebie usuwając poprzez wytrząsanie protoplast, a następnie wytrawienie krzemionki kwasem fluorowodorowym [36].

Od takiego schematu budowy ściany komórkowej okrzemek znane są jednak odstępstwa [37]. Poza jedynym całkowicie bezpancerzykowym gatunkiem z rodzaju *Licmophora*, np. *Phaeodactylum tricornutum* jest formą niemal całkowicie pozbawioną pancerzyka. Okrzemka ta może w zależności od stopnia zasolenia środowiska tworzyć dwa fenotypy (ryc. 1): wrzecionowaty (niekiedy także trójpromienisty), który nie wy-



Ryc. 1. Fenotypy *Phaeodactylum tricornutum*  
A — owalny, B — wrzecionowaty, C — trójpromienisty

twarza pancerzyka, oraz owalny, wytwarzający bardzo delikatny i pozbawiony ornamentacji pancerzyk. Cała komórka mieści się jednak w jednej okrywie, a więc w połowie pancerzyka. Część organiczna ściany komórkowej składa się z trzech warstw (ryc. 2). Warstwa wewnętrzna (A) przylega do plazmolemy, jest cienka (3 nm grubości) i ciemna na fotografiach z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Warstwa środkowa (B), która jest stosunkowo najgrubsza (4–6 nm grubości) i jasna; tu też u owalnych form tego gatunku odkładany jest pancerzyk. Warstwa zewnętrzna (C), odgraniczająca komórkę od środowiska zewnętrznego, jest znowu cienka, ciemna i ma pofałdowaną powierzchnię. Fałdy te (7 nm wysokie i oddalone o 10 nm od siebie) grupują się po 2–5, a grupy takie rozrzucone w różnych kierunkach układają się względem siebie pod kątami: 40, 60 i 80 stopni (ryc. 3).

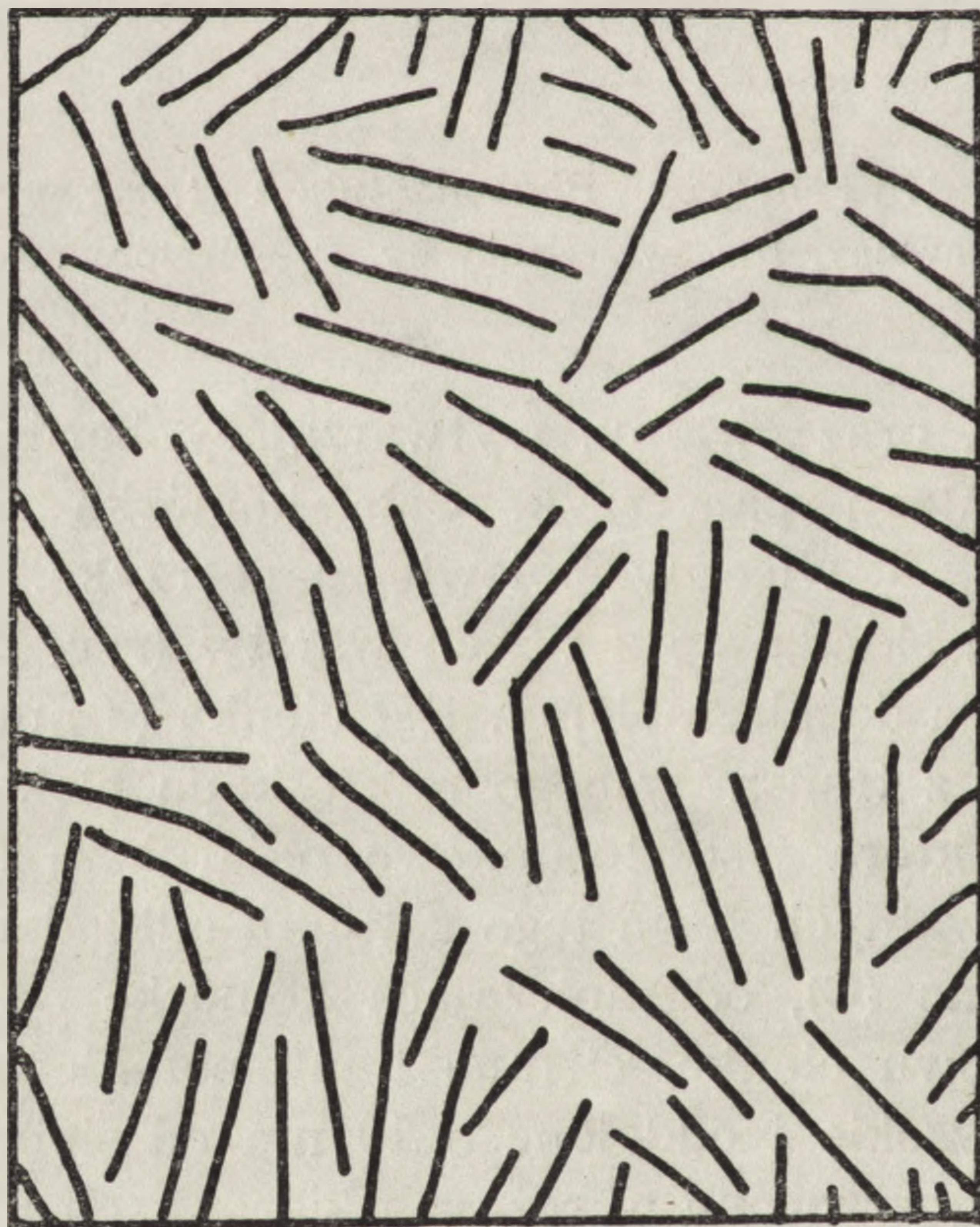
U wszystkich innych dotychczas zbadanych okrzemek warstwa organiczna jest zwykle cienka i nie zróżnicowana.





Ryc. 2. Rekonstrukcja ściany komórkowej  
*Phaeodactylum tricornutum* [37],  $\times 2\,000\,000$

A — warstwa wewnętrzna, B — warstwa środkowa, C — warstwa zewnętrzna



Ryc. 3. Fragment zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej  
*Phaeodactylum tricornutum* wybarwionej w kwasie wolframowo-fosforanowym  
(PTA) [37],  $\times 500\,000$



## FORMOWANIE PANCERZYKA

Najczęstszymi obiektami szczegółowych badań nad sposobem formowania się typowego pancerzyka są: *Amphipleura pellucida* [43], *Cylindrotheca fusiformis* [35], *Gomphonema parvulum* [11,12], *Navicula pellucida* [8, 36] i *Nitzschia alba* [22]. Zaobserwowano, że proces ten przebiega dość podobnie u wszystkich tych gatunków okrzemek. Nowy pancerzyk lub tylko nowa okrywa może powstać w zasadzie jedynie przy świeżo powstałej lub w inny sposób odsłoniętej plazmolemie. Może to mieć miejsce po wyjściu protoplastu z auksospori, po podziale komórkowym lub po plazmolizie [21]. Formowanie nowej okrywy rozpoczyna się jeszcze przed całkowitym oddzieleniem się komórek potomnych. Schemat obrazujący ten proces u *Gomphonema parvulum* przedstawia ryc. 4. Pojawia się wtedy najczęściej wzdłuż podłużnej osi komórki wakuola szybko powiększająca się, a jednocześnie w jej wnętrzu obserwuje się ciemne plamy. Oznacza to, że depozycja krzemu rozpoczęła się (spolikondensowany kwas krzemowy jest elektronowo gęsty, stąd na fotografiach z mikroskopu elektronowego transmisyjnego struktury krzemionkowe są czarne). Wakuola ta, nazwana wakuolą odkładającą krzem, powstaje z mniejszych pęcherzyków, układających się zawsze bardzo blisko plazmolemy, niejako przyciśniętych do niej, a następnie zlewających się. Trójwarstwową błonę tej wakuoli nazwano silikolemą [36]. Silikolema każdej wakuoli odkładającej krzem zawsze ściśle przylega do nowo tworzonego denka lub innego elementu pancerzyka, tak że przy uzyskiwanych obecnie zdolnościach rozdzielczych transmisyjnych mikroskopów elektronowych nie można zaobserwować jakiegokolwiek wolnej przestrzeni między nimi. Poszczególne elementy pancerzyka, np. tarczka, pasy obwodowe, tworzone są przez jedną oddzielną wakuolę. U *Navicula pelliculosa* obserwowano w bardzo wczesnych stadiach formowania pancerzyka, że silikolema przylega bardzo ściśle i nawet wpukła się w miejscach, gdzie powstaną następnie prążki poprzeczne. Nie stwierdzono jednak u zbadanych dotychczas okrzemek by wakuola odkładająca krzem przybierała dokładny kształt tworzonej następnie krzemionkowej struktury, tak jak to ma miejsce w czasie tworzenia łusek *Synura* (*Chrysophyceae*).

Wydaje się także, że nie ma morfologicznych różnic między tymi rejonami silikolemy, które w danej chwili odkładają krzem i rejonami nieaktywnymi.

Także u gąbki *Spongilla lacustris* [40] stwierdzono taką błonę (silikolema), w której obrębie odkłada się i zestala kwas krzemowy.

Decydującą rolę w produkowaniu zlewających się pęcherzyków i w konsekwencji wakuoli odkładającej krzem oraz silikolemy w komór-



kach okrzemek odgrywa aparat Golgiego [11] (na fotografiach z mikroskopu elektronowego znajdujący jest zawsze w pobliżu miejsca powstania wakuoli odkładającej krzem). Krzem ujawnia się jednak dopiero w obrębie wakuoli odkładającej krzem. Pęcherzyki produkowane przez aparat Golgiego, poza wspomnianą, spełniają prawdopodobnie jeszcze inne funkcje. Przypuszcza się [11], że przenoszą one także do miejsca powstawania wakuoli odkładającej krzem i nowej okrywy materiały do ich budowy; najprawdopodobniej nie tylko kwas krzemowy, ale także polisacharydy. Związek aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej z wytwarzaniem i przenoszeniem materiałów budujących wakuole odkładającą krzem prezentują na przykładzie komórek *Gomphonema parvulum* fotografie obrazujące wszystkie te struktury zawsze blisko siebie [11].

Bardziej krytycznie do udziału aparatu Golgiego w formowaniu wakuoli odkładającej krzem ustosunkowują się inni badacze [7] na przykładzie *Navicula pelliculosa*. Obserwowali oni, że pęcherzyk inicjujący wakuole odkładającą krzem jest znacznie mniejszy niż pęcherzyki produkowane przez aparat Golgiego. Skłonni są oni przyjąć, że w tym przypadku ma miejsce kompleksowe oddziaływanie wielu organelli komórkowych (aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna i/lub mikrotubule). Nawet udział plazmolemy, tak jak ma to miejsce w przypadku gąbek, nie powinien być wykluczany.

U wszystkich dotychczas badanych okrzemek, np. *Gomphonema parvulum*, *Navicula pelliculosa*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Amphipleura pellucida*, *Nitzschia alba*, kwas krzemowy najwcześniej zaczyna polikondensować (termin „polimeryzacja” zastrzega się [52] dla reakcji, gdzie  $H_2O$  jest jej produktem) w okolicy szczeliny nowej okrywy, po czym stopniowo postępuje ku brzegom pancerzyka, np. *Navicula pelliculosa*. W okolicy szczeliny pancerzyk jest zwykle potem najgrubszy. W następnej kolejności, np. u *Gomphonema parvulum*, zakłada się peryferyczna część okrywy, tzw. płaszcz, a rejon wakuoli odkładającej krzem między szczeliną a płaszczem wypełnia się kwasem krzemowym na końcu. Inne elementy pancerzyka, jak pas obwodowy, np. u *Amphipleura pellucida* i *Gomphonema parvulum* [13, 14], czy przegródki z komorami u *Mastogloia grevillei* [42], powstają dopiero wtedy, gdy okrywa jest już kompletnie uformowana. Ale nawet wtedy jeszcze, np. u *Gomphonema parvulum*, można zauważyć cytoplazmatyczne połączenie między protoplastami komórek potomnych. Jest to most cytoplazmatyczny przechodzący przez szczeliny obu komórek potomnych i wypełniający je (ryc. 4 D,E). U *Navicula pelliculosa* ponadto obserwowano [7] takie połączenie poprzez pory prążków poprzecznych.

Gdy pancerzyk jest już całkowicie wykształcony, bezpośrednio pod nim pojawia się, w sposób jeszcze nie całkiem jasny, nowa plazmolema.



Stoermer i wsp. [43], a potem i inni [11, 36], sugerowali, że powstaje ona z wewnętrznej (dokomórkowej) części silikolemy. Związane by to było oczywiście z poważnymi zmianami funkcjonalnymi. Z błony, której rola ograniczona była do odkładania kwasu krzemowego, silikolema miałaby przejąć znacznie bardziej złożone funkcje, jakie spełnia błona komórkowa.

Pozostałe na zewnątrz nowo wytworzonego pancerzyka błony organiczne (zewnątrzna część silikolemy i plazmolema) spotkać może dwojaki los. Mogą one zostać odrzucone (złuszczone), tak jak np. u *Gomphonema parvulum* i *Amphipleura pellucida*. Wtedy najbardziej zewnętrzną częścią komórki staje się pancerzyk. Komórki potomne w ten sposób oddzielają się od siebie i każda z nich rozpoczyna samodzielny żywot. Inaczej proces ten przebiega u *Navicula pelliculosa* i *Cylindrotheca fusiformis*, gdzie błony te pozostają na zewnątrz pancerzyka i wraz z innymi później dodanymi elementami tworzą dookoła pancerzyka nie zróżnicowaną organiczną otoczkę (skin).

Otoczka taka może, z obserwowanym u niektórych gatunków cytoplazmatycznym połączeniem poprzez szczeliny, pomagać w tworzeniu się i utrzymywaniu kolonii, szczególnie u tych okrzemek, których okrywy nie posiadają wyrostków łączących komórki w kolonie (haczyki, guzkowate wyrostki — ryc. 6 A). Może także spełniać i inną funkcję. Niektórzy sądzą [36], że chronić ona może komórkę przed rozpuszczeniem krzemionki pancerzyka. Proces taki w mniejszym lub większym stopniu ma miejsce dopiero po śmierci komórki, chociaż jest on stosunkowo bardzo powolny w porównaniu do mineralizacji organicznych związków azotowych czy fosforowych. Brakuje jednak niestety eksperymentalnych badań, które porównałyby te dwie na razie hipotetyczne funkcje otoczki u gatunków z otoczką oraz pozbawionych jej.

#### CHEMICZNE I FIZYCZNE WŁAŚCIWOŚCI PANCERZYKÓW

Pancerzyk zbudowany jest przede wszystkim z krzemu — jednego z najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie pierwiastków. Związki krzemu stanowią 26,4% masy ziemi, a wraz z tlenem — 49,4% jej masy. Dane te wskazują, że wiązanie Si—O jest najbardziej pospolitym wiązaniem chemicznym w skorupie ziemskiej.

Spśród 25 pierwiastków, koniecznych dla życia znanych organizmów, krzem zajmuje specjalną pozycję ze względu na jego położenie w układzie okresowym, a mianowicie w grupie węglowodanów. Jednak właściwości tego pierwiastka niosą znacznie bardziej interesujące różnice niż podobieństwa. Wyrażają się one m. in. w sile wiązań między krzemem i węglem a kilkoma innymi pierwiastkami ( $C-H > SiH$  — wiązanie bardziej trwałe;



C-O < SiO — wiązanie mniej trwałe; C-C Si-Si) oraz fizykochemicznymi właściwościami ich tlenków (CO<sub>2</sub> — gaz; SiO<sub>2</sub> — ciało stałe).

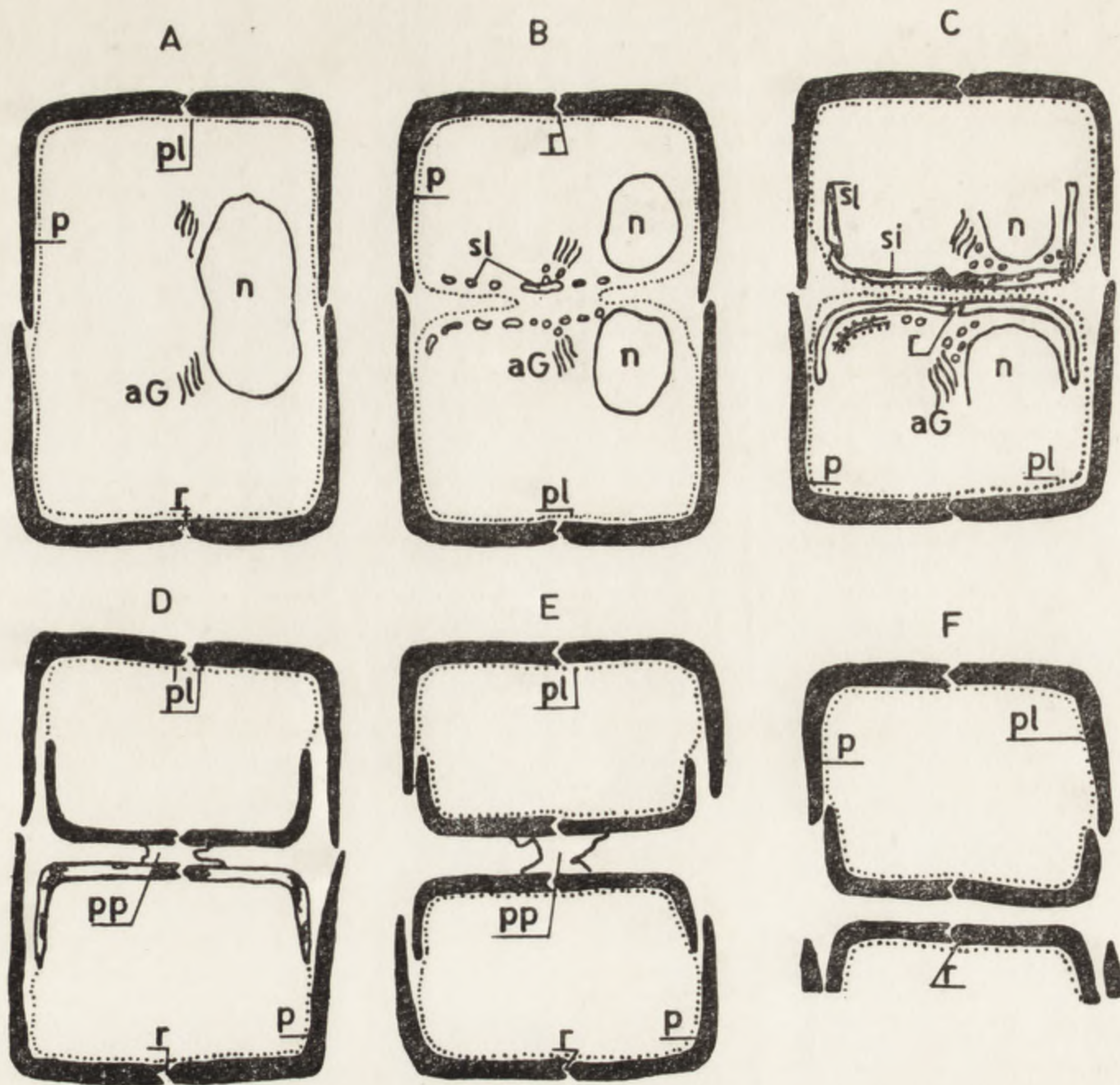
W organizmach większości roślin i zwierząt krzem występuje stosunkowo rzadko i zazwyczaj w niewielkich ilościach. Niemniej jednak w historii Ziemi znane są okresy masowego rozwoju organizmów odkładających w swoim ciele związki krzemu; uważa się, że wszystkie powstałe po refejku (najwyższy proterozoik) osady krzemionkowe są pochodzenia organicznego [46]. Do tej pory, spośród znanych glonów krzemionkę wykryto u przedstawicieli *Bacillariophyceae*, *Silicoflagellatae* i niektórych *Chrysophyceae*, *Chlorophyta*, *Phaeophyta*, *Xantophyceae*.

Postać, mechanizm pobierania i odkładania krzemu w komórce oraz rolę, jaką w niej spełnia, były najczęściej dotychczas badane i są najlepiej poznane u okrzemek i złotowiciowców (*Chrysophyceae*), a spośród zwierząt — u gąbek.

Struktury krzemionkowe okrzemek — podobnie zresztą jak gąbek i roślin wyższych — zbudowane są z amorficznego, spolikondensowanego i uwodnionego kwasu krzemowego, który występuje tutaj niemal w chemicznie czystej formie. Pancerzyki niektórych okrzemek morskich zawierają ponadto inne związki, głównie tlenki glinu, żelaza i magnezu w ilości nie większej niż 2%. Mogą one z kwasem krzemowym być związane strukturalnie lub jedynie zaadsorbować się na jego powierzchni. Stopień uwodnienia kwasu krzemowego w pancerzykach różnych gatunków okrzemek może być rozmaity, np. pancerzyk słodkowodnej okrzemki *Navicula pelliculosa* zawiera 9,6% wody, a okrzemki morskiej *Biddulphia sinensis* — tylko 1,9%. Stopień uwodnienia kwasu krzemowego może być różny w pancerzykach nawet tego samego gatunku w zależności od szybkości podziału komórki. Im szybciej komórka dzieli się, tym bardziej uwodniony jest jej pancerzyk [19, 20, 26]. Ciężar właściwy pancerzyków też nie jest wielkością stałą dla wszystkich okrzemek; u form współczesnych wynosi np. 2,07, podczas gdy u kopalnych — tylko 2,00. Właściwość ta wiązana jest ze zmianą części amorficznej (najbardziej podobnej do opalu, tj. koloidalnej krzemionki) struktury krzemionki pancerzyka w strukturę krystaliczną (kwarc) w miarę upływu czasu.

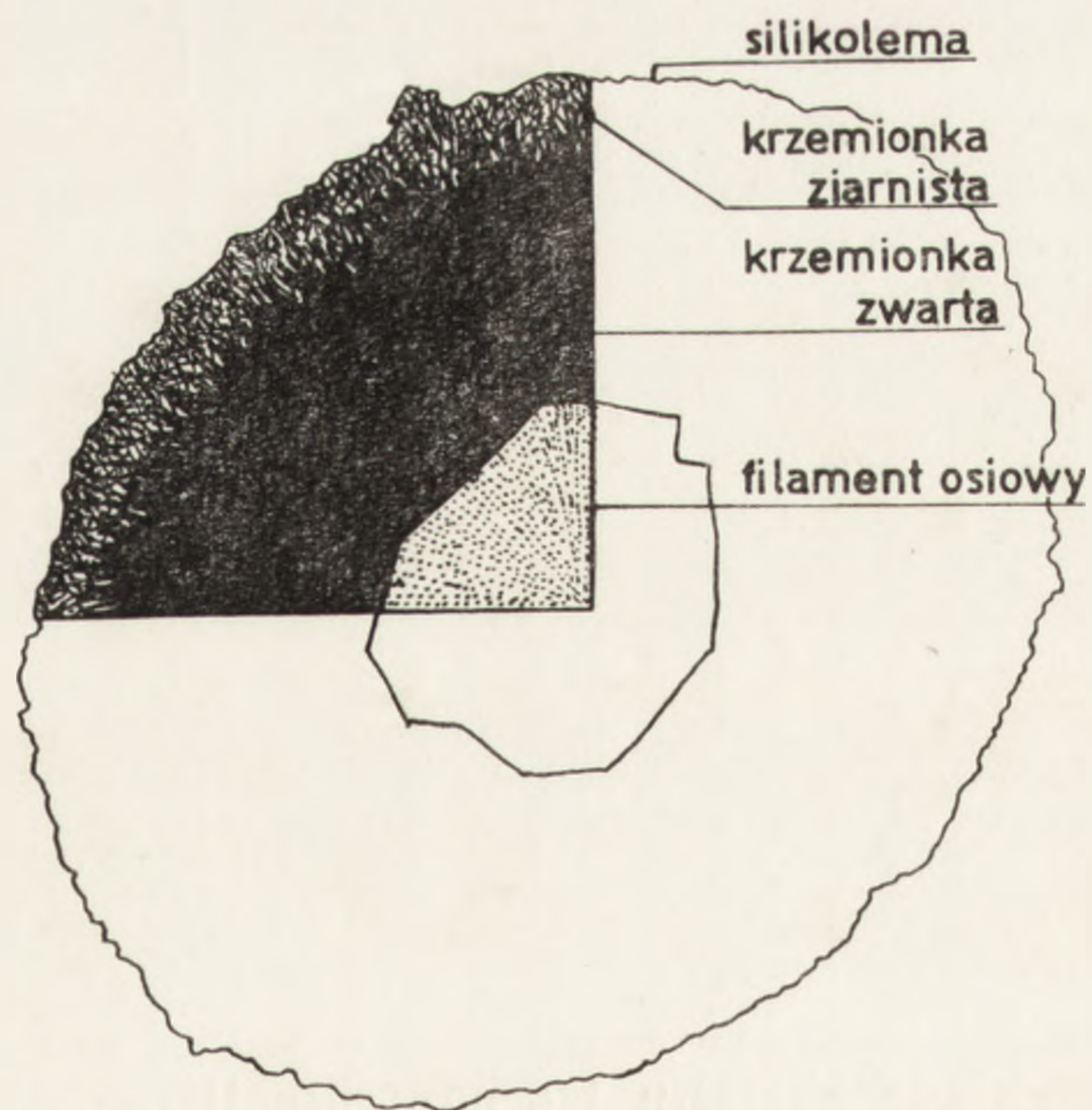
Obserwacje fizycznej struktury litej części pancerzyka w mikroskopie elektronowym ujawniły jednolitą piankowatą budowę krzemionki. Taka struktura powstać mogła, gdy w chwili polikondensacji kwas krzemowy występował w postaci żelu [15]. Średnica tych sferycznych (piankowatych) elementów budujących skonsolidowany żel krzemowy wynosi, jak obliczono, 22 nm [27]. Budowa krzemionkowych igieł gąbki *Spongilla lacustris* [40] nie jest, w przeciwieństwie do okrzemek, tak jednolita. W obrębie igły (ryc. 5) zaobserwowano morfologiczne zróżnicowanie krzemionki. Warstwa wewnętrzna igły, starsza, otaczająca filament osiowy jest





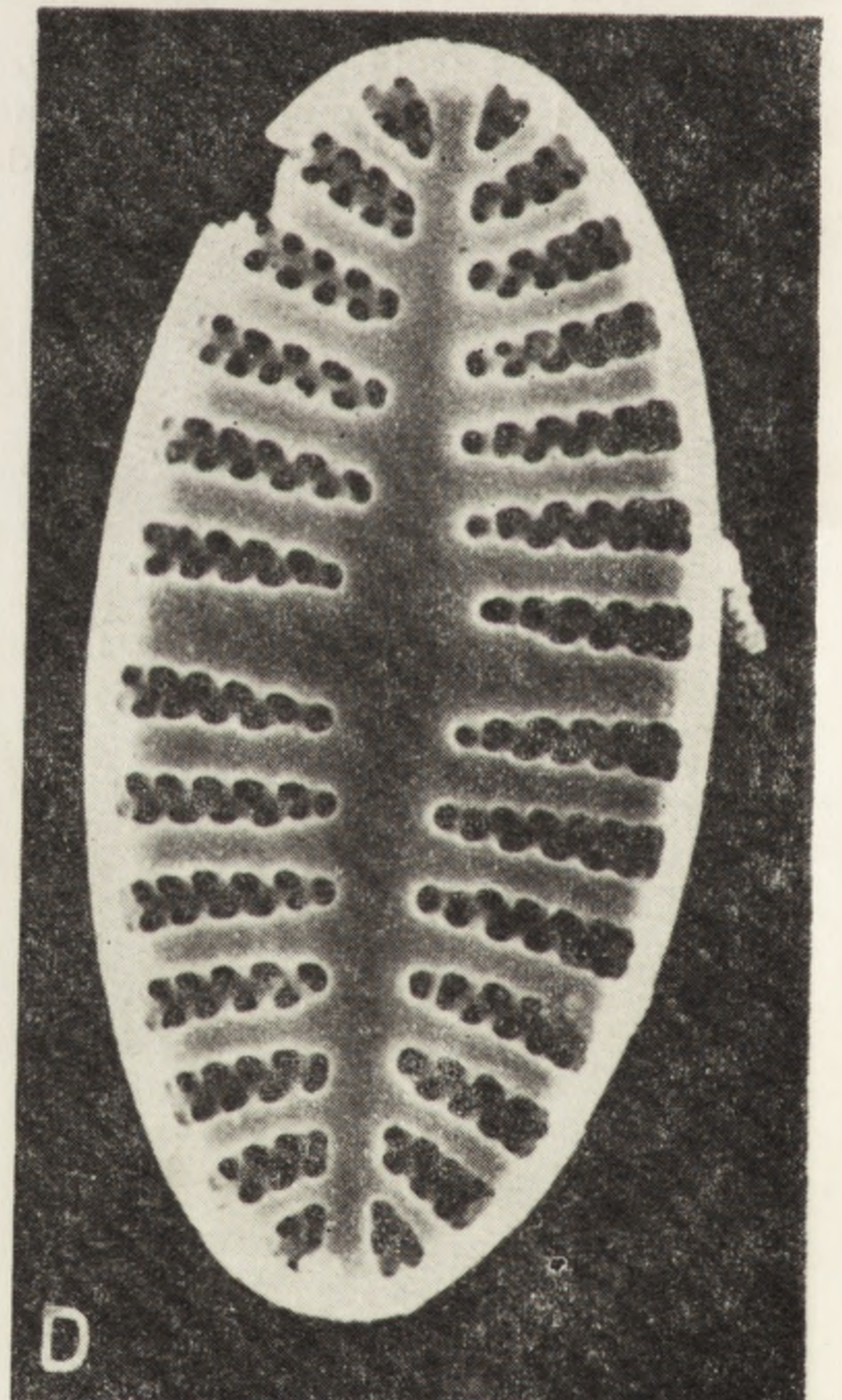
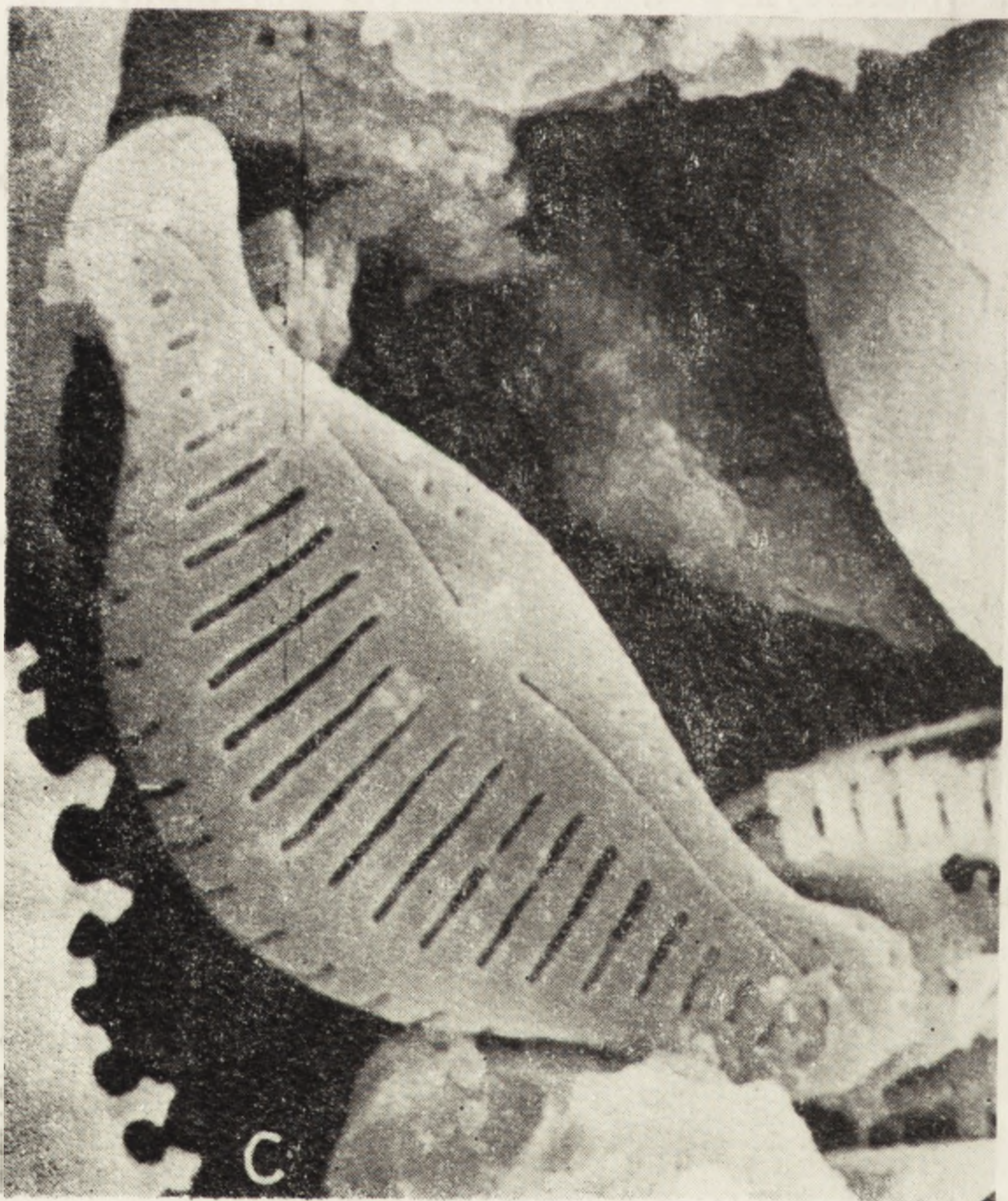
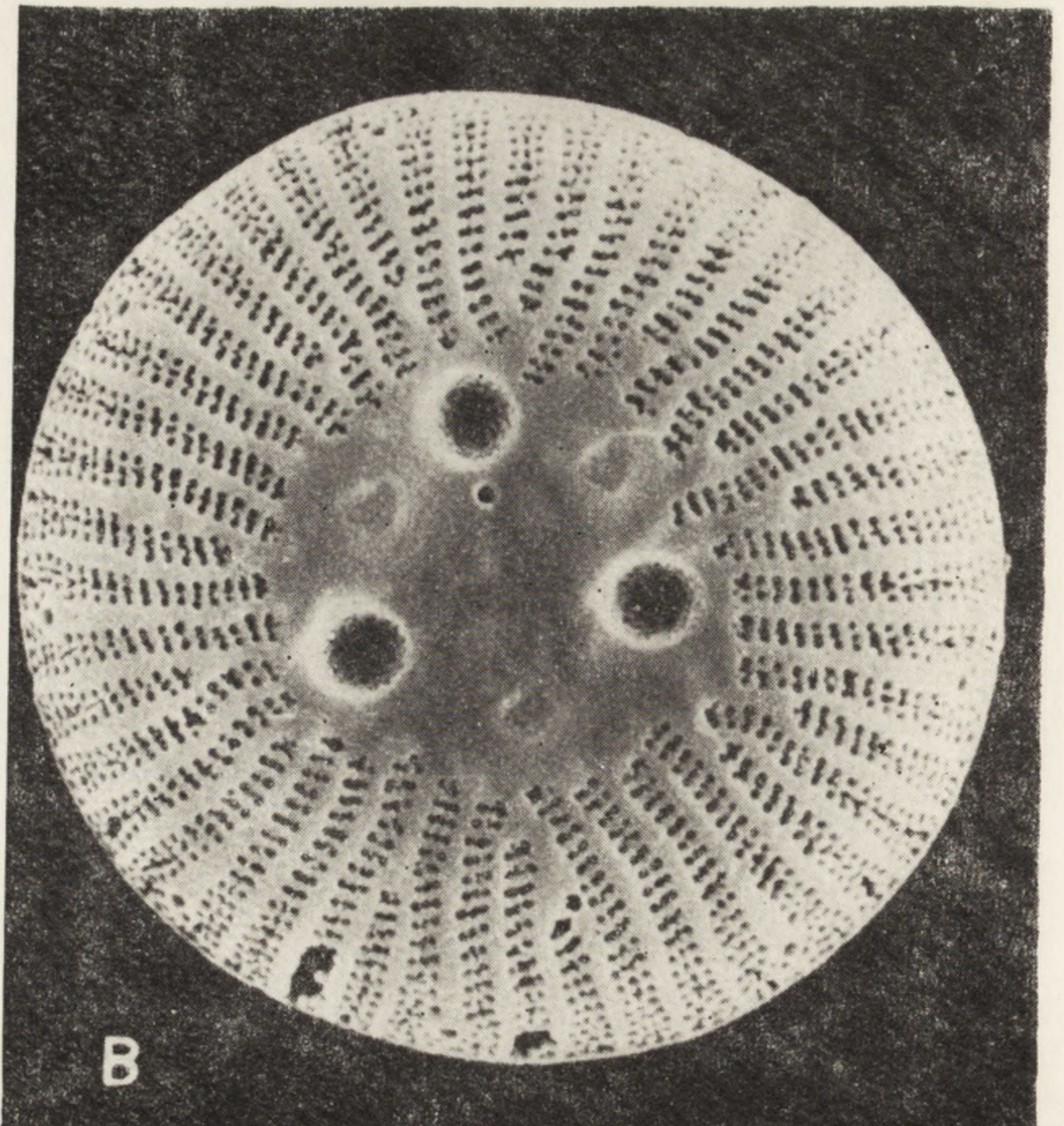
Ryc. 4. Schemat formowania pancerzyków u *Gomphonema parvulum* [11]

aG — aparat Golgiego, n — jądro, p — pancerzyk, pl — plazmolema, pp — pozostałości plazmolemy i zewnętrznej części silikolemy, które u tego taksonu złączają się, r — szczelina, si — świeżo zdeponowana krzemionka, sl — silikolema



Ryc. 5. Przekrój poprzeczny przez igłę gąbki *Spongilla lacustris* [40],  $\times 42\,500$





Ryc. 6. Przykłady kształtu i ornamentacji pancerzyków okrzemek  
 A — *Melosira sulcata*, kolonia ( $\times 1100$ ), B — *Cyclotella ocellata* ( $\times 8600$ ), C — *Cymbella thumensis* ( $\times 7800$ ), D — *Achnanthes conspicua*, okrywa górna ( $\times 7800$ ); elektronogramy wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Zoologii UJ w Krakowie



elektronowo gęstsza, nie wykazuje substruktury i jest mniej wrażliwa na rozpuszczające działanie kwasu fluorowodorowego (HF). Warstwa peryferyczna, młodsza, jest elektronowo mniej gęsta, ziarnista i łatwiej rozpuszczająca się w HF. Po całkowitym wytrawieniu krzemionki z obydwu warstw uwidacznia się siateczka zbudowana z nie zidentyfikowanych jeszcze substancji. Natomiast po wytrawieniu w taki sam sposób pancerzyka okrzemek, podobnej siateczki nigdy nie obserwowano. Warstwowa budowa igieł gąbki sugeruje, że proces odkładania krzemu przebiega w nich etapami.

W igłach gąbek nie obserwowano, jak dotychczas, innych typów budowy, a tzw. „bloki” krzemionki, obserwowane także na ultracienkich skrawkach okrzemek, wiązane są z techniką krojenia [11, 40].

#### KRZEM JAKO NIEZBĘDNY SKŁADNIK ODŻYWCZY

W jakiej postaci pobierają okrzemki ten składnik odżywczy: zjonizowanej, jako  $H_4SiO_4^{-1}$  czy też  $H_4SiO_4^{-2}$ , albo niezjonizowanej ( $H_4SiO_4$ ), nie można było jak dotąd rozstrzygnąć, gdyż wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na wszystkie trzy możliwości.

W przeciwieństwie do wcześniejszych sugestii [28], ostatnie badania [48] wykazały, że komórka okrzemki w ciągu całego cyklu życiowego pobiera krzem niejednakowo intensywnie. Nie może on też być pobrany i pozostawiony w komórce „na zapas”. Sullivan [47, 48] wykazał, że intensywność pobierania kwasu krzemowego zależy przede wszystkim od stadium cyklu życiowego, w jakim znajduje się komórka.

Zsynchronizowane populacje *Navicula pelliculosa* w czasie podziału komórki pobierały kwas krzemowy 10 razy bardziej intensywnie niż w stadium wegetatywnym. Intensywność pobierania zaczynała wzrastać tuż przed podziałem komórek, a maksymalną wartość osiągała przed cytokinezą i formowaniem pancerzyka. Krzywa obrazująca intensywność pobierania kwasu krzemowego podobna jest [48] do krzywej szybkości reakcji enzymatycznej. Kinetyczna analiza tego zjawiska wykazała znaczne zmiany wartości stałej substratowej ( $K_s$ ) i maksymalnej szybkości reakcji ( $V_{max}$ ) w różnych stadiach cyklu życiowego okrzemek. Znaczne zmiany wartości tej ostatniej sugerują większą liczbę czynnych przenośników kwasu krzemowego w błonie komórkowej. Dostawcą energii dla pobrania krzemu jest prawdopodobnie ATP [15]. Intensywność pobierania kwasu krzemowego nie jest, jak sugeruje Sullivan, zależna od ilości kwasu krzemowego w środowisku, w którym znajdują się komórki, ani też nie wydaje się być indukowana jego obecnością.

Proces zużytkowania kwasu krzemowego przebiega w kilku etapach



[47]. Zostaje on przede wszystkim aktywnie z dużym nakładem energii pobrany ze środowiska zewnętrznego poprzez plazmolemę do wnętrza komórki. Dzieje się to przy udziale czynnych przenośników i w obecności kationów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . W komórce znajdować się może w formie rozpuszczonej i możliwe, że dlatego nie powiodły się próby wykrycia krzemu metodą trawienia komórki kwasem fluorowodorowym. Może także przejściowo, na pewien okres, łączyć się ze związkami organicznymi. Związki takie, gdy zajdzie tego potrzeba, mogą być następnie przy udziale specyficznego enzymu rozłożone. Związki krzemoorganiczne nie są wprawdzie znane w przyrodzie (poza doniesieniem Schwartza [38]), mogą być jednak otrzymywane przez chemików w laboratoriach [23]. Na koniec, krzem dostarczony jest na miejsce formowania pancerzyka, gdzie następuje polikondensacja kwasu krzemowego. Wydaje się, że w przypadku okrzemek, w przeciwieństwie do gąbek, polikondensacja kwasu krzemowego w obrębie jednej wakuoli odkładającej krzem jest jednorazowa. Bardzo możliwe jednak, że rozpatrując ten proces na poziomie molekularnym można będzie w przyszłości wyodrębnić jakieś kolejne etapy. Ostatecznie powstaje pancerzyk charakterystyczny dla danego gatunku. Jego wielkość, kształt i często bardzo skomplikowana ornamentacja jest podstawą systematyki tej grupy glonów.

Krzem jest konieczny dla normalnego rozwoju wszystkich dotychczas badanych okrzemek. Jest on przez komórki okrzemek zużytkowywany nie tylko do budowy pancerzyków, lecz także, a może przede wszystkim, jest on koniecznie potrzebny dla metabolizmu ich komórek. Reakcja okrzemek na brak kwasu krzemowego jest bardzo szybka i swoista. W podobny sposób nie ujawnia się brak jakiegokolwiek innego składnika odżywczego. Ani brak związków azotowych, ani fosforowych w pożywce nie powoduje tak szybkich ani tak głębokich zmian w procesach metabolicznych komórki. Głód związków fosforowych uwidacznia się np. dopiero w trzeciej generacji komórek. Jak bardzo okrzemki potrzebują krzemu świadczyć może fakt, że hodowane w ciemności populacje *Navicula pelliculosa* potrafią pobierać kwas krzemowy nawet w środowisku pozbawionym azotu [24, 25], a koncentracja kwasu krzemowego w komórce może być w pewnych warunkach nawet 250 razy większa niż w środowisku [47]. Doświadczenia prowadzone na populacjach hodowanych w kulturach, w warunkach niedoboru Si, wykazały znaczny spadek aktywności metabolicznej i w konsekwencji zahamowanie ich rozwoju najczęściej w dwóch fazach cyklu życiowego okrzemki: tuż przed podziałem komórki lub przed formowaniem pancerzyka (w zależności od organizmu i warunków eksperymentu) [40]. U słodkowodnej okrzemki *Cyclotella cryptica* brak krzemu powoduje zahamowanie wielu bardzo istotnych syntez organicznych, w tym syntezy białek, DNA,



karotenoidów, chlorofilu, co powodowało spadek intensywności fotosyntezy nawet o 80%. Jediną syntezą, jaka odbywa się w takich warunkach, jest synteza tłuszczów. Jej intensywność może nawet wzrosnąć o 100%. W związku z tym wydaje się, że często obserwowane w żywych komórkach okrzemek kropelki tłuszczu świadczą o niedoborze krzemu, a nie o optymalnych warunkach życia, jak to sugeruje wiele podręczników. Sullivan i Volcani [49, 50] wykazali, że także w kulturach *Cylindrotheca fusiformis* brak  $H_4SiO_4$  powodował zatrzymanie syntezy DNA i nie było to wynikiem braku potrzebnej energii, lecz zmniejszeniem aktywności polimerazy DNA. Także Oey i Schnepf [30] sugerowali zależność procesu formowania pancerzyka od wcześniejszej syntezy DNA, wskazując, że impulsy inicjujące wytwarzanie pancerzyka powstają w czasie lub tuż po fazie S cyklu życiowego komórki. Pogląd ten podtrzymują też ostatnie obserwacje nad formowaniem pancerzyka *Navicula pelliculosa* [7]. Zaobserwowano, że pierwszym etapem podziału komórki jest wytworzenie trzeciego pasa obwodowego, po którym następuje mitoz, a potem formowanie nowej hypoteki (denko).

Ponowne dodanie krzemu do pożywki tak głodzonej populacji powoduje natychmiastowy wzrost aktywności metabolicznej (u *Navicula pelliculosa* rozpoczęcie syntezy białek, DNA, chlorofilu, zatrzymanie syntezy lipidów) i rozpoczęcie nowego podziału komórki. W środowisku całkowicie pozbawionym krzemu okrzemki na ogół nie dzielą się i nie tworzą pancerzyków. Co do dalszych losów takich komórek zdania badaczy są podzielone. Proskhina - Lavrenko [33] na podstawie danych Bachracha i Lefevra [2-4] oraz innych [5, 6, 16, 18, 54] uważa, że powstają wtedy bezpancerzykowe komórki, które mogą żyć, dzielić się, a po dodaniu do pożywki krzemu tworzyć normalne, charakterystyczne dla danego gatunku pancerzyki. Natomiast Lewin [28], a za nim Steward [41] podają, że jakkolwiek nie tak rzadko spotyka się w kulturach nagie komórki okrzemek [3, 18, 44, 53], to jednak nie udało się ich jak dotąd utrzymać dłużej przy życiu ani też pobudzić do wytworzenia pancerzyka w kulturach w eksperymentalnie określonych warunkach. Jedinym znany przypadek całkowicie bezpancerzykowej okrzemki stanowi gatunek z rodzaju *Licmophora* żyjący w symbiozie z morskim robakiem płaskim *Convoluta convoluta* [11], jednak dotychczasowe próby hodowania go w kulturze i pobudzania do wytworzenia pancerzyka także nie powiodły się.

#### UWAGI KOŃCOWE

Niewątpliwie jednymi z najbardziej interesujących obserwacji poczynionych w ostatnich latach w dziedzinie biologii okrzemek były te,



które dotyczyły roli krzemu w procesach metabolicznych komórek tych glonów. W ich wyniku dotychczasowy prosty model, w myśl którego kwas krzemowy pobierany jest i transportowany do odpowiednich pęcherzyków po to, by mógł powstać pancerzyk, zastąpiony został przez znacznie bardziej skomplikowany. Wiemy już, że kwas krzemowy bardzo szybko i specyficznie wpływa na zahamowanie lub zintensyfikowanie niektórych syntez organicznych. Jego losy jak i droga w obrębie komórki, a także morfogeneza krzemionkowych struktur, znajdują się pod generalną kontrolą metaboliczną. Jaką wobec tego rolę może spełniać kwas krzemowy w tych reakcjach? Szczególnie interesujące i obiecujące wydają się prace prowadzone nad zbadaniem wpływu krzemianów na procesy polimeryzacyjne. Ich wyniki sugerują [51], że może on spełniać rolę katalizatora. Zaawansowane studia nad tym zagadnieniem poczynili Katchalsky [20] i Paecht-Horowitz [31, 32]. Dokonali oni w obecności montmorylonitu heterogenicznej polimeryzacji poliamin. Otrzymali w ten sposób łańcuch 50 aminokwasów. Zakładając, że podobny system odgrywał rolę w przedbiologicznej ewolucji, można się spodziewać, że funkcje kwasu krzemowego w dzisiejszych organizmach żywych — w tym też okrzemek — mogą być rozwinięciem takich katalitycznych funkcji krzemianów. W związku z tym rodzi się pytanie, czy takie metaboliczne funkcje kwasu krzemowego nie mogły być w odległej historii okrzemek funkcjami ewolucyjnie pierwotnymi, a może nawet jedynymi w tym czasie. Wówczas można przypuszczać, że przodkowie lub pierwsze prymitywne okrzemki nie posiadały jeszcze zdolności wytwarzania pancerzyka. W takim przypadku kwas krzemowy, np. tak jak to teraz ma miejsce z wieloma innymi związkami mineralnymi, mógł być odkładany w specjalnych wakuolach. Następnym krokiem w ewolucji okrzemek mogło być wytworzenie bardzo delikatnych krzemionkowych struktur wewnątrzkomórkowych, które z czasem stały się coraz bardziej skomplikowane, aż do takiej postaci, jaką znamy od pierwszych kredowych niewątpliwych okrzemek.

Nie należy jednak sądzić, że krzemionkowy pancerzyk jest niepotrzebnym produktem przemiany materii w komórce i jest taki skomplikowany tylko w wyniku splotu ewolucyjnych okoliczności. Najprawdopodobniej sam pancerzyk także spełnia istotne funkcje w życiu okrzemki. Jakie mogą być to funkcje, starają się wyjaśnić dwie teorie. Pierwsza wskazuje na aspekt ekonomiczny. Polikondensacja kwasu krzemowego nie wymaga tak dużego nakładu energii, jak w przypadku innych materiałów budujących ścianę komórkową (celuloza, pektyny, chityna). Dzięki temu pancerzyk może stanowić nawet więcej niż 30% suchej masy komórki. Druga teoria uwypukla korzyści, które może odnosić organizm posiadający tak ogromną powierzchnię absorpcyjną, jaką jest



krzemionkowy pancerzyk. Okrzemki rzeczywiście potrafią skuteczniej niż jakiegokolwiek inne rośliny planktonowe wydobywać organiczne i nieorganiczne składniki odżywcze, nawet gdy ich stężenie w środowisku jest bardzo niskie.

## LITERATURA

- [1] APELT G., Die Symbiose zwischen den acoelen Turbellar *Convoluta convoluta* und Diatomeen der Gattung *Licmophora*, Mar. Biol., 3 : 165–187, 1969.
- [2] BACHRACH E., LEFEVRE M., Disparition de la carapace siliceuse chez les diatomées, Compt. Rend. Soc. Biol., 98 : 1510–1511, 1928.
- [3] — Contribution à l'étude du rôle de la silice chez les êtres vivant — observations sur la biologie des diatomées, J. Physiol. et Pathol. Gen., 27 : 241–249, 1929.
- [4] — Quelques observations sur les diatomées nues, Tran. Crypt. dédiés à Louis Manguin, Paris, 181–187, 1931.
- [5] BACHRACH E., PILLET, Micro-incinération des diatomées sans carapaces, Compt. Rend. Acad. Sci., 190 : 1442–1443, 1930.
- [6] — Etude de cendres des diatomés sans carapaces, Bull. d'Histol. Appl., 8 : 33–37, 1931.
- [7] CHAPPINO A. L., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. VII. Sequential cell wall development in the Pennate *Navicula pelliculosa*, Protoplasma, 93 : 205–223, 1977.
- [8] COOMBS J., LAURITIS J. A., DARLEY W. M., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. V. Effects of colchicine on wall formation in *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse, Z. Pflanz. Physiol., 59 : 124–152, 1968.
- [9] — Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. VI. Fine structure of colchicine-induced polyploids of *Navicula pelliculosa* during its formation, Planta, 82 : 280–292, 1968.
- [10] COOMBS J., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Chemical changes in the wall of *Navicula pelliculosa* during its formation, Planta, 82 : 280–292, 1968.
- [11] DAWSON P. A., Observations on the structure of some forms of *Gomphonema parvulum* Kütz. III. Frustule formation, J. Phycol., 9 : 353–364, 1973.
- [12] DRUM R. W., PANKRATZ H. S., Post mitotic fine structure of *Gomphonema parvulum*, J. Ultrastruct. Res., 10 : 217–223, 1964.
- [13] DRUM R. W., PANKRATZ H. S., STOERMER E. F., Electron microscopy of diatom cell, [w] J - G. HELMKE, W. KRIEGER, Diatomeenschalen in Elektronenmikroskopischem Bild, VI, J. Cramer, Lehre, 1966.
- [14] HECKY R. E., MOPPER K., KILHAM P., DEGENS F. T., The amino acid and sugar composition of diatom - cell walls, Mar. Biol., 19 : 323–333, 1973.
- [15] HELMKE J - G., Die Feinstruktur der Kieselsäure und ihre physiologische Bedeutung in Diatomeenschalen, Naturwissenschaften, 11 : 254–255, 1954.
- [16] HENNINGSEN B. B., A mono-silicic acid stimulated adenosinetriphosphatase from protoplasts of the apochlorotic diatom, *Nitzschia alba*. Doctoral thesis, University of California, San Diego, 1971.



- [17] HENDEY N. I., Extra - frustular diatoms, *J. Roy. Microscop. Soc.*, **65** : 34-39, 1945.
- [18] — Diatoms without siliceous frustules, *Nature*, **158** : 588, 1946.
- [19] JORGENSEN E. G., Variations in the silica content of diatoms, *Physiol. Plantarum*, **8** : 840-845, 1955.
- [20] KATCHALSKY A., Prebiotic synthesis of biopolymers on inorganic templates, *Naturwissenschaften*, **60** : 215-220, 1973.
- [21] KÜSTER - WINKELMAN G., Über die Doppelschalen der Diatomeen, *Arch. Protistenk.*, **91** : 237-266, 1938.
- [22] LAURITIS J. A., COOMBS J., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. IV. Fine structure of the apochlorotic diatom *Nitzschia alba* Lewin and Lewin, *Arch. Mikrobiol.*, **62** : 1-16, 1968.
- [23] LESBERE M., MAZEROLLES M., SATJE J., The organic compounds of germanium, John Wiley and Sons, New York, 1-701, 1971.
- [24] LEWIN J. C., Silicon metabolism in diatoms. I. Evidence for the role of reduced sulfur compounds in silicon utilization, *J. Gen. Physiol.*, **37** : 589-599, 1954.
- [25] — Silicon metabolism in diatoms. III. Respiration and silicon uptake in *Navicula pelliculosa*, *J. Gen. Physiol.*, **39** : 1-10, 1955.
- [26] — Silicon metabolism in diatoms. IV. Growth and frustule formation in *Navicula pelliculosa*, *Can. J. Microbiol.*, **3** : 427-433, 1957.
- [27] — The dissolution of silica from walls, *Geochim. et Cosmochim. Acta*, **21** : 182-198, 1961.
- [28] — Physiology and biochemistry of algae, Academic Press, New York, London, 1-929, 1962.
- [29] LUND J. W. G., Studies on *Asterionella formosa* Hass. II. Nutrient depletion and the spring maximum, *J. Ecol.*, **38** : 15-35, 1950.
- [30] OEY J. L., SCHNEPF E., Über die Auslösung der Valvenbildung bei der Diatomee *Cyclotella cryptica*, *Arch. Mikrobiol.*, **71** : 199-213, 1970.
- [31] PAECHT - HOROWITZ M., Die Entstehung des Lebens, *Angew. Chem.*, **85** : 422-430, 1973.
- [32] PAECHT - HOROWITZ M., BERGER J., KATCHALSKY A., Prebiotic synthesis of polypeptides by heterogenous polycondensation of aminoacid adenylates, *Nature*, **228** : 636-639, 1970.
- [33] PROSKHINA - LAVRENKO A. I., Diatomovye vodorosli SSSR. Iskopaemye i sovremennye, I. Nauka, Leningrad, 1-399, 1974.
- [34] REIMANN B., Bildung, Bau und Zusammenhang der Bacillariophyceenschalen, *N. Hedwigia*, **2** : 349-373, 1960.
- [35] — Deposition of silica inside a diatom cell, *Expl. Cell Res.*, **34** : 605-608, 1964.
- [36] REIMANN B., LEWIN J. C., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. II. The structure of the cell wall of *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse, *J. Phycol.*, **2** : 74-84, 1966.
- [37] REIMANN B., VOLCANI B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. III. The structure of the cell wall of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *J. Ultrastruct. Res.*, **21** : 182-193, 1968.
- [38] SCHWARTZ K., A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70** : 1608-1621, 1973.
- [39] SIEVER R., SCOTT R. A., Organic geochemistry of silica. II. [w] Organic Geochemistry, Breger I. A., Macmillan Co. New York, 579-595, 1963.



- [40] SIMPSON T. L., VACCARO C. A., An ultrastructural study of silica deposition in the freshwater sponge *Spongilla lacustris*, J. Ultrastruct. Res., 47 : 296-309, 1974.
- [41] STEWARD W. D. P., Algal physiology and biochemistry, Botanical Monographs, 10, Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1974.
- [42] STOERMER E. F., PANKRATZ H. S., DRUM R. N., The fine structure of *Mastogloia Grevillei* Wn. Smith, Protoplasma, 59 : 1-13, 1964.
- [43] STOERMER E. F., PANKRATZ H. S., BOWEN C. C., Fine structure of the diatom *Amphipleura pellucida*. II. Cytoplasmic fine structure and frustule formation, Am. Bot. J., 52 : 1067-1078, 1965.
- [44] STOSCH H. A., von, Form und Formwechsel der Diatomee *Achnanthes longipes* in Abhängigkeit von der Ernährung mit besonderer Berücksichtigung der Spurenstoffe, Ber. Deut. Bot. Ges., 60 : 2-16, 1942.
- [45] — Ueber das Perizonium der Diatomeen, Votr. Ges. Bot., Neue Folge, 1 : 43-53, 1962.
- [46] STRACHOV N. M., O nekotorych voprosach geochimii kremenziema, [w] Geochimija kremenziema, Moskva, Nauka, 5-8, 1966.
- [47] SULIVAN C. W., Diatom mineralization of silicic acid. I.  $\text{Si(OH)}_4$  transport characteristics in *Navicula pelliculosa*, J. Phycol., 12 : 383-390, 1976.
- [48] — Diatom mineralization of silicic acid. II. Regulation of  $\text{Si(OH)}_4$  transport rates during the cell cycle of *Navicula pelliculosa*, J. Phycol., 13 : 86-91, 1977.
- [49] SULIVAN C. W., VOLCANI B. E., Role of silicon in the diatom metabolism. II. Endogenous nucleoside triphosphate pools during silicic acid starvation of synchronised *Cylindrotheca fusiformis*, Biochim. Biophys. Acta, 308 : 205-211, 1973.
- [50] — Role of silicon in diatom metabolism. III. The effects of silicic acid on DNA polymerase, TMP kinase and DNA synthesis in *Cylindrotheca fusiformis*, Biochim. Biophys. Acta, 308 : 212-299, 1973.
- [51] WACKER A., Zur Entstehung des Lebens auf der Erde, Angew. Chem., 70 : 519-526, 1958.
- [52] WERNER D., The biology of diatoms, [w] Botanical Monographs, 13, Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1-498, 1977.
- [53] WIEDLING S., A skeleton-free diatom, Bot. Notiser, 1 : 33-36, 1941.
- [54] — Cultivation of *Nitzschiae*, Bot. Notiser, 1 : 37-39, 1941.

Otrzymano: 8 sierpnia 1978.

Przyjęto: 17 sierpnia 1978.

Adres autorki: ul. Lubicz 46, 31 - 512 Kraków.



[150] ...  
[151] ...  
[152] ...  
[153] ...  
[154] ...  
[155] ...  
[156] ...  
[157] ...  
[158] ...  
[159] ...  
[160] ...  
[161] ...  
[162] ...  
[163] ...  
[164] ...  
[165] ...  
[166] ...  
[167] ...  
[168] ...  
[169] ...  
[170] ...  
[171] ...  
[172] ...  
[173] ...  
[174] ...  
[175] ...  
[176] ...  
[177] ...  
[178] ...  
[179] ...  
[180] ...  
[181] ...  
[182] ...  
[183] ...  
[184] ...  
[185] ...  
[186] ...  
[187] ...  
[188] ...  
[189] ...  
[190] ...  
[191] ...  
[192] ...  
[193] ...  
[194] ...  
[195] ...  
[196] ...  
[197] ...  
[198] ...  
[199] ...  
[200] ...



## PLAZMOLEMA KOMÓRKI ROŚLINNEJ

## I. MORFOLOGIA, IZOLACJA I STRUKTURA

## THE PLASMALEMMA OF THE PLANT CELL

## I. MORPHOLOGY, ISOLATION AND STRUCTURE

Marek POLAŃSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, UJ

*Streszczenie.* Plazmolema, błona komórkowa komórki roślinnej, w odróżnieniu od błony komórki zwierzęcej barwi się kontrastowo przy użyciu techniki PTA - CrO<sub>3</sub>. Na cytoplazmatycznej powierzchni tej błony występują liczniej niż na powierzchni zewnętrznej globule o charakterze kompleksów białkowych. Powierzchnia plazmolemy wyizolowanych protoplastów wykazuje zdolność wiązania Con A. Plazmolemę izoluje się w gradiencie ciągłym i skokowym sacharozy z homogenatu tkanki roślinnej. Otrzymane frakcje są zawsze obarczone pewną zawartością innych błon komórkowych i mogą być traktowane jako wzbogacone w plazmolemę. Identyfikacja frakcji plazmolemy dokonywana jest najczęściej trytowaniem NPA oraz określeniem aktywności ATPazy zależnej od jonów K<sup>+</sup> w pH=6,5 jako enzymu markerowego. Błona komórkowa posiada w porównaniu z innymi błonami cytoplazmatycznymi niski stosunek białek do lipidów oraz przeważającą ilość fosfolipidów nad sterolami.

*Summary.* The plasmalemma of the plant cell in contrast to animal cell can be identified by special EM staining technique: PTA - CrO<sub>3</sub>. The surface of the plasmalemma membrane shows globular structures of the protein complexes. The surface of the isolated plant protoplasts has the ability to bind concanavalin A.

The methods used for isolation of plasmalemma membranes have been reviewed. Up till now no isolation procedure permit to get pure plasmalemma membranes. The obtained fractions are only more or less enriched in plasmalemma. The method used for identification of plasmalemma membranes including marker enzymes were described.

Chemical analysis showed that plasmalemma membranes have lower protein/lipid ratio in comparison to other cytoplasmic membranes. In lipid composition the domination of phospholipids was found.



Istnienie warstwy powierzchniowej protoplastu o własnościach innych niż pozostała część cytoplazmy postulowali już cytologowie drugiej połowy XIX w. Warstwa ta, określona w literaturze niemieckiej jako „Hautschicht” lub „Plasmahaut”, była zdaniem Pfeffera [48] niemożliwa ani do wyizolowania, ani do wykrycia metodami chemicznymi czy anatomicznymi. W innym miejscu ten sam autor [49] stwierdza, że hyalino-wa warstwa powierzchniowa tylko w wyjątkowych obiektach, np. u śluzowców, sięga grubości do 8  $\mu\text{m}$ , natomiast w typowych komórkach roślinnych jest niedostrzegalna i być może ograniczona do wymiarów warstwy molekularnej. Jak z tego wynika, Pfeffer traktował warstwę ektoplazmy jako wchodzącą w skład warstwy powierzchniowej. Określenie takie okazuje się użyteczne dla szeregu problemów, gdyż powraca w nowej literaturze pod nazwą kompleksu powierzchniowego (cell surface complex). Kompleks obejmuje typową błonę lipoproteidową a także warstwę żelu cytoplazmatycznego o zmiennej grubości niekiedy tylko kilkudziesięciu nm wraz z zakotwiczonymi w niej mikrofibrylami oraz zewnętrzną otoczkę złożoną częściowo z glikoproteidów [1]. Termin „plazmolema”, dla określenia samej błony zewnętrznej protoplastu roślinnego, wprowadził Plowe w 1931 r. [51].

Do lat pięćdziesiątych brak było metod pozwalających na bezpośrednie badanie plazmolemy, natomiast pewne informacje o własnościach tej błony przyniosły studia przepuszczalności [19]. Komórka roślinna ze swą charakterystyczną zdolnością do plazmolizy i deplazmolizy nadawała się dobrze do tego typu badań. Prace związane z nazwiskami Overtona, Ruhlanda, Collandera i innych [46, 61] wykazały, że do komórki przenikają najłatwiej substancje rozpuszczalne w tłuszczach. Im substancja jest bardziej polarna, tym trudniejsze jest jej wnikanie. Związki polarne (np. jony) mogą jednak penetrować przez plazmolemę, choć znacznie wolniej, a szybkość ich przenikania jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczek. Na tej i podobnych podstawach wyłaniał się obraz plazmolemy jako struktury gęstszej niż pozostała cytoplazma, w budowie której to struktury dominują substancje lipidowe. W 1937 r. Collander (cyt. za [61]) zakładał, że błona zbudowana jest z lipidów, w obrębie których istnieją pory umożliwiające przenikanie związków nierozpuszczalnych w tłuszczach.

Zasadniczy postęp w badaniu plazmolemy dokonany został na przełomie lat 50–60, dzięki wprowadzeniu nowych technik badawczych. Pomiaru wewnętrznych parametrów elektrycznych komórki za pomocą mikroelektrod pozwoliły stwierdzić, że niemal cały opór elektryczny między wnętrzem komórki a środowiskiem zlokalizowany jest w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej. Bariera ograniczającą przepuszczalność jonów jest więc plazmolema [69, 70]. Z drugiej strony, mikroskopia



elektronowa umożliwia wizualne stwierdzenie obecności plazmolemy jako błony o podwójnym zarysie i grubości około 8 nm, występującej w sposób ciągły na powierzchni każdej żywej komórki. Obrazy te były zgodne z rozwiniętą wówczas koncepcją struktury błony lipoproteinowej typu błony elementarnej (unit membrane) [57], postulowaną jako dotyczącą wszystkich błon cytoplazmatycznych. Schemat ten z pewnymi modyfikacjami [63] przyjmowany jest do chwili obecnej jako najlepiej zgodny z danymi doświadczalnymi dla plazmolemy.

Obecnie badania nad plazmolemą koncentrują się wokół zagadnień płynności i dynamiki tej błony, jej składu chemicznego i aktywności enzymatycznej. Próby izolacji błony komórkowej dokonane z powodzeniem dla komórek zwierzęcych są w odniesieniu do komórek roślinnych związane z większymi trudnościami. Znajdują się one w fazie początkowej, ale zarazem w fazie szybkiego rozwoju. Przedstawienie ich aktualnego stanu jest jednym z celów niniejszego przeglądu. Dodatkowo przedstawione zostaną niektóre zagadnienia dotyczące funkcji plazmolemy. O ile bowiem do lat pięćdziesiątych za główne zagadnienie zewnętrznej błony plazmatycznej uważano kontrolę przepuszczalności, o tyle dziś przypisujemy plazmolemie szeroki wachlarz istotnych dla życia komórki procesów, zarówno o charakterze enzymatycznym, jak i o charakterze funkcji receptorowej.

#### MORFOLOGIA PLAZMOLEMY

Na przekrojach komórki roślinnej utrwalonej czterotlenkiem osmu plazmolema widoczna jest jako błona powierzchniowa o grubości od 6 do 10 nm. Warstwa ta zawiera dwa peryferyczne obszary elektronowo gęste o grubości około 2 nm i środkowy pas elektronowo rzadki grubości około 4 nm [17, 64]. Podobny obraz dają przekroje innych błon komórki roślinnej. Jak dotąd jedyną metodą selektywnego wyróżnienia błony plazmatycznej od innych błon jest opracowana przez Rolanda i wsp. [58] technika barwienia kwasem fosforowolframowym i chromowym (technika PTA - CrO<sub>3</sub>), zwana też techniką PACP (periodic - chromic - phosphotungstic acid) [35]. Polega ona na odbarwieniu skrawka przygotowanego standardową techniką (utrwalanie glutaraldehydem i OsO<sub>4</sub>, odwodnienie, zatopienie w Eponie) przez traktowanie przez 30 min 1% kwasem nadjodowym, a następnie, po wielokrotnym przepłukaniu w wodzie destylowanej, potraktowaniu przez 5 min mieszaniną 1% kwasu fosforowolframowego i 10% kwasu chromowego.

Plazmolema wybarwia się intensywnie w przeciwieństwie do błon tonoplastu, mitochondriów, plastydów, diktyosomów czy siateczki śród-



plazmatycznej (ryc.1). Reakcja jest specyficzna dla plazmolemy komórek roślin wyższych, drożdży i bakterii, natomiast nie daje rezultatów w komórkach zwierzęcych [58]. Specyficzna zdolność plazmolemy do barwienia się metodą PTA - CrO<sub>3</sub> została wykorzystana przy identyfikacji frakcji plazmolemy uzyskiwanej z homogenatu komórki [10, 30, 33, 35, 58, 68]. W ogromnej większości przypadków plazmolema przedstawia się na przekroju komórki jako płaska błona przylegająca do ściany komórkowej (ryc. 1). Wielokrotnie obserwowano jednak pofałdowania i inwaginacje tej błony [31, 44, 71, 73]. Inwaginacje te mogą przybierać krańcowe formy, tworząc daleko w głąb komórki sięgające wodniczki, otwarte tylko wąskim kanałem na zewnątrz, albo gęsto ułożone pofałdowania typu mikrokosmków (ryc. 2) Pierwsze struktury zostały opisane dla komórek korzenia i są przypuszczalnie morfologicznym objawem endocytozy [14, 43], drugie stwierdzono w rurkach sitowych, gdzie ich występowanie traktowane jest jako sposób wydawnego powiększenia powierzchni plazmolemy, co ma ułatwić transport międzykomórkowy [65].

Uzyskanie obrazu powierzchni plazmolemy lub jej podłużnego przekroju umożliwiają dwie techniki: obserwacja powierzchni izolowanych protoplastów i metoda kriorytownictwa (freeze fracturing), tj. badanie powierzchni przełomu uzyskanego po zamrożeniu preparatu w płynnym azocie. Protoplasty otrzymane po usunięciu ściany komórkowej wykazują w mikroskopie skaningowym powierzchnię z reguły gładką [7-9]. Niekiedy na powierzchni świeżo otrzymanych protoplastów widoczne są sferyczne uwypuklenia o średnicy 1 μm (ryc. 3). Są to miejsca kontaktu małej wodniczki cytoplazmatycznej z powierzchnią protoplastu. Na uwypukleniach tych nie występują glikoproteidy [8]. Metodą kriorytową stwierdzono w plazmolemie, zarówno w komórkach liścia, jak i w izolowanych protoplastach, obecność globularnych kompleksów białkowych [56], charakterystycznych zresztą dla wszystkich błon aktywnych. Globule te są rozrzucone równomiernie, ale nie wykazują uporządkowanego regularnego układu. Są one liczniejsze na wewnętrznej powierzchni przełomu niż na jego powierzchni zewnętrznej (ryc. 4)

Informacje dotyczące zmian morfologii plazmolemy i dynamiki przebiegu tych zmian są dość skąpe z uwagi na to, że podstawowa metoda badań — mikroskopia elektronowa — dostarcza obrazów statycznych. Grubość plazmolemy może ulegać zmianom pod wpływem bodźców mechanicznych. Plazmolema komórki roślinnej podlega z reguły działaniu sił ściskających (poprzecznych), wynikających z istnienia ciśnienia osmotycznego przyciskającego plazmolemę do ścian komórkowych. Odkształcenia wynikające z napięć poprzecznych można obliczyć opierając się na znajomości modułu elastyczności ściskania (wyznaczonego



różnymi metodami), którego wielkość waha się od 2 do  $40 \cdot 10^6 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$ . I tak, np. plazmolema posiadająca moduł  $5 \cdot 10^6 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$  i grubość początkową 9 nm ulega ściśnięciu o około  $0,17 \text{ nm} \cdot \text{bar}^{-1}$  działającego na nią ciśnienia ściskającego. Jeżeli w komórce ciśnienie turgorowe wynosi 10 barów, wiąże się to z redukcją grubości plazmolemy z 9 nm do 7,3 nm [12, 13]. Cyfry te wskazują, że plazmolema jest czułym wskaźnikiem ciśnienia, a zachodzące w niej zmiany mogą wpływać zarówno na właściwości elektryczne błony (np. potencjał przebicia), jak i na procesy osmoregulacji.

Zmiany grubości plazmolemy stwierdzono również jako wynik działania substancji chemicznych modyfikujących stan tej błony. Morré i Bracker [41] wykazali, że np. plazmolema izolowana z etiolowanego koleoptyla soji zmienia *in vitro* grubość o 10–15% pod wpływem IAA (kwasu indoliloctowego) lub zwiększa ją o 15–20% w stosunku do kontroli pod wpływem jonów wapnia (ryc. 5), przy czym zmiany te są wielokrotnie odwracalne.

Danych dotyczących płynności plazmolemy dostarczyły ostatnio badania wiązania konkanawaliny A (ConA) przez protoplasty roślinne. Związek ten jest lektyną otrzymaną z *Canavalia ensiformis* i posiada właściwości specyficznego wiązania się z resztami cukrów wchodzących w skład strukturalnych glikoproteidów błon [45]. Izolowane protoplasty wiążą ConA [7, 8], co świadczy o występowaniu na ich powierzchni glikozydowych akceptorów. Podobnie jak w komórkach zwierzęcych, istnieje granica wysycenia procesu wiązania pozwalająca na oszacowanie liczby miejsc wiązania. Wynosi ona dla protoplastów liści tytoniu około  $10^8$  [8], jest więc tego samego rzędu co w komórkach zwierzęcych. W początkowych fazach wiązania, cząsteczki ConA są rozmieszczone równomiernie na całej powierzchni protoplastu (ryc. 6a), po pewnym czasie jednak skupiają się w agregaty (ryc. 6b). Zjawisko przemieszczenia związanej ConA nie występuje w niskiej temperaturze, ani po potraktowaniu błony glutaraldehydem, jest objawem płynności plazmolemy.

#### IZOLACJA PLAZMOLEMY

Pozytywne wyniki, uzyskane w latach sześćdziesiątych, w izolacji plazmolemy komórek zwierzęcych [42] dały podstawy do podjęcia podobnych prób izolacji tych błon także z tkanek roślinnych. W roku 1970 Morré i wsp. [40] dokonali ciekawego studium porównawczego nad sposobem izolacji błony plazmatycznej z komórek wątroby szczura i komórek pędu cebuli. Dokonano też prób izolacji plazmolemy z korzenia owsa [18, 26, 29, 34], kukurydzy [35], soji [67], fasoli [2]; koleoptyla



kukurydzy [5, 24, 28, 33]; młodych siewek fasoli [21, 30]; liścieni fasoli [32]; hypokotyli *Glicyne* [11, 23]; epidermy *Allium porrum* [10], dalej z liści: *Suaeda maritiana* [22], trzciny cukrowej [62], a także z drożdży [20, 59], grzybów *Phycomycetes* [60] i *Neurospora* [4, 5] oraz glonu *Ochromonas* [47].

Specyfika materiału roślinnego, związana z obecnością odpornej mechanicznie ściany komórkowej oraz dużej wakuoli zawierającej kwasy organiczne i hydrolazy, stwarza szczególne problemy w izolacji błon komórek roślinnych i wymaga wprowadzenia modyfikacji w stosunku do metod stosowanych dla materiału zwierzęcego. Proces izolacji obejmuje etap homogenizacji tkanki, oczyszczania wstępnego oraz właściwego rozdziału błon na frakcje i ich identyfikację.

Homogenizacja komórek jest bardzo ważnym elementem w omawianym postępowaniu. Podczas homogenizacji rozerwane zostają błony plazmolemy i siateczki śródplazmatycznej, których fragmenty przekształcają się w pęcherzyki i na ogół rozerwanym zostaje przynajmniej część innych organelli zbudowanych z błon. Ponieważ wrażliwość poszczególnych systemów błoniastych jest różna, to od sposobu homogenizacji zależy nie tylko wydajność procesu izolacji błon, ale i czystość uzyskanych frakcji. Stąd szczegóły techniki homogenizacji należy dobrać do badanego materiału. Homogenizację przeprowadza się w temperaturze bliskiej 0°C w ośrodku zawierającym 0,25 M sacharozy, 1–3 mM EDTA i 25–100 mM buforu HEPES lub Tris o pH w granicach od 7,2 do 7,6. W niektórych przypadkach stosowany bywał dodatek jonów  $Mg^{2+}$  [3, 35], merkaptoetanolu [47], dekstranu [40] lub albuminy [30]. Homogenat sączy się przez gazę w celu oddzielenia nierozdrobnionych części tkanek.

Organelle, ich fragmenty i makrocząsteczki zawarte w homogenacie różnią się zarówno swą gęstością, jak i stałą Svedberga (ryc. 7). Wirowanie wstępne, zazwyczaj 2- lub 3-krotne, pozwala na eliminację składników o większej zdolności do odwirowania (większej stałej Svedberga). I tak, stosując przyspieszenia rzędu 1500 g przez 10 min usuwamy ściany komórkowe, ziarna skrobi i jądra, a przy następnym wirowaniu (15 000–40 000 g) sedimentują mitochondria, peroksysomy i plastydy. Pozostały supernatant wiruje się następnie przy przyspieszeniach 80–100 000 g przez około 30–150 min, uzyskując osad zawierający składniki błonowe homogenatu. Kolejnym etapem jest izolacja poszczególnych rodzajów błon z tak uzyskanego preparatu. Niestety, fragmenty błon cytoplazmatycznych pochodzące z różnych struktur mają dość zbliżone właściwości (masę, objętość, gęstość, ruchliwość elektroforetyczną) [50], co powoduje, że uzyskanie czystej frakcji złożonej tylko z błon jednego rodzaju jest niezmiernie trudne, a na ogół otrzymywane frakcje są tylko mniej lub więcej wzbogacone w określony typ błon.



Dla rozdziału poszczególnych rodzajów błon wykorzystywana bywa ich różna gęstość. Postępowanie polega na nałożeniu cienkiej warstwy preparatu błon na szczyt gradientu gęstości sacharozy w probówce wirowkowej i wirowaniu przy wysokich przyspieszeniach przez czas określony empirycznie. Stosowane bywają przyspieszenia 75 000–100 000  $g$ , a czas wirowania wynosi od kilku do 15 godz. [35]. Używany gradient gęstości może mieć charakter ciągły, w którym frakcja plazmoemy umieszcza się w strefie  $1,165 \text{ g ml}^{-1}$  (tj. około 36% sacharozy) (tab. 1), lub

TABELA 1

Średnie gęstości błon cytoplazmatycznych i organelli komórkowych według metody wirowania w gradiencie gęstości sacharozy [17, 35]

Błony — organelle	Gęstość sacharozy (g/ml)
Siateczka śródplazmatyczna gładka	1,10
Zewnętrzna błona mitochondrialna	1,12-1,14
Diktiosomy	1,12-1,15
Błona tylakoidu	1,14-1,18
Plazmolema roślin wyższych	1,16-1,18
Plazmolema glonów i grzybów	1,18-1,23
Mitochondria	1,17-1,22
Peroksysomy	1,17-1,25
Siateczka śródplazmatyczna ziarnista	1,19
Oślonka jądrowa	1,18-1,22
Chloroplasty	1,20-1,25
Wewnętrzna błona mitochondrialna	1,21
Glioksysomy	1,24-1,25

może być gradient skokowy i wówczas błony plazmoemy lokują się w okolicy 36% sacharozy, np. w interfazie 32/39% [3] lub 34/45% [67].

Jak wynika z tabeli 1, gęstość plazmoemy nie różni się w sposób zasadniczy od gęstości niektórych innych błon cytoplazmatycznych, co powoduje, że frakcja plazmoemy zawiera zawsze pewne zanieczyszczenia fragmentami chloroplastów, mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej.

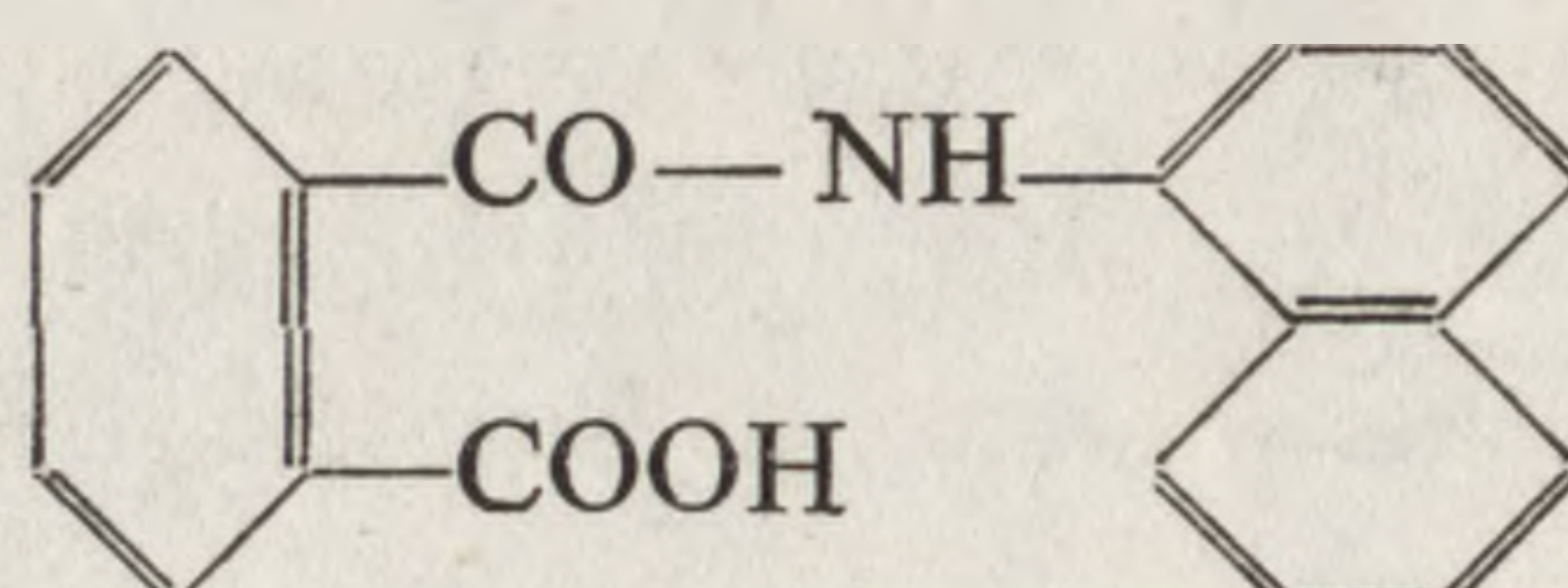
Teoretycznie istnieje możliwość wykorzystania różnic innych parametrów fizycznych błon, np. ich ładunku powierzchniowego i rozdziału metodą elektroforezy swobodnej, jednakże sposób ten nie znalazł dotąd zastosowania odnośnie do tkanek roślinnych, bywa również rzadko stosowany w izolacji błon komórek zwierzęcych [6].

Identyfikacja frakcji plazmoemy lub określenie udziału błon plazmoemy w poszczególnych frakcjach stwarza pewne trudności. Za najbardziej niezawodny sposób identyfikacji uważany jest test ultrastruktury, w którym preparat badany w mikroskopie elektronowym został po-



traktowany metodą PTA - CrO<sub>3</sub>, pozwalającą na selektywne wybarwienie plazmolemy [58] (ryc. 8). Testowanie każdej frakcji metodą ultrastrukturalną jest jednak zadaniem bardzo czasochłonnym. Dlatego metoda ta bywa stosowana głównie dla sprawdzenia innych szybszych metod testowania [30, 33, 35].

Z chemicznych, a ściślej radiochemicznych sposobów oznaczania plazmolemy na uwagę zasługuje wykorzystanie zdolności plazmolemy do specyficznego wiązania inhibitora transportu auksyn, jakim jest N-1-naftylamid kwasu ftalowego (NPA) [39].



Jeśli związek ten (stosowany w formie trytowanej ze względu na łatwość wykrycia) dozowany jest do preparatów błon w niskim stężeniu rzędu 10<sup>-8</sup>-10<sup>-9</sup> M, to jest on silnie i wybiórczo wiązany przez plazmolemę [28, 33]. Wykazano, że istnieje ścisła korelacja (współczynnik korelacji 0,949) między związaną radioaktywnością a udziałem błon plazmolemy w danej frakcji oznaczonej metodą PTA - CrO<sub>3</sub> [33]. Próby wprowadzenia innych metod radiochemicznych [24, 54] wzbudzają zastrzeżenia i nie znalazły szerokiego zastosowania.

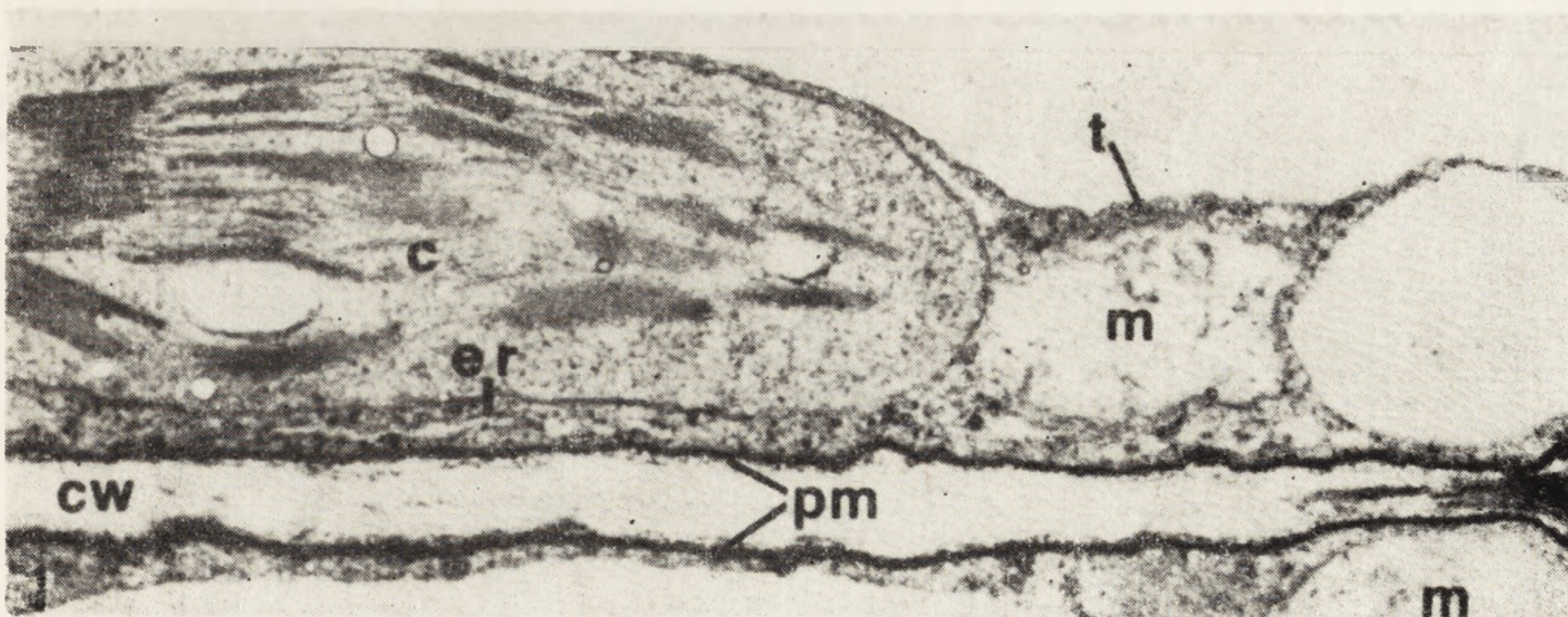
Najczęściej spotykanym sposobem identyfikacji frakcji komórkowych są metody enzymatyczne, oparte na pomiarze aktywności specyficznych enzymów — markerów związanych ze strukturami komórkowymi obec-

TABELA 2

Enzymy markerowe dla struktur błoniastych komórek roślinnych

Struktura błoniasta	Enzym	Literatura
Plazmolema	K <sup>+</sup> ATPaza pH = 6,5 niewrażliwa na ouabainę	[25, 35]
	Syntetaza β-glukanu II, czynna przy wysokich stężeniach UDPG	[28, 55]
Błony Golgiego	Utajona IDPaza	[52, 55]
	UDP: sterol glukozylotransferaza	[72]
Siateczka śródplazmatyczna	NADPH-cyt c reduktaza	[10, 22, 26]
	NADH-cyt c reduktaza niewrażliwa na antymycynę A	[25, 27, 37]
Mitochondria	Oksydaza cyt c	[66]
	ATPaza pH = 9	[35]
Tylakoidy	(absorpcja chlorofilu)	
Oślonka chloroplastów	Ca <sup>2+</sup> ATPaza	[16]



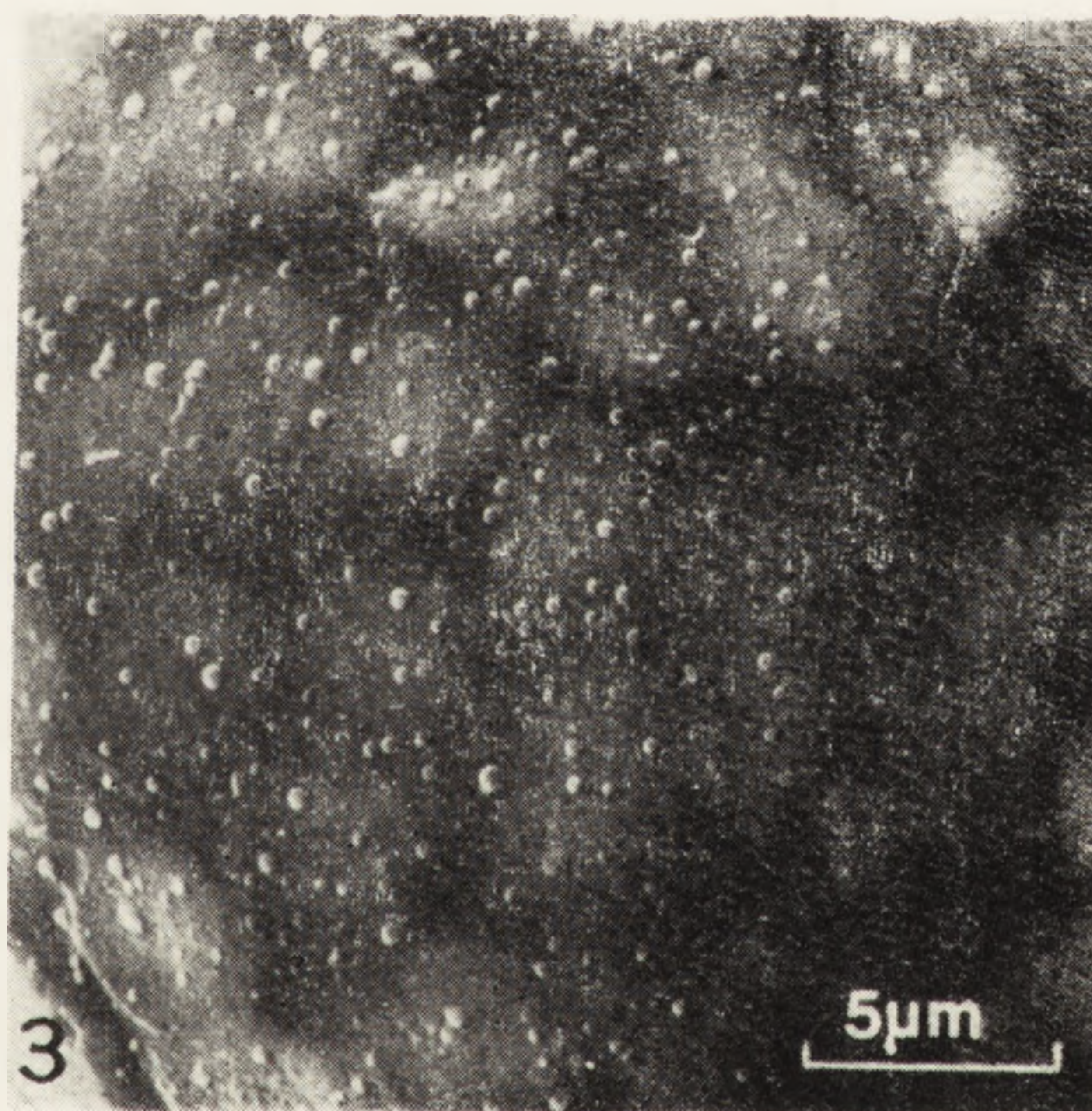


Ryc. 1. Obraz z mikroskopu elektronowego przekroju komórki liścienia fasoli po potraktowaniu metodą barwienia PTA-CrO<sub>3</sub> [30], pow. około  $\times 20\ 000$

t — tonoplast; er — siateczka śródplazmatyczna; m — mitochondria, c — chloroplast;  
pm — plazmolema

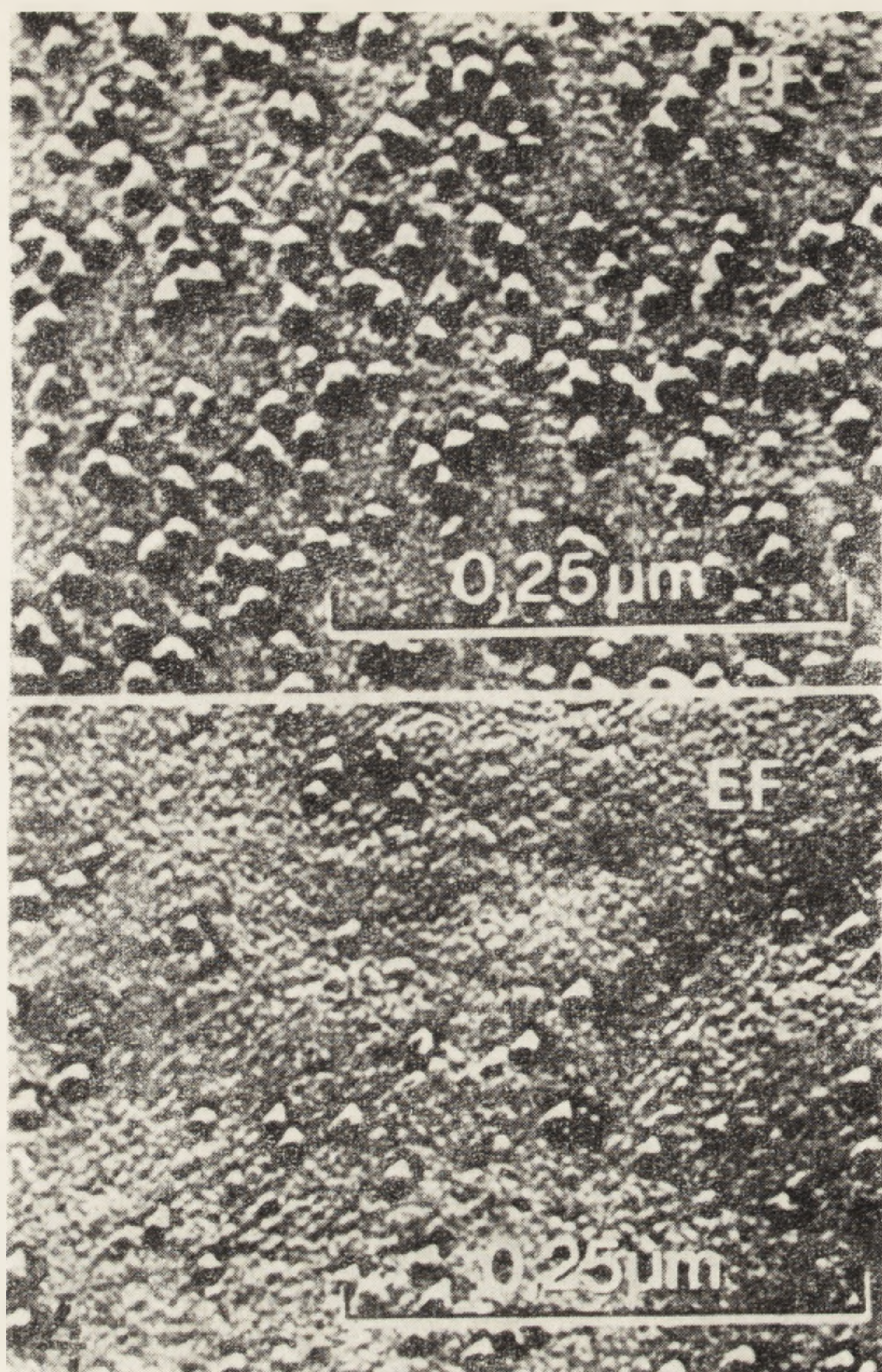


Ryc. 2. Obraz z mikroskopu elektronowego mikrokosmek plazmolemy w komórkach rurek siatkowych *Nymphoides peltatum* [65], pow. około  $\times 84\ 000$



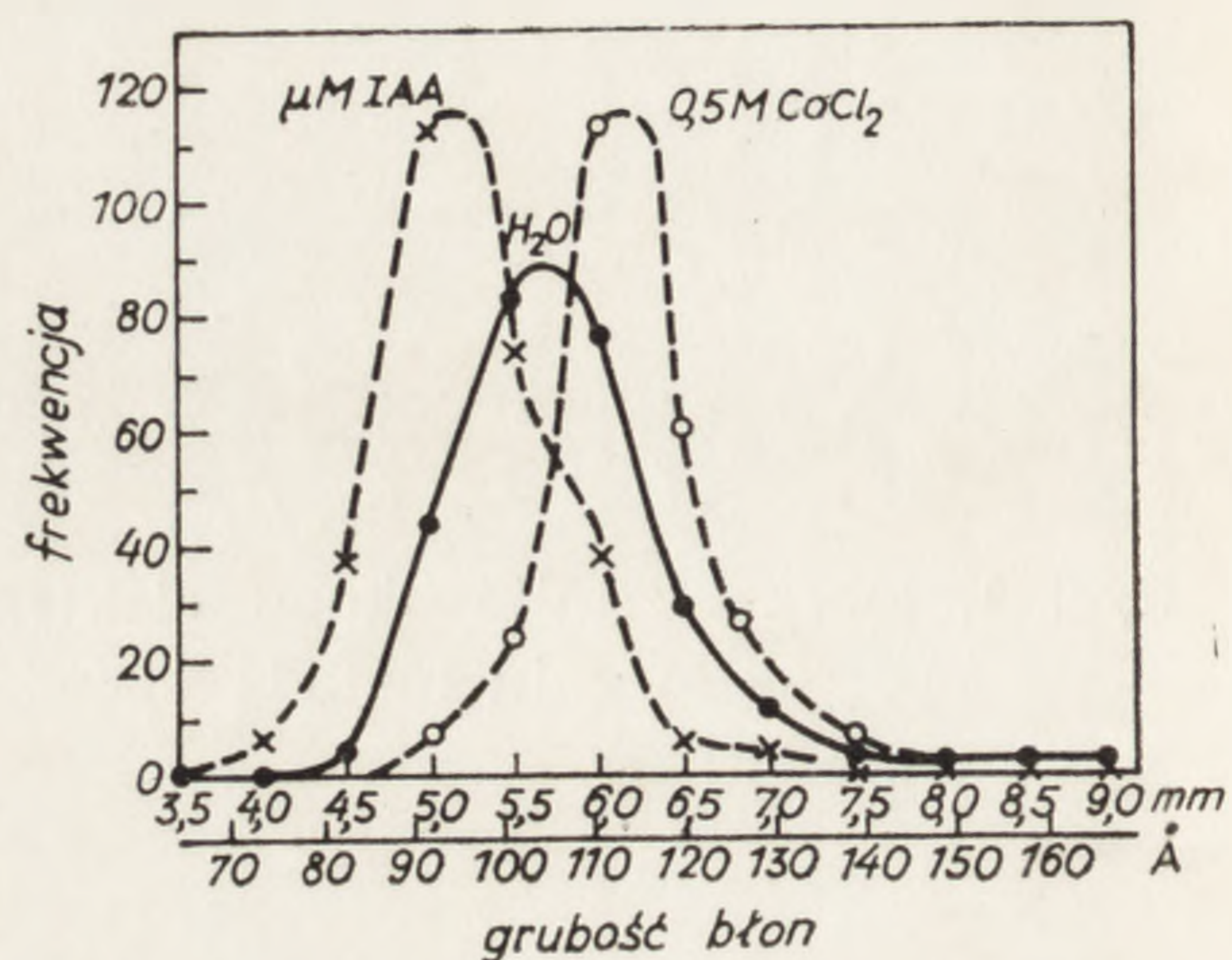
Ryc. 3. Powierzchnia protoplastu z liścia *Antirrhinum*, obraz otrzymany z mikroskopu skaningowego [9],  $\times 10\ 000$



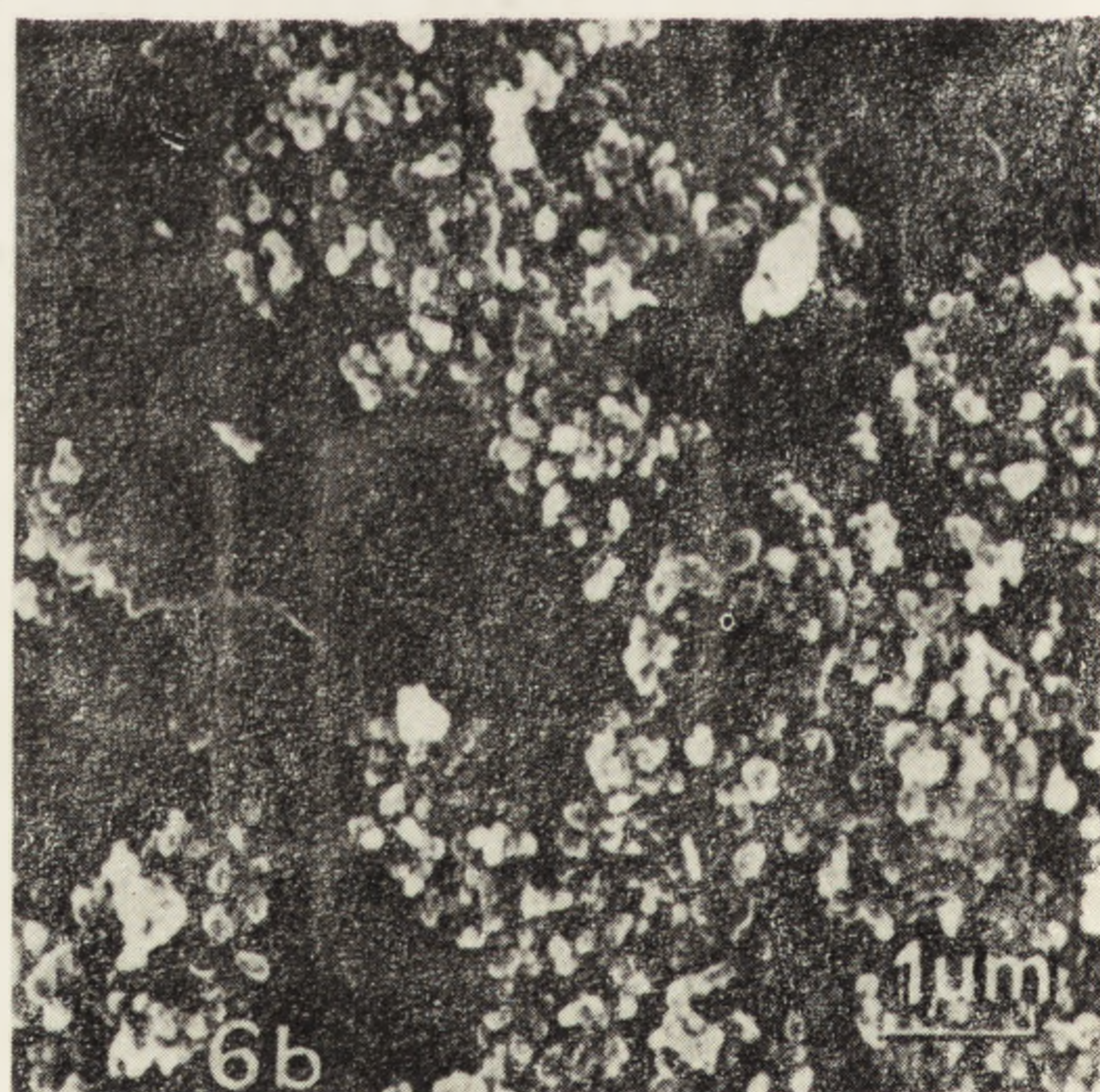
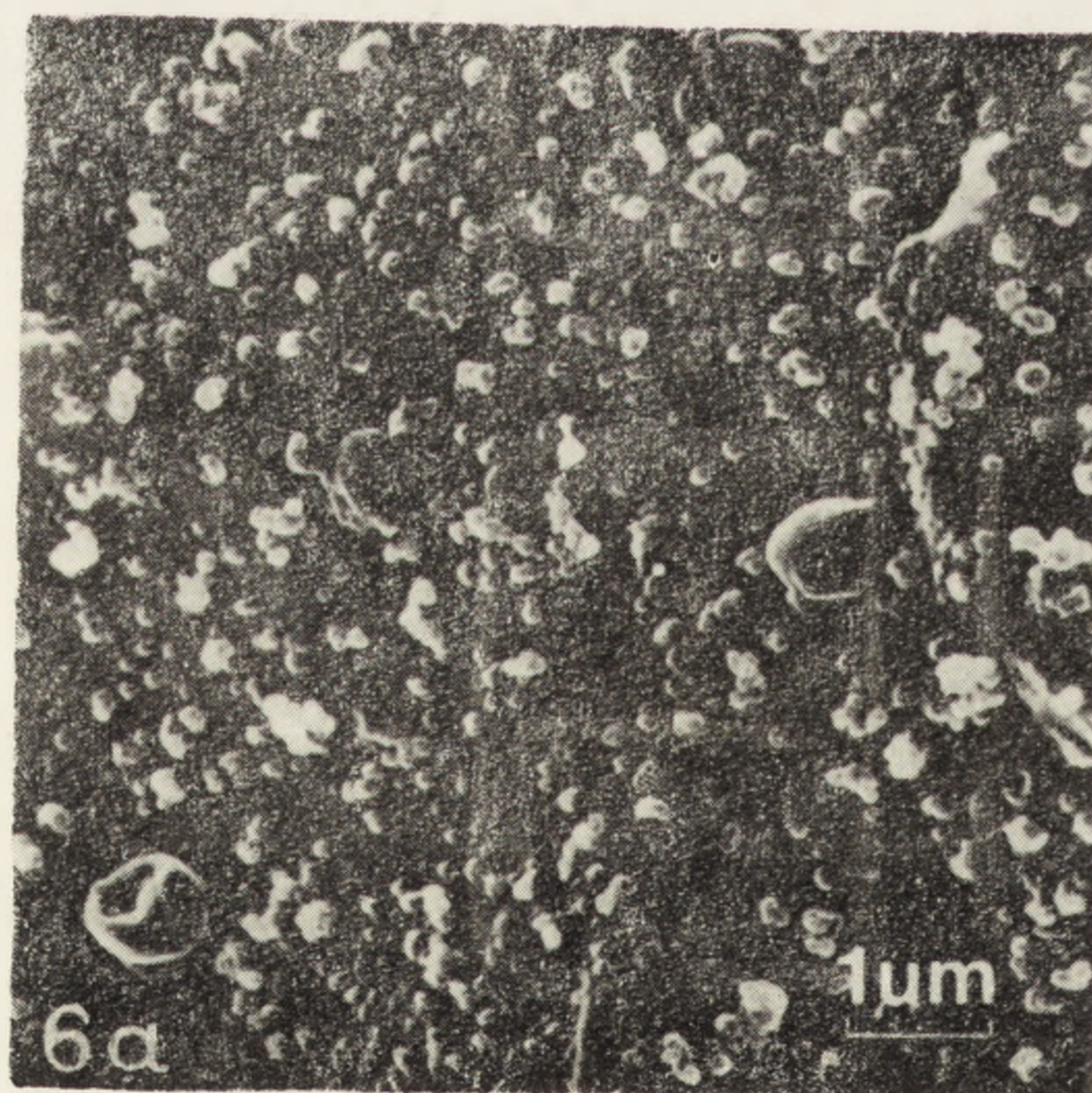


Ryc. 4. Obraz powierzchni przełomu plazmolemy z mikroskopu elektronowego (technika freeze fracturing) tkanki kalusowej *Skimmia japonica* [56]

PF — strona wewnętrzna plazmolemy, EF — strona zewnętrzna plazmolemy



Ryc. 5. Zmiany grubości błony plazmatycznej etiolowanych hypokotyli *Glicine max* pod wpływem IAA i  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}$  — kontrola) [41]



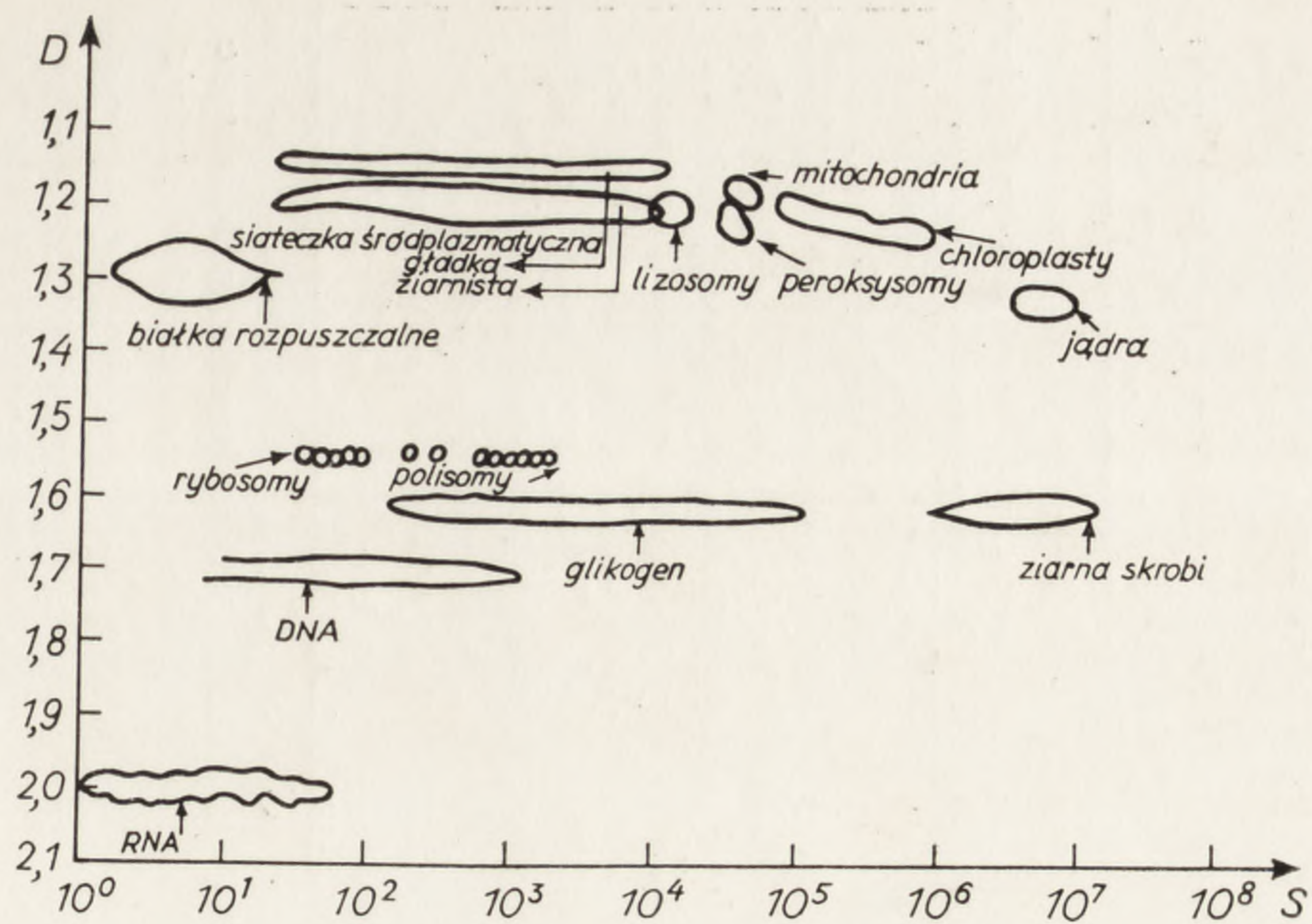
Ryc. 6a. Powierzchnia protoplastów liści tytoniu, obraz uzyskany z mikroskopu skaningowego [8]

Protoplast inkubowany przez 30 min w temperaturze  $5^\circ\text{C}$  w roztworze  $30 \mu\text{g/ml}$  AuConA — równomierne rozmieszczenie cząsteczek konkanawaliny A

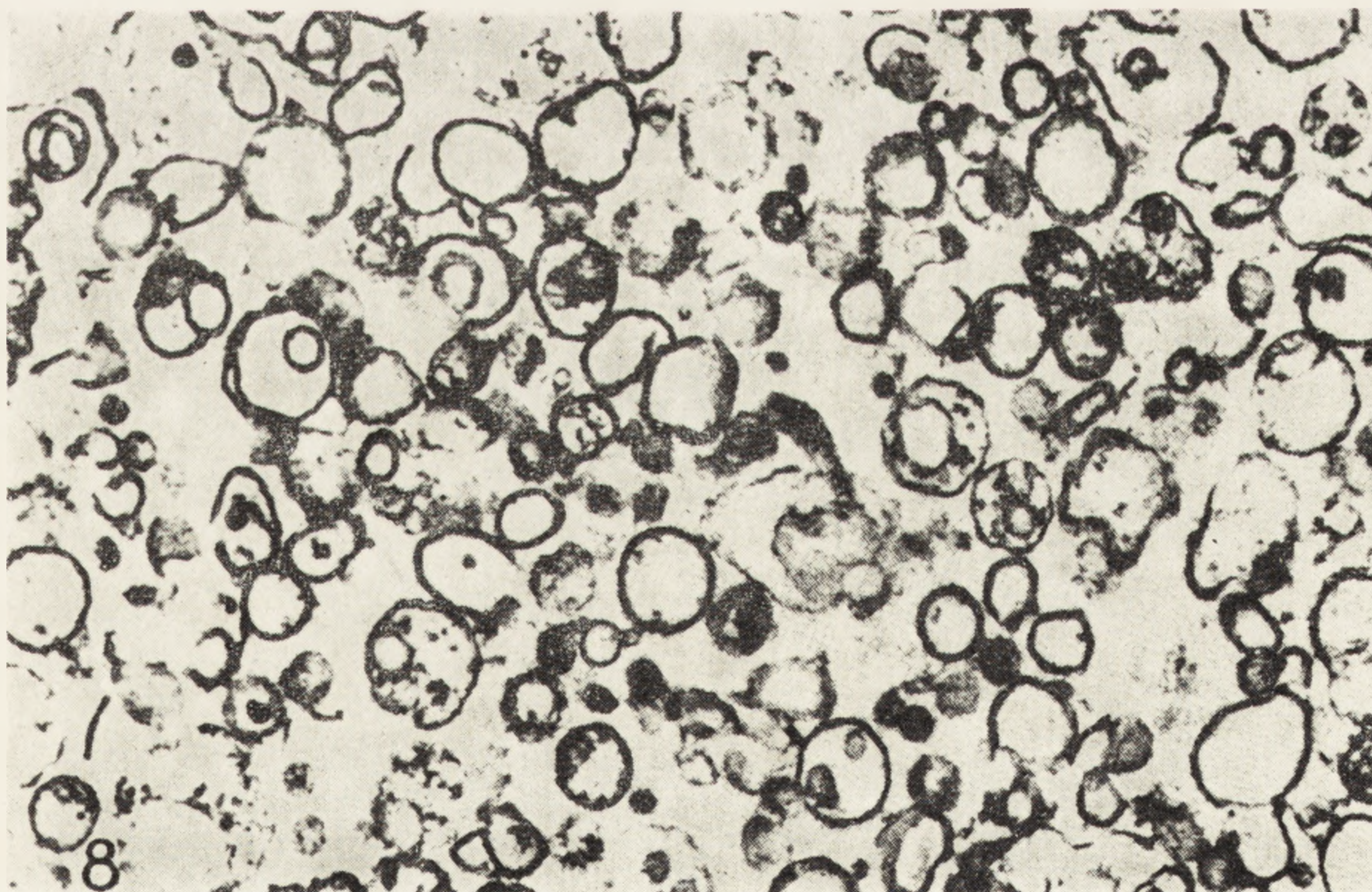
Ryc. 6b. Agregaty konkanawaliny A na powierzchni protoplastu liści tytoniu [8]

Protoplast inkubowany przez 60 min w temperaturze  $35^\circ\text{C}$  w roztworze  $30 \mu\text{g/ml}$  AuConA



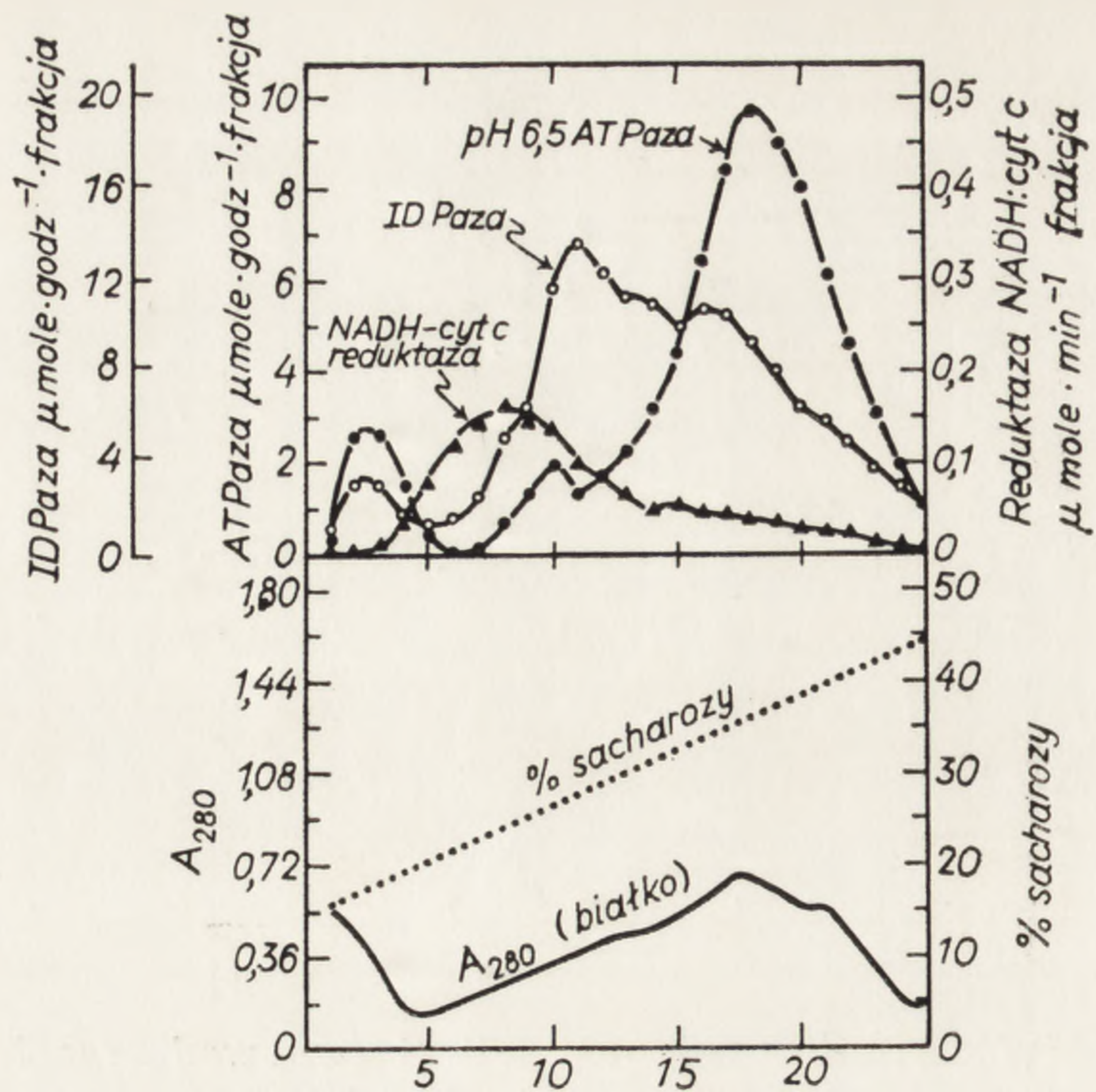


Ryc. 7. Zależność współczynnika sedymentacji S (w swedbergach) od gęstości D (g/cm<sup>3</sup>) dla błon i organelli komórkowych [53]

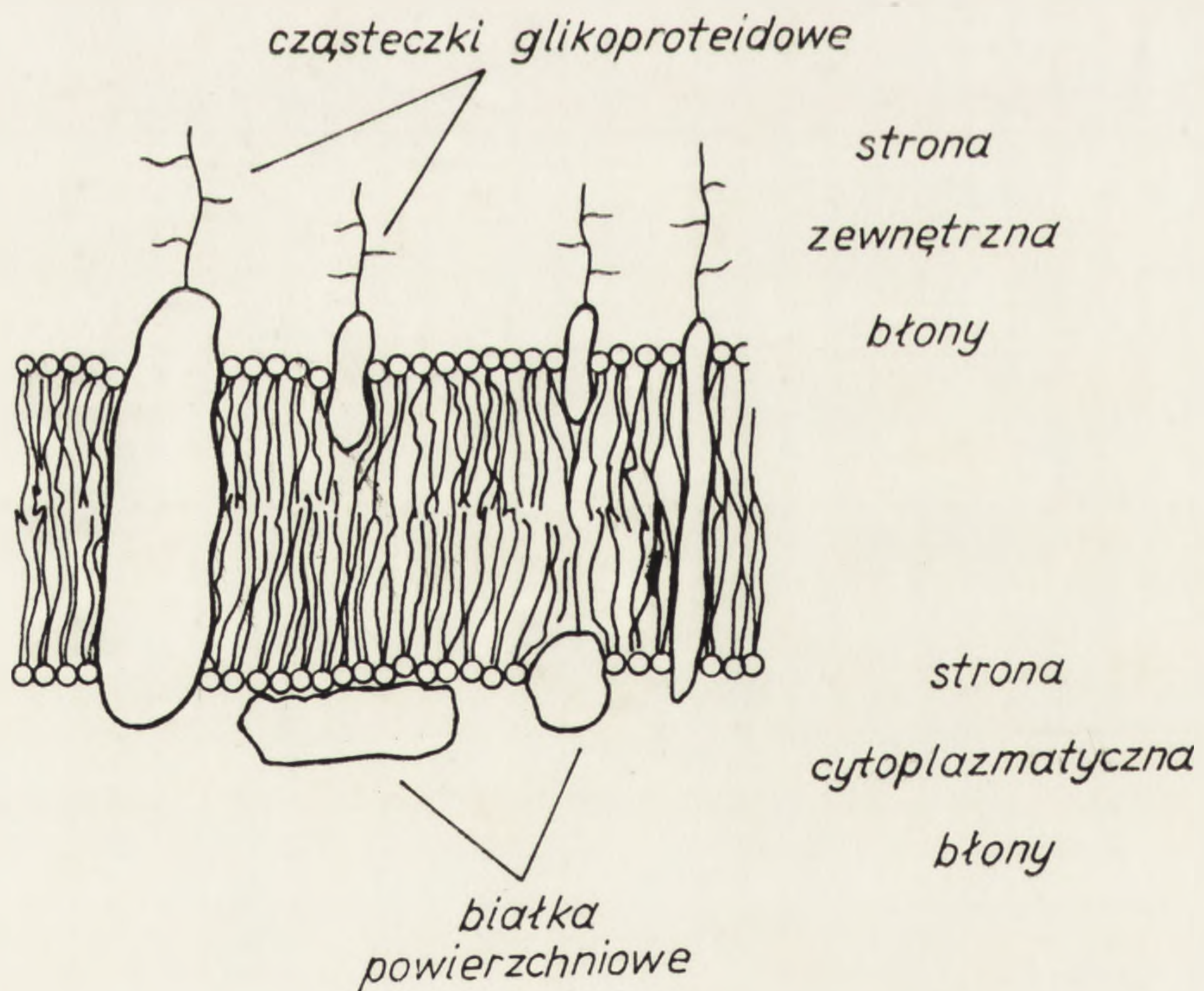


Ryc. 8. Obraz z mikroskopu elektronowego frakcji błon plazmatycznych liścienia fasoli barwiony techniką PTA - CrO<sub>3</sub> [30] × 29 000





Ryc. 9. Rozkład aktywności enzymatycznych błon z komórek korzeni kukurydzy rozfrakcjonowanych w gradiencie ciągłym sacharozy podczas wirowania przy 80 000 g przez 15 godz. [35]



Ryc. 10. Model błony plazmatycznej



nymi we frakcjach. Tabela 2 zestawia podstawowe enzymy markerowe stosowane do wyróżniania błon komórek roślinnych.

Markerem enzymatycznym dla siateczki śródplazmatycznej komórek roślinnych jest reduktaza NADPH:cytochrom c [10, 22, 26] oraz reduktaza NADH:cytochrom c. Ten ostatni enzym jest mniej specyficzny, gdyż występuje też w mitochondriach i peroksysomach, ale w tych ostatnich organellach reduktaza jest wrażliwa na Antymycynę A [15]. Dla określenia błon mitochondrialnych używa się oksydazy cytochromu c, przy czym, jak wykazano w materiale roślinnym, aktywność ta jest ściśle skorelowana z aktywnością ATPazy przy  $\text{pH}=9$  [35]. Za typową dla błon struktur Golgiego uważana jest „utajona” aktywność IDPazy. Aktywność IDPazowa może pojawiać się też w plazmolemie, natomiast typowe dla błon diktiosomów jest jej ujawnienie się dopiero po 48 - godzinnym przetrzymywaniu preparatu w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$  [55]. Ostatnio postuluje się jako enzym markerowy struktur Golgiego u roślin glukozylotransferazę UPD:sterol [36, 72]. Obecność błon tylakoidów można określić pomiarem absorpcji długofalowych pasm światła przez zawarte w nich chlorofile, natomiast za marker błon otoczki chloroplastów uważana jest ATPaza zależna od jonów  $\text{Ca}^{+2}$  [16]. Dla błony komórkowej komórek roślinnych brak enzymu markerowego, który byłby specyficzny i występował powszechnie w plazmolemie wszystkich obiektów. Typowa dla plazmolemy kręgowców 5'nukleotydaza albo wykazuje u roślin słabą aktywność [34], albo nie jest w ogóle wykrywalna [22, 32]. Jak dotychczas za najbardziej powszechny marker enzymatyczny plazmolemy komórek roślinnych uważana jest zależna od jonów  $\text{K}^{+}$  ATPaza w  $\text{pH}=6,5$  [25, 26, 34, 35]. Stwierdzono przynajmniej dla niektórych obiektów, że istnieje ścisła korelacja (współczynnik korelacji — 0,975) między aktywnością tego enzymu a zawartością błon plazmolemy we frakcji błonowej zmierzoną metodą PTA -  $\text{CrO}_3$  [35]. Jako enzym markerowy plazmolemy stosowano także syntezę  $\beta$  - glukanową II aktywną przy wysokich stężeniach UDPG w przeciwieństwie do syntetazy I stymulowanej jonami  $\text{Mg}^{+2}$  aktywnej przy niskich stężeniach UDPG, która jest charakterystyczna dla błon Golgiego [28, 55]. Ryc. 9 przedstawia przykładowo wyniki wirowania preparatu błon komórkowych w gradiencie ciągłym sacharozy i wyniki aktywności enzymów markerowych w poszczególnych frakcjach pozwalające na wyróżnienie m. in. frakcji błon wzbogaconych w plazmolemę.

#### SKŁAD PLAZMOLEMY

Podstawową trudność w dokładnym określeniu składu chemicznego plazmolemy stanowi fakt, że uzyskiwane dotychczas frakcje tej błony



są zawsze zanieczyszczone (do 30%) innymi rodzajami błon. Niemniej wyniki analiz pozwalają na stwierdzenie, że plazmolemę wyróżnia się spośród innych błon pewnymi charakterystycznymi cechami. Pierwszą z nich jest mniejsza ilość białek w plazmolemie w porównaniu z innymi błonami i co za tym idzie większa ilość lipidów przypadających na jednostkę białka. Stosunek masy lipidów do białek wynosi np. w plazmolemie korzeni owsa 1,17, podczas gdy średnio dla wszystkich błon wynosi 0,69, a w błonach mitochondrialnych spada do 0,49 [29]. Drugą charakterystyczną cechą wydaje się być wysoka zawartość steroli [25]. Stosunek steroli do fosfolipidów wynosi w plazmolemie korzeni kukurydzy 1,1–1,2, podczas gdy dla innych błon jest on znacznie niższy [25]. Szczególnie niski udział fosfolipidów (rzędu 1%) zarejestrowano dla plazmoemy liści trzciny cukrowej [62]. Analogicznie wysoki stosunek steroli do fosfolipidów stwierdzono dla plazmoemy komórek zwierzęcych. Stosunkowo niski jest w plazmolemie udział wolnych kwasów tłuszczowych [29]. Spośród lipidów obojętnych szczególnie duży udział przypada na trójglicerydy.

Nieliczne stosunkowo dane dotyczące składu chemicznego plazmoemy komórek roślinnych nie pozwalają stwierdzić, czy wszystkie wymienione cechy mają charakter ogólny i powszechny. Jak dotąd zupełnie brak informacji o asymetrii w składzie plazmoemy komórki roślinnej, jakkolwiek przez analogię z innymi organizmami [38] istnienie takiej asymetrii jest dalece prawdopodobne.

Z przedstawionych informacji na temat morfologii, składu i cech plazmoemy wynika, że nie są one sprzeczne z mozaikowym modelem błon zaproponowanym przez Singera i Nicolsona [63]. Przypuszczalny schemat struktury plazmoemy przedstawia ryc. 10.

Profesorowi drowi Janowi Zurzyckiemu składam serdeczne podziękowanie za cenne myśli i wskazówki dotyczące niniejszego artykułu.

#### LITERATURA

- [1] AMBROSE E. J., Cell shapes and cell contacts, *Acta Protozool.*, **11** : 9–20, 1972.
- [2] BARTHOLOMEW L., MACE K. D., Isolation and identification of phospholipids from root tip cell plasmalemma of *Phaseolus limensis*, *Cytobios*, **5** : 241–247, 1972.
- [3] BEFFAGNA N., COCUCCI S., MARRÈ E., Stimulating effect of fusicoccin on K-activated ATPase in plasmalemma preparations from higher plant tissues, *Plant Sci., Lett.*, **8** : 91–98, 1977.
- [4] BRAIN R. D., BRIGGS W. R., Light-induced cytochrome reduction in



- Neurospora crassa* membrane fractions, [w] Research in Photobiology, red. A. Castellani, Plenum Publishing Corporation, 1977, 539-544.
- [5] BRAIN R. D., FREEBERG J. A., WEISS Ch. V., BRIGGS W. R., Blue light - induced absorbance changes in membrane fractions from corn and *Neurospora*, Plant Physiol., 59 : 948-952, 1977.
- [6] BRUNNER G., HEIDRICH H. G., GOLECKI J. R., BAUER H. C., SUTER D., PLÜCKHAHN P., FERBER E., Fractionation of membrane vesicles. II. A method for separation of membrane vesicles bearing different enzymes by free - flow electrophoresis, Biochim. Biophys. Acta, 471 : 195-212, 1977.
- [7] BURGESS J., LINSTEAD P. J., Ultrastructural studies of the binding of Concanavalin A to the plasmalemma of higher plant protoplasts, Planta, 130 : 73-79, 1976.
- [8] — Membrane mobility and the Concanavalin A binding system of the plasmalemma of higher plant protoplasts, Planta, 136 : 253-259, 1977.
- [9] BURGESS J., LINSTEAD P. J., BONSALE V. E., Observations on the time course of wall development at the surface of isolated protoplasts, Planta, 139 : 85-91, 1978.
- [10] CASSAGNE C., LESSIRE R., CARDE J. P., Plasmalemma enriched fraction from leek (*Allium porrum* L.) epidermal cells, Plant Sci. Lett., 7 : 127-135, 1976.
- [11] CLARK J. E., MORRÉ D. J., CHERRY J. H., YUNGHANS W. N., Enhancement of RNA polymerase activity by non - protein components from plasma membranes of soybean hypocotyls, Plant Sci. Lett., 7 : 233-238, 1976.
- [12] COSTER H. G. L., ZIMMERMANN U., Transduction of turgor pressure by cell membrane compression, Z. Naturforsch., 31c : 461-463, 1976.
- [13] COSTER H. G. L., STEUDLE E., ZIMMERMANN U., Turgor pressure sensing in plant cell membranes, Plant Physiol., 58 : 636-643, 1976.
- [14] COULOMB C., Diversité des corps multivésiculaires et notion d'hétérophagie dans le méristème racinaire de scorsonère (*Scorzonera hispanica*), J. Microscopie, 16 : 345-360, 1973.
- [15] DONALDSON R. P., TOLBERT N. E., SCHNARRENBERGER C., A comparison of microbody membranes with microsomes and mitochondria from plant and animal tissue, Arch. Biochem. Biophys., 152 : 199-215, 1972.
- [16] DOUCE R., HOLTZ R. B., BENSON A. A., Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts, J. Biol. Chem., 248 : 7215-7222, 1973.
- [17] FALK R. H., STOCKING C. R., Plant membranes, [w] Transport in Plants, Encyclopedia of Plant Physiology 3, red. C. R. Stocking, U. Heber, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 3-50.
- [18] FISHER J., HODGES T. K., Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots, Plant Physiol., 44 : 385-395, 1969.
- [19] FREY - WYSSLING A., MÜHLETHALER K., Plasmalemma, [w] Ultrastructural Plant Cytology with an introduction to Molecular Biology, Amsterdam, London, New York 1965, 140-157.
- [20] FUHRMANN G. F., WEHRLI E., BOEHM C., Preparation and identification of yeast plasma membrane vesicles, Biochim. Biophys. Acta, 363 : 295-310, 1974.
- [21] GALSTON A. W., BRITZ S. J., BRIGGS W. R., Blue - light - induced absorbance changes in membrane fractions from *Pisum sativum*, Carnegie Institution Year Book, 76 : 293-295, 1977.
- [22] HALL J. L., FLOWERS T. J., Properties of membranes from the halophyte



- Suaeda maritiana*. II. Distribution and properties of enzymes in isolated membrane fractions, *J. Exp. Bot.*, **27** : 673-689, 1976.
- [23] HARDIN J. W., CHERRY J. H., MORRÉ D. J., LEMBI C. A., Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released from plasma membrane, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69** : 3146-3150, 1972.
- [24] HENDRIKS T., Iodination of maize coleoptiles: a possible method for identifying plant plasma membranes, *Plant Sci. Lett.*, **7** : 347-357, 1976.
- [25] HODGES T. K., LEONARD R. T., BRACKER C. E., KEENAN T. W., Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: Association with plasma membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69** : 3307-3311, 1972.
- [26] HODGES T. K., LEONARD R. T., Purification of plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots, *Methods Enzymol.*, **32** : 392-406, 1974.
- [27] HUANG A. H. C., Comparative studies of glyoxysomes from various fatty seedlings, *Plant Physiol.*, **55** : 870-874, 1975.
- [28] JESAITIS A. J., HENERS P. R., HERTEL R., BRIGGS W. R., Characterization of a membrane fraction containing a b-type cytochrome, *Plant Physiol.*, **59** : 941-947, 1977.
- [29] KEENAN T. W., LEONARD R. T., HODGES T. K., Lipid composition of plasma membranes from *Avena sativa* roots, *Cytobios*, **7** : 103-112, 1973.
- [30] KOEHLER D. E., LEONARD R. T., Van Der WOUDE W. J., LINKINS A. E., LEWIS L. N., Association of latent cellulase activity with plasma membranes from kidney bean abscission zones, *Plant Physiol.*, **58** : 324-330, 1976.
- [31] KURSANOV A. L., PARAMONOVA N. W., Ultrastrukturnyje izmienienija w mezofille listiew *Beta vulgaris* L. w swjazi z transportom assimilatow, *Fizjologja Rast.*, **23** : 286-291, 1976.
- [32] LAI Y. F., THOMPSON J. E., The preparation and properties of an isolated plant membrane fraction enriched in (Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>) stimulated ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **233** : 84-90, 1971.
- [33] LEMBI C. A., MORRÉ D. J., THOMPSON K. St., HERTEL R., N-1-Naphthylphthalamic-acid-binding activity of plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles, *Planta*, **99** : 37-45, 1971.
- [34] LEONARD R. T., HANSEN D., HODGES T. K., Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots, *Plant Physiol.*, **51** : 749-754, 1973.
- [35] LEONARD R. T., Van Der WOUDE W. J., Isolation of plasma membranes from corn roots by sucrose density gradient centrifugation an anomalous effect of ficoll, *Plant Physiol.*, **57** : 105-114, 1976.
- [36] LERCHER M., WOJCIECHOWSKI Z. A., Localization of plant UDP-Glucose:sterol Glucosyltransferase in the Golgi membranes, *Plant Sci. Lett.*, **7** : 337-340, 1976.
- [37] LORD J. M., KAGAWA T. MOORE T. S., BEEVERS H., Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm, *J. Cell Biol.*, **57** : 659-667, 1973.
- [38] MICHALAK M., SARZAŁA G., Asymetria błon biologicznych, *Post. Biochem.*, **23** : 523-539, 1977.
- [39] MORGAN D. G., SÖDING H., Über die Wirkungsweise von Phthalsäuremono- $\alpha$ -Naphthylamid (PNA) auf das Wachstum der Haferkoleoptile. *Planta*, **52** : 235-249, 1958.
- [40] MORRÉ D. J., ROLAND J. C., LEMBI C. A., Comparisons of isolated plasma



- membranes from plant stems and rat liver, Proc. Indiana Acad. Sci., **79** : 96–106, 1970.
- [41] MORRÉ D. J., BRACKER Ch. E., Ultrastructural alteration of plant plasma membranes induced by auxin and calcium ions, Plant Physiol., **58** : 544–547, 1976.
- [42] NEVILLE D. M., The isolation of a cell membrane fraction from rat liver, J. Biophys. Biochem. Cytol., **8** : 413–422, 1960.
- [43] NISHIZAWA N., MORI S., Invagination of plasmalemma: Its role in the absorption of macromolecules in rice roots, Plant Cell Physiol., **18** : 767–782, 1977.
- [44] O'BRIEN T. P., Observation on the fine structure of the oat coleoptile. I. The epidermal cells of the extreme apex, Protoplasma **63** : 385–416, 1967.
- [45] OCHAŁEK T., Zastosowanie konkanawaliny A w badaniu antygenów komórki stransformowanej, Z. Nauk. U.J. Prace z Biol. Molek., **3** : 91–97, 1976.
- [46] OVERTON E., Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle, Jb. wiss. Bot., **34** : 669–701, 1900.
- [47] PATNI N. J., BILLMIRE E., AARONSON S., Isolation of the *Ochromonas danica* plasma membrane and identification of several membrane enzymes, Biochim. Biophys. Acta, **373** : 347–355, 1974.
- [48] PFEFFER W., Osmotische Untersuchungen, Leipzig, W. Engelmann, 1877.
- [49] — Zur Kenntnis der Plasmahaut und der Vakuolen nebst Bemerkungen über den Aggregatzustand des Protoplasmas und über osmotische Vorgänge, Abh. math. - phys. Kl. sächs. Ges. Wiss., **16** : 185–343, 1890.
- [50] PIERRE J. W., DeKARNOVSKY M. L., Plasma membranes of mammalian cells, J. Cell Biol., **56** : 275–305, 1973.
- [51] PLOWE J. Q., Membranes in the plant cell. I. Morphological membranes at protoplasmic surface, Protoplasma, **12** : 196–221, 1931.
- [52] POUX N., Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du meristem radicaire de *Cucumis sativus* L. I. Activités phosphotiques neutres dans les cellules du protoderm, J. Microsc., **6** : 1043–1058, 1967.
- [53] PRICE C. A., Plant cell fractionation, Methods Enzymol., **31A** : 501–519, 1974.
- [54] QUAIL P. H., BROWNING A., Failure of lactoperoxidase to iodinate specifically the plasma membrane of Cucurbita tissue segments, Plant Physiol., **59** : 759–766, 1977.
- [55] RAY P. M., SHININGER T. L., RAY M. M., Isolation of  $\beta$ -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **60** : 605–612, 1969.
- [56] ROBENEK H., PEVELING E., Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of *Skimmia japonica* Thunb., Planta, **136** : 135–145, 1977.
- [57] ROBERTSON J. D., The organisation of cellular membranes, [w] Molecular Organisation and Biological Function, red. J. M. Allen, New York, Harper and Row 1967, 65–106.
- [58] ROLAND J. C., LEMBI C. A., MORRÉ D. J., Phosphotungstic acid - chromic acid as a selective electron - dense stain for plasma membranes of plant cells, Stain Technol., **47** : 195–200, 1972.
- [59] SCHIBERI A., RATTRAY J. B. M., KIDBY D. K., Isolation and identification of yeast plasma membrane, Biochim. Biophys. Acta, **311** : 15–25, 1973.
- [60] SCHMIDT W., THOMSON K., BUTLER W. L., Cytochrome b in plasma



- membrane enriched fractions from several photoresponsive organisms, *Photochem. Photobiol.*, **26** : 407-411, 1977.
- [61] SEIFRIZ W., The physical chemistry of cytoplasm, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, red. W. Ruhland, Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1955, 340-382.
- [62] SINENSKY M., STROBEL G., Chemical composition of a cellular fraction enriched in plasma membranes from sugarcane, *Plant Sci. Lett.*, **6** : 209-214, 1976.
- [63] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175** : 720-731, 1972.
- [64] SITTE P., *Ultrastruktura komórki roślinnej*, PWRiL, Warszawa 1970, 129-153.
- [65] SPANNER D. C., JONES R. L., The sieve tube wall and its relation to translocation, *Planta*, **92** : 64-72, 1970.
- [66] TOLBERT N. E., OESER A., KISAKI T., HAGEMAN R. H., YAMAZAKI R. K., Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism, *J. Biol. Chem.*, **243** : 5179-5184, 1968.
- [67] TRAVIS R. L., WOODS W. G., Studies on the mechanism of action dinitramine effect on soybean root plasma membrane, *Plant Physiol.*, **60** : 54-57, 1977.
- [68] Van Der WOUDE W. J., Significance of the specific staining of plant plasma membranes by treatment with chromic acid - phosphotungstic acid, *Plant Physiol.*, **51** : S82, 1973.
- [69] WALKER N. A., Ion permeability of the plasmalemma of the plant cells, *Nature*, **180** : 94-95, 1957.
- [70] — The electric resistance of the cell membranes in *Chara* and *Nitella* species, *Australian J. Biol. Sci.*, **13** : 468-478, 1960.
- [71] WHALEY W. G., MOLLENHAUER H. H., LEECH J. H., The ultrastructure of the meristematic cell, *Amer. J. Bot.*, **47** : 401-449, 1960.
- [72] WOJCIECHOWSKI Z. A., VAN UON N., Intracellular localization and some properties of UDPG: sterol Glucosyltransferase from *Calendula officinalis*, *Acta Biochim. Polon.*, **32** : 25-38, 1975.
- [73] ZURZYCKI J., Experimental modification of the reaction pattern of *Lemna* leaf cells to polarized light, *Protoplasma*, **68** : 193-207, 1969.

Otrzymano: 30 sierpnia 1978.

Przyjęto: 13 września 1978.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31 - 001 Kraków.



## PROTEAZY BIAŁEK CHROMATYNY

## PROTEASES OF CHROMATIN PROTEINS

Henryk LUBOŃ i Danuta TYRAWSKA - SPYCHAŁOWA

Zakład Biochemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach  
Zakład Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczo - Pedagogicznej w Siedlcach

*Streszczenie.* Niektóre komórkowe enzymy proteolityczne charakteryzują się dużym powinowactwem do białek chromatynowych. Obecność ich wykazano w obrębie organelli cytoplazmatycznych i w jądrze komórkowym. Aktualnie wyodrębniono i opisano właściwości dwóch enzymów proteolitycznych będących integralnym składnikiem chromatyny. Aktywność proteaz białek chromatyny zmienia się w erytroporezie i spermatogenezie. Uważa się, że uczestniczą one w indukcji proliferacji oraz w działaniu hormonów na tkanki docelowe. Obserwowano także różnice tkankowe w aktywności proteaz. Sugeruje się, że proteazy białek jądrowych mogą pełnić pewną rolę w regulacji czynności genów organizmów eukariotycznych.

*Summary.* Some cell proteolytic enzymes show a considerable relationship to chromatin proteins. Their presence has been indicated within cytoplasmic organelles and in nucleus. The two proteolytic enzymes being an integral part of chromatin were isolated and their properties described recently. Activity of proteases of chromatin proteins changes during maturation of erythroid cells and spermatogenesis. It is considered that the protease are involved in the stimulation of proliferation and effects of hormones on target tissues. Tissue specific in protease activity has been observed. It is suggested that proteases of nuclear proteins may play a role in the gene regulation of eucaryotic organisms.

Aktywność enzymów proteolitycznych w jądrach komórkowych [22, 75], chromatynie [71] lub w wyodrębnionych frakcjach białek jądrowych [74] obserwowano od wielu lat. Występowanie enzymów proteolitycznych w materiale wyodrębnionym z jąder komórkowych potwierdziły badania przy zastosowaniu różnorodnych technik, jak np. chromatografia kolumnowa [80], elektroforeza w żelu skrobiowym [69, 84] i poliakrylamidowym [72, 73], spektrofotometria [76], doświadczenia z piętno-



wanymi substratami [9] i inhibitorami [10], oznaczanie grup końcowych aminokwasów w preparatach białek chromatynowych [74] i obserwacje aktywności matrycowej chromatyny [82].

Aktywność proteolityczną stwierdzono w chromatynie tego samego narządu z różnych gatunków zwierząt: grascicy szczura i cielęcia [9, 27-29], a także w chromatynie izolowanej z różnych narządów tego samego organizmu, jak np. wątroba, nerka, jądro, mózg szczura [9] lub płuco, śledziona, nerka wieprza (cyt. według [58]). Występowanie proteaz białek chromatyny stwierdzono także w tkankach nowotworowych typu raka Novikoffa [2], wysięku Ehrlicha [14] oraz w różnych odmianach wątrobiaka Morrisa [12, 51]. Endogenną degradację białek chromatyny obserwowano ponadto u roślin, np. w chromatynie zarodków grochu [49], ziarnach pyłku sagowca [6] i w liścieniach żyta [60].

Wysiłki badaczy skupiły się początkowo na wykluczeniu możliwości degradacji białek jądra komórkowego w czasie postępowania preparatywnego, co było warunkiem niezbędnym w badaniu ich właściwości fizykochemicznych. Ograniczenie aktywności enzymów proteolitycznych osiągnięto poprzez preparowanie białek jądrowych w niskich temperaturach (0°-4°C) oraz w obecności inhibitorów enzymów proteolitycznych.

Ostatnio komórkowe enzymy proteolityczne o dużej specyficzności w stosunku do białek chromatynowych wzbudzają coraz większe zainteresowanie z uwagi na możliwość ich udziału w mechanizmie regulacji aktywności genomu organizmów eukariotycznych.

#### WEWNĄTRZKOMÓRKOWE ROZMIESZCZENIE PROTEAZ

Lizosomy, mitochondria, peroksosomy, cytoplazma podstawowa i jądro komórkowe posiadają częściowo specyficzne układy enzymów proteolitycznych zdolnych do degradacji egzogennych białek (cyt. według [5]). Fakt występowania w różnych frakcjach komórkowych enzymów proteolitycznych utrudnia precyzyjne określenie źródła proteolitycznej aktywności w poszczególnych frakcjach. Szczególnie pochodzenie enzymów wykrywanych w jądrach komórkowych i chromatynie jest w świetle dotychczasowych doniesień zagadnieniem niejasnym. Część badaczy uważa, że degradacja białek w jądrach komórkowych, chromatynie i oczyszczonych frakcjach białek chromatynowych jest spowodowana obecnością enzymów pochodzenia cytoplazmatycznego. Według tej koncepcji enzymy proteolityczne cytoplazmy podstawowej i organelli cytoplazmatycznych mogą się adsorbować na zewnętrznej błonie jądra komórkowego w czasie postępowania preparatywnego lub też tworzyć kompleksy z chromatyną preparowaną bezpośrednio z całej tkanki. Frakcja lizyno - bogatych hi-



stonów, izolowana z jąder komórkowych grasicy cielęcej, inkubowanych wcześniej w temperaturze 37°C daje dodatkowe pasmo wykrywane elektroforezą w żelu poliakrylamidowym [80]. Stopień hydrolizy histonu lizyno - bogatego jest uzależniony od ilości całych komórek obecnych w zawieszynie jąder komórkowych, degradacja zmniejsza się jeżeli preparat jąder komórkowych zawiera więcej całych komórek. Stellwagen i wsp. [80] uważają, że aktywacja enzymów degradujących histony jest związana z rozerwaniem komórek w czasie homogenizacji i adsorpcją na błonie jądra komórkowego mikrosomów zawierających proteazy. Zastosowanie w preparatyce jąder komórkowych roztworów zawierających detergent niejonowy (Triton X - 100) nie wywołuje różnic w obrazach elektroforetycznych białek chromatynowych wątroby myszy lub szczura izolowanych z jąder komórkowych przed lub po krótkiej inkubacji (15 min w temperaturze 37°C). Stwierdzono jednak intensywną degradację białek nukleoplazmatycznych [77]. Triton X - 100 powoduje usunięcie zewnętrznej błony jądra komórkowego, co ma duży wpływ na właściwości przechowywanej chromatyny [82]. Aktywność matrycowa chromatyny wątroby szczura wzrasta o 12% w ciągu 36 dni (w temperaturze 2°C), jeżeli chromatynę otrzymano z jąder komórkowych preparowanych w obecności Tritonu X - 100, i odpowiednio o 50% i 150% w ciągu 25 dni, w przypadku chromatyny wyodrębnionej z jąder komórkowych preparowanych bez stosowania detergentu lub też w przypadku chromatyny izolowanej bezpośrednio z tkanki (ryc. 1).

Chromatyna otrzymana z jąder preparowanych w obecności Tritonu X - 100 zawiera także najmniej fosfolipidów i enzymów pochodzenia cytoplazmatycznego. Sugeruje to, że niektóre proteazy degradujące białka chromatyny pochodzą z fragmentów błon retikulum endoplazmatycznego oraz zewnętrznej błony jądra komórkowego. Podobne wnioski o występowaniu proteaz białek chromatynowych w zewnętrznej błonie jądra komórkowego wysnuto na podstawie badań wpływu antybiotyków na stabilność białek jądra komórkowego nerki psa [52-54].

Wysoka aktywność proteolityczna chromatyny izolowanej bezpośrednio z tkanki wydaje się być spowodowana występowaniem dodatkowego enzymu. Wnioski takie sprecyzowano na podstawie doświadczeń ze znakowanym  $H^3$  dwuizopropylofluorofosforanem. W rozdziałach białek chromatyny wątroby szczura, izolowanej bezpośrednio z tkanki w żelu poliakrylamidowym, wykryto pasmo białkowe o masie cząsteczkowej 100 000 daltonów wiążące znakowany inhibitor, a które nie występuje w chromatynie preparowanej z jąder komórkowych [10]. Degradację białek chromatynowych mogą powodować enzymy pochodzenia lizosomowego [19-21]. Kwaśne i obojętne proteazy frakcji lizosomowej wątroby szczura hydrolizują histony w chromatynie wątroby szczura i erytrocytów.



*Xenopus laevis* [21]. Proteaza obojętna lizosomów leukocytów królika wykazuje dużą specyficzność w stosunku do histonów i aktywność jej wzrasta w miarę oczyszczania frakcji lizosomowej [19, 20]. Brak aktywności tego enzymu w całych komórkach potwierdza przypuszczenie Stellwagena i wsp. [80] o wpływie rozbicia komórki na proteolizę białek chromatynowych.

Innym zanieczyszczeniem jąder komórkowych i chromatyny mogą być enzymy pochodzenia mitochondrialnego, wśród których stwierdzono obecność obojętnej proteazy o dużym powinowactwie do histonów [33, 34, 38].

Z drugiej strony, wiele badań przemawia za występowaniem enzymów proteolitycznych białek chromatynowych *in vivo* w jądrze komórkowym. Wskazują na to doświadczenia, w których inkubowano jądra komórkowe w temperaturze 37°C, w środowisku obojętnym. Jak wcześniej wspomniano, obserwowano stabilność białek chromatynowych po krótkiej inkubacji [77]. Inkubacja ponad jedną godzinę powoduje zmiany w obrazach elektroforetycznych białek chromatyny ludzkich limfocytów, leukocytów białaczkowych [85] i komórek macicy szczura [44]. Jednocześnie wyraźnie obniża się po inkubacji ilość piętnowanych aminokwasów w jądrach komórkowych wątroby szczura [5] oraz ludzkich limfocytów i leukocytów białaczkowych [85].

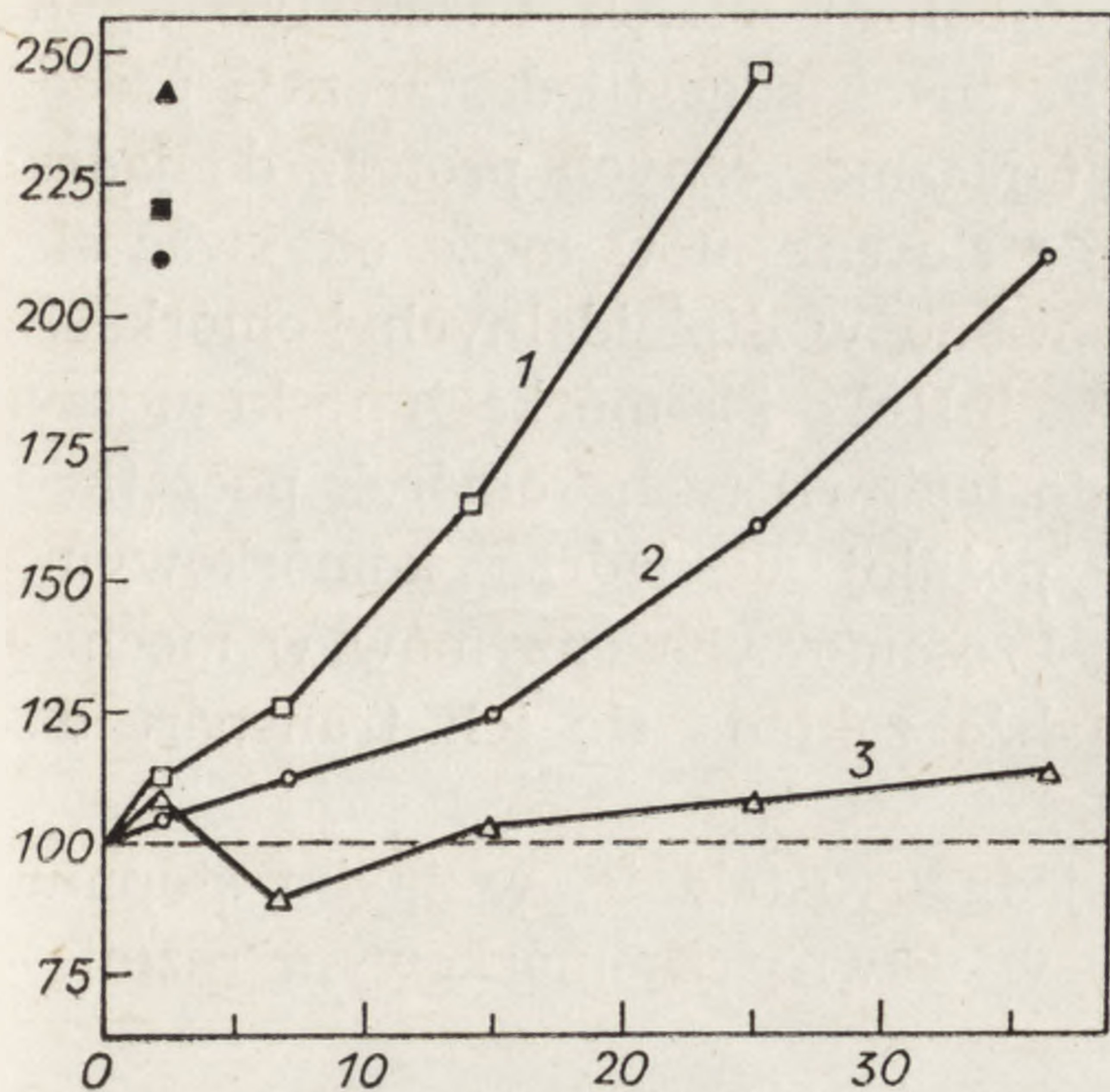
Dokładne badania wpływu postępowania preparatywnego na aktywność proteaz w chromatynie [9] wykazały, że preparaty chromatyny wątroby szczura, otrzymane powszechnie stosowanymi metodami, posiadają aktywność enzymów proteolitycznych, mimo stosowania w niektórych metodach Tritonu X-100 na etapie otrzymywania jąder komórkowych. Użycie kwasu cytrynowego w izolowaniu jąder komórkowych nie wyklucza aktywności proteolitycznej w otrzymanych preparatach chromatyny [2].

Aktywność proteolityczną stwierdzono również w wyodrębnionych frakcjach białek jądrowych, tj. białkach nukleoplazmatycznych [47], białkach chromatynowych rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl [31], histonach oraz innych białkach ekstrahujących się z chromatyny roztworem 0,25 N HCl [6, 57-59, 70]. Powoduje to szereg trudności w rekonstrukcji chromatyny z oczyszczonych komponentów (histonów, białek niehistonowych i DNA) [11, 13, 14].

Jak wynika z przedstawionych danych, enzymy proteolityczne o dużej specyficzności w odniesieniu do białek chromatynowych i białek nukleoplazmatycznych są obecne w jądrze komórkowym i innych organelach komórkowych.

Jak można przypuszczać na podstawie wspomnianych danych, pozajądrowe i jądrowe enzymy proteolityczne mogą jednak stanowić cało-

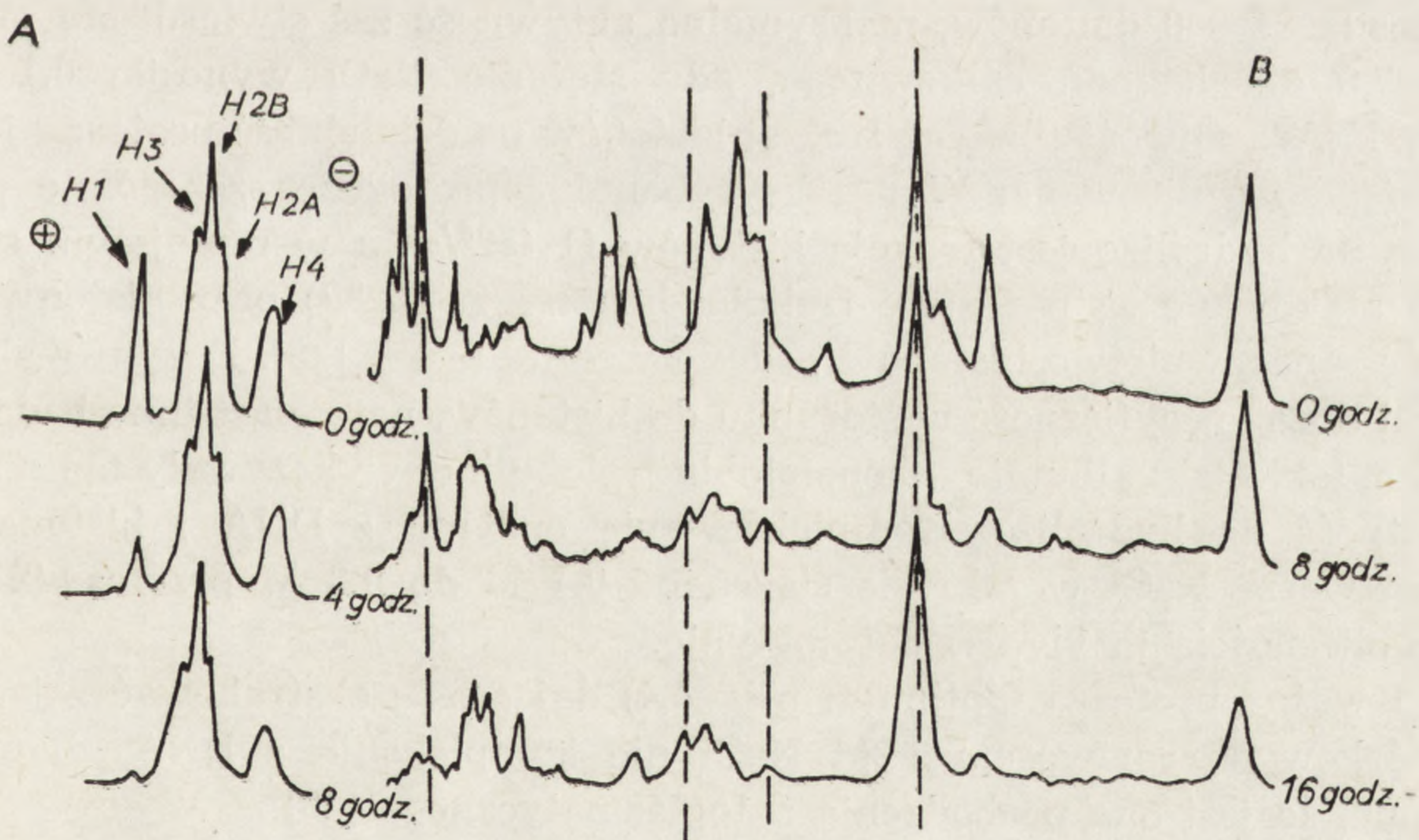




Ryc. 1. Zmiany aktywności matrycowej chromatyny wątroby szczura w czasie przechowywania w temperaturze 2°C (w obecności  $10^{-8}$  M -  $\text{NaN}_3$ ) [82]

Chromatynę preparowano bezpośrednio z tkanki (1), jąder komórkowych (2) oraz jąder komórkowych otrzymanych w obecności Tritonu x-100 (3).

Czarne symbole ■, ▲, ● określają wzrost syntezy RNA in vitro przy zastosowaniu jako matrycy próbek chromatyn trawionych pronazą w ciągu 90 min



Ryc. 2. Wykresy densytometryczne rozdzielania w żelu poliakrylamidowym białek chromatynowych wątroby szczura degradowanych przez endogenną proteazę [30] Chromatynę inkubowano w roztworze 0,04 M NaCl — 10 mM Tris (pH=8) w różnym czasie i preparowano histony (A) oraz niehistonowe białka chromatyny (B)



ściowy układ odpowiedzialny za katabolizm białek chromatynowych i innych białek jądra komórkowego. Pewnych sugestii dostarczają prace, w których potwierdzono transport cytoplazmatycznych proteaz do jądra komórkowego [45, 81]. Przemieszczanie się enzymów może odbywać się w oparciu o mechanizm jaki obserwowano w diploidalnych komórkach ludzkich fibroblastów WI - 38, komórkach HeLa i komórkach nerki myszy CBM - 17 [40, 64] – trypsynę dodaną do hodowli tych komórek początkowo wykrywano w cytoplazmie, a później w jądrze komórkowym. W modelowych rozważaniach udziału lizosomowych enzymów w mechanizmie kontroli aktywności genów także zakłada się ich transport do jądra komórkowego [41].

Problemem otwartym pozostaje jednak ustalenie, w jakim stopniu ingerencja badacza powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu enzymów proteolitycznych.

#### PREPAROWANIE I NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI ENZYMÓW ZWIĄZANYCH Z CHROMATYNĄ

Pierwszą próbę izolowania enzymu wykrytego w jądrach komórkowych i chromatynie grasicy cielęcej podjęli Furlan i Jericijo [27–29]. Rozpuszczoną w 2,5 M NaCl chromatynę traktowano absolutnym etanolem w celu wytrącenia DNA. Frakcję białkową rozdzielono na żelu Sephadex G - 75, zbierając część frakcji posiadającą aktywność proteolityczną i dodatkowo oczyszczono ją poprzez autolizę. Masa cząsteczkowa enzymu wynosiła 24 000 daltonów, maksymalną aktywność zaś stwierdzono przy  $\text{pH}=7,8$  dla histonu całkowitego, gdy stężenie NaCl wynosiło 0,1 M lub 1 M. Wrażliwość różnych frakcji histonów na działalność proteazy jest wyraźnie zróżnicowana. W dezoksyrybonukleoproteidzie szczególnie podatną na hydrolizę jest frakcja histonów f1 (52%), a w mniejszym stopniu atakowane są pozostałe frakcje, histony f2 (32%) oraz histony f3 (19%) – nazewnictwo histonów podano według pracy [28]. Enzym wykazywał dużą specyficzność w stosunku do histonów, natomiast inne badane białka, takie jak: albumina, hemoglobina, globulina, wykazywały mniejszą podatność na hydrolizę. Kompleksowanie enzymu z DNA i histonami w roztworze NaCl w zakresie stężeń od 0,1 M do 0,3 M przemawia za jego obecnością *in vivo* w chromatynie.

Kwaśna proteaza (optimum  $\text{pH}=4,4$ ) dająca się ekstrahować z jąder komórkowych roztworem 1 M NaCl nie kompleksuje z DNA, dlatego uznano, że jest ona pochodzenia cytoplazmatycznego [28].

Metoda Kureckiego i wsp. [57, 58] izolowania proteazy chromatynowej grasicy cielęcej jest oparta na wymywaniu proteazy łącznie z histonami roztworem 0,25 N HCl. Rozpuszczalne w kwasie solnym białka wytrącano czterema objętościami zakwaszonego acetonu, po uprzednim



doprowadzeniu roztworu białek do  $\text{pH}=4,5-4,7$ . Filtracja żelowa kwaso-rozpuszczalnych białek chromatyny na żelu Sephadex G - 75, autoliza frakcji bogatej w enzym oraz ponowna filtracja żelowa pozwala oczyścić enzym 1000 -krotnie. Pozostałe zanieczyszczenia usuwano stosując preparatywną elektroforezę w żelu Sephadex G - 75 lub w nowszej modyfikacji — metodą chromatografii jonowymiennej w żelu CM - Sephadex [59]. Tak otrzymany enzym daje praktycznie pojedyncze pasmo w toku elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Masa cząsteczkowa tej proteazy wynosi  $15\,400 \pm 1000$  daltonów, optimum  $\text{pH}=8,5$  dla histonu całkowitego. Reakcja z chlorowodorkiem p - nitrofenylo - p - guanidyno benzenu wykazała, że w oczyszczonym preparacie występuje 40% aktywnego enzymu [59]. Kiedy histony i enzym są w kompleksie z DNA, to histony H1 i H3 są szybko hydrolizowane, natomiast histony H4 i H2A w mniejszym stopniu [56]. Kazeina, hemoglobina, rybonukleaza i albumina są mniej wrażliwe na atak enzymu, jedynie białka zasadowe rybosomów są rozkładane z szybkością zbliżoną do histonów [57, 58]. Proteaza chromatynowa nie trawi  $\beta$  - naftyloamidowych pochodnych alaniny, lizyny i histydyny. Inhibitory specyficzne dla trypsyny, jak np. dwuizopropylofluorofosforan, chlorometyloketon  $\alpha$  - N - tosylo - L - lizyny, inhibitor sojowy trypsyny i zasadowy inhibitor Kunitza z trzustki wołowej, reagują stechiometrycznie z enzymem. Specyficzny inhibitor chymotrypsyny chlorometyloketon  $\alpha$  - N - tosylo - L - fenyloalaniny, kwaśny siarczyn sodu, a także związki chelatujące metale oraz blokujące grupy tiolowe nie hamują aktywności enzymu [58, 59]. Wrażliwość na inhibitory, a także rozszczepianie przez proteazę chromatynową głównie wiązań Liz - X i Arg - X wskazuje na duże podobieństwo tego enzymu do trypsyny [48].

Carter i wsp. [9, 10] uważają, że podobna niskocząsteczkowa proteaza o optimum  $\text{pH}=8-9$  degradowa histony i białka niehistonowe chromatyny w wielu tkankach szczura, erytroidalnych komórkach królika i kurczęcia, komórkach wątrobiaka Morrisa i wysięku Ehrlicha. Aktywność jej wzrasta w stosunku do białek niehistonowych w miarę zwiększania siły jonowej roztworu, w którym jest inkubowana chromatyna. Stąd większość badań przeprowadzono dysocjując chromatynę w roztworze o składzie 2M NaCl-5M mocznik. Wrażliwość histonu H1 na degradację zależy od siły jonowej roztworu w jakim inkubowano chromatynę wątroby szczura; wzrasta ona wraz z podniesieniem stężenia NaCl od 0,1 do 0,5 M i maleje przy zwiększaniu stężenia NaCl do 2 M. Stopień hydrolizy pozostałych histonów jest także zależny od warunków inkubacji. Z wielu badanych inhibitorów jedynie fluorek kwasu fenylometanosulfonowego, dwuizopropylofluorofosforan, keton karbobenzoksyfenyloalaninowochlorometylowy i octan p - nitrofenylowy efektywnie hamują aktywność enzymu. Fakt, że dwa ostatnie związki są dobrymi inhibitorami proteazy



chromatynowej sugeruje jej podobieństwo do chymotrypsyny. Jednakże inhibitory chymotrypsyny, jak np. chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-fenyloalaniny, nie mają wpływu na aktywność enzymu. Proteaza chromatynowa wątroby szczura nie jest także wrażliwa na działanie specyficznego dla trypsyny inhibitora chlorometyloketonu  $\alpha$ -N-tosylo-L-lizyny oraz p-chloromerktobenzoesanu, chociaż związki te hamują aktywność proteazy chromatynowej grasicy cielej [29, 48].

Na podstawie szeregu prac [9, 10, 27, 29, 48, 49, 56–59] należy uznać niskocząsteczkową, obojętną proteazę serynową za podstawowy enzym hydrolityczny występujący w chromatynie *in vivo*. Różnice we właściwościach enzymu preparowanego z tej samej tkanki przez różnych badaczy mogą wynikać ze stosowanych metod. Nie można jednak całkowicie wykluczyć istnienia specyficzności tkankowej i gatunkowej enzymu.

W wątrobie szczura stwierdzono występowanie innego enzymu proteolitycznego związanego z chromatyną [15, 30]. Bogatą w enzym frakcję białek otrzymano przez ekstrakcję chromatyny 0,7 M roztworem NaCl o pH=8. W dalszych etapach stosowano filtrację na złożu Sepharoza 6B w celu otrzymania frakcji bogatej w enzym, ale oddzielonej od innych białek i DNA [30]. W późniejszej pracy zastosowano chromatografię na złożu Bio-Gel A50m oraz wiązanie części białek w żelu Bio-Rex 70 [15]. Białka nie związane przez żel frakcjonowano na złożu Sepharoza 6B. Frakcję zawierającą enzym, mieszano z żelem fosforanu wapniowego i zbierano białka wymywające się roztworem 0,4 M NaCl o pH=8. W końcowym etapie preparat enzymu oczyszczano na drodze chromatografii jonowymiennej przy użyciu żywicy QAE-Sephadex z zastosowaniem gradientu stężeń NaCl. Enzym ten wyodrębniony przez Chonga i wsp. [15] jest zbudowany z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej około 100 000 daltonów. Pasma białkowe o zbliżonej masie cząsteczkowej wiążące piętnowany  $H^3$  dwuizopropylofluorofosforan znaleziono także w chromatynie wątroby szczura izolowanej bezpośrednio z tkanki [10]. Wysokocząsteczkowa proteaza chromatynowa wykazuje największą aktywność przy pH=7, atakując histony i białka niehistonowe (ryc. 2). Szczególnie podatnymi na degradację enzymatyczną są białka kurczliwe wykryte w chromatynie wątroby szczura [24]. Szereg właściwości wspomnianej wysokocząsteczkowej proteazy chromatynowej odpowiada cechom niskocząsteczkowej proteazy chromatynowej, omówionej we wcześniejszych ustępach pracy. Jest ona enzymem termostabilnym, a aktywność jej zależy od stężenia soli w roztworze. Dwuizopropylofluorofosforan całkowicie hamuje jej aktywność. Jeżeli histony są związane z chromatyną, to najbardziej wrażliwy na hydrolizę jest histon H1. Jednocześnie histon H1 jest najwolniej atakowany w oczyszczonym preparacie histonu całkowitego. Z drugiej strony, omawiana proteaza chromatynowa po-



siada dużo większą masę cząsteczkową niż poprzednio opisywana proteaza, a jako aktywatorów wymaga jonów dwuwartościowych. Związki rozrywające wiązania dwusiarczkowe blokują jej aktywność, co sugeruje istotne znaczenie obecności ugrupowań dwusiarczkowych nie tylko w strukturze, ale i w funkcji. Kwaśny siarczyn sodu okazał się tu efektywnym inhibitorem, co jest zgodne z doniesieniami niektórych badaczy mówiących o hamowaniu aktywności proteolitycznej chromatyny przez ten związek [1, 3, 46, 71, 72].

#### BIOLOGICZNA ROLA PROTEAZ BIAŁEK CHROMATYNY

Komórkowe enzymy proteolityczne białek chromatyny mogą uczestniczyć w autolizie białek w tkankach o intensywnym obrocie komórek, tj. grasicy i nabłonku jelitowym cielęcia [3]. Porównanie aktywności proteolitycznej chromatyny ludzkich diploidalnych fibroblastów WI - 38 pasażu 19, 22, 31, 40 i 50 wykazało większą degradację białek chromatynowych w komórkach „starych”, co sugeruje udział proteaz w procesach starzenia [79].

Wiele danych przemawia za regulacyjną rolą enzymów proteolitycznych w procesach zmian struktury chromatyny oraz w mechanizmie aktywacji genów organizmów eukariotycznych. Na takie możliwości wskazują badania wpływu inhibitorów proteaz na indukcję przez różne czynniki podziałów komórkowych w hodowlach *in vitro*. Wykazano, że inhibitor sojowy trypsyny całkowicie hamuje włączanie radioaktywnej tymidyny do komórek limfoidalnych chomika stymulowanych do proliferacji trypsyną oraz częściowo hamuje działanie chymotrypsyny [36]. Indukcja proliferacji komórek limfoidalnych chomika przez konkanawalinę A i lipopolisacharydy *E. coli* jest blokowana w początkowej fazie przez chlorometyloketon  $\alpha$  - N - tosylo - L - lizyny. Chlorometyloketon  $\alpha$  - L - tosylo - L - fenyloalaniny okazał się efektywny także po 24 godzinach stymulacji [37]. Szereg inhibitorów proteaz oddziałuje na syntezę RNA w limfocytach ludzkich stymulowanych do proliferacji przez fitohemaglutyninę [39] oraz mitogeny szkarłatki [16].

Należy zaznaczyć, że indukcja proliferacji przez proteazy w hodowlach komórek *in vitro* nie jest spowodowana prostą proteolityczną hydrolizą białek związanych z DNA [64]. Trypsyna nie aktywuje syntezy DNA w jądrach komórkowych fibroblastów chomika będących w fazie S cyklu komórkowego. Wywołanie syntezy DNA w jądrach komórkowych fibroblastów chomika w fazie  $G_1$  jest związane z bezpośrednim działaniem trypsyny na aktywność polimerazy DNA [7]. Wydaje się prawdopodobne, że przejście komórek z fazy  $G_1$  do S jest kontrolowane m. in. przez proteazy podobne do trypsyny.



Reaktywacja syntezy DNA i RNA jąder komórkowych erytrocytów kurczęcia w heterokarionach (heterokariony erytrocytów kurczęcia i komórek HeLa) jest hamowana przez inhibitory trypsyny i inhibitory enzymów o właściwościach podobnych do trypsyny [17, 18]. Przykładowo, w heterokarionach inkubowanych w środowisku zawierającym chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-lizyny (0,1 M) w ciągu 48 godzin włączanie piętnowanego trytem uracylu do RNA w jądrach komórkowych erytrocytów zmniejsza się siedmiokrotnie w porównaniu do heterokarionów kontrolnych. Darzynkiewicz i wsp. [17, 18] uważają, że aktywacja enzymów proteolitycznych jąder komórkowych erytrocytów w heterokarionach jest czynnikiem reaktywującym syntezę RNA i DNA.

Udział proteaz białek chromatyny w przemianach białek związanych z DNA w czasie spermatogenezy jest już obecnie dobrze udokumentowany. W procesie spermatogenezy zachodzi wymiana somatycznych histonów na specyficzne dla dojrzałych plemników protaminy, które decydują o tworzeniu zwartej postaci chromatyny. Chromatynę jąder pstrąga rozdzielono na dwie frakcje różniące się rodzajem białek związanych z DNA [65]. Jedna frakcja okazała się bogata w somatyczne histony, natomiast druga zawierała więcej protamin. Bogata w protaminy frakcja chromatyny posiada białka rozpuszczalne w 0,4 N kwasie solnym, które są bardziej heterogenne i wędrują w żelu poliakrylamidowym przed histonami. Dodatkowe niskocząsteczkowe pasma białkowe wskazują na degradację histonów we frakcji chromatyny zawierającej protaminy. Możliwość występowania selektywnej degradacji histonów przez proteazy w czasie spermatogenezy sugerują badania nad stopniem hydrolizy przez trypsynę białek jąder komórkowych plemników preparowanych z jąder oraz nadjądrzy myszy i szczura [68]. Główki plemników nadjądrzy zawierające więcej arginino-cysteinowych białek zasadowych są odporne na działanie trypsyny, natomiast główki plemników jąder nie posiadają takich własności. Rozbicie wiązań dwusiarczkowych występujących między cząsteczkami protamin w chromatynie plemników ułatwia ich degradację przez trypsynę. Podobnie proteaza związana z chromatyną plemników byka [66] i myszy [8] aktywnie hydrolizuje protaminy, jeżeli zostaną zerwane wiązania dwusiarczkowe. Udział specyficznego dla protamin enzymu proteolitycznego sugeruje się w procesie hydrolizy protamin po zapłodnieniu komórki jajowej szczura [66].

Modelowe badania wymiany histonów w chromatynie grasicy ciełej przez protaminy plemników łososa w roztworze o niskiej sile jonowej (0,15–0,3 M NaCl) potwierdzają udział chromatynowych proteaz we wspomnianym procesie [67, 86]. Histon H1 jest zastępowany w chromatynie przez protaminy bez udziału proteazy, lecz wymiana przebiega szybciej przy jednoczesnej jego proteolitycznej hydrolizie. Acetylacja histo-





Ryc. 3. Aktywność proteazy chromatynowej komórek erytroidalnych kurczęcia w różnych stadiach rozwoju [50]

Wykresy densytometryczne rozdzielu histonów w żelu poliakrylamidowym preparowanych z chromatyn po inkubacji w pH=8, w temperaturze 37°C.

A — erytroblasty, B — retikulocyty, C — erytrocyty



nów H2A, H2B i H3 ułatwia ich szybki proteolityczny rozpad i zastąpienie przez protaminy. Pozostający w chromatynie acetylowany histon H4 łatwo oddysocjowuje w roztworze NaCl o stężeniu 0,3 M. Z badań prowadzonych *in vitro* [67, 86] i *in vivo* [32] wynika, że w efekcie acetylacji i proteolizy histonów mogą one oddysocjować od chromatyny w obecności protamin w środowisku o sile jonowej zbliżonej do występującej *in vivo* w jądrze komórkowym.

Przypuszcza się, że enzymy proteolityczne białek chromatyny mogą odgrywać ważną rolę w erytroporezie zwłaszcza, że obserwowano wyraźną zależność stopnia degradacji histonów przez proteazy chromatynowe od stadiów rozwojowych w komórkach erytroidalnych kurczęcia. Szybkość hydrolizy histonów (głównie H1 i H5) — największa w erytroblastach, zmniejsza się w retikulocytach i jest minimalna lub nie występuje w erytrocytach [35, 50] (ryc. 3). W chromatynie komórek erytroidalnych wykryto obok proteazy obojętnej enzym o optimum pH=3, który nie ekstrahuje się z chromatyny razem z histonami [35].

Powszechnie wiadomo, że jądra komórkowe i chromatyna posiadają większą aktywność matrycową jeżeli są trawione trypsyną. W macicy szczura i człowieka wpływ trypsyny jest uzależniony od stanu hormonalnego tkanki [42]. Chromatyna macicy szczurów pozbawionych jajników, którym nie podawano lub podawano estradiol, wykazuje większą wrażliwość na względny wzrost włączania  $H^3$  UTP do RNA wywołany działaniem trypsyny niż chromatyna zwierząt otrzymujących estradiol i progesteron [43]. Z badań cytologicznych wynika, że macica szczurów otrzymujących estradiol w ciągu trzech dni znajduje się w fazie wzrostu, natomiast u zwierząt otrzymujących estradiol i progesteron — w fazie wydzielniczej. Inkubowanie chromatyny macicy szczura w temperaturze 37°C w ciągu godziny powoduje silną degradację histonu H1 w grupie zwierząt, które otrzymywały lub nie otrzymywały estradiolu [61].

Inkubacja chromatyny macicy samic szczurów będących w 17–19 dniu ciąży daje efekt odpowiadający rezultatom otrzymanym dla samic pozbawionych jajników otrzymujących estradiol i progesteron. W kolejnych pracach Katz i wsp. [44, 45] stwierdzili występowanie w macicy szczura enzymu proteolitycznego (optimum pH=8,5) o właściwościach zbliżonych do trypsyny, którego działanie jest kontrolowane hormonalnie. Proteaza ta, ich zdaniem, określa *in vitro* wzrost syntezy RNA w chromatynie macicy szczura i wykazuje wyraźną specyficzność tkankową.

Z innych zjawisk związanych z omawianą problematyką zwraca uwagę niejednorodny poziom aktywności jądrowych i chromatynowych proteaz w różnych tkankach. Aktywność proteazy chromatynowej ekstrahującej się z histonami jest większa w wątrobiaku Morrisa linii 5123D i 7777 niż w wątrobie szczura. Jeżeli proteaza jest związana z chroma-



tyną, to jej aktywność jest większa w wolno rosnącym wątrobiaku Morrisa 5123D w porównaniu do szybko rosnącej linii 7777 [51]. Według Chae i wsp. [12], wzrost szybkości degradacji histonu H1 w różnych liniach wątrobiaka Morrisa przedstawia się następująco: linia 7800 > 7794A = 9121 > 7777 = wątroba szczura, natomiast szybkość wzrostu tych czterech linii wątrobiaka Morrisa przedstawia się następująco: 7777 > 9121 = 7800 > 7794A.

W szybko rosnącym wysięku Ehrlicha myszy oraz płacie płucnym cielęcia aktywność proteolityczna chromatyny jest minimalna w roztworach o niskiej sile jonowej. Natomiast obserwowano znaczną degradację białek chromatyny wysięku Ehrlicha w roztworach o dużym stężeniu NaCl i mocznika [9, 14] w porównaniu do degradacji białek chromatyny w tkankach o wysokim obrocie komórek, jak grasica i nabłonek jelitowy cielęcia [3]. Podobnie białka nukleoplazmatyczne regenerującej wątroby szczura, nowotworowych komórek Yoshida i mózgu myszy są stabilne w czasie krótkiej inkubacji jąder w temperaturze 37°C, mimo intensywnej ich degradacji w przypadku innych tkanek szczura i myszy [77]. Zaobserwowano również dużo większą aktywność proteaz białek jądra komórkowego w ludzkich limfocytach i leukocytach białaczkowych niż w limfocytach stymulowanych do proliferacji fitohemaglutyniną oraz komórkach chłoniaka Burkitta [85]. W transformowanych przez wirus SV-40 fibroblastach linii WI-38 (linia 2RA) aktywność proteolityczna chromatyny jest większa [55], a w linii WI-38 VA-13 — mniejsza [79] niż w normalnych komórkach. Inne doświadczenia wskazują, że stymulacji ludzkich diploidalnych fibroblastów linii WI-38 do proliferacji towarzyszy minimalna zmiana aktywności proteolitycznej chromatyny [25]. Mimo niestwierdzenia wyraźnej zależności między aktywnością enzymów degradujących białka chromatyny a szybkością wzrostu tkanek, interesujące jest istnienie różnic tkankowych we względnej aktywności proteaz. Może to świadczyć o istnieniu czynników tkankowych regulujących aktywność enzymów w tkankach. W macicy szczura aktywność proteazy degradującej histony jest kontrolowana przez hormony sterydowe, które nie aktywują proteaz przepony i grasicy [45].

#### UWAGI KOŃCOWE

Degradacja białek chromatyny w preparatach jąder komórkowych i chromatyny jest tak znaczna, że konieczne stało się stosowanie w pracach badawczych inhibitorów proteaz. Oddziaływanie inhibitorów proteaz z materiałem jądrowym jest słabo poznane, chociaż są prowadzone prace w tym kierunku.



Przykładowo, powszechnie do niedawna używany kwaśny siarczyn sodu w reakcji z cytozyną powoduje dezaminację tej zasady [78], fluorek kwasu fenylometanosulfonowego hamuje spontaniczne uwalnianie polimerazy RNA z jąder komórkowych i jąderek wątroby szczura [62]. Niektóre inhibitory proteaz i stosowane jony metali ciężkich są związkami silnie toksycznymi [9, 23]. Stosowanie inhibitorów proteaz z pewnością zmienia biologiczne właściwości chromatyny, jeżeli proteazy są integralnym składnikiem chromatyny. Obecność w komórce proteaz białek chromatyny utrudnia prowadzenie wielu eksperymentów *in vitro*, np. syntezę RNA, rekonstrukcję chromatyny czy fosforylację białek chromatynowych.

Wysoka specyficzność substratowa, niejednorodna aktywność w różnych tkankach, prawdopodobna specyficzność tkankowa, zmiany aktywności w czasie proliferacji i różnicowania się komórek oraz podczas indukcji aktywności genów, uczestnictwo w działaniu hormonów na tkanki docelowe sugerują udział proteaz białek chromatynowych w obrocie metabolicznym histonów i niehistonowych białek chromatyny. Wysoka wrażliwość histonów na proteolityczną hydrolizę nie odpowiada ich „niskiemu obrotowi” w jądrze komórkowym. Enzymy proteolityczne *in vivo* mogą być hamowane przez komórkowe inhibitory lub występować w specyficznych miejscach jądra komórkowego i dopiero ingerencja badacza zmienia ich rozmieszczenie oraz aktywność (cyt. według [15]). Badania aktywności obojętnej proteazy chromatynowej w poszczególnych frakcjach histonowych wątroby szczura wykazały degradację tylko we frakcji H2B [63]. Można przypuszczać, że proteaza chromatynowa występuje w chromatynie w kompleksie z histonem H2B.

Na obecnym etapie badań nie można wykluczyć udziału proteaz białek chromatyny w determinowaniu struktury chromatyny i ich roli w procesach regulacji czynności genów. Większość proponowanych modeli regulacji aktywności genów w organizmach eukariotycznych zakłada selektywne usuwanie represorowych białek związanych z DNA [4]. Mechanizm usuwania represorowych białek w chromatynie w czasie genowej derepresji i wiązania białek efektorowych może być podobny do obserwowanego procesu wymiany histonów na protaminy w spermatogenezie. Koncepcja udziału proteaz białek chromatyny w regulacji aktywności genów ma już obecnie swoich zwolenników [15, 17, 18, 45], lecz zagadnienie to pozostaje nadal dyskusyjne.

#### LITERATURA

- [1] ADAMS G. H. M., NEELIN J. M., The absence of cell-specific histone in erythroid cells from rabbit marrow, *Can. J. Biochem.*, 54:571-577, 1976.



- [2] BALLAL N. R., GOLDBERG D. A., BUSCH H., Dissociation and reconstitution of chromatin without appreciable degradation of the proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62** : 972-982, 1975.
- [3] BARTLEY J., CHALKLEY R., Further studies of a thymus nucleohistone-associated protease, *J. Biol. Chem.*, **245** : 4286-4292, 1970.
- [4] BONNER J., Regulation of gene expression in higher organisms: how it all works, [w] *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp., **28**, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E. W., Ass. Sci. Publ. Amsterdam - Oxford - New York, 315-327, 1975.
- [5] BROSTROM C. O., JEFFAY H., Protein catabolism in rat liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **278** : 15-27, 1972.
- [6] BRANAT W. F., BÖHM L., Von HOLT C., Proteolytic degradation of histones and site of cleavage in histone f2a1 and f3, *FEBS Lett.*, **51** : 88-93, 1975.
- [7] BROWN R. L., CLARK R. W., CHIU J-F., STUBBLEFIELD E., Protease activation of G1 nuclei isolated from chinese hamster fibroblasts, *Exp., Cell Res.*, **104** : 207-213, 1977.
- [8] CALVIN H. I., Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta*, **434** : 377-389, 1976.
- [9] CARTER D. B., CHAE C - B., Chromatin - bound protease: degradation of chromosomal proteins under chromatin dissociation conditions, *Biochemistry*, **15** : 180-185, 1976.
- [10] CARTER D. B., EFRID P. H., CHAE C - B., Chromatin - bound protease:  $^3\text{H}$ /diisopropyl fluorophosphate labeling patterns of chromatin, *Biochemistry*, **15** : 2603-2607, 1976.
- [11] CHAE C - B., CARTER D. B., Degradation of chromosomal proteins during dissociation and reconstitution of chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57** : 740-746, 1974.
- [12] CHAE C - B., SMITH M. C., Lack of relationship between activity of chromatin - bound proteinase and cell growth rates, *Biochem. J.*, **146** : 281-283, 1975.
- [13] CHAE C - B., GADSKI R. A., CARTER D. B., EFRID P. H., Integrity of proteins in reconstituted chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67** : 1459-1465, 1975.
- [14] CHAE C - B., Reconstitution of chromatin: mode of reassociation of chromosomal proteins, *Biochemistry*, **14** : 900-906, 1975.
- [15] CHONG M. T., GARRARD W. T., BONNER J., Purification and properties of a neutral protease from rat liver chromatin, *Biochemistry*, **13** : 5128-5134, 1974.
- [16] DARZYNKIEWICZ Z., ARNASON B. G. W., Suppression of RNA synthesis in lymphocytes by inhibitors of proteolytic enzymes, *Exp. Cell Res.*, **85** : 95-104, 1974.
- [17] DARZYNKIEWICZ Z., CHEŁMICKA - SZORC E., ARNASON B. G. W., Chick - erythrocyte nucleus reactivation in heterokaryons: suppression by inhibitors of proteolytic enzymes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71** : 644-647, 1974.
- [18] — Suppressive effect of protease inhibitors on heterokaryons containing chick erythrocyte nuclei, *Exp. Cell Res.*, **87** : 333-345, 1974.
- [19] DAVIES P., RITA G. A., KRAKAUER K., WEISSMANN G., Characterization of a neutral protease from lysosomes of rabbit polymorphonuclear leucocytes, *Biochem. J.*, **123** : 559-569, 1971.
- [20] DAVIES P., KRAKAUER K., WEISSMANN G., Calf thymus histone as a sub-



- strate for neutral and acid proteases of leucocyte lysosomes and other proteolytic enzymes, *Anal. Biochem.*, **45** : 428-440, 1972.
- [21] DESTREE O. H. J., D'ADELHART - TOOROP H. A., CHARLES R., Cytoplasmic origin of the so - called nuclear neutral histone protease, *Biochim. Biophys. Acta*, **378** : 450-458, 1975.
- [22] DOUNCE A. L., UMANA R., The proteases of isolated cell nuclei, *Biochemistry*, **1** : 811-819, 1962.
- [23] DOUNCE A. L., ICKOWICZ R., The use of low concentrations of heavy metals in the isolation of rat liver nuclei, *Arch. Biochem. Biophys.*, **137** : 143-155, 1970.
- [24] DOUVAS A. S., HARRINGTON C. A., BONNER J., Major nonhistone proteins of rat liver chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72** : 3902-3906, 1975.
- [25] FARBER J., ROVERA G., BASERGA R., Template activity of chromatin during stimulation of cellular proliferation in human diploid fibroblasts, *Biochem. J.*, **122** : 189-195, 1971.
- [26] FRANCESCHI R. T., KIM K - H., Studies on the stability of chromatin from hen oviduct, *Arch. Biochem. Biophys.*, **176** : 489-500, 1976.
- [27] FURLAN M., JERICIJO M., Protein catabolism in thymus nuclei. I. Hydrolysis of nucleoproteins by proteases present in calf - thymus nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **147** : 135-144, 1967.
- [28] — Protein catabolism in thymus nuclei. II. Binding of histone - splitting nuclear proteases to deoxyribonucleic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **147** : 145-153, 1967.
- [29] FURLAN M., JERICIJO M., SUHAR A., Purification and properties of a neutral protease from calf thymus nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **167** : 154-160, 1968.
- [30] GARRELS J. I., ELGIN S. C. R., BONNER J., A histone protease of rat liver chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46** : 545-551, 1972.
- [31] GOODWIN G. H., WOODFEAD L., JOHNS E. W., The presence of high mobility group non - histone chromatin proteins in isolated nucleosomes, *FEBS Lett.*, **73** : 85-88, 1977.
- [32] GRIMES S. R., CHAE C - B, IRVIN J. L., Acetylation of histones of rat testis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **168** : 425-435, 1975.
- [33] HAAS R., WEISS E., JUSIC M., HEINRICH P. C., Limited proteolysis of the very - lysine - rich histone H1 by a membrane - bound proteinase from rat liver, *FEBS Lett.*, **63** : 117-119, 1976.
- [34] HAAS R., NAGASAWA T., HEINRICH P. C., The localization of a proteinase within rat liver mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74** : 1060-1065, 1977.
- [35] HARLOW R., WELLS J. R. E., Histone proteases of avian erythroid cells, *J. Cell Sci.*, **18** : 217-225, 1975.
- [36] HART D. A., STREILEIN J. S., Stimulation of a subpopulation of hamster lymphoid cells by trypsin and chymotrypsin, *Exp. Cell. Res.*, **102** : 246-252, 1976.
- [37] — Effect of protease inhibitors on mitogen stimulation of hamster lymphoid cells, *Exp. Cell Res.*, **102** : 253-263, 1976.
- [38] HEINRICH P. C., RAYDT G., PUSCHENDORF B., JUSIĆ M., Subcellular distribution of histone - degrading enzyme activities from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **62** : 37-43, 1976.
- [39] HIRSCHHORN R., GROSSMAN J., TROLL W., WEISSMANN G., The effect of epsilon amino caproic acid and other inhibitors of proteolysis upon the



- response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin, *J. Clin. Invest.*, **50** : 1206-1217, 1971.
- [40] HODGES G. M., LIVINGSTON D. C., FRANKS L. M., The localization of trypsin in cultured mammalian cells, *J. Cell Sci.*, **12** : 887-902, 1973.
- [41] ISANIN N. A., YAKOVLEV N. A., The involvement of the cell lysosomal apparatus in the regulation of cell proliferation, *Cytology*, **19** : 575-584, 1977.
- [42] KATZ J., LEVITZ M., GORSTEIN F., TROLL W., Influence of trypsin on in vitro RNA synthesis by disrupted nuclei of rat and human uteri in different hormonal states, *Endocrinology*, **87** : 294-301, 1970.
- [43] KATZ J., KRONE P., TROLL W., BLAUSTEIN A., LEVITZ M., Effect of proteases on in vitro RNA synthesis by rat uteri in different hormonal states, *Endocrinology*, **90** : 1147-1153, 1972.
- [44] KATZ J., TROLL W., RUSSO J., FILKINS K., LEVITZ M., Effect of protease inhibitors on in vitro breakdown of uterine histones from hormone - treated rats, *Endocrine Res. Commun.*, **1** : 331-337, 1974.
- [45] KATZ J., TROLL W., LEVY M., FILKINS K., RUSSO J., LEVITZ M., Estrogen - dependent trypsin - like activity in the rat uterus. Localization of activity in the 12 000g pellet and nucleus, *Arch. Biochem. Biophys.*, **173** : 347-354, 1976.
- [46] KLEIMAN L., HUANG R. C. C., Reconstitution of chromatin. The sequential binding of histones to DNA in the presence of salt and urea, *J. Mol. Biol.*, **64** : 1-8, 1972.
- [47] KLEINSMITH L. J., STEIN J., STEIN G., Dephosphorylation of nonhistone proteins specifically alters the pattern of gene transcription in reconstituted chromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73** : 1174-1178, 1976.
- [48] KOWALSKA - LOTH B., ZIELIŃSKI J., TOCZKO K., CHMIELEWSKA I., Similarity in active site arrangement of neutral protease from calf thymus chromatin and trypsin, *Act. Biochim. Polon.*, **23** : 139-144, 1976.
- [49] KOWALSKA - LOTH B., BRUDZYŃSKA T., TOCZKO K., CHMIELEWSKA I., The presence of serine protease in pea embryo chromatin, *Acta Biochim. Polon.*, **23** : 369-374, 1976.
- [50] KRAJEWSKA W., WIERZBICKI R., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Activity of neutral chromatin protease during maturation of chicken erythroid cells, *Biochemie*, **58** : 1281-1284, 1976.
- [51] KRAJEWSKA W., LIPIŃSKA A., KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Activity of chromatin - bound protease of rat liver and Morris hepatomas, *Acta Biochim. Polon.*, **24** : 127-132, 1977.
- [52] KRAVCHENKO L. S., OKSMAN A. Ya., GLUBOVSKAYA I. O., TERESHIN I. M., Effect of polyene antibiotics on nuclear membrane - bound and free DNP fractions from dog kidney, *Biochimija*, **41** : 133-142, 1976.
- [53] KRAVCHENKO L. S., OKSMAN A. Ya., ASINOVSKAYA N. K., TERESHIN I. M., Effect of polyene antibiotics on isolated dog kidney nuclei, *Biochimija*, **41** : 1220-1228, 1976.
- [54] KRAVCHENKO L. S., OKSMAN A. Ya., TERESHIN I. M., Study of nistatin effect on nuclear proteases of dog kidney causing degradation of acid - soluble proteins of chromatin, *Biochimija*, **42** : 687-692, 1977.
- [55] KRAUSE M. O., KLEINSMITH L. J., STEIN G. S., Properties of the genome in normal and SV40 transformed WI38 human diploid fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, **92** : 164-174, 1975.
- [56] KURECKI T., TOCZKO K., CHMIELEWSKA I., Catalytic properties of prote-



- ase of calf thymus chromatin, *Bull. Acad. Polon. Ser. Sci. Biol.*, **19** : 627–631, 1971.
- [57] KURECKI T., TOCZKO K., Isolation and partial purification of protease from calf thymus chromatin, *Bull. Acad. Polon. Ser. Sci. Biol.*, **20** : 543–546, 1972.
- [58] — Purification and partial characterization of protease from calf thymus chromatin, *Acta Biochim. Polon.*, **21** : 225–233, 1974.
- [59] KURECKI T., KOWALSKA-LOTH B., TOCZKO K., CHMIELEWSKA I., Evidence that neutral protease from calf thymus chromatin is a serine type enzyme, *FEBS Lett.*, **53** : 313–315, 1975.
- [60] LaRUE H., PALLOTTA D., The selective extraction of histones from rye chromatin, *Can. J. Biochem.*, **54** : 765–771, 1976.
- [61] LEVITZ M., KATZ J., KRONE P., PROCHOROFF N. N., TROLL W., Hormonal influences on histones and template activity in the rat uterus, *Endocrinology*, **94** : 633–640, 1974.
- [62] LINDELL T. J., Inhibition of eukaryotic DNA - dependent RNA polymerase release from isolated nuclei and nucleoli by phenylmethylsulfonylfluoride, *Arch. Biochem. Biophys.*, **171** : 268–275, 1975.
- [63] LIPIŃSKA A., DŁUŻNIEWSKA M., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Aktywność proteazy we frakcjach histonowych wątroby szczura, XV Zjazd PTB, Streszczenia, 147, 1977.
- [64] MAIZEL A., NICOLINI C., BASERGA R., Effect of cell trypsinization on nuclear proteins of WI - 38 fibroblasts in culture, *J. Cell. Physiol.*, **86** : 71–82, 1975.
- [65] MARUSHIGE K., DIXON G. H., Transformation of trout testis chromatin, *J. Biol. Chem.*, **246** : 5799–5805, 1971.
- [66] MARUSHIGE Y., MARUSHIGE K., Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **403** : 180–191, 1975.
- [67] MARUSHIGE K., MARUSHIGE Y., WONG T. K., Complete displacement of somatic histones during transformation of spermatid chromatin: a model experiment, *Biochemistry*, **15** : 2047–2053, 1976.
- [68] MEISTRICH M. L., REID B. O., BARCELLONA W. J., Changes in sperm nuclei during spermatogenesis and epididymal maturation, *Exp. Cell Res.*, **99** : 72–78, 1976.
- [69] NEELIN J. M., NEELIN E. M., Zone electrophoresis of calf thymus histone in starch gel, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38** : 355–363, 1960.
- [70] NOODEN L. D., Van den BROEK H. W. J., SEVALL J. S., Stabilization of histones from rat liver, *FEBS Lett.*, **29** : 326–328, 1973.
- [71] PANYIM S., JENSEN R. T., CHALKLEY R., Proteolytic contamination of calf thymus nucleohistone and its inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **160** : 252–255, 1968.
- [72] PANYIM S., CHALKLEY R., High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones, *Arch. Biochem. Biophys.* **130** : 337–346, 1969.
- [73] PANYIM S., BILEK D., CHALKLEY R., An electrophoretic comparison of vertebrate histones, *J. Biol. Chem.*, **246** : 4206–4215, 1971.
- [74] PHILLIPS D. M. P., JOHNS E. W., A study of the proteinase content and the chromatography of thymus histones, *Biochem. J.*, **72** : 538–544, 1959.
- [75] REID B. R., COLE R. D., Biosynthesis of a lysine - rich histone in isolated calf thymus nuclei, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51** : 1044–1050, 1964.
- [76] SARKAR N. K., DOUNCE A. L., Relationship of protease action and hydro-



- dynamic shearing to cleavage of thymus deoxyribonucleoprotein, Arch. Biochem. Biophys., **92** : 321-328, 1961.
- [77] SELLWOOD S. M., RICHNES P. G., HARRAP K. R., RICKWOOD D., MacGILLIVRAY A. J., CAPPS M., The integrity of nuclear proteins following incubation of isolated nuclei in vitro, Eur. J. Biochem., **52** : 561-566, 1975.
- [78] SHAPIRO R., COHEN B. I., SERVIS R. E., Specific deamination of RNA by sodium bisulphite, Nature, **227** : 1047-1048, 1970.
- [79] SRIVASTAVA B. I. S., Changes in enzymic activity during cultivation of human cells in vitro, Exp. Cell Res., **80** : 305-312, 1973.
- [80] STELLWAGEN R. H., REID B. R., COLE R. D., Degradation of histones during the manipulation of isolated nuclei and deoxyribonucleoprotein, Biochim. Biophys. Acta, **155** : 581-592, 1968.
- [81] SZEGO C. M., The role of cyclic AMP in lysosome mobilization and their nucleotropic translocation in steroid hormonal target cells, Adv. Cycl. Nucleotid., 541-564, 1972.
- [82] TATA J. R., HAMILTON M. J., COLE R. D., Membrane phospholipids associated with nuclei and chromatin: melting profile, template activity and stability of chromatin, J. Mol. Biol., **67** : 231-246, 1972.
- [83] Van den BROEK H. W. J., NOODEN L. D., SEVALL S., BONNER J., Isolation, purification and fractionation of nonhistone chromosomal proteins, Biochemistry, **12** : 229-236, 1973.
- [84] VIDALI G., NEELIN J. M., The stability of acid - soluble chromosomal proteins from avian erythrocytes, Can. J. Biochem., **46** : 781-788, 1968.
- [85] WEISENTHAL L. M., RUDDON R. W., Catabolism of nuclear proteins in control and phytohemagglutinin - stimulated human lymphocytes, leukemic leukocytes and Burkitt lymphoma cells, Cancer Res., **33** : 2923-2935, 1973.
- [86] WONG T. K., MARUSHIGE K., Modification of histone binding in calf thymus chromatin and in the chromatin - protamine complex by acetic anhydride, Biochemistry, **15** : 2041-2046, 1976.

*Otrymano: 6 lipca 1978.*

*Przyjęto: 20 września 1978.*

*Adres autorów: ul. 3 - Maja 54, 08 - 110 Siedlce.*







## RECENZJA

R. Y. STANIER, H. J. ROGERS and B. J. WARD, wydawcy.  
Relation between structure and function in the prokaryotic cell.

Wydane przez Cambridge University Press; Cambridge, London, New York, Melbourne, 1978. Str. 369, twarda okładka z obwolutą, funtów ang. 17,50.

Omawiana książka jest zbiorem 14 wybranych referatów wygłoszonych na 28 Sympozjum Towarzystwa Mikrobiologii Ogólnej, odbytym na Uniwersytecie w Southampton (Anglia) w kwietniu 1978 r. Autorzy artykułów rekrutują się przede wszystkim z ośrodków naukowych Stanów Zjednoczonych (11), następnie z Francji (6) i Anglii (6) oraz Republiki Federalnej Niemiec (2). Książka rozpoczyna się krótkim wstępem napisanym przez wydawców, a następne dwa jej rozdziały poświęcone są strukturze rybosomów bakteryjnych (1) oraz strukturze i funkcji zespołu translacyjnego (2). Autor rozdziału 1 omawia strukturę rybosomu bakteryjnego w oparciu o pozyskane informacje za pomocą różnych technik badawczych, m. in. immunoelektromikroskopii oraz technik rozpraszania elektronów.

Funkcją układu rybosomalnego zajmują się autorzy rozdziału 2. Omawiają oni całą złożoność tego układu, włączają do niego te składniki, które nierozdzielnie tworzą kompleks syntetyzujący: aminoacyl-tRNA, mRNA, łączniki w formie jedno- i dwuwartościowych jonów oraz nukleotydy i przejściowo związane z rybosomami białka. Obydwa rozdziały ilustrowane są instruktywnymi schematami i są zaopatrzone w bogaty spis literatury przedmiotu z pełną bibliografią.

Rozdział 3 i 4 został poświęcony strukturze i funkcji ściany komórek bakterii Gram - negatywnych (3) i Gram - pozytywnych (4). Autorzy przedstawili w nich swoje propozycje wyjaśniające procesy syntezy i odnowy ściany bakterii po podziale. Rozdział 4 jest ilustrowany bardzo dobrymi elektronogramami.

W rozdziale 5 dwaj autorzy francuscy omawiają immunogenne własności oraz chemiczną strukturę ściany mykobakterii.

Rozdziały 6 i 7 poświęcone zostały strukturze i funkcji błony komórkowej, jej ultrastrukturze, budowie chemicznej oraz własnościom antygenowym i jej składowi enzymatycznemu (6).



W rozdziale 7 Henderson (Anglia) omawia bardzo krótko (4 strony) strukturę błon purpurowych *Halobacterium halobium* i ich znaczenie jako pompy protonowej.

W rozdziale 8 znajdzie czytelnik nowe poglądy na wydzielanie przez *Bacillus licheniformis* enzymów (penicylinazy), które okazały się chemicznie fosfolipoproteinami.

Następne rozdziały dotyczą struktury rewersji protoplastów bakterii (dobrze ilustrowane elektronogramami), struktury i funkcji witki bakteryjnej, ruchliwości bakterii oraz sporulacji bakterii i specyficznej struktury wytwarzanych spor. Rozdział ten jest bogato ilustrowany schematami obrazującymi procesy związane z formowaniem się spory oraz przypuszczalne zmiany konformacyjne błony bakterii w procesie sporulacji.

Ostatni rozdział zawiera informacje morfologiczno - chemiczne na temat pęcherzyków gazowych w komórkach wodnych prokariota (sinicach i bakteriach).

Książkę zamyka starannie sporządzony indeks. Nabywca książki znajdzie wiele interesujących i nowych informacji dotyczących zjawisk życiowych komórek prokariotycznych.

Wincenty Kilarski



## MIANOWNICTWO DOTYCZĄCE HODOWLI KOMÓREK I TKANEK IN VITRO

**Hodowla tkanek** (tissue culture) — technika pozwalająca na badanie komórek, tkanek lub narządów przetrzymywanych lub rosnących in vitro ponad 24 godziny.

(a) hodowla komórkowa (cell culture) — nie zorganizowane w tkankę komórki mnożą się poza ustrojem.

(b) hodowla narządowa (organ culture) — utrzymywanie przy życiu związków narządów, całych narządów lub ich części z zapewnieniem im warunków przeżycia lub rozrostu, różnicowania się i zachowania struktury i/lub czynności.

(c) hodowla tkankowa (tissue culture) — utrzymywanie fragmentów tkanki in vitro, niekoniecznie w warunkach umożliwiających zachowanie struktury.

**Eksplantat** (explant) — wyosobniony fragment tkanki lub narządu użyty do zapoczątkowania hodowli in vitro.

**Hodowla jednowarstwowa** (monolayer) — pojedyncza warstwa komórek rosnących na powierzchni.

**Hodowla w zawiesinie** (suspension culture) — hodowla, w której rozmnażają się komórki zawieszona w pożywce.

**Hodowla pierwotna** (primary culture) — hodowla wyprowadzona z ko-

mórek, tkanek lub narządów pobranych bezpośrednio z organizmu.

Termin nie obejmuje hodowli wyprowadzonych z eksplantatów guzów powstałych po wszczepieniu zwierzętom komórek z hodowli. Hodowla pierwotna zachowuje swą nazwę do czasu pierwszego pasażu (założenia pierwszych podhodowli), a następnie staje się linią komórkową.

**Linia komórkowa** (cell line) — powstaje z hodowli pierwotnej po przepasażowaniu komórek (założeniu pierwszej podhodowli). Hodowle z niej pochodzące składają się z potomstwa komórek obecnych w hodowli pierwotnej.

**Szczep komórkowy** (cell strain) — może zostać wyprowadzony albo z hodowli pierwotnej, albo z linii komórkowej na drodze selekcji lub klonowania komórek mających swoiste właściwości lub znaczniki. Właściwości te lub znaczniki muszą utrzymywać się w dalszych podhodowlach.

Przy opisie szczepu komórkowego należy określić jego swoistą cechę, np. szczep komórkowy ze znacznikiem chromosomalnym, szczep komórkowy z nabytą odpornością na zakażenie określonym wirusem, szczep komórkowy ze swoistym antygenem itp.

**Podszczep** (sub-strain) — można wyprowadzić ze szczepu izolując pojedynczą komórkę lub grupę komórek o

\* Opracowano na podstawie zaleceń Komitetu do Spraw Słownictwa Stowarzyszenia Hodowli Tkanek (S. Fedoroff, 1967, „Proposed usage of animal tissue culture terms”, Exp. Cell Res., 46:642-648) z uwzględnieniem modyfikacji podanych w informacji technicznej katalogu Gibco 1976-1977, str. 128 i 129.



właściwościach lub znacznikach, których nie posiadają wszystkie komórki szczepu.

**Klon** (clone) — populacja komórek powstała na drodze podziałów mitotycznych z pojedynczej komórki.

Klon nie musi być jednorodny, stąd też terminy „klon” lub „klonowany” nie powinny być używane dla określania jednorodności populacji komórek.

**Szczep klonowany** (cloned strain) lub **linia klonowana** (cloned line) — szczep lub linia bezpośrednio wyprowadzona z klonu.

**Diploidalna linia komórkowa** (diploid cell line) — linia komórkowa, w której co najmniej 75% komórek (ustalenie arbitralne) ma taki sam kariotyp jak normalne komórki somatyczne gatunku, z którego wyprowadzono hodowlę.

Diploidalna liczba chromosomów nie musi być jednoznaczna z diploidalnym kariotypem, gdyż istnieją sytuacje, w których komórka może utracić jeden chromosom, a uzyskać dodatkowo inny chromosom. Kariotyp wtedy jest zmieniony, a liczba chromosomów jest zachowana. Komórki takie powinno nazywać się pseudodiploidalnymi. Opis diploidalnej linii komórkowej powinien zawierać liczbę zbadanych komórek oraz odsetek komórek diploidalnych i ich kariotyp.

**Heteroploidalna linia komórkowa** (heteroploid cell line) — linia komórkowa, w której mniej niż 75% komórek posiada diploidalną liczbę chromosomów.

Termin ten niekoniecznie musi oznaczać, że komórki mają cechy nowotworowe lub że są zdolne do nieograniczonego w czasie rozmnażania się *in vitro*. Przy opisie linii heteroploidalnej należy podać kariotyp linii macierzystej i odsetek komórek z takim kariotypem.

**Ploidalność** (ploidy) — liczba garniturów chromosomów.

**Haploidalność** (haploid) — 1. Podstawowa jednostka ploidalności (symbol:  $x$ ); w tym znaczeniu haploid jest monoploidem. 2. Liczba chromosomów w haplofazie; zredukowana liczba chromosomów charakterystyczna dla gamet diploida (symbol:  $n$ ).

**Diploidalność, triploidalność, tetraploidalność** itd. (diploid, triploid, tetraploid, etc.) — podwójna, potrójna, poczwórna itd. (symbole  $2x$ ,  $3x$ ,  $4x$  itd.) podstawowa liczba chromosomów.

**Poliploidalność** (polyploid) — ogólne określenie wskazujące na wielokrotną zawartość podstawowej liczby chromosomów, większą niż podwójna.

**Heteroploidalność** (heteroploid) — 1. U organizmów z dominującą fazą diploidalną, każda liczba chromosomów różniąca się od normalnej liczby diploidalnej. 2. U organizmów z dominującą fazą haploidalną, każda liczba chromosomów różniąca się od normalnej liczby haploidalnej.

**Euploidalność** (euploid) — wszystkie dokładne wielokrotności podstawowej liczby chromosomów ( $x$ ).

**Aneuploidalność** (aneuploidy) — każda liczba chromosomów różniąca się od  $x$  lub od dokładnej wielokrotności  $x$ .

**Miksoploidalność** (mixoploidy) — występowanie w populacji komórek co najmniej dwu ich rodzajów różniących się liczbą chromosomów.

**Endopoliploidalność** (endopolyploidy) — występowanie w populacji komórkowej komórek poliploidalnych powstałych drogą endomitoz.

**Podhodowla** (subculture) — hodowla uzyskana przez przeniesienie komórek z jednego naczynia hodowlanego do innego.

**Pasażowanie** lub **pasaż** (passage) — synonim określenia „zakładanie podhodowli”; może oznaczać przeniesienie komórek z jednego naczynia do drugiego.

Używając tego terminu należy jednak wyraźnie określić, co jest przenoszone, gdyż wirusolodzy posługują się tym terminem opisując przeniesienie płynu sponad hodowli.

**Kolejny numer podhodowli** (subculture number) — liczba określająca, ile razy dokonano pasażowania, czyli



przenoszenia komórek z jednego naczynia do drugiego.

**Czas trwania podhodowli** (subculture interval) — okres między następującymi po sobie pasażami komórek.

Określenie to nie ma związku z terminem „czas generacji komórek”.

**Czas generacji komórek** (cell generation time) — odstęp czasu między dwoma następującymi po sobie podziałami komórki.

Termin ten nie jest synonimem terminu „czas podwojenia populacji”.

**Czas podwojenia populacji** (population doubling time) — czas, w którym podwaja się liczba komórek całej populacji.

Termin ten nie jest synonimem terminu „czas generacji komórek”.

**Wydażność posiewu** (plating efficiency) — stosunek liczby utworzonych kolonii do liczby posianych komórek.

**Bezwzględna wydażność posiewu** (absolute plating efficiency) — odsetek posianych komórek, które wytworzyły kolonie.

Powinna być przy tym wymieniona całkowita liczba komórek wprowadzonych do naczynia, rodzaj naczyń hodowlanych i warunki środowiska (pożywka, temperatura, szczególnie zamknięte lub otwarte naczynia, skład atmosfery itd.).

**Względna wydażność posiewu** (relative plating efficiency) — odsetek posianych komórek, które wytworzyły kolonie w odniesieniu do kontroli, dla której należy podać bezwzględną wydażność posiewu.

**Fibroblasty** (fibroblasts) — komórki o kształcie wrzecionowatym lub nieregularnym zdolne do wytwarzania włókien.

W hodowli komórek wiele innych rodzajów komórek nie różni się wyglądem od fibroblastów. W hodowli narządowej lub tkankowej, w których zachowane są stosunki odniesienia, fibroblasty można rozpoznać na podstawie kryteriów ogólnie przyjętych w histologii.

**Komórki fibroblastopodobne** (fibro-

blast-like cells) — Komórki mające kształt wrzecionowaty lub nieregularny zaliczane do fibroblastów.

W hodowli komórkowej różne typy komórek przybierają podobny wygląd. Na ogół nie jest jednak znane pochodzenie tych komórek ani ich zdolność do tworzenia włókien.

**Komórki nabłonkowe** (epithelial cells) — komórki przylegające do siebie, tworzące zwarte płyty przypominające wyglądem mozaikę, o bardzo małej ilości substancji międzykomórkowej, tak jak to widać in vivo lub w hodowli tkankowej albo narządowej.

**Komórki nabłonkowopodobne** (epithelial-like cells) — Komórki nabłonkowe przybierające w hodowli komórkowej różne kształty i wykazujące na ogół dążność do tworzenia płatów złożonych ze ściśle przylegających do siebie komórek wielobocznych.

Stożenie tego przylegania może być różny. Jeżli jedynym kryterium identyfikacji tych komórek jest ich dążność do wzajemnego przylegania, właściwiej jest określać je jako komórki nabłonkowopodobne.

**Przemiana hodowli** (culture alteration) — Trwała zmiana właściwości lub zachowania się hodowli.

Np. zmieniony wygląd, garnitur chromosomów, podatność na zakażenie wirusami, wymagania odżywcze, zdolność do podziałów, cechy złośliwości itd. Terminowi temu zawsze powinien towarzyszyć dokładny opis zmiany, która wystąpiła w hodowli.

**„Transformacja komórek”** (cell transformation) — Zmiany wywołane w komórkach przez wprowadzenie nowego materiału genetycznego.

Należy wtedy określić naturę i źródło tego materiału.

**Zdolność do wzrostu w postaci guza** (tumorigenicity) — nie ma kryteriów określających zdolność do tworzenia guzów przez komórki obserwowane jedynie in vitro. Cecha ta może być określona tylko na podstawie zachowania się komórek po przeszczepieniu ich zwierzętom doświadczalnym.

**Toksyczność** (toxicity) — Zjawisko



występujące w hodowli, które nabiera znaczenia tylko wtedy, gdy jest opisany również obserwowany skutek.

Np. zjawisko, które wpłynęło na zmianę wyglądu komórek, ich zdolność do przyczepiania się do powierzchni, szybkość rozplemu (rozrostu), śmiertelność itd.

\* \* \*

Przekazując Czytelnikom *Mianownictwo dotyczące hodowli komórek i tkanek in vitro*, opracowane przez Komisję Hodowli Komórek i Tkanek Komitetu Patofizjologii PAN, Redakcja zwraca się z uprzejmą prośbą o nadsyłanie uwag na ten temat do dnia 30 maja 1979 r. Nadesłane uwagi, po rozpatrzeniu przez Komisję Hodowli Komórek i Tkanek oraz Redakcję „Postępów Biologii Komórki”, zostaną opublikowane w zeszycie 4/1979 i z tą chwilą *Mianownictwo* wraz z przyjętymi uwagami Czytelników będziemy uważali za obowiązujące.



**Warunki prenumeraty kwartalnika**  
**POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.—      półrocznie zł 40.—

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

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

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

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

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

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

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

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

I. KACZMARSKA, Budowa i powstawanie krzemionkowych pancerzyków okrzemek . . . . .	1
M. POLAŃSKI, Plazmolema komórki roślinnej. I. Morfologia, izolacja i struktura . . . . .	17
H. LUBOŃ i D. TYRAWSKA - SPYCHAŁOWA, Proteazy białek chromatyny . . . . .	31
Recenzja . . . . .	51
Mianownictwo dotyczące hodowli komórek i tkanek in vitro . . . . .	53

Indeks 36970