

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 8-NR 1
1981 (1-86)**

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 597 + 103 egz. Ark. wyd. 7,75. Ark. druk. $5\frac{5}{8} + \frac{1}{8}$ wkł. Papier druk. ilustr. III kl., 70 g,
70×100 cm. Oddano do składania w grudniu 1980 r. Podpisano do druku w marcu 1981 r.
Druk ukończono w marcu 1981 r. Zam. 2537/80 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

POLIMERAZY DNA KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH I REWERTAZY ONKOWIRUSÓW

EUKARYOTIC DNA POLYMERASES AND ONCORNA VIRUSES POLYMERASES

Wiesława BARTNIKOWA

Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej Instytut Onkologii Oddział w Gliwicach

Streszczenie. Na podstawie danych z piśmiennictwa zestawiono właściwości wirusowych rewertaz (RNA zależnych polimeraz DNA) i polimeraz DNA wydzielonych z komórek eukariotycznych. Omówiono wartość kryteriów stosowanych dla stwierdzenia obecności wirusowej rewertazy w materiale komórkowym. Wskazano na trudności rozdzielenia wirusowej rewertazy od komórkowych polimeraz DNA w przypadku badań prowadzonych na materiale komórkowym pochodzącym od zwierząt, będących naturalnymi gospodarzami onkowirusów.

Summary. The characteristics of viral reverse transcriptases (RNA-dependent DNA polymerases) and those of DNA polymerases isolated from eukaryotic cells have been compared on the basis of published reports. Some problems concerning the specificity of criterias applied to include eukaryotic-cellular enzymes into the group of viral reverse transcriptases have been discussed. Attention has been focused upon isolation procedures aiming at separation of viral reverse transcriptase from other cellular DNA polymerases. This task appears especially difficult in such experimental animals which are natural hosts of endogeneous oncornavirus.

W 1970 r. Baltimore [1] oraz Temin i Mizutani [113] stwierdzili w nowotworowych wirusach zawierających RNA (onkowirusy należące do rodziny retrowirusów) obecność polimerazy DNA katalizującej reakcję transkrypcji RNA w komplementarny DNA (tzw. cDNA). Enzym nazwano odwrotną transkryptazą, rewertazą lub też RNA zależną polimerazą DNA.

Przez pewien okres wydawało się, że aktywność rewertazy w badanym materiale komórkowym wskazuje na zakażenie tego materiału onkowirusem. W wyniku badań stwierdzono bowiem obecność rewertazy nie tylko w zakażonych onkowirusami hodowlach komórek [18, 19, 58] i w tkankach, w których zmiany nowotworowe powstały wskutek

zakażenia onkowirusem [45, 98, 99], lecz również w tkance nowotworowej o nie udowodnionej wirusowej etiologii [8, 9, 23, 25, 26, 36, 39, 96, 110, 125, 131]. Rola rewertazy w mechanizmie zakażenia nowotworowymi wirusami RNA polega na umożliwieniu przepisania informacji zawartej w wirusowym RNA na „prowirusowy” DNA, który może integrować w odpowiednich warunkach z genomem komórki. Obecność rewertazy w komórkach, zarówno w trakcie zakażenia wirusem, jak i w okresie tworzenia cząstek wirusa, była zgodna z oczekiwaniami. Szybko jednak uzyskano dane wskazujące na obecność rewertazy w nie-nowotworowych wirusach RNA [67, 84], w hodowlach komórek normalnych [19, 56, 89, 112], w normalnych tkankach [25, 27, 78–80, 85, 87, 93, 99] i w limfocytach stymulowanych fitohemaglutyniną [85]. Nasuwało się przypuszczenie, że kataliza reakcji odwrotnej transkrypcji, tj. przepisanie informacji zapisanej w RNA na cDNA, nie jest wyłączną właściwością rewertaz wirusowych. Badania aktywności polimerazy DNA I z *E. coli*, prowadzone przez Travaglini i Loeb [115], potwierdziły w pewnym sensie te przypuszczenia, gdyż stwierdzono, że enzym ten katalizuje reakcję transkrypcji RNA hemoglobiny królika na komplementarny DNA. Powstało zatem pytanie, czy możliwość katalizowania reakcji odwrotnej transkrypcji może również być cechą charakterystyczną eukariotycznych polimeraz DNA [94] oraz czy istnieje związek między wirusową rewertazą i komórkowymi polimerazami DNA, jak postulował Temin [73, 114].

POLIMERAZY DNA KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH

Z komórek eukariotycznych wydzielono cztery polimerazy DNA nazywane α , β , γ i mitochondrialna [126]. Można je odróżnić za pomocą właściwości chromatograficznych, ciężaru cząsteczkowego i zdolności do katalizowania reakcji transkrypcji różnych matryc.

α polimeraza DNA — do niedawna nazywana „cytoplazmatyczną”, dużą polimerazą — mieści się w jądrze komórkowym. W roztworach wodnych wydzielana jest we frakcji cytoplazmatycznej. Wydaje się jednak, iż podobnie jak w przypadku β polimerazy DNA obecność α polimerazy DNA w cytoplazmie jest artefaktem wynikającym ze stosowania roztworów wodnych do rozdziału jądra od cytoplazmy. Herrick i wsp. [50] wywołując enukleację za pomocą cytochalazyny stwierdzili obecność 85% aktywności polimeraz DNA w izolowanych jądrach. Siebert i wsp. [102] uzyskali podobne rezultaty, używając rozpuszczalników organicznych do izolacji jąder, a Foster i Gurney [33], preparując jądra komórkowe z użyciem glicerolu, stwierdzili jedynie 10% całkowitej aktywności komórkowych polimeraz DNA w cytoplazmie. α polimeraza

DNA jest pierwszą poznaną polimerazą DNA ssaków [11]. Jej obecność stwierdzono w grasicy cielęcej [133], w komórkach ludzi [32, 101] myszy [70], królika [22], w tkankach ptasich [12], w jajach jeżowców [68] i w drożdżach [131].

Ciężar cząsteczkowy α polimeraz DNA jest różny i waha się od 70 000 do 1 000 000 daltonów w zależności od materiału biologicznego, z którego je izolowano, i od stosowanych warunków oznaczeń [101, 106, 129]. Jak dotąd nie uzyskano enzymu w postaci czystej. Heterogenność uzyskiwanych preparatów α polimerazy DNA wydaje się mieć związek z proteolitycznym rozkładem białka enzymatycznego w trakcie procesu oczyszczania. Powoduje to wydzielanie zwiększonej ilości aktywnych enzymatycznie białek o mniejszym ciężarze cząsteczkowym [70, 71]. Ten fakt stał się punktem wyjściowym dla spekulacji dotyczących związków strukturalnych między α i β polimerazą DNA. Aktywność α polimerazy DNA gwałtownie rośnie wraz z pobudzeniem proliferacji komórkowej [3, 17], co sugeruje, iż głównie ten enzym bierze udział w replikacji DNA [3, 15, 21, 106]. α polimeraza DNA jest bardzo aktywna wobec matrycy „aktywowanego” DNA (dwuniciowy DNA poddany działaniu DNazy I), a produktem reakcji jest dwuniciowy DNA o strukturze „szpilki do włosów” (hairpin-like) [120]. Najwyższą aktywność wykazuje enzym wobec syntetycznych matryc * dezoksyrybonukleotydowych, choć katalizuje również reakcję transkrypcji matryc będących łańcuchem polirybonukleotydowym, np. poli (A).

β polimeraza DNA — nazywana jest „małą, jądrową” polimerazą DNA. W komórkach znajduje się najprawdopodobniej w jądrze, chociaż — jak już wspomniano — w roztworach wodnych wydzielana jest z frakcji cytoplazmatycznej. Enzym znaleziono najpierw w komórkach HeLa, a później w jądrach komórek wątroby szczura [2]. W formie jednorodnej uzyskano enzym wydzielony z grasicy cielęcej [13] i z ludzkich komórek KB [121]. Oczyszczony enzym posiada ciężar cząsteczkowy około 45 000 daltonów. Aktywność enzymu pozostaje niezmieniona niezależnie od stopnia proliferacji komórkowej [3, 16]. Brak korelacji aktywności enzymatycznej z aktywnością replikacyjną sugeruje, że enzym może pełnić funkcje naprawcze. Potwierdza to inkorporacja nawet pojedynczych dezoksyrybonukleotydów w obecności matrycy będącej „aktywowanym” DNA (DNA zawierające wiele końcowych grup 3'—OH) [14]. W obecności odpowiednich primerów * dezoksyrybonukleo-

* Termin „matryca” użyty jest dla określenia polinukleotydu kopiowanego przez polimerazę DNA. Z matrycą związany jest wiązaniami wodorowymi krótki łańcuch „primera”, tzn. łańcuch komplementarnego polinukleotydu lub oligonukleotydu zawierający końcową grupę 3'-OH, do której zostają kowalentnie dołączone dezoksyrybonukleotydy syntetyzowanej nici.

tydowych enzym katalizuje reakcje transkrypcji informacji zawartej w łańcuchu polirybonukleotydowym. Wydajność reakcji transkrypcji matrycy polidezoksyrybonukleotydowej jest wyższa niż reakcji przebiegającej wobec matrycy polirybonukleotydowej: poli (dA) i poli (dC) > > poli (A) lub poli (C) [14].

γ polimeraza DNA, nazywana również R-DNA polimerazą, została wydzielona z komórek HeLa [34], a także z komórek myszy [89] i ludzi [66, 107]. Jak dotąd nie uzyskano jednorodnego preparatu γ polimerazy DNA. Ciężar cząsteczkowy oznaczony dla heterogennych preparatów waha się od 100 000 do 300 000 daltonów. γ polimeraza DNA katalizuje zarówno reakcje transkrypcji matryc będących naturalnymi i syntetycznymi polidezoksyrybonukleotydami, jak również matryc będących polirybonukleotydami (np. poli (A) i poli (C)). Stwierdzono 5-10-krotnie wyższą wydajność reakcji transkrypcji matrycy poli (A) niż poli (dA) [128].

Mitochondrialna polimeraza DNA została wydzielona z mitochondriów pochodzących z komórek wątroby szczura (Kalf i Ch'ih [54] oraz Meyer i Simpson [72]) i różni się od polimeraz α , β , i γ tym, że wyższe stężenie soli nie hamuje, lecz pobudza jej aktywność [72]. Dyskutowana jest możliwość, że γ polimeraza DNA i mitochondrialna polimeraza DNA są tym samym enzymem. Wskazują na to również wyniki pracy Bolena i wsp. [10].

ZWIĄZKI STRUKTURALNE MIĘDZY POLIMERAZAMI DNA KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH

Zmienne właściwości α polimerazy DNA zależne od stężenia soli [16, 22, 49, 63] i od kolejności etapów oczyszczania [121], jak również niejednorodność uzyskiwanych preparatów enzymatycznych wskazują na pewną niestabilność strukturalną tego białka [22, 51, 70]. Zmienne właściwości enzymu nasunęły przypuszczenie, że cząsteczka α polimerazy DNA składa się z podjednostek będących β polimerazą DNA [49, 63]. Hecht [48] podaje, że przeprowadzenie enzymu o stałej sedymentacji 6-8 S (α polimeraza DNA) w enzym o stałej sedymentacji 3,5 S nadaje temu białku cechy właściwe dla enzymu „jądrowego”, tzn. β polimerazy DNA. α polimeraza DNA, jak sugerują Hecht i Davidson [49], stanowi agregat 3,5 monomeru, a zmiana formy α w β zależy od stanu fizjologicznego komórki. Również de Recondo i Abadiedebat [88] stwierdziły w jądrze i w cytoplazmie komórek z regenerującej wątroby szczura obecność polimerazy DNA, która zmienia swe właściwości w zależności od stężenia soli. W roztworze o niskim stężeniu soli enzym posiada właściwości α polimerazy DNA, a w roztworze o wysokim stężeniu soli — β

polimerazy DNA. Inne prace nie potwierdzają możliwości zmiany enzymu α w β [101, 106]; nie stwierdzono także powinowactwa antygenowego między obu enzymami, tj. między α i β polimerazą DNA [104, 106].

REWERTAZY ONKOWIRUSÓW PTAKÓW I SSAKÓW

Onkowirusy, których genom zawiera RNA, posiadają informację dla szczególnej polimerazy DNA, która katalizuje reakcję transkrypcji RNA w komplementarny DNA [119]. Enzym ten, nazywany rewertazą, obecny jest w aktywnej formie w wirionie [1, 113]. Wirowanie wirusa traktowanego niejonowymi detergentami (Triton X - 100, Nonidet P - 40) w gradiencie sacharozy pozwala na stwierdzenie aktywności enzymu w tych samych pasmach gęstości, w których sedymentuje wirusowy RNA [1, 40, 46, 109].

WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE WIRUSOWYCH REWERTAZ

Rewertazy z onkowirusów różnią się między sobą znacznie pod względem właściwości strukturalnych. Rewertazy z wirusów ssaków są pojedynczym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym około 70 000 daltonów [43, 75, 77], natomiast rewertazy z ptasich onkowirusów posiadają ciężar cząsteczkowy około 150 000 daltonów i składają się z dwóch podjednostek polipeptydowych [28, 43]. Stwierdzono, że rewertaza z wirusa ptasiej mieloblastozy (AMV) składa się z podjednostki α o ciężarze cząsteczkowym 68 000 daltonów i z podjednostki β o ciężarze cząsteczkowym 105 000 daltonów [41, 53]. Główna część enzymu izolowanego z wirusem AMV stanowi kompleks podjednostek α i β w stosunku 1 : 1. Nie wielka ilość katalitycznie czynnej podjednostki α jest wymywana z fosfocelulozy w trakcie chromatograficznego oczyszczania przy niższej sile jonowej niż kompleks $\alpha\beta$. Moelling [77] sugeruje, że podjednostka α powstaje przez proteolityczny rozkład podjednostki β . Wspólną cechą wszystkich poznanych dotąd wirusowych rewertaz jest obecność rybonukleazy H (RNazy H). Obecność tego enzymu, katalizującego reakcję hydrolizy RNA obecnego w kompleksie RNA - DNA, stwierdzano nawet w preparatach rewertaz oczyszczanych chromatograficznie [38, 43, 64, 76, 77, 118, 124]. Obecność RNazy H stwierdzono oprócz aktywności rewertazy w podjednostce α [44, 117], co pozwala przypuszczać, iż aktywność RNazy obecna jest w tym samym polipeptydzie co aktywność rewertazy [117].

WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE WIRUSOWYCH REWERTAZ

Rewertazy z onkowirusów różnią się właściwościami chromatograficznymi. Rewertaza z wirusa mięsaka małąp wymywana jest z DEAE

celulozy 0,05 M KCl, podobnie jak komórkowa β polimeraza DNA [66], podczas gdy rewertaza z AMV wmywana jest z DEAE celulozy wyższym od 0,05 M stężeniem KCl, podobnie jak komórkowa α polimeraza DNA [53].

WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOLOGICZNE

Istnieją dane poszlakowe, iż rewertazy wirusowe różnią się między sobą właściwościami immunologicznymi. Można o tym sądzić na podstawie kilku prac, w których do wytworzenia przeciwciał stosowano oczyszczone białko enzymatyczne [83, 100]). Wyniki badań, w których stosowano do wytworzenia przeciwciał lizaty wirusów lub nie oczyszczone preparaty enzymatyczne, budzą wątpliwości [95].

WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE

Podobnie do wszystkich znanych polimeraz DNA, rewertaza wirusowa do rozpoczęcia swej działalności katalitycznej wymaga obecności matrycy i primera [105]. In vivo rolę primera spełnia obecny w genomie retrowirusów fragment 4S RNA, będący komórkowym tRNA [4, 47, 97, 122]. Stwierdzono, że primerem dla rewertazy z wirusów ptasich jest tRNA tryptofanu [4, 24, 29, 47], a dla rewertaz z onkowirusów myszy — tRNA proliny [86, 90, 122].

Dla wykazania aktywności enzymu wobec naturalnych matryc konieczna jest obecność wszystkich czterech dezoksyrybonukleotydów i jonów magnezu. Wydajność reakcji transkrypcji naturalnych matryc typu RNA jest in vitro niewielka [59, 108, 118, 123]. Najwyższą wydajność tej reakcji stwierdza się w reakcjach katalizowanych przez rewertazy z ptasich onkowirusów [59, 108, 118], natomiast reakcje z udziałem rewertaz ssaków osiągają najwyżej 50% tej wydajności [38], a nieraz tylko 25% [118] lub nawet 5% [74]. Moelling [77] podaje, iż w przypadku enzymów wydzielonych z wirusów mysich białaczek, transkrypcja heterogennych RNA możliwa jest jedynie wtedy, gdy wydzielony enzym nie uległ degradacji w trakcie procesów oczyszczania. W przypadku rewertazy z wirusa białaczki mysiej Friend, do spontanicznej degradacji białka enzymatycznego może dojść nawet jeszcze przed wydzieleniem białka z wirionu [77].

Wydajność reakcji katalizowanych przez rewertazy można znacznie zwiększyć stosując matryce syntetyczne. Szczególnie efektywny jako matryca okazał się kompleks poli (A) · poli (dT) i poli (A) · oligo (dT). Katalizowanie reakcji transkrypcji matrycy poli (A) uważano pierwotnie za cechę przesądzającą o zaliczeniu enzymu do grupy wirusowych rewertaz. Nieco później matryca poli (C) · oligo (dG) była tą, której przepisanie przesądzało o wirusowym pochodzeniu enzymu [96, 108]. Rewer-

tazy z różnych onkowirusów różnią się jednak znacznie pod względem wykazywanej specyficzności matrycowej [59, 60, 108, 118, 123] nawet wobec takich matryc, jak poli(A)·poli(dT), a matrycę poli(C)·oligo(dG) preferują tylko rewertazy z ptasich onkowirusów [75, 95]. Wyniki pracy Kontora i Kruegera wskazują ponadto, iż enzymy towarzyszące tym samym onkogennym wirusom RNA, namnażanym w różnych hodowlach komórkowych, różnią się pod względem wykazywanej specyficzności matrycowej [60].

POJAWIENIE SIĘ NOWYCH POLIMERAZ DNA
W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH
W WARUNKACH ZAKAŻENIA WIRUSAMI DNA LUB RNA

Zakażenie wirusem może spowodować pojawienie się w komórce dodatkowej polimerazy DNA i istnieją tu dla wirusów DNA dwie ewentualności:

1. Wirusy posługują się systemem replikacji komórki gospodarza; dzieje się tak w przypadku małych wirusów nie posiadających informacji dla własnej polimerazy DNA, jak np. wirusy należące do grupy „papowa” (rodzina *Papillomaviridae*) [58].

2. Wirusy posługują się własnym systemem replikacji, np. wirusy należące do rodziny wirusów opryszczki (*Herpesviridae*); replikacja tych wirusów odbywa się niezależnie od cyklu życiowego komórki [20]. W tych przypadkach po zakażeniu pojawia się nowa polimeraza DNA, jak np. wydzielona z zakażonych komórek HeLa, która posiada ciężar cząsteczkowy 180 000 daltonów. W przeciwieństwie do komórkowych polimeraz DNA enzym ten wykazuje dużą aktywność nawet w środowisku o dużym stężeniu soli [127].

Po zakażeniu wirusami RNA, czyli retrowirusami, w komórce pojawia się nowa polimeraza DNA, czyli rewertaza [66]. Retrowirusy posiadają w swym genomie informację dla własnej polimerazy DNA [12], która w formie aktywnej obecna jest w wirionie [1, 113]. Różnice we właściwościach rewertaz pochodzących z różnych onkowirusów utrudniają właściwą ocenę danych z piśmiennictwa, donoszących o obecności rewertazy wirusowej zarówno w tkankach nowotworowych, jak i w prawidłowych. Wydaje się, że zbieżność pewnych właściwości eukariotycznych polimeraz DNA i wirusowych rewertaz spowodowała, że wydzielony z komórek enzym zaliczano nieraz pochopnie do grupy rewertaz. Ostatnio uważa się, że wśród eukariotycznych polimeraz DNA najbardziej zbliżone właściwości do rewertaz wirusowych posiada γ polimeraza DNA [95]. Jako kryterium podobieństwa enzymów uważa się katalizowanie reakcji transkrypcji matryc poli(A)·oligo(dT) i poli(C)·oligo

(dG), co w świetle przytoczonych danych, dotyczących właściwości wirusowych rewertaz i komórkowych polimeraz DNA, budzi poważne zastrzeżenia.

Wydaje się zatem konieczne omówienie metod stosowanych dla wyróżnienia rewertaz spośród komórkowych polimeraz DNA i przedstawienie krytycznej oceny wartości tych metod.

METODY STOSOWANE DLA WYRÓŻNIENIA REWERTAZ WIRUSOWYCH SPOŚRÓD KOMÓRKOWYCH POLIMERAZ DNA

W pierwszych latach po odkryciu rewertazy dowodem na obecność tego enzymu w materiale komórkowym było:

1. stwierdzenie w badanym materiale komórkowym obecności RNazo-wrażliwej frakcji enzymatycznej sedimentującej w gradiencie sacharozy w pasmie gęstości właściwym dla retrowirusów lub

2. stwierdzenie obecności hybrydu RNA - DNA w produkcie krótkotrwałej reakcji przebiegającej wobec endogennej matrycy zawartej w badanym materiale komórkowym.

Na podstawie tych kryteriów stwierdzono obecność rewertazy wirusowej w mleku kobiet [25, 31, 93, 99], w leukocytach ludzi chorych na białaczkę [8, 35, 36], w tkance guza sutka myszy [45, 98], w komórkach embrionalnych zdrowych kurcząt [55, 57], w hodowlach komórek pochodzących z grasicy zdrowych szczurów [112], w komórkach guza Burkitta [62, 110], w hodowli komórek pochodzących od pacjenta z czerwienicą prawdziwą [125].

Uważne prześledzenie wyników uzyskanych w 1971 r. przez Coffina i Temina [19] nasuwa poważne wątpliwości co do pierwszej metody identyfikacji rewertazy w materiale komórkowym. Okazuje się, że produkt RNazo - wrażliwej reakcji transkrypcji endogennej matrycy sedimentującej w gradiencie sacharozy wraz z polimerazą DNA wykazuje podobieństwo do komórkowego RNA niezależnie od tego czy badany materiał pochodził z komórek zdrowych, czy też zakażonych onkowirusem. Wyniki uzyskane w układzie doświadczalnym, w którym stosowano materiał pochodzący z komórek, które posiadały wbudowaną w DNA 5 - bromo - dezoksyurydynę (BUDR) [61], wyjaśniają do końca powstałe wątpliwości. Okazało się, iż matrycą w RNazo - wrażliwej reakcji, katalizowanej przez enzym obecny we frakcji mikrosomowej, jest komórkowy DNA, a nie RNA.

Wartość drugiej metody identyfikacji rewertazy w materiale komórkowym można również zakwestionować. Wiadomo bowiem, że RNA jest naturalnym primerem dla syntezy DNA. Obecność kowalentnie

związanego RNA - DNA w produkcji krótkotrwałej reakcji transkrypcji endogennej matrycy może wskazywać na to, iż wydzielają się tzw. „fragmenty Okazaki”, tj. cząsteczki nowo powstałego DNA, syntetyzowanego na matrycy DNA związanego kowalentnie z primerem, którym jest RNA [111].

Tak więc stwierdzenie obecności wirusowej rewertazy na podstawie obu podanych metod nie może być przekonujące.

Jako kryterium zaliczania enzymu wydzielonego z komórek do grupy wirusowych rewertaz stosuje się również właściwości katalityczne przejawiane przez enzym w reakcjach przebiegających wobec syntetycznych polirybonukleotydów, takich jak poli (A) lub poli (C) [26, 79, 85, 87, 89, 103, 125, 130]. Trudno nie ustosunkować się krytycznie i do tego sposobu wnioskowania skoro wiadomo, że eukariotyczne polimerazy DNA również katalizują reakcje transkrypcji informacji zawartej w polirybohomopolimerach. Podobnie krytycznie należy się ustosunkować do stwierdzenia obecności wirusowej rewertazy w „surowym” ekstrakcie komórkowym na podstawie transkrypcji matrycy poli (C) · oligo (dG) [27, 78, 80]. Wiadomo bowiem, że matrycę poli (C) · oligo (dG) — bardzo wrażliwą na działanie hydrolaz — można stosować dopiero w materiale wydzielonym poprzez chromatografię na fosfocelulozie [37] i że matrycę tę preferują jedynie rewertazy z ptasich onkowirusów [95].

W nadziei znalezienia matrycy specyficznej wyłącznie dla wirusowej rewertazy, czyniono próby zastosowania polirybonukleotydów zmodyfikowanych przez podstawniki. W wyniku takich prób Gerard i wsp. [37, 39] postulowali, że matryca poli (Cm) · oligo (dG) (poli (Cm) = poli (2'-0-metylo-cytydyna)) jest specyficzna dla rewertazy obecnej w tkankach nowotworowych. Na razie jedynie Ohno i wsp. [82] zastosowali tę matrycę dla określenia właściwości rewertazy enzymu wydzielonego z tkanki ludzkiego guza sutka.

Trudności w określeniu specyficzności matrycowej wirusowych rewertaz skłoniły Sarngadharana i wsp. [95] do podjęcia prób różnicowania ilościowego właściwości katalitycznych wirusowych rewertaz i eukariotycznych polimeraz DNA. Autorzy na podstawie danych z własnego ośrodka postulują, iż stosunek aktywności polimeraz DNA wobec matrycy poli(dA) · oligo(dT)/poli (A) · oligo(dT) jest charakterystyczny dla różnych polimeraz. I tak, dla wirusowej rewertazy według Sarngadharana i wsp. stosunek ten jest mniejszy od 0,01 dla α polimerazy DNA — znacznie większy od 1, a dla β polimerazy — jedynie nieco większy od 1. Z danych z piśmiennictwa wynika jednak, że stosunek ten może dla rewertazy z AMV wynosić 0,11 [52] lub nawet od 0,2 do 0,8 [6], dla rewertazy z wirusa Rauschera — 0,13 [52], a dla rewertazy z wirusa Grossa — od 0,94 do 2,12 w zależności od stosunku zasad w stosowanym

kompleksie poli (A) · oligo (dT) [15]. Ponadto przy przechowywaniu rewertazy wydzielonej z AMV stwierdza się różne straty aktywności wobec różnych syntetycznych matryc [6, 30], a w trakcie ogrzewania enzymu stwierdza się niejednolity spadek aktywności w zależności od stosowanej matrycy [69]. Centra aktywne wobec matrycy poli (A) · oligo (dT) są najbardziej wrażliwe. Eksperymenty z inhibitorami potwierdzają, że zmiany aktywności rewertaz w stosunku do różnych matryc nie przebiegają równolegle [65]. Tak więc proponowane przez Sarngadharana i wsp. [95] kryterium rozróżnienia polimeraz DNA na podstawie stosunków ilościowych nie może być uważane jako kryterium pewne i rozstrzygające.

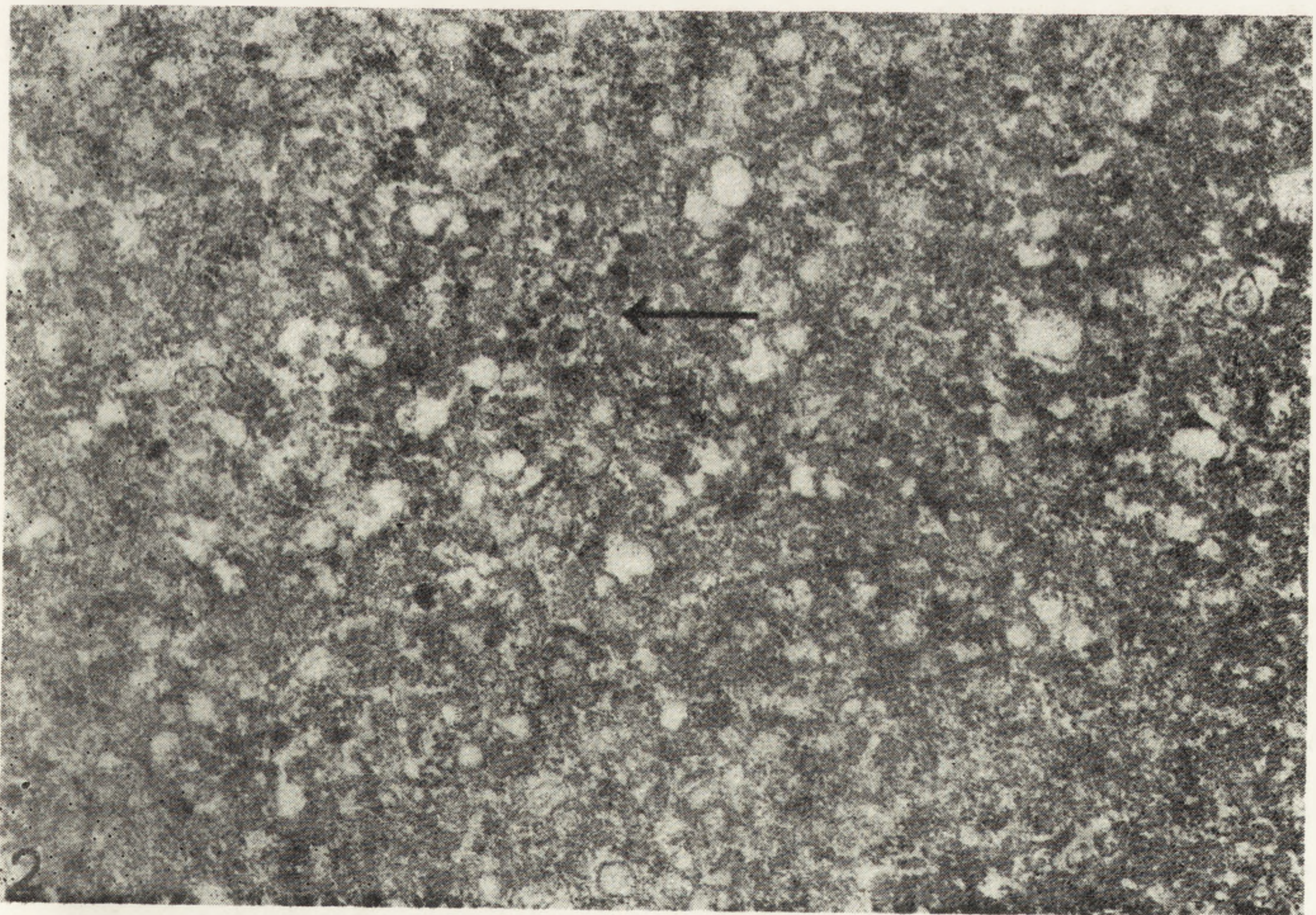
Najwłaściwszym kryterium zaliczenia enzymu wydzielonego z komórek eukariotycznych do klasy rewertaz wirusowych pozostałoby wobec tego katalizowanie reakcji transkrypcji naturalnych RNA. Należy być jednak świadomym tego, że rewertazy wirusowe *in vitro* znacznie różnią się w wydajności katalizowanej przez siebie reakcji transkrypcji naturalnych RNA [60, 74] i że enzym może zostać pozbawiony możliwości katalizowania reakcji transkrypcji naturalnego RNA przez procesy proteolityczne zachodzące w trakcie oczyszczania białka enzymatycznego lub nawet jeszcze wtedy, gdy znajduje się wewnątrz wirionu [77].

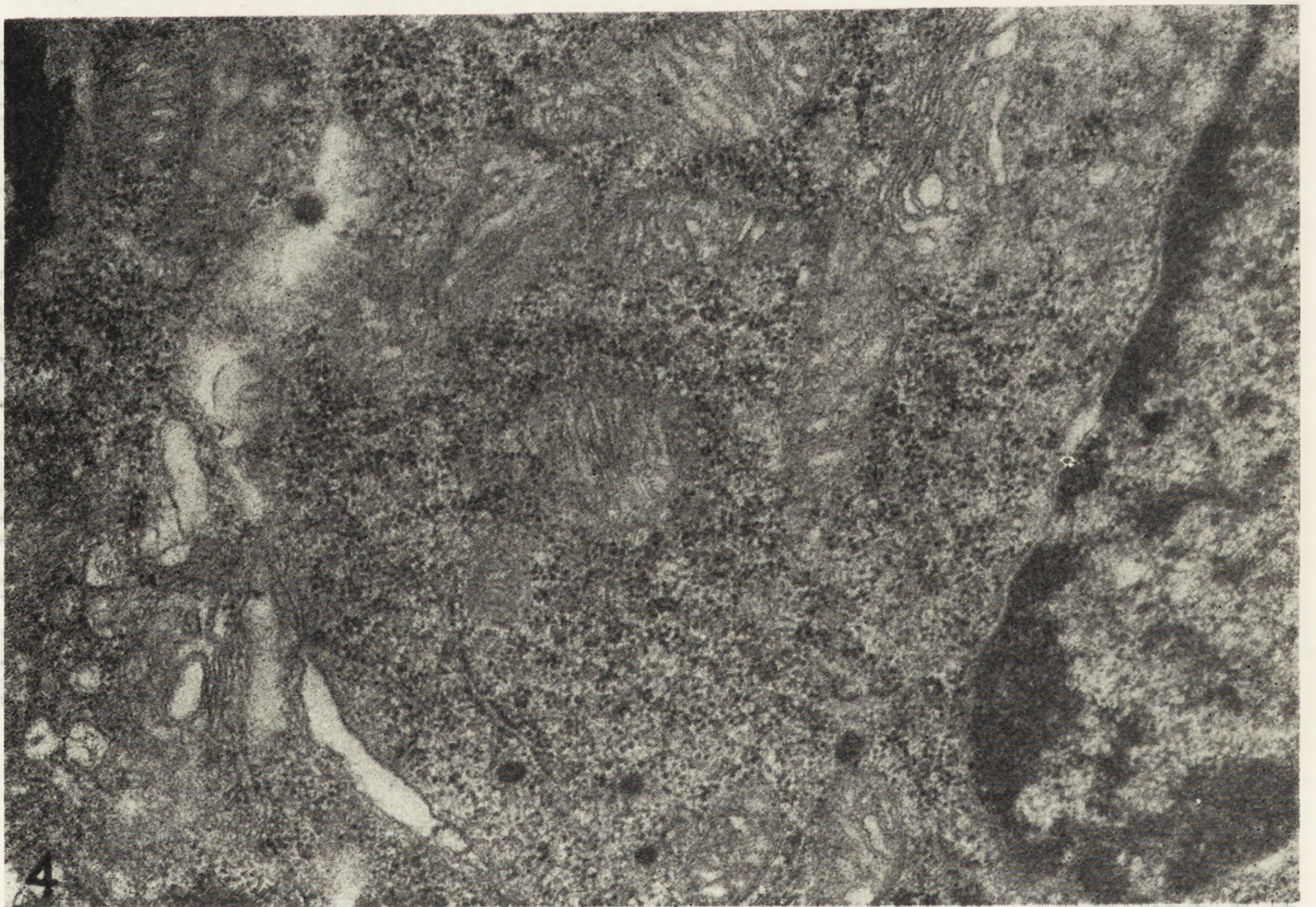
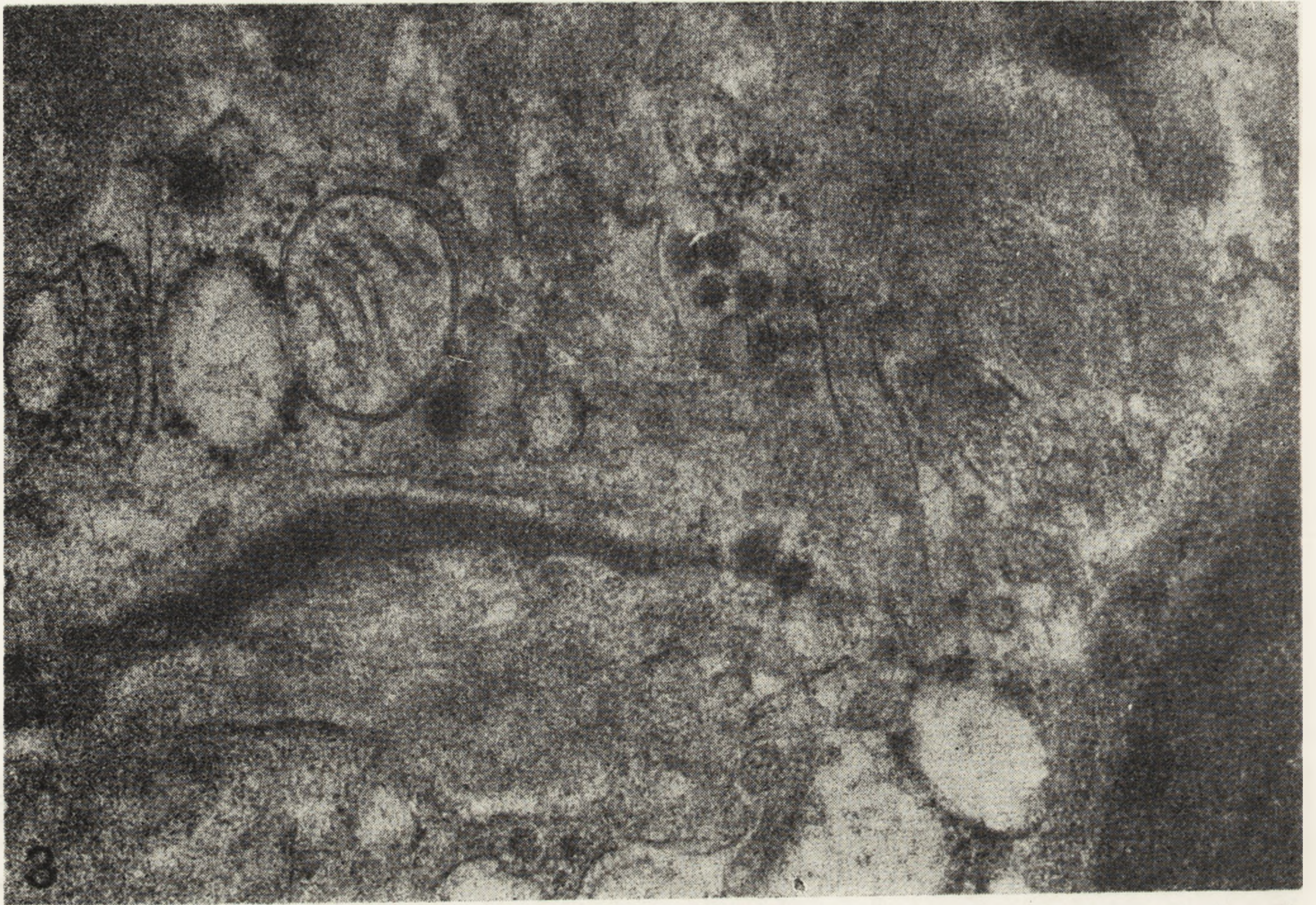
Metody immunologiczne odróżnienia rewertazy wirusowej od komórkowych polimeraz DNA są trudne do zrealizowania, ponieważ rewertazy z endogennych retrowirusów wykazują powinowactwo immunologiczne do komórkowych polimeraz DNA [73], a rewertazy wirusowe różnią się znacznie między sobą właściwościami immunologicznymi [84, 96].

Wyróżnienie rewertazy spośród komórkowych polimeraz DNA jest zatem zadaniem trudnym. Kryteria fizykochemiczne, takie jak stałe sedymentacji i ciężar cząsteczkowy, nie mogą mieć znaczenia decydującego z uwagi na niejednorodność uzyskiwanych preparatów enzymatycznych zarówno pochodzenia komórkowego, jak i wirusowego. Pewne wskazówki uzyskać można jedynie na podstawie powinowactwa do wymienników jonowych oraz z porównania kinetyki reakcji enzymatycznej. Należy przy tym mieć na względzie fakt, iż np. rewertaza z wirusa AMV pod względem powinowactwa do wymienników jonowych przypomina α polimerazę DNA i z DEAE celulozy wmywane jest stę-

Ryc. 1. Duże nagromadzenie retrowirusów w mieloblastacie kurczęcia zakażonego wirusem ptasiej mieloblastozy. Powiększenie 23 400

Ryc. 2. Frakcja mikrosomowa uzyskana z mieloblastów kurcząt zakażonych wirusem ptasiej mieloblastozy z licznymi cząstkami wirusowymi. Powiększenie 23 400; → cząstki wirusowe





żeniem KCl wyższym od 0,05 M [53], a np. rewertaza z wirusa mięsaka małop pod względem powinowactwa do wymienników jonowych przypomina β polimerazę DNA i z DEAE celulozy jest wmywana buforem zawierającym 0,05 M KCl [66].

Z ogromnej ilości prac na temat obecności rewertazy wirusowej w materiale komórkowym dzisiejszy stan wiedzy pozwala zatem zachować jedynie nieliczne prace, w których stwierdzono obecność enzymu zdolnego do katalizowania reakcji syntezy DNA na matrycy naturalnego RNA [9, 82, 96, 132] lub też prace stwierdzające obecność rewertazy poprzez chromatograficzne rozdzielenie jej od komórkowych polimerów DNA i zestawienie właściwości wydzielonego z komórek enzymu z właściwościami enzymu wydzielonego z odpowiedniego wirusa [66].

REWERTAZY WIRUSOWE

W KOMÓRKACH NATURALNYCH GOSPODARZY ONKOWIRUSÓW

Podjęto próby wydzielenia rewertazy wirusowej spośród komórkowych polimerów DNA u zwierząt będących naturalnymi gospodarzami retrowirusów. U kurcząt po zakażeniu wirusem AMV w trakcie ostrej mieloblastozy dochodzi do wytworzenia dużej liczby cząstek retrowirusa. Z frakcji mikrosomalnej chorych kurcząt wydzielono enzym katalizujący reakcję transkrypcji heterogennego RNA w komplementarny DNA. Enzym wykazuje tę samą specyficzność matrycową co enzym wydzielony z wirusa AMV [6]. We frakcji mikrosomalnej obecne są błony gładkie i cząstki wirusowe (ryc. 1 i 2).

Jak wynika z danych z piśmiennictwa, błonom gładkim zwykle towarzyszy w tych warunkach aktywność α polimerazy DNA [2, 49, 63, 70]. Stosowane warunki rozdziału chromatograficznego spełniają warunki niezbędne dla wydzielenia z badanego materiału biologicznego zarówno α polimerazy DNA, jak i rewertazy z wirusa ptasiej mieloblastozy (AMV). Oba enzymy, tzn. α polimeraza DNA i rewertaza z AMV wmywane są z DEAE celulozy stężeniem KCl wyższym od 0,05 M [53, 66, 103]. Nasuwa się przypuszczenie, że albo w badanej frakcji komórkowej komórek produkujących onkowirusy obecna jest w aktywnej formie tylko rewertaza potrzebna dla wyposażenia tworzonych cząstek wirusowych w aktywną formę tego białka, albo też obecna w tej frakcji

Ryc. 3. Retrowirusy w komórce śledziony zdrowej myszy AKR/J. Powiększenie 37 400

Ryc. 4. Retrowirusy w komórce śledziony myszy AKR/J z przeszczepialną ostrą białaczką limfatyczną. Powiększenie 23 400

rewertaza wirusowa i komórkowa α polimeraza DNA są pod względem pewnych właściwości tak podobne, że trudno je rozdzielić chromatograficznie [6].

Do podobnych wniosków prowadzą próby wydzielenia rewertazy z komórek śledziony myszy AKR/J, u których endogenna informacja związana z wirusem białaczki Grossa powoduje, że w tkankach tych zwierząt stale znajduje się pewna ilość cząstek wirusowych [81, 92] (ryc. 3 i 4). Polimeraza DNA wydzielona ze śledziony zdrowych myszy AKR/J, myszy z przejściową splenomegalią wywołaną podaniem fenyllohydrazyny oraz myszy z ostrą przeszczepialną białaczką limfatyczną, która posiada właściwości β polimerazy DNA, wykazuje pod względem specyficzności matrycowej wrażliwości na zmiany pH, jak również pod względem kinetyki reakcji — podobieństwo do rewertazy obecnej w wirusie Grossa [7]. Ten stan rzeczy może wynikać z niedoskonałości stosowanych metod rozdziału chromatograficznego. Zastosowanie jednak różnych grup eksperymentalnych, zmieniające udział komórkowej polimerazy DNA i wirusowej rewertazy w hipotetycznej mieszaninie obu enzymów, nie spowodowało żadnych zmian obserwowanych właściwości, potwierdzając tym samym, iż oba enzymy posiadają rzeczywiście szereg właściwości wspólnych lub być może są nawet identyczne. Sugestie w sprawie podobieństwa enzymu wirusowego i komórkowego zawierała już praca opublikowana w 1974 r. przez Mizutani i Temina [73], w której u ptaków stwierdzono serologiczne powinowactwo polimeraz DNA wydzielonych z onkowirusów i ze zdrowych komórek.

Pojawienie się w komórce dodatkowej polimerazy DNA zachodzi zatem zapewne tylko po zakażeniu obcogatunkowym wirusem, jak to stwierdzili Lewis i wsp. [66] w przypadku ludzkich fibroblastów zakażonych wirusem mięsaka małp. W komórce nowotworowej można by oczekiwać obecności polimeraz DNA różne od polimeraz DNA komórki zdrowej jedynie wtedy, gdy zmiany nowotworowe zostały wywołane zakażeniem obcym, egzogennym wirusem.

Obecnie wygasa zainteresowanie rewertazą jako wyznacznikiem wskazującym na wirusowe pochodzenie choroby nowotworowej lub też informującym o zmianach nowotworowych. Spadek zainteresowania aktywnością tego enzymu dla badań diagnostycznych tłumaczy przedstawione trudności interpretacyjne uzyskanych wyników. Aktywność wirusowej rewertazy ma natomiast dużą wartość dla genetyki molekularnej w badaniach związanych z poznaniem struktury i funkcji genomu. Do tego celu służy zsyntetyzowany *in vitro* za pomocą wirusowej rewertazy tzw. „cDNA”, tzn. DNA komplementarny do różnych typów mRNA [42, 90, 91, 116].

LITERATURA

- [1] BALTIMORE D., Viral RNA dependent polymerase, *Nature*, **226**: 1209-1211, 1970.
- [2] BARIL E. F., BROWN O. E., JENKIS M. D., LASZLO J., Deoxyribonucleic acid polymerases with rat liver ribosomes and smooth membranes. Purification and properties of the enzymes, *Biochemistry*, **10**: 1981-1992, 1971.
- [3] BARIL E. J., JENKINS M. D., BROWN O. E. LASZLO J., MORRIS H. P., DNA polymerase I and II in regenerating rat liver and Morris Hepatomas, *Cancer Res.*, **33**: 1187-1193, 1973.
- [4] BAROUDY B. M., FOURNIER M., LOBOUESSE J., PAPAS T. S., CHIRIKJIAN J. G., t-RNA-Trp(bovine) binding to the reverse transcriptase of avian myeloblastosis virus and function as a heterologous primer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 1889-1893, 1977.
- [5] BARTNIKOWA W., DNA polymerase from Gross murine leukemia virus, *Japan. J. Exp. Med.*, **49**: 9-11, 1979.
- [6] — Polimeraza DNA z frakcji mikrosomalnej mieloblastów kurcząt zakażonych wirusem AMV, *Acta Haemat. Pol.* (przyjęte do druku, 1980).
- [7] — Rewertaza z wirusa Grossa i polimerazy DNA z komórek śledzion myszy AKR (w przygotowaniu).
- [8] BAXT W., HEHLMAN R., SPIEGELMAN S., Human leukaemic cells contain reverse transcriptase associated with a high molecular weight virus related RNA, *Nature New. Biol.*, **240**: 72-75, 1972.
- [9] BHATTACHARYYA J., XUMA M., REITZ M., SARIN P. S., GALLO R. C., Utilization of mammalian 70 S RNA by a purified reverse transcriptase from human myelocytic leukemic cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 324-334, 1973.
- [10] BOLDEN A., NOY G. P., WEISSBACH A., DNA polymerase of mitochondria is a γ -polymerase, *J. Biol. Chem.*, **252**: 3351-3356, 1977.
- [11] BOLLUM F., Calf thymus polymerase, *J. Biol. Chem.*, **235**: 2399-2403, 1960.
- [12] BRUN G., ROUGEON F., LAUBER M., CHAPEVILLE F., Comparative studies on the template initiator requirements of chick embryo DNA polymerase I and avian myeloblastosis virus DNA polymerase, *Eur. J. Biochem.*, **41**: 253-261, 1974.
- [13] CHANG L. M., Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. 1. Preparation of homogenous enzyme, *J. Biol. Chem.*, **248**: 3789-3795, 1973.
- [14] CHANG L. M., BOLLUM F. J., Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from rabbit bone marrow. *Biochemistry*, **11**: 1264-1712, 1972.
- [15] — A comparison of associated enzyme activities in various deoxyribonucleic acid polymerases, *J. Biol. Chem.*, **248**: 3398-3404, 1973.
- [16] CHANG L. M., BROWN M., BOLLUM F., Induction of DNA polymerase in mouse L cells, *J. Mol. Biol.*, **74**: 1-8, 1973.
- [17] CHIU R. W., BARIL E. F., Nuclear DNA polymerase and HeLa cell cycle, *J. Biol. Chem.* **250**: 7951-7957, 1975.
- [18] COFFIN J. M., TEMIN H. M., Comparison of Rous Sarcoma Virus-specific deoxyribonucleic acid polymerase in virions of Rous Sarcoma virus and in Rous Sarcoma Virus-infected chicken cells, *J. Virol.*, **7**: 625-634, 1971.
- [19] — Ribonuclease-sensitive deoxyribonucleic acid polymerase activity in unin-

- fecting rat cells and rat cells infected with Rous Sarcoma Virus, *J. Virol.*, **8**: 630-642, 1971.
- [20] COHEN G. H., VANUGHAN R. K., LAWRENCE W. C., Deoxyribonucleic acid synthesis in synchronized mammalian KB cells infected with herpes simplex virus, *J. Virol.*, **7**: 783-791, 1971.
- [21] CRAIG R. K., COSTELLO P. A., KEIR H. M., Deoxyribonucleic acid polymerases of BHK-21/C₁₃ cells. Relationship to the physiological state of the cells and synchronous induction of synthesis of deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.*, **145**: 233-240, 1975.
- [22] CRAIG R. K., KEIR H. M., Deoxyribonucleic acid polymerases of BHK-21/C₁₃ cells. Heterogeneity, molecular asymmetry and subcellular distribution of the enzymes, *Biochem. J.*, **145**: 225-232, 1975.
- [23] CUATICO W., CHO J. R., SPIEGELMAN S., Evidence of particle-associated RNA-directed DNA polymerase and high molecular weight RNA in human gastrointestinal and lung malignancies, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3304-3308, 1974.
- [24] DAHLBERG J. E., SAWYER R. C., TAYLOR J. M., FARAS A. K., LEVINSON W. E., GOODMAN H. M., BISHOP J. M., Transcription of DNA from the 70 S RNA of Rous Sarcoma virus. 1. Identification of a specific 4S RNA which serves as primer, *J. Virol.*, **13**: 1126-1133, 1974.
- [25] DAS M. R., VAIDA A. B., SIRSAT S. M., MOORE D. H., Polymerase and RNA studies on milk virions from women of the Parsi community, *J. Nat. Cancer Inst.*, **48**: 1191-1195, 1972.
- [26] DESAI L. S., SHORT D. L., FRIEDMAN O. M., FOLEY G. E., Human leukemic cells: RNA-directed DNA polymerase, *Eur. J. Biochem.*, **47**: 453-460, 1974.
- [27] DION A. S., VAIDYA A. B., GARLAND S. E., Cation preference for poly(rC)·oligo(dG) directed DNA synthesis by RNA tumor viruses and human milk particulates, *Cancer Res.*, **34**: 3509-3515, 1974.
- [28] DUESBERG P., HELM K. V., CANNANI E., Properties of a soluble DNA polymerase isolated from Rous Sarcoma virus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 747-751, 1971.
- [29] FARAS A. J., DAHLBERG J. E., SAWYER R. C., HARADA F., TAYLOR J. M., LEVINSON W. E., BISHOP J. M., GOODMAN H. M., Transcription of DNA from the 70S RNA of Rous Sarcoma virus. II. Structure of a 4S RNA primer, *J. Virol.*, **13**: 1134-1142, 1974.
- [30] FARAS A. J., TAYLOR J. M., McDONNELL J. P., LEVINSON W. E., BISHOP J. M., Purification and characterization of the deoxyribonucleic acid polymerase associated with Rous Sarcoma virus, *Biochemistry*, **11**: 2334-2342, 1972.
- [31] FELDMAN S. P., SCHLOM J., SPIEGELMAN S., Further evidence for oncornaviruses in human milk: the production of cores, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 1976-1980, 1973.
- [32] FISCHER P. A., KORN D., DNA polymerase α . Purification and structural characterization of the near homogenous enzyme from human KB cells, *J. Biol. Chem.*, **252**: 6528-6535, 1977.
- [33] FOSTER D. N., GURNEY T. Jr., Sizes of DNA polymerases from nuclei isolated by a non-aqueous method, *J. Cell Biol.*, **63**: 103a, 1974.
- [34] FRIDLINDER B., FRY M., BOLDEN A., WEISSBACH A., A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 452-455, 1972.

- [35] GALLO R. C., MILLER N. R., SAXINGER W. C., GILLESPIE D., Primate RNA tumor virus-like DNA synthesised endogenously by RNA dependent DNA polymerase in virus particle from fresh human acute leukemic blood cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3219-3224, 1973.
- [36] GALLO R. C., YANG S., TING R., RNA-dependent DNA polymerase of human acute leukaemic cells, *Nature*, **228**: 927-929, 1970.
- [37] GERARD G. F., Poly (2'-o-methylcytidylate)·oligodeoxyguanylate a template-primer specific for reverse transcriptase, is not utilized by HeLa cell γ DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Res Commun.*, **63**: 706-711, 1975.
- [38] GERARD G. F., GRANDGENETT D. P., Purification and characterization of the DNA polymerase and RNase H activities in Moloney murine sarcoma leukemia virus, *J. Virol.*, **15**: 785-797, 1975.
- [39] GERARD G. F., LOEVENSTEIN P. M., GREEN M., ROTTMAN F., Detection of reverse transcriptase in human breast tumor with poly (Cm)·oligo (dG), *Nature*, **256**: 140-143, 1975.
- [40] GERWIN B., TODARO G. J., TEVE V., SCOLNICK E. M., AARONSON S. A., Separation of RNA-dependent DNA polymerase activity from the murine leukaemia Virion, *Nature*, **228**: 435-438, 1970.
- [41] GIBSON W., VERMA I. M., Studies on the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Structural relatedness of two subunits of avian RNA tumor viruses, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 4991-4994, 1974.
- [42] GILBOA E., GOFF S., SHIELDS A., YOSHIMURA E., MITRA S., BALTIMORE D., In vitro synthesis of a kbp terminally redundant DNA carrying the infectivity of Moloney Murine leukemia virus, *Cell*, **16**: 863-874, 1979.
- [43] GRANDGENETT D. P., GERARD G. F., GREEN M., A single subunit from avian myeloblastosis virus with both RNA-directed DNA polymerase and ribonuclease H activity, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 230-234, 1973.
- [44] GRANDGENETT D. P., GREEN M., Different mode of action of ribonuclease H in purified α and $\alpha\beta$ ribonucleic acid directed deoxyribonucleic acid polymerase from avian myeloblastosis virus. *J. Biol. Chem.*, **249**: 5148-5152, 1974.
- [45] GULATI S. C., AXEL R., SPIEGELMAN S., Detection of RNA-instructed DNA polymerase and high molecular weight RNA in malignant tissue, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 2020-2024, 1972.
- [46] HATANAKA M., HUEBNER R. J., GILDEN R. V., DNA polymerase activity associated with RNA tumor viruses, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**: 143-147, 1970.
- [47] HARADA F., SAWYER R. C., DAHLBERG J. E., A primer ribonucleic acid for initiation of in vitro Rous Sarcoma virus deoxyribonucleic acid synthesis, *J. Biol. Chem.*, **250**: 3487-3497, 1975.
- [48] HECHT N. B., Interconvertibility of mouse DNA polymerase activities derived from the nucleus and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 471-483, 1973.
- [49] HECHT N. B., DAVIDSON D., The presence of a common active subunit in low and high molecular weight murine DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **51**: 299-305, 1973.
- [50] HERRICK G., SPEAR B. B., VEOMETT G., Intercellular localization of mouse DNA polymerase - alfa. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 1130-1139, 1976.
- [51] HOLMES A. M., HESSLEWOOD I. P., JOHNSTON J. R., Evidence that DNA polymerase of calf thymus contain a subunit of molecular weight 155.000, *Eur. J. Biochem.*, **62**: 229-235, 1976.

- [52] HURWITZ J., LEIS J. P., RNA - dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. 1. Directing influence of DNA in the reaction, *J. Virol.*, **9**: 116-129, 1972.
- [53] KACIAN D. L., WATSON K. F., BURNY A., SPIEGELMAN S., Purification of the DNA polymerase of avian myeloblastosis virus, *Biochim. Biophys. Acta*, **246**: 365-383, 1971.
- [54] KALF G. F., CH'IH J. J., Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **243**: 4904-4916, 1968.
- [55] KANG C. Y., TEMIN H. M., Endogenous RNA directed DNA polymerase activity in uninfected chicken embryos, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1550-1554, 1972.
- [56] — Early DNA - RNA complex from the endogenous RNA - directed DNA polymerase activity of uninfected chicken embryos, *Nature New Biol.*, **242**: 206-208, 1973.
- [57] KARA J., DVORAK M., CERNA H., Presence of viral - instructed DNA polymerase in the oncogenic subviral particles (virosomes) isolated from the mitochondria of Rouse Sarcoma cells, *FEBS Letters.*, **25**: 33-37, 1973.
- [58] KARA J., WEIL R., Specific activation of the DNA - synthesing apparatus in contact-inhibited mouse kidney cells by polyoma virus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**: 63-70, 1967.
- [59] KIESSLING A., GOULIAN M., A comparison of the enzymatic responses of the DNA polymerases from four RNA tumor viruses, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**: 1069-1077, 1976.
- [60] KONTOR E. J., KRUEGER R. G., Template specificities of the RNA dependent DNA polymerases of different murine C - type virus particles, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 1235-1242, 1976.
- [61] KOTLER M., HASPEL O., BECKER Y., dsDNA made by RNase - sensitive DNA polymerase from RSV - transformed cells, *Nature*, **249**: 441-445, 1974.
- [62] KUFÉ D., MAGRATH I. T., ZIEGLER J. L., SPIEGELMAN S., Burkitt's tumors contain particles encapsulating RNA - instructed DNA polymerase and high molecular weight virus - related RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 737-741, 1973.
- [63] LAZARUS L. H., KITRON N., Cytoplasmic DNA polymerase: polymeric forms and their conversion into active monomer resembling nuclear DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **81**: 529-534, 1973.
- [64] LEIS J., BERKOWER J., HURWITZ J., Mechanism of action of ribonuclease H isolated from avian myeloblastosis virus and *Escherichia coli*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 466-470, 1973.
- [65] LEWINSON W. E., FARAS A. J., WOODSON B., JACKSON J., BISHOP J. M., Inhibition of RNA - dependent DNA polymerase of Rous sarcoma virus by thiosemicarbazones and several cations, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 164-168, 1973.
- [66] LEWIS B. J., ABRELL J. W., SMITH R. C., GALLO R. C., DNA polymerase in human lymphoblastoid cells infected with Simian sarcoma virus, *Biochim. Biophys. Acta*, **349**: 148-160, 1974.
- [67] LIN F. H., THORMAR H., RNA - dependent DNA polymerase in Visna virus, *J. Virol.*, **8**: 702-704, 1970.
- [68] LOEB L. A., Purification and properties of deoxyribonucleic acid poly-

- merase from nuclei of sea Urchin embryos. *J. Biol. Chem.*, **244**: 1672-1681, 1969.
- [69] MARCUS S. L., MODAK M. J., CAVALIERI L. F., Evidence for template specific sites in DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **56**: 516-521, 1974.
- [70] MATSUKAGE A., BOHN E. W., WILSON S. H., Multiple form of DNA polymerases in mouse myeloma, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 578-582, 1974.
- [71] MECHALI M., de RECONDO A. M., Co-fractionation of an endonuclease activity during the purification of DNA polymerase α from regenerating rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **58**: 461-466, 1975.
- [72] MEYER R. R., SIMPSON M. V., DNA biosynthesis in mitochondria: partial purification of distinct DNA polymerase from isolated rat liver mitochondria, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**: 130-137, 1968.
- [73] MIZUTANI S., TEMIN H. M., Specific serological relationship among partially purified DNA polymerases of avian leukosissarcoma viruses, and reticuloendotheliosis viruses avian cells, *J. Virol.*, **13**: 1020-1029, 1974.
- [74] — RNA polymerases activity in purified virions of avian reticuloendotheliosis viruses, *J. Virol.*, **19**: 610-619, 1976.
- [75] MODAK M. J., MARCUS S. L., Purification and properties of Rauscher leukemia virus DNA polymerase and selective inhibition of mammalian viral reverse transcriptase by inorganic phosphate, *J. Biol. Chem.*, **252**: 11-19, 1977.
- [76] MOELLING K., Characterisation of reverse transcriptase and RNase H from Friend murine leukemia virus, *Virology*, **62**: 46-59, 1974.
- [77] — Further characterization of the Friend murine leukemia virus reverse transcriptase RNase H complex, *J. Virol.*, **18**: 418-425, 1976.
- [78] MONDAL H., Occurrence of particle-bound reverse transcriptase in human amniotic fluid, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **79**: 67-75, 1977.
- [79] MUKHERJEE A. S., BANERJEE M. R. RNA-dependent DNA polymerase in preneoplastic nodules and tumors of the mammary gland of Balb/c mice, *J. Nat. Cancer Inst.*, **53**: 817-824, 1974.
- [80] NELSON J., LEONG J. A., LEVY J. A., Normal human placentas contain RNA-directed DNA polymerase activity like that in viruses, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**: 6263-6267, 1978.
- [81] NOWINSKI R. C., HAYS E. F., Oncogenicity of AKR endogenous leukemia viruses, *J. Virol.*, **27**: 13-18, 1978.
- [82] OHNO T., SWEET R. W., HU R., DEJAK D., SPIEGELMAN S., Purification and characterization of the DNA polymerase of human breast cancer particles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 764-768, 1977.
- [83] PARKS W. E., SCOLNICK E. M., ROSE J. J., TODARO G. J., AARONSON S. A., Immunological relationship of reverse transcriptase from ribonucleic acid tumor viruses, *J. Virol.*, **9**: 110-115, 1972.
- [84] PARKS W. E., TODARO G. J., SCOLNICK E. M., AARONSON S. A., RNA dependent DNA polymerase in primate syncytium-forming (Foamy) viruses, *Nature*, **229**: 258-260, 1971.
- [85] PENNER P. E., COHEN L. H., LOEB L. A., RNA dependent DNA polymerase: presence in normal human cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **42**: 1228-1234, 1971.
- [86] PETERS G., HARADA F., DAHLBERG J. E., PANET A., HASELTINE W.

- A., BALTIMORE D., Low - molecular weight RNAs of Moloney murine leukemia virus: identification of the primer for RNA - directed DNA synthesis, *J. Virol.*, **21**: 1030-1041, 1977.
- [87] RAINER H., MOSER K., Reverse transcriptase in human placenta, *Klin. Wochr.*, **51**: 41-42, 1973.
- [88] De RECONDO A. M., ABADIEDEBAT J., Regenerating rat liver DNA polymerases: dissimilitude or relationship between nuclear and cytoplasmic enzymes? *Nucleic Acid. Res.*, **3**: 1823-1837, 1976.
- [89] ROSS J. J., SCOLNICK E. M., TODARO G. J., AARONSON S. A., Separation of murine cellular and murine leukaemia virus DNA polymerases, *Nature New Biol.*, **231**: 163-167, 1971.
- [90] ROTHENBERG E., BALTIMORE D., Increased length of DNA made by virions of murine leukemia virus at limiting magnesium ion concentration, *J. Virol.*, **21**: 168-178, 1977.
- [91] ROTHENBERG E., DONOGHUE D. J., BALTIMORE D., Analysis of a 5' leader sequence of murine leukemia virus 21S RNA: heteroduplex mapping with long reverse transcriptase products, *Cell*, **13**: 435-451, 1978.
- [92] ROWE W. P., PINCUS T., Quantitative studies of naturally occurring murine leukemia virus infection of AKR mice, *J. Exp. Med.*, **135**: 429-436, 1972.
- [93] ROY - BURMAN R. W., HENDERSON B. E., GARDNER M. B., Attempts to detect RNA tumor virus in human milk, *Nature New Biol.*, **244**: 146, 1973.
- [94] SALZMAN L. A., MCKERKIE L., Characterization of the deoxyribonucleic acid polymerase associated with Kilham rat virus, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5583-5588, 1975.
- [95] SARNGADHARAN M. G., GUROFF M. R., GALLO R. C., DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta* **516**: 418-487, 1978.
- [96] SARNGADHARAN H. G., SARIN P. S., REITZ M. S., GALLO R. C., Reverse transcriptase activity of human acute leukemic cells: purification of the enzyme, response to AMV 70S and characterization of the DNA product, *Nature New Biol.*, **240**: 67-72, 1972.
- [97] SAWAYER R., HARADA F., DAHLBERG J. E., Virion - associated RNA primer for Rous sarcoma virus DNA synthesis: isolation from uninfected cells, *J. Virol.*, **13**: 1302-1311, 1974.
- [98] SCHLOM J., SPIEGELMAN S., Simultaneous detection of reverse transcriptase and high molecular weight RNA unique to oncogenic RNA viruses, *Science*, **174**: 840-843, 1971.
- [99] SCHLOM J., SPIEGELMAN S., MOORE D., Reverse transcriptase and high molecular weight RNA in particles from mouse and human milk, *J. Nat. Cancer Inst.*, **48**: 1197-1203, 1972.
- [100] SCOLNICK E. M., PARKS W. E., TODARO G. J., AARONSON S. A., Immunological characterization of primate C - type virus reverse transcriptases, *Nature New Biol.*, **235**: 35-40, 1972.
- [101] SEDWICK W. D., WANG T., KORN D., „Cytoplasmic” deoxyribonucleic acid polymerase. Structure and properties of the highly purified enzyme from KB cells, *J. Biol. Chem.*, **250**: 7045-7056, 1975.
- [102] SIEBERT G., BURR - FURLONG N., ROMAN W., SCHLATTERER B., JANS H., In *Methodological Developments in Biochemistry*. v. 4. Subcellular Studies, 13-29, 1973, wyd. E. Reid. Edinburgh, Longman Group.

- [103] SIEDLECKI J. A., MIKKE E., ZMUDZKA B., DNA polymerases of murine LBN/b cells, *Acta Biochim. Pol.*, **23**: 69-83, 1976.
- [104] SMITH G. S., ABRELL J. W., LEWIS B. J., GALLO R. C., Serological analysis of human deoxyribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.*, **250**: 1702-1709, 1975.
- [105] SMOLER D., MOLINEUX J., BALTIMORE D., Direction of polymerization by avian myeloblastosis virus deoxyribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.*, **246**: 7697-7700, 1971.
- [106] SPADARI S., MULLER R., WEISSBACH A., The dissimilitude of the low high molecular weight deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2991-2992, 1974.
- [107] SPADARI S., WEISSBACH A., R - deoxyribonucleic acid polymerases. HeLa cell R - DNA polymerase. Separation and characterization of two enzymatic activities, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5809-5815, 1974.
- [108] SPIEGELMAN S., BURNY A., DAS M. R., KEYDAR J., SCHLOM J., TRAVNICEK M., WATSON K., Synthetic DNA - RNA hybrids and RNA - DNA duplex as templates for polymerase of the oncogenic RNA viruses, *Nature*, **228**: 430-432, 1970.
- [109] — Characterization of the product of RNA - directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses, *Nature*, **227**: 563-567, 1970.
- [110] SPIEGELMAN S., KUFÉ D., HEHLMAN R., PETERS W. P., Evidence for RNA tumor viruses in human lymphomas including Burkitt's disease, *Cancer Res.*, **33**: 1515-1526, 1973.
- [111] SUGINO A., HIROSE S., OKAZAKI R., RNA - linked nascent DNA fragments in *E. coli*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1863-1867, 1972.
- [112] TEITZ Y., Reverse transcriptase activity detected in C - type particles from normal rat thymus cultures, *Nature New Biol.*, **232**: 250-253, 1971.
- [113] TEMIN H. M., MIZUTANI S., RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma virus, *Nature*, **226**: 1211-1213, 1970.
- [114] TEMIN H. M., *Advances in Cancer Research*. t. 19. The cellular and molecular biology of RNA tumor viruses especially avian leukosis - sarcoma viruses and their relatives, 47-104, 1974, Academic Press N. York, wyd. G. Klein, S. Weinhouse.
- [115] TRAVAGLINI E., LOEB L. A., Ribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid synthesis by *E. coli* deoxyribonucleic acid polymerase. 1. Characterization of the polymerization reaction, *Biochemistry*, **13**: 3010-3017, 1974.
- [116] TSUDA M., OKSHIMA Y., SUZUKI Y., Assumed initiation site of fibroin gene transcription, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 4872-4876, 1979.
- [117] VERMA I. M., Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses. I. Localization of thermolabile DNA polymerase and RNase H activities on one polypeptide, *J. Virol.*, **15**: 121-126, 1975.
- [118] — Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses. III. Properties of purified Moloney murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. *J. Virol.*, **15**: 843-854, 1975.
- [119] VERMA I. M., MASON W. S., DROST S. D., BALTIMORE D., DNA polymerase activity from two temperative sensitive mutants of Rous sarcoma virus is termolabile, *Nature*, **251**: 27-31, 1974.
- [120] WANG E. R., HENNER D., FURTH J. J., Duplication of single stranded DNA catalysed by calf thymus DNA polymerase, *Nucleic Acid Res.*, **3**: 129-147, 1976.

- [121] WANG F., SEDWICK W. D., KORN D., Nuclear deoxyribonucleic acid polymerase. Further observation on the structure and properties of the enzyme from human KB cells, *J. Biol. Chem.*, **250**: 7040-7044, 1975.
- [122] WATERS L. C., Transfer RNase associated with the 70S RNA of AKR murine leukemia virus, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 1130-1136, 1975
- [123] WATERS L. C., YANG W. K., Comparative biochemical properties of RNA-directed DNA polymerases from Rauscher murine leukemia virus and avian myeloblastosis virus, *Cancer Res.*, **34**: 2585-2593, 1974.
- [124] WATSON K. F., MOELLING K., BAUER H., Ribonucleose H activity present in purified DNA polymerase from avian myeloblastosis virus, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **51**: 232-240, 1973.
- [125] WEIMAN B. J., SCHMIDT J., KLUGE N., OSTERTAG W., WOLFRUM D. J., RNA-dependent DNA polymerase from a cell line derived from the bone marrow of a patient with polycythemia vera, *Eur. J. Biochem.*, **59**: 581-588, 1975.
- [126] WEISSBACH A., BALTIMORE D., BOLLUM F., GALLO R. C., KORN D., Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases, *Eur. J. Biochem.*, **59**: 1-2, 1975.
- [127] WEISSBACH A., HONG S. C., AUCKER J., MULLER R., Characterization of herpes simplex virus induced deoxyribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.*, **248**: 6270-6277, 1973.
- [128] WEISSBACH A., Vertebrate DNA polymerases, *Cell*, **5**: 101-108, 1975.
- [129] — Annual Review of Biochemistry, t. 46. Eukaryotic DNA Polymerases, 25-47, wyd. Palo Alto, California, 1977.
- [130] WILSON S. H., KUFF E. L., BOHN E. W., LUEDERS K. K., Studies on DNA synthesis in murine myeloma. II. Activation of latent RNA-dependent DNA polymerase in membrane fraction, *Biochim. Biophys. Commun.*, **49**: 1093-1099, 1972.
- [131] WINTERSBERGER U., WINTERSBERGER E., Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from wild type and respiration-deficient yeast cells, *Eur. J. Biochem.*, **13**: 20-27, 1970.
- [132] WITTKIN S. S., OHNO T., SPIEGELMAN S., Purification of RNA instructed DNA polymerase from human leukemic spleens, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 4133-4136, 1975.
- [133] YONEDA M., BOLLUM F. J., Deoxyribonucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland, *J. Biol. Chem.*, **240**: 3385-3391, 1965.

Otrzymano: 2 maja 1980.

Przyjęto: 10 września 1980.

Adres autora: ul. Armii Czerwonej 15, 44 - 101 Gliwice.

ROLA USZKODZEŃ DNA I ICH REPERACJI W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

THE POSSIBLE ROLE OF DNA DAMAGE AND ITS REPAIR IN CARCINOGENESIS

Elżbieta ANUSZEWSKA

Zakład Leków Witaminizowanych Instytutu Leków w Warszawie

Streszczenie. Związki chemiczne oddziałując na materiał genetyczny komórki mogą powodować uszkodzenia DNA, które czasem są przyczyną zainicjowania procesów reperacyjnych. Mogą one również oddziaływać na DNA przez zahamowanie reperacji uszkodzeń wywołanych przez inne czynniki. Zdefiniowano trzy główne procesy reperacji w komórkach prokariota i eukariota: reperację fotoenzymatyczną, reperację przez wycinanie i reperację postreplikacyjną. Wielkość reperacji zachodzących przez wycinanie po zadziałaniu związkiem chemicznym w określonych warunkach jest odzwierciedleniem ilości dających się reperować uszkodzeń i może być pośrednim wskaźnikiem potencji mutagennych i karcynogennych związku chemicznego. Istnieje bowiem korelacja między uszkodzeniem DNA i procesami reperacji a mutagenezą i procesami nowotworowymi.

Summary. Chemicals can interact with genetic material inducing DNA damage and sometimes its repair. They can be effective by inhibiting DNA repair of damage caused by other agents. Damage can be repaired in three distinct processes: photoreactivation, excision repair and postreplication repair. The amount of excision repair that occurs under various conditions of exposure to chemical is an indication of the amount of repairable damage and may be an indirect indication of the mutagenic and carcinogenic potential of the chemical. There is a correlation between DNA damage, its repair and mutagenesis or carcinogenesis.

W latach trzydziestych, na długo przed poznaniem struktury materiału genetycznego, budowy chemicznej czynników rakotwórczych oraz ich interakcji z komórkowym DNA, została sformułowana hipoteza, w myśl której nowotwory powstają w wyniku mutacji. Hipoteza mutacji somatycznej opiera się na założeniu, że pewne typy mutacji są odpowiedzialne za przemianę komórek prawidłowych w nowotworowe. Hi-

poteza ta wyjaśniała niezliczoną różnorodność typów nowotworów i fakt, że po podziale komórki potomne utrzymują swoje cechy nowotworowe.

Wywołanie nowotworów u zwierząt doświadczalnych przy zastosowaniu chemicznych czynników rakotwórczych dało początek nowym kierunkom badań. Od tej chwili jednym z celów onkologii doświadczalnej było ustalenie powiązań i korelacji między procesami nowotworowymi a zmianami w materiale genetycznym. W miarę rozwoju badań stwierdzono, że nie tylko proces różnicowania komórki prowadzi do pojawienia się nowej struktury i funkcji, lecz także fizyczne i chemiczne oddziaływanie na jej DNA. Są opinie, że poznanie mechanizmów działania czynników chemicznych i fizycznych na materiał genetyczny pozwoliłoby na zrozumienie procesu mutagenezy i karcynogenezy.

Przypuszcza się, że dla rozwinięcia nowotworu potrzeba jest kilku kolejnych mutacji. Na przykład Kundson [22] sugeruje, że ludzka retinoblastoma powstaje w wyniku dwóch kolejnych mutacji. Jedna ma miejsce w komórkach rozrodczych i jest dziedziczona, a druga zachodzi w komórkach somatycznych. Model systemu mutacyjnego dla badań nad karcynogenezą opiera się na założeniu, że związki chemiczne lub czynniki fizyczne oddziałują na materiał genetyczny komórki, powodując w nim zmiany inicjujące przemianę nowotworową.

Interakcja czynników fizycznych i chemicznych z cząsteczką DNA może powodować zmianę w sekwencji i budowie łańcucha polinukleotydowego oraz w efekcie zmianę informacji genetycznej. Wszelkiego rodzaju modyfikacje i uszkodzenia pojawiające się w cząsteczce DNA, jeżeli dotyczą procesów istotnych dla życia komórki, mogą spowodować jej śmierć. W przypadku uszkodzeń mniej istotnych funkcji, uszkodzenia mogą być tolerowane i pomijane w dalszym życiu komórki lub poprawiane i eliminowane na drodze procesów reperacyjnych. Tak więc wszelkie uszkodzenia DNA balansują na pograniczu efektu toksycznego i śmierci komórki oraz zmiany fenotypu, które są ekspresją zmian w łańcuchu DNA.

Hipoteza mutagenezy chemicznej zakłada, że mutacja powstaje jako bezpośredni błąd w dopasowaniu pary dla zasady zmodyfikowanej przez mutagen. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują, że mutageneza chemiczna, podobnie jak mutageneza indukowana światłem UV, zachodzi z udziałem szeregu procesów komórkowych. Wydaje się, że istotną rolę wśród nich odgrywają procesy reperacji DNA, a modyfikacja zasady jest tylko uszkodzeniem przedmutacyjnym. Włączenie zasady w miejscu odpowiadającym zmodyfikowanej zasadzie odbywa się prawdopodobnie przypadkowo, ponieważ w tym miejscu matryca nie zawiera informacji dla włączenia zasady. Początkowo łączono fakt powstawania mutacji z obecnością dimerów. Dalsze badania wykazały, że di-

mery mogą pozostawać w DNA przez kilka pokoleń, a mutacje obserwuje się w pierwszym lub drugim pokoleniu.

Innym uszkodzeniem przedmutacyjnym może być miejsce pozbawione zdolności przyłączania zasad na podstawie komplementarności na skutek modyfikacji zasady bądź depurynacji lub depirymidynacji. Miejsca pozbawione zasad mogą powstawać wtórnie na skutek usuwania alkilopochodnych puryn i pirymidyn w procesie reperacji przez wycinanie.

Większość karcynogenów daje ten sam typ mutacji, a mianowicie mutacje punktowe. Najczęściej są to tranzycje pary G - C na A - T [35]. Konsekwencją mutacji punktowych mogą być aberracje chromosomowe. Wiele uwagi poświęcono badaniu specyficzności zmian w chromosomach w nowotworach indukowanych przez czynniki chemiczne, fizyczne i wirusowe [46]. Ogromna liczba związków nieonkogennych powoduje również aberracje chromosomowe, zatem wydaje się, że występowanie aberracji chromosomowej jest mało specyficznym znacznikiem chemicznej karcynogenezy w przeciwieństwie do zwiększonej częstotliwości rekombinacji [46].

Każde uszkodzenie DNA, które nie zostanie zreperowane lub będzie naprawione błędnie, może stać się przyczyną mutacji. O tym, czy uszkodzenie stanie się przyczyną mutacji, decyduje m.in. droga reperacji, która zależy od aktualnego stanu komórki, pewnych predyspozycji genetycznych, zakażeń wirusowych i czynników środowiskowych oraz wydajności procesu reperacyjnego i jego bezbłędności. Badania prowadzone na mutantach bakteryjnych wykazują, że szczepy posiadające defekt w procesie reperacji przez wycinanie cechują się zwiększoną częstotliwością mutacji. Proces reperacji przez wycinanie, działając na zasadzie „cut and patch”, znacznie ogranicza liczbę uszkodzeń przedmutacyjnych, usuwając pewną ich część.

Zgodnie z aktualnymi poglądami, trwała zmiana pierwotnej struktury makrocząsteczki DNA podczas błędnego procesu reperacji może prowadzić do zapoczątkowania procesu nowotworowego. Z licznych badań wynika, że karcynogeneza jest procesem przynajmniej dwustopniowym, składającym się z fazy inicjującej, w trakcie której komórki prawidłowe ulegają przekształceniu w komórki potencjalnie nowotworowe (przednowotworowe), i fazy promocji lub proliferacji tych komórek. Za inicjowanie procesu nowotworowego przez czynniki karcynogenne zależy od wielkości i rodzaju uszkodzeń cząsteczki DNA.

Ważnym zagadnieniem w dyskusji nad etiologią nowotworów jest interakcja między fizycznymi i chemicznymi karcynogenami, cząsteczkami wirusowymi i procesami reperacji uszkodzeń [43]. Na przykład Fisher i wsp. [17] podają, że traktowanie hodowli komórkowych zakażonych wirusem SV40 lub adenowirusem i związkami karcynogennymi

powoduje spotęgowanie transformacji indukowanej przez wirusy. Mechanizm tego synergizmu według Casto i wsp. [6] polega na dostarczeniu dodatkowych miejsc dla integracji wirusowego DNA, podczas procesu reperacji przez wycinanie, lub na inkorporacji wirusowego DNA do luk powstałych w komórkowym DNA, podczas postreplikacyjnego procesu reperacji.

Rola procesu reperacji w mutagenezie i karcynogenezie w przypadku eukariota jest skomplikowana przez szereg czynników genetycznych, jak gatunek, komórka, tkanka oraz stadium cyklu życiowego komórki, w którym zachodzi uszkodzenie i reperacja.

Chociaż wykryto szereg mechanizmów reperacyjnych w komórkach ssaków, to jednak poziom wiedzy jest daleko w tyle w porównaniu do układu mikrobiologicznego.

RODZAJE USZKODZEŃ DNA

Uszkodzenia DNA powodowane przez fizyczne i chemiczne karcynogeny można podzielić na cztery grupy [9, 11]:

1. uszkodzenia lub modyfikacje zasad bez rozerwania łańcucha polinukleotydowego;
2. rozerwanie wiązań fosfodwuestrowych z uszkodzeniem towarzyszących zasad lub bez ich uszkodzenia;
3. utworzenie poprzecznych wiązań między łańcuchami DNA i białkami.

TABELA

Rodzaje uszkodzeń	Czynnik rakotwórczy
Uszkodzenie zasad dimery pirymidyny alkilacja	światło UV β-propiolakton, alkilonitrozoaminy alkilonitrozoamidy, dwumetylosulfonian
Kowalencyjne wiązania między zasadą i czynnikiem rakotwórczym	benz(α)antracen, aflatoksyny N-acetylofluoren
Depurynacja	czynniki alkilujące
Rozerwanie łańcucha rozerwanie z destrukcją cukru i ubytkiem zasady	promienie X
Wiązania poprzeczne między łańcuchami DNA między DNA i białkami	mitomycyna C światło UV, cykloheksylonitrozomocznik
Zniekształcenie łańcucha	bromek 3,8-dwuamino-5-etylo-6-fenylfenantrenu (ethidium bromide)

4. zniekształcenie łańcucha DNA pod wpływem czynników wiążących się elektrostatycznie między przyległymi zasadami.

Rodzaje uszkodzeń i przykładowe czynniki rakotwórcze zestawiono w tabeli według Cleavera i wsp. [11].

PROCESY REPERACJI DNA

Reperacja każdego typu uszkodzenia jest związana z uruchomieniem właściwych procesów metabolicznych. Rodzaj uszkodzeń powstałych w DNA determinuje rodzaj uruchamianych mechanizmów enzymatycznych odpowiedzialnych za reperację. Stwierdzono szereg mechanizmów reperacyjnych, prowadząc badania na bakteriach, drożdżach, roślinach wyższych, owadach, gryzoniach, ptakach, rybach i komórkach ludzkich [9, 11, 12, 35, 52, 53]. Za pomocą badań biochemicznych zidentyfikowano trzy główne procesy reperacyjne: reperację fotoenzymatyczną, reperację przez wycinanie i reperację postreplikacyjną.

Reperacja fotoenzymatyczna jest dobrze poznaną formą reperacji „in situ”, specyficzną dla uszkodzeń powodowanych przez światło UV w zakresie długości fali 220-300 nm. Absorpcja promieniowania w tym zakresie przez cząsteczkę DNA powoduje powstanie fotoproduktu — najczęściej dimerów pirymidyn. Enzymy — fotolazy biorące udział w monomeryzacji dimerów — w ciemności istnieją w postaci trwałych kompleksów. Kompleksy te przechodzą w aktywne formy pod wpływem światła powyżej 330 nm. Fotolazy zostały wyizolowane i dobrze scharakteryzowane. Ten rodzaj reperacji jest szeroko rozpowszechniony w świecie roślinnym i zwierzęcym [53]. W większości przypadków, w badaniach in vitro prowadzonych na komórkach ssaków, nie stwierdzono aktywności enzymów fotoreaktywnych. W 1974 r. Sutherland [49] donosi o wyodrębnieniu fotolaz z leukocytów ludzkich i określeniu ich właściwości in vitro, chociaż nie wykazano ich obecności in vivo. Stwierdzenie istnienia enzymów reperacyjnych w ekstraktach komórkowych, których funkcji nie obserwuje się in vivo, może być wskaźnikiem istnienia mechanizmów kontrolnych, które mogą stymulować lub hamować aktywność enzymów biorących udział w procesach reperacji. Proces reperacji fotoenzymatycznej jest uważany za wolny od błędów (error free), a zatem proces ten nie pozostawia zmian w zapisie genetycznym.

Reperacja przez wycinanie jest to proces reperujący uszkodzenia, które nie powodują bezpośrednio pęknięcia łańcucha DNA [35]. Mechanizm naprawy polega na wycięciu zmienionego miejsca w cząsteczce DNA i dobudowaniu odpowiednich nukleotydów przy wykorzystaniu informacji o komplementarnym przyłączaniu zasad. Mechanizm ten nazywany potocznie „cut and patch”, jest wieloetapowy i wymaga całego

kompleksu enzymów [5, 7, 35]. Badania nad identyfikacją kolejnych etapów enzymatycznych prowadzono *in vivo* przy użyciu mutantów bakteryjnych pozbawionych aktywności poszczególnych enzymów oraz na wyizolowanym DNA [35].

Pierwszym etapem tego procesu jest rozpoznanie różnorodnych uszkodzeń w strukturze cząsteczki DNA. Mechanizm działania rozpoznającego nie jest dokładnie znany; prawdopodobnie bierze w nim udział szereg enzymów w zależności od rodzaju uszkodzenia.

Następnym etapem jest nacięcie łańcucha w pobliżu miejsca uszkodzonego. Nacięcia dokonują enzymy z grupy endonukleaz, specyficzne dla uszkodzonych zasad. Wycięcie uszkodzonego odcinka odbywa się z udziałem 5'-3' egzonukleazy. Usunięty odcinek ulega degradacji. Działanie egzonukleazy jest prawdopodobnie związane z polimerazą reperyacyjną, odpowiadającą za resyntezę usuniętego odcinka DNA. Rola egzonukleazy polega na usuwaniu błędnie włączonych zasad podczas normalnej replikacji DNA, działa ona w kierunku przeciwnym do kierunku wydłużania łańcucha, kontrolując wierność syntezy DNA. Ciągłość łańcucha DNA jest zapewniona poprzez działanie ligazy polinukleotydowej, która łączy końce 5'P i 3'OH. Jest to ostatni etap procesu reperaturacji przez wycinanie.

Wielkość wyciętego odcinka zależy od natury uszkodzenia. W przypadku uszkodzeń indukowanych światłem UV, wycięciu ulega od dziesięciu do stu zasad, a przy uszkodzeniach indukowanych promieniami X — tylko kilka zasad.

Reperacja przez wycinanie jest związana ściśle z cyklem życiowym komórki. W badaniach prowadzonych na bakteriach wyodrębniono cały szereg enzymów biorących udział w procesie reperaturacji przez wycinanie. Indywidualna modyfikacja zasady w łańcuchu DNA wymaga indywidualnego rozpoznania poprzez endonukleazę lub odrębne białka w zależności czy uszkodzona jest jedna zasada, czy kilka jednocześnie (dimery pirymidyn). Wiązania poprzeczne są reperowane przez wycięcie kolejnych zasad łącznie z wiązaniami.

Lindahl [28] bardzo obszernie omawiając poszczególne enzymy reperaturacyjne sugeruje, że w przypadku *E. coli* funkcję egzonukleazy i polimerazy spełnia jeden enzym — polimeraza I DNA. Jednak w komórkach ludzkich dla procesu reperaturacji wymagane jest odrębne zadziałanie egzonukleazy i polimerazy. U ludzi stwierdza się szereg schorzeń wykazujących się defektem w reperaturacji przez wycinanie. Wydaje się to być znamienne ważnym aspektem w hipotezie dziedziczenia predyspozycji do zapadalności na nowotwory.

Proces reperaturacji postreplikacyjnej jest ściśle związany z fazą syntezy DNA. Jest on w pewnym sensie modyfikacją normalnej syntezy

DNA, spowodowaną obecnością uszkodzenia w macierzystym łańcuchu DNA. Bezpośrednio po ekspozycji na czynnik uszkadzający następuje przerwanie ciągłości w syntezie siostrzanych łańcuchów i tworzenie się luk obejmujących do tysiąca zasad [12]. Ciężar cząsteczkowy nowo zsyntetyzowanych łańcuchów DNA jest mniejszy niż w równoległe powstających łańcuchach kontrolnych. Powstałe luki są powoli zabudowywane w przeciągu kilku godzin.

Reperację postreplikacyjną obserwował Lehman i wsp. [24] w komórkach ludzkich fibroblastów traktowanych światłem UV oraz D'Ambrosio i wsp. [14] w zarodkowych komórkach chomików syryjskich po podaniu pochodnych antracenu.

Wydłużenie łańcucha DNA lub wypełnianie luk może być zahamowane przez nietoksyczne dawki kofeiny. Chociaż Trosko i Chu [52] podają, że komórki chomików syryjskich traktowane pochodnymi fluorenu są zdolne do wydłużania łańcucha DNA mimo obecności kofeiny, lecz nie stwierdzili oni faktu zabudowywania luk. Harm [19] badając działanie kofeiny na procesy reperacyjne stwierdził, że hamuje ona monomeryzację dimerów pirymidyn. Jednym z etapów mechanizmu działania jest prawdopodobnie przyłączanie się kofeiny w miejscu uszkodzenia.

Niektóre wyniki badań sugerują istnienie odrębnych systemów reperacji, nazywanych systemami „SOS” [18, 35, 52]. Istnienie ich wykryto u bakterii, lecz do tej pory nie wiadomo czy istnieją one również w komórkach ssaków.

NIE REPEROWANE USZKODZENIA DNA, PRZYCZYNY I ZNACZENIE

Ogólny poziom wiedzy o genetycznej i biologicznej roli procesów reperacji oraz o jego konsekwencjach jest jeszcze dość niski. Szereg prac wskazuje na pewne korelacje między uszkodzeniami DNA, reperacją i jej błędem lub zahamowaniem a mutagenezą i procesami nowotworowymi. Błąd w materiale genetycznym powstaje podczas semikonserwatywnej replikacji matrycy DNA zawierającej uszkodzenie, które jeszcze nie jest lub nie może być naprawione. Analiza procesów reperacji fotoenzymatycznej i reperacji przez wycinanie pozwala sądzić, że są to procesy wolne od błędów. Dlatego głównie reperację postreplikacyjną uważa się za odpowiedzialną za powstałe błędy, a co za tym idzie — za powstawanie mutacji. Powstałe w materiale genetycznym uszkodzenie może nie zostać naprawione z bardzo wielu przyczyn. Jedną z nich może być defekt w procesach reperacji wynikający ze schorzeń lub obecności związków działających hamująco na procesy reperacyjne.

Z szeregiem zespołów chorobowych jest związana zwiększona zapa-

dalność na nowotwory [11, 12, 31, 52]. Można tu zaliczyć xeroderma pigmentosum, anemię Fanconiego, ataksję naczyniową oraz zespoły Bloomsa, Chediak-Higashiego, Wernera i Cockayna. W schorzeniach tych występują zmiany w mechanizmach reperujących uszkodzenia DNA. W przypadku xeroderma pigmentosum, która charakteryzuje się nadmierną wrażliwością na światło słoneczne i wysoką zapadalnością na różnorodne nowotwory skóry, we wszystkich jej sześciu odmianach obserwuje się defekt w reperacji wycinającej nukleotydy. Niektóre przypadki wykazują także defekt w reperacji wycinającej zasady, reperacji post-replikacyjnej i reperacji fotoenzymatycznej. Cleaver [7-9, 12] prowadząc badania na hodowlach ludzkich fibroblastów, zakładanych z wycinków skóry dawców zdrowych i chorych na xeroderma pigmentosum, stwierdził w nich brak zdolności do usuwania dimerów pirymidyn. Autor sugeruje, że wysoką częstość mutacji w hodowlach in vitro można porównać ze znaczną zapadalnością na nowotwory pacjentów chorych na xeroderma pigmentosum. Również Burk i wsp. [5], badając naświetlane światłem UV limfocyty ludzi chorych na xeroderma pigmentosum, stwierdzili zmianę w zdolności do wycinania i usuwania dimerów tyminowych. Day i wsp. [15] przeprowadzili ciekawe doświadczenie na hodowlach ludzkich fibroblastów pochodzących od dawców zdrowych i chorych na xeroderma pigmentosum, zakażonych adenowirusem 5. Zaobserwowali, że przeżywanie adenowirusa 5 poddanego działaniu benzo-pirenu jest dużo lepsze w normalnych fibroblastach niż w fibroblastach pochodzących od dawców chorych. Wynika stąd, że reperacja uszkodzonego wirusowego DNA przebiega bardziej sprawnie w fibroblastach posiadających prawidłowy system reperacji. Te same wnioski podali Rabson i wsp. [41], badając przeżywanie naświetlanego światłem UV wirusa opryszczki w hodowlach fibroblastów pochodzących od chorych na xeroderma pigmentosum.

Inne zespoły chorobowe nie są tak dobrze poznane jak xeroderma pigmentosum, wiadomo jednak, że ataksja naczyniowa charakteryzuje się defektem w reperacji wycinającej uszkodzenia powodowane przez promieniowanie X [12, 33], a anemia Fanconiego — brakiem zdolności do reperacji poprzecznych wiązań, co obserwuje się podczas wymian siostrzanych chromatyd [12, 48].

W niektórych przypadkach opinie są kontrowersyjne. Na przykład Cleaver [12] zalicza chroniczną białaczkę limfatyczną (CLL) do schorzeń obarczonych defektem w reperacji uszkodzeń, natomiast Ringborg i Lambert [40] nie stwierdzają różnic w odpowiedzi na naświetlanie światłem UV limfocytów pochodzących od ludzi zdrowych i chorych na CLL.

Wiele związków chemicznych, które same w sobie nie są czynnikami rakotwórczymi, powoduje nasilenie karcynogenezy indukowanej przez

inne czynniki. Istnieje hipoteza, że te „promotory raka” działają poprzez hamowanie procesu reperacji [11]. Badania prowadzone nad hamowaniem procesu replikacji semikonserwatywnej [10, 12, 25, 32, 38, 50, 61] i hamowaniem replikacji reperacyjnej [12, 19, 21, 24, 26, 36] wykazują, że nie ma związku, który by wybiórczo hamował wszystkie procesy reperacyjne. Na przykład kofeina, hamująca reperację wycinającą u bakterii, nie wydaje się hamować tego procesu w testowanych komórkach ssaków [52], natomiast wyraźnie wpływa na reperację postreplikacyjną [12, 24]. Badania prowadzone na hodowlach fibroblastów pochodzących od dawców chorych na xeroderma pigmentosum wykazały, że kofeina hamuje proces zabudowywania luk w łańcuchach potomnych, powstałych w czasie reperacji postreplikacyjnej, prawdopodobnie poprzez hamowanie enzymu — esterazy dwufosforanowej. Efekt jej działania obserwuje się jako zwiększenie wrażliwości na światło w niektórych schorzeniach skóry.

Michael i Williams [30] badali wpływ na proces reperacji DNA powszechnie używanego w profilaktyce czynnika przeciwmalarycznego, jakim jest chlorochinina [CLQ]. Autorzy powodowali uszkodzenia DNA metanosulfonianem metylu (MMS) w komórkach wątrobowych szczurów i podczas procesu reperacyjnego dodawali chlorochininę. Stwierdzili, że CLQ hamuje reperację uszkodzonego DNA i zwiększa działanie toksyczne MMS. Mechanizm działania nie jest znany, prawdopodobnie zachodzi tu interakcja z DNA. Wprawdzie CLQ hamuje również syntezę białek, co wpływa zapewne na obniżenie procesu reperacji, lecz nie jest główną przyczyną jego zahamowania. Potwierdza to fakt, że cykloheksimid, który w równym stopniu jak CLQ hamuje syntezę białek, nie ma wpływu na obniżenie syntezy reperacyjnej DNA [26].

Innym ciekawym związkiem jest arabinozyd cytozyny (1- β -D-arabino-furanosylcytozyna, araC). Ten stosowany w leczeniu czynnikiem przeciwbiałaczkowy wykazuje zdolność hamowania reperacji uszkodzeń powodowanych przez światło UV i niektóre związki chemiczne [1, 21, 26, 36, 59, 60], jak mitomycyna C i pochodne guanidyny. Działanie araC polega prawdopodobnie na zahamowaniu polimerazy DNA [21, 26] i zależy od fazy cyklu życiowego komórki. Maksimum czułości przypada na późną fazę S i wczesną G₁ [21].

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA POMIARU STOPNIA REPERACJI JAKO WSKAŹNIKA ZDOLNOŚCI MUTAGENNYCH I KARCYNOGENNYCH

W badaniach właściwości mutagennych i karcynogennych związków chemicznych ważną sprawą jest uwzględnienie faktu, że niektóre czynniki w postaci pierwotnej są nieaktywne i wymagają konwersji do form

ostatecznie rakotwórczych. Tego rodzaju przemiana może mieć miejsce również *in vitro* i polega na przekształceniu się w metabolity. W piśmiennictwie przedstawiono kilka różnych możliwości uzyskania przemiany prokarcynogenów w warunkach doświadczalnych; można je podzielić na trzy zasadnicze grupy:

1. Zastosowanie mieszaniny aktywującej, która składa się z frakcji mikrosomalnej wątroby i NADPH. Układ ten wykorzystali w swojej pracy Laishes i Stich [23], wykazując różnice w działaniu uszkodzającym DNA dwumetylonitrozoaminy przed i po aktywacji.

2. Zastosowanie komórek różnicujących się, zachowujących zdolność do aktywacji prokarcynogenów i specyficzną dla narządów, z których pochodzą, odpowiedź na działanie związku chemicznego. Tę atrakcyjną formę badań, pozwalającą na uniknięcie pracochłonnego przygotowania mieszaniny aktywującej, wykorzystał w swoich pracach Williams [54–58].

3. Zastosowanie kombinowanej metody *in vivo/in vitro*. Związek chemiczny jest podawany zwierzętom różnymi drogami, a efekt jego działania uszkodzającego DNA w postaci syntezy reperacyjnej badany jest *in vitro* w hodowli tkanek lub narządów [2, 45–47]. Trochę inne rozwiązanie zastosowali Cox i wsp. [13], podając dootrzewnowo szczurom metanosulfonian metylu i badając w odstępach czasowych w gradiencie stężeń sacharozy zmiany DNA.

Pomysł skryningu, umożliwiającego wykazanie zdolności związków chemicznych do wywołania mutacji i zmian nowotworowych, opiera się na pomiarze wielkości reperacji przez wycinanie. Jej wielkość można mierzyć inkorporacją trytowanej tymidyny (lub innych prekursorów DNA), autoradiograficznie lub metodą scyntylicyjną (pomiar nie kontrolowanej syntezy DNA podczas zablokowania replikacji semikonserwatywnej). Pomiar te są powszechnie przyjmowane jako odbicie zdolności komórki do usunięcia uszkodzonego miejsca w DNA.

Nasuwa się pytanie, czy pomiar nie kontrolowanej syntezy DNA można przyjąć jako rzetelny wskaźnik ilościowy i jakościowy potencji mutagennych i karcynogennych. Poważną trudnością w interpretacji tego zjawiska jest fakt, że nie kontrolowana synteza DNA jest średnią z uszkodzeń we wszystkich komórkach populacji, a mutacja zależy od liczby nie reperowanych uszkodzeń w małym odsetku komórek. Cleaver i wsp. [11] sugerują, że liczba uszkodzeń naprawianych jest taką samą częścią ogólnie wywołanych uszkodzeń, co pozwala na wnioskowanie przy zachowaniu jednakowych warunków doświadczenia.

Szeroki zakres prowadzonych badań [3, 4, 27, 29, 34, 39, 42, 44, 51, 54, 57] wskazuje na zależności między zdolnością do wywołania nie kontrolowanej syntezy DNA a procesem nowotworowym i możliwość zasto-

sowania tego pomiaru do wykrywania chemicznych związków rakotwórczych. San i Stich [42] przebadali zdolność do wywołania syntezy reperacyjnej 64 związków chemicznych w hodowlach ludzkich fibroblastów. Wielkość nie kontrolowanej syntezy DNA mierzyli na podstawie inkorporacji trytowanej tymidyny. Wszystkie związki rakotwórcze działające bezpośrednio lub pośrednio powodowały uszkodzenia DNA w przeciwieństwie do związków nierakotwórczych. Również Stich i wsp. [46] podają wykaz 87 związków chemicznych podzielonych na grupy w zależności od zdolności wywołania syntezy reperacyjnej w hodowlach ludzkich fibroblastów. Stwierdzili oni wyraźną zależność między potencją rakotwórczą a zdolnością do wywołania syntezy reperacyjnej. Poziom syntezy reperacyjnej zależy od stężenia, czasu działania i rodzaju czynnika rakotwórczego. Obserwuje się także różnice w zależności od gatunku komórek i wieku hodowli [16, 52].

Wielkość syntezy reperacyjnej nie zawsze jest ilościowym odpowiednikiem potencji rakotwórczych; np. aby wywołać syntezę reperacyjną tej samej wielkości przez 1-oxyd-4-nitrochinoliny (4NQO) i epoxyd-20-metylocholantrenu (epoxyMCA), należy zastosować 1000 razy większą dawkę epoksydu MCA niż 4NQO, chociaż 4NQO nie jest tysiącrotnie silniejszym karcynogenem [42].

Należy jeszcze zwrócić uwagę na fakt, że szereg karcynogenów wykazuje powinowactwo narządowe, np. azaseryna [27] jest karcynogenem dla trzustki, nerek i wątroby, a 4NQO [46] działa silniej na tkankę płucną niż na nerki i wątrobę.

Należy również pamiętać, że każda cecha fenotypowa jest wynikiem interakcji czynników genetycznych i środowiskowych. Dlatego w ogólnym aspekcie rozważań trzeba uwzględnić jeszcze wiek, płeć, rasę i pochodzenie geograficzne [20, 37].

LITERATURA

- [1] BENEDICT W. F., JONES P. A., Mutagenic, clastogenic and oncogenic effect of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, *Mutation Res.*, **65**: 1-20, 1979.
- [2] BRAMBILLA G., CAVANNA M., CARLO P., FINOLLO R., PARODI S., DNA repair synthesis in primary cultures of kidneys from BALB/c and C3H mice treated with dimethylnitrosamine; *Cancer Letters*, **5**: 153-159, 1978.
- [3] BROOKES P., On the interaction of carcinogens with DNA, *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 999-1003, 1971.
- [4] BRIDGES B. A., Short term screening test for carcinogens, *Nature*, **261**: 195-200, 1976.
- [5] BURK P. G., LUTZNER M. A., CLARKE D. D., ROBBINS J. M., Ultraviolet-stimulated thymidine incorporation in xeroderma pigmentosum lymphocytes, *J. Lab. Clin.*, **77**: 759-767, 1971.

- [6] CASTO B. C., PIECZYNSKI W. J., JANOSKO N., DIPAOLO J. A., Significance of treatment interval and DNA repair in the enhancement of viral transformation by chemical carcinogens and mutagens, *Chem.-Biol. Interactions*, **13**: 105-125, 1976.
- [7] CLEAVER J. E., DNA damage and repair in light sensitive human skin disease, *J. Invest. Dermatol.*, **54**: 181-195, 1970.
- [8] — Xeroderma pigmentosum. Variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light, *J. Invest. Dermatol.*, **58**: 124-127, 1972.
- [9] — Methods for studying repair of DNA damage by physical and chemical carcinogens, *Methods in Cancer Research*, **XI**: 123-165, 1975.
- [10] CLEAVER J. E., PAINTER R. B., Absence of specificity in inhibition of DNA repair replication by DNA binding agents, carcinogens and steroids in human cells, *Cancer Res.*, **35**: 1773-1778, 1975.
- [11] CLEAVER J. E., GOTH R., FRIEDBERG E. C., Value of measurement of DNA repair level in predicting carcinogenic potential of chemicals; IARC Scientific Publications 12, 639-655, 1976.
- [12] CLEAVER J. E., DNA repair processes in human cells, *Mutation Res.*, **53**: 169, 1978.
- [13] COX R., DAMJANOV I., ABANOBI S. E., SARMA D. S., Method for measuring DNA damage and repair in the liver in vivo, *Cancer Res.*, **33**: 2114-2121, 1973.
- [14] D'AMBROSIO S. M., DANIEL F. B., HART R. W., CAZER F. D., WITIAK D., DNA repair in hamster embryo cells treated with 7, 12-dimethyl-benz (α) anthracene and its weakly carcinogenic 5-fluoro analogue, *Cancer Letters*, **6**: 255-261, 1979.
- [15] DAY R. S., SCUDIERO D., DIMATTINA M., Excision repair by human fibroblasts of DNA damaged by r-7, t-8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo(α)pyrene, *Mutation Res.*, **50**: 383-394, 1978.
- [16] DIPPLE A., SCHULTZ E., Excision of DNA damage arising from chemicals of different carcinogenic potencies, *Cancer Letters*, **7**: 103-108, 1979.
- [17] FISHER P. B., GOLDSTEIN N. I., WEINSTEIN I. B., Phenotypic properties and tumor promotor-induced alterations in rat embryo cells transformed by adenovirus, *Cancer Res.*, **39**: 3051-3057, 1979.
- [18] GOZE A., DERORET R., Repair promoted by plasmid pKM101 is different from SOS repair, *Mutation Res.*, **61**: 163-179, 1979.
- [19] HARM W., Inhibition of photoenzymatic repair of UV lesion in *E. coli* DNA by caffeine, *Mutation Res.*, **10**: 319-333, 1970.
- [20] ISHIKAWA T., TAKAYAMA S., KITAGAWA T., DNA repair synthesis in rat ratinal ganglion cells treated with chemical carcinogens or ultraviolet light in vitro, with special reference to ageing and repair level, *JNCI*, **61**: 1101-1105, 1978.
- [21] JONES P. A., TANDERERA J. V., HAWTREY A. O., Transformation of hamster cells in vitro by 1- β -Darabinofuranosylcytosine, 5-fluorodeoxyuridine and hydroxyurea, *Europ. J. Cancer*, **8**: 595-599, 1972.
- [22] KUNDSON A. G. Jr., Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 820-823, 1971.
- [23] LAISHES B. A., STICH H. F., Repair synthesis and sedimentation analysis of DNA of human cells exposed to dimethylnitrosoamine (DMN) and activated dimethylnitrosamine, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**: 827-833, 1973.
- [24] LEHMANN A. R., KIRK-BELL S., ARLETT C. F., HARCOURT S. A., de

- WEERD - KASTELEIN E. A., KAIJZER W., HALL - SMITH P., Repair of ultraviolet light damage in a variety of human fibroblast cell strains, *Cancer Res.*, **37**: 904-910, 1977.
- [25] LIEBERMAN M. W., BANEY R. N., LEE R. E., SELL S., FARBER S., Studies on DNA repair in human lymphocytes treated with proximate carcinogens and alkylating agents, *Cancer Res.*, **31**: 1297-1306, 1971.
- [26] LIEBERMAN M. W., SELL S., FARBER E., Deoxyribonucleoside incorporation and the role of hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying DNA repair in carcinogenesis, *Cancer Res.*, **31**: 1307-1312, 1971.
- [27] LILJA H. S., HYDE E., LONGNECKER D. S., YAGER J. D., DNA damage and repair in rat tissues following administration of azaserine, *Cancer Res.*, **37**: 3925-3931, 1977.
- [28] LINDAHL T., New class of enzymes acting on damaged DNA, *Nature*, **259**: 64-66, 1976.
- [29] LO L. W., STICH H. F., The use short — term tests to measure the preventive action of reducing agents on formation and activation of carcinogenic nitroso compounds, *Mutation Res.*, **57**: 57-67, 1978.
- [30] MICHAEL R. O., WILLIAMS G. M., Chloroquine inhibition of repair of DNA damage induced in mammalian cells by methyl - metanosulfonate, *Mutation Res.*, **25**: 391-396, 1974.
- [31] NOWELL P. C., Cytogenetics - Genetics disorders, *Cancer* 1, N. Y., 21-22, 1975.
- [32] OCKEY C. H., ALLEN T. D., Distribution of DNA synthesis in mammalian cells following inhibition with hydroxyurea and 5 - fluorodeoxyuridine, *Exptl. Cell Res.*, **93**: 275-282, 1975.
- [33] PATERSON M. C., SMITH B. P., LOHMAN P. H., ANDERSON A. K., FISHMAN L., Defective excision repair of X - ray - damaged DNA in human (ataxia telangiectasia) fibroblasts, *Nature*, **260**: 444-447, 1976.
- [34] PATERSON A. R., HEIDELBERGER Ch., Oncogenesis, mutagenesis, DNA damage and cytotoxicity in cultured mammalian cells treated with alkylating agents, *Cancer Res.*, **39**: 131-138, 1979.
- [35] PIETRZYKOWSKA J., Mechanizmy mutogenezy indukowanej a procesy reperacji DNA, *Post. Biochem.*, **24**: 27-58, 1978.
- [36] PRESTON R. J., HISS E. A., The use of cytosine arabinoside for studying the rate and extent of DNA repair in mammalian cells following irradiation or chemical treatment, *Mutation Res.*, **53**: 250, 1978.
- [37] PERO R. W., BRYNGELSSON C., MITELMAN F., KORNFÄLT R., THÜLIN Th., NORDEN A., Interindividual variation in the responses of cultured human lymphocytes to exposure from DNA damaging chemicals agents *Mutation Res.*, **53**: 327-341, 1978.
- [38] RAMSEIER H. P., BULKHALTER M., GAUTSCHI J. R., Survival of cells CHO that replicated in the presence of hydroxyurea, *Expl. Cell Res.*, **105**: 445-453, 1977.
- [39] REGAN J. D., SETLOW R. B., Two forms of repair in the DNA human cell damaged by chemical carcinogens and mutagens, *Cancer Res.*, **34**: 3318-3325, 1974.
- [40] RINGBORG U., LAMBERT B., Ultraviolet - induced DNA - repair synthesis in lymphocytes from patients with chronic lymphatic leucemia, *Cancer Letters*, **3**: 77-81, 1977.
- [41] RABSON A. S., TYRRELL S. A., LEGALLAIS F. Y., Growth of ultraviolet-

- damaged herpesvirus in Xeroderma Pigmentosum cells (34312), *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **132**: 802, 1969.
- [42] SAN R. H. C., STICH H. F., DNA synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens, *Int. J. Cancer*, **16**: 284-291, 1975.
- [43] SNEIDER T. W., DNA: Replication, modification and repair oncogenic viruses and host cell DNA; *The Molecular Biology of Cancer*, Acad. Press, 107-187, 1974.
- [44] STICH H. F., SAN R. C. H., DNA repair and chromatid anomalies in mammalian cells exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide, *Mutation Res.*, **10**: 389-404, 1970.
- [45] STICH H. F., KIESER D., Use of DNA repair synthesis in detecting organotropic actions of chemical carcinogens, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **145**: 1339-1342, 1974.
- [46] STICH H. F., LAM P., LO L. W., KUROPATNIC D. J., SAN R. C. H., The search for relevant short term bioassays for chemical carcinogens: The tribulation of a modern sisyphus, *Can. J. Gen. Cyt.*, **XVII**: 471-492, 1975.
- [47] STICH H. F., SAN R. C. H., LAM P. P. S., KUROPATNIC D. J., LO L. W., LAISHES B.A., DNA fragmentation and DNA repair as in vitro and in vivo assay for chemical procarcinogens, carcinogens and carcinogenic nitrosation products, IARC Scientific Publications, 12, 1976.
- [48] STICH H. F., KATO H., Sister chromatid exchanges in ageing and repair-deficient human fibroblasts, *Nature*, **260**: 447-448, 1976.
- [49] SUTHERLAND B. M., Photoreactivating enzyme from human leukocytes, *Nature*, **248**: 109-112, 1974.
- [50] TIMSON J., Hydroxyurea, *Mutation Res.*, **32**: 115-132, 1975.
- [51] TROSKO J. E., YAGER J. D., A sensitive method to measure physical and chemical carcinogen-induced unscheduled DNA synthesis in rapidly dividing eucaryotic cells, *Exptl. Cell Res.*, **88**: 47-55, 1974.
- [52] TROSKO J. E., CHU E. Y., The role of DNA repair and somatic mutation in carcinogenesis, *Advances in Cancer Research*, **21**: 391-425, 1975.
- [53] URBACH F., Ultraviolet radiation: interaction with biological molecules, *Cancer 1*, Plenum Press, N. Y., 1975.
- [54] WILLIAMS G. M., Carcinogen-induced DNA repair in primary rat liver cell cultures; a possible screen for chemical carcinogens, *Cancer Letters*, **1**: 231-236, 1976.
- [55] — The use of liver epithelial cultures of the study chemical carcinogenesis, *Amer. J. Path.*, **85**: 739-754, 1976.
- [56] — Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures, *Cancer Res.*, **37**: 1845-1851, 1977.
- [57] — Further improvements in the hepatocyte primary culture DNA repair test for carcinogens: detection of carcinogenic biphenyl derivatives, *Cancer Letters*, **4**: 69-75, 1978.
- [58] WILLIAMS G. M., LASPIA M. F., The detections of various nitrosoamines in hepatocytes primary culture/DNA repair test, *Cancer Letters*, **6**: 199-206, 1979.
- [59] WOBUS A. M., SCHÖNEICH J., THIEME R., The effect the mode of administration of nitrogen mustard and cytosine arabinoside on the production of chromosomal aberration in mouse bone marrow and ascites tumor cells, *Mutation Res.*, **58**: 67-77, 1978.
- [60] WOODCOCK D. M., FOX R. M., COOPER I. A., Evidence for new mechanism

of cytotoxicity of 1 - β - D - arabinofuranosylcytosine, *Cancer Res.*, **39**: 1418-1424, 1979.

- [61] YOUNG Ch. W., SCHOCHETMAN G., HODAS S., BALIS E., Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea: structure- activity relationship, *Cancer Res.*, **27**: 535-540, 1967.

Otrzymano: 3 grudnia 1979.

Przyjęto: 29 lipca 1980.

Adres autorki: ul. Chetmska 30/34, 00 - 725 Warszawa.

of a solution of 1,4-dioxane (molecular weight 98) in benzene. The solution was prepared by dissolving 1.0 g of the polymer in 100 ml of the solvent. The solution was then cooled to 0°C and the reaction was carried out for 24 hours. The reaction mixture was then poured into excess methanol and the precipitate was filtered off and dried in a vacuum oven at 40°C for 24 hours. The yield of the product was 0.8 g.

Received March 15, 1962

OKRĘŻNY STRUMIEŃ CYTOPLAZMATYCZNY W KOMÓRCIE *PARAMECIUM*

I. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

ROTATIONAL CYTOPLASMIC STREAMING IN *PARAMECIUM* CELL

I. GENERAL CHARACTER

Jerzy SIKORA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego w Warszawie

Streszczenie. Występujący u orzęsków z rodzaju *Paramecium* okrężny strumień cytoplazmatyczny jest dogodnym modelem do badań dynamiki ruchu cytoplazmy i możliwych do zaobserwowania efektów działania sił wytworzonych na poziomie molekularnym. Wysunięto przypuszczenie, że większość dotychczas opisanych form ruchu cytoplazmy ma ten sam mechanizm molekularny. Przejawy działania tego mechanizmu są uzależnione od lokalizacji struktur napędzających oraz prędkości i ilości cytoplazmy bezpośrednio zaangażowanej w dany ruch. Tym samym wnioski, wynikające z badań nad dynamiką strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium*, mogą być pomocne w poznaniu ruchów cytoplazmatycznych występujących w innych komórkach.

Summary. Ciliates of genus *Paramecium* demonstrates rotational cytoplasmic streaming which may serve as a convenient model to study dynamics of cytoplasmic motility and transmission of the force from molecular into visible level. Presumably most of the cytoplasmic motility forms are driven by the same molecular propulsive mechanism, while differences between them depends chiefly on velocity, amount of cytoplasm involved directly in a given motion and on localization of the propulsive structures. Therefore conclusions drawn upon studies of cytoplasmic streaming in *Paramecium*, might be helpful in understanding of the unresolved questions of some motile events in other cells.

Jedną z form aktywności ruchowej niektórych komórek roślin i pierwotniaków jest łatwo zauważalny pod mikroskopem szybki przepływ stosunkowo dużych mas cytoplazmy, nazwany obrazowo strumieniem cytoplazmatycznym [1, 2, 14-17, 20, 21, 25, 31, 34, 50]. Cytoplazma więk-

szości komórek *Eukaryota* nie wykazuje ruchów o takim charakterze. Regułą są ruchy powolne, które stwierdzić można jedynie za pomocą specjalnej aparatury filmowej przystosowanej do zdjęć poklatkowych. Ruchliwość wewnątrzkomórkowa pod postacią strumienia cytoplazmatycznego nie wydaje się jednak zjawiskiem wyjątkowym, wymagającym poszukiwania odrębnego i specyficznego mechanizmu napędowego. Wyróżniane bowiem dotychczas formy ruchu cytoplazmy: saltacyjne (saltation*), przepływowe (circulation*) i różne odmiany strumienia cytoplazmatycznego (cytoplasmic streaming*) [2, 16, 17] są w stanie przechodzić jedna w drugą [13, 17, 30, 34, 38]. Istnieją więc podstawy aby sądzić, że różnice między większością dotychczas wyróżnianych form ruchu cytoplazmy wynikają w dużej mierze z różnic maksymalnych prędkości cytoplazmy, jakie stwierdza się w różnych komórkach (tabela), z ilo-

TABELA

Maksymalne prędkości strumienia cytoplazmatycznego ([17] uzupełnione)

Obiekt	Prędkość ($\mu\text{m s}^{-1}$)
Śluzowiec <i>Physarum polycephalum</i>	1350
Strzępki <i>Humaria leucoloma</i>	250
Komórki międzywęźla <i>Chara braunii</i>	60
<i>Ameba Chaos chaos</i>	30
Komórki chwytników <i>Nitella</i>	20
Otwornica <i>Allogromia laticollaris</i>	12
Komórki roślin <i>Euphorbia</i> i <i>Nicotiana</i>	6
Włośnik <i>Zea mays</i>	6
Orzęsek <i>Paramecium bursaria</i>	5,4
Komórki pręcików <i>Tradescantia virginica</i>	5
Szybki przepływ aksoplazmy w neuronach	4,6
Komórki skórki <i>Allium cepa</i>	4
Orzęsek <i>Paramecium caudatum</i>	3,4
<i>Acetabularia calyculus</i>	3
Orzęsek <i>Paramecium aurelia</i>	2,5
Orzęsek <i>Paramecium calkinsi</i>	2,1
Wolny przepływ aksoplazmy w neuronach	0,4

ści cytoplazmy zaangażowanej bezpośrednio w tym ruchu i lokalizacji struktur napędzających. W takim ujęciu strumień cytoplazmatyczny jest jedynie jedną z najbardziej dynamicznych form ruchu cytoplazmy. Natomiast te ruchy cytoplazmatyczne, których nie sposób dostrzec bezpośrednio pod mikroskopem, gdyż mają bardzo małe prędkości, powinny zostać zaliczone do ruchów cytoplazmatycznych i włączone do klasyfikacji jako jedna z jej form.

* Według terminologii anglosaskiej.

Ważną implikacją takiego ujęcia ruchów cytoplazmatycznych jest sugestia, że zapewne większość przemieszczeń organelli komórkowych i innych struktur w czasie całego życia komórki, a zwłaszcza w okresie jej różnicowania się, może być spełniana przez sprawny transport wewnątrzkomórkowy, który swym charakterem niewiele odbiega od okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* [34].

U pierwotniaków strumień cytoplazmatyczny opisany został przede wszystkim u orzęsków z rodzaju *Paramecium* [34]. We wnętrzu tych komórek cytoplazma płynie stale w tym samym kierunku. Obieg tworzy zamkniętą pętlę. Ruch cytoplazmy w tej formie odbywa się przez większość cyklu międzypodziałowego. Jedynie w okresie bezpośrednio poprzedzającym podział *Paramecium* oraz w pewnej fazie koniugacji zawsze następuje zatrzymanie strumienia cytoplazmatycznego. Zdarzają się również krótkotrwałe spontaniczne zatrzymania ruchu [34, 37–39]. W okresie odtwarzania strumienia cytoplazmatycznego cząstki zawieszane w cytoplazmie wykonują większość wspomnianych uprzednio form ruchu cytoplazmy [22, 23, 33, 37–39]. Najpierw pojawiają się ruchy zbliżone swym charakterem do saltacyjnych, później przepływowe, aż ukształtuje się regularny strumień cytoplazmatyczny. Obserwacja ta stanowi potwierdzenie sugestii o możliwości przechodzenia różnych form ruchu cytoplazmy jedna w drugą [2, 13, 17, 33, 37, 39].

W literaturze na temat mechanizmów napędzających strumień cytoplazmatyczny największe kontrowersje wzbudzają zagadnienia dotyczące: sposobu wytwarzania siły napędowej, lokalizacji punktów napędu oraz transmisji sił na struktury dostrzegalne w komórce. Dla przykładu, następującym mechanizmom przypisuje się napędzanie strumienia cytoplazmatycznego: aktywnemu poślizgowi na granicy ekto- i endoplazmy u *Chara*, *Nitella* i *Paramecium* [14–16, 18, 19], sinusoidalnemu falowaniu rozgałęzionych pęczków mikrofilamentów aktynowych wraz z poślizgiem na granicy ektoplazmatycznego żelu i upłynnionej endoplazmy u *Nitella* [2], rozproszonemu systemowi skurczowemu opartemu na interakcji mikrofilamentów aktynowych z miozyną w obrębie samego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* [35], skurczowi tylnej części ciała ameby wywołującego hydrostatyczne nadciśnienie przepychające cytoplazmę do przodu u *Amoeba proteus* [1, 20, 27, 42], żelifikacji ektoplazmatycznej tuby wytwarzającej podciśnienie i zarazem siłę ciągnącą lepkoelastyczną cytoplazmę w kierunku wysuwającej się nibynóżki u *Amoeba proteus* i *Chaos chaos* [1] oraz skurczom ścian kanałów śluzowca *Physarum polycephalum* [48]. Większość autorów wymienionych mechanizmów napędowych uważa, że interakcja mikrofilamentów aktynowych z miozynami leży u podstaw molekularnych mechanizmów napędzających strumień cytoplazmatyczny. Istnieją liczne opracowania [7,

13, 30, 47] sugerujące, że mikrotubule również biorą aktywny udział w wytwarzaniu siły napędzającej strumień cytoplazmatyczny, np. u niektórych orzęsków [11, 44–46], słonecznic [28, 32, 43] oraz aksoplazmy w neuronach [24, 26]. Równolegle pojawiają się liczne dowody na współwystępowanie mikrotubuli z aktyną lub nawet współdziałanie mikrotubuli z mikrofilamentami aktynowymi w wytwarzaniu siły napędzającej ruchy cytoplazmy bądź organelli komórkowych [3, 5, 6, 8–12, 29, 49].

Wprawdzie brak jeszcze bezpośrednich dowodów, mimo to istnieje duże prawdopodobieństwo, że interakcja mikrofilamentów aktynowych z miozyną jest źródłem sił wektorowych napędzających strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium* [35]. Bezpośrednie stwierdzenie tego faktu wymagałoby wyodrębnienia poruszającej się cytoplazmy (brak widocznych różnic w ultrastrukturze między cytoplazmą ruchomą i nieruchomą [36]) i stwierdzenia obecności elementów przypuszczalnego systemu napędowego, co jest zadaniem technicznie bardzo trudnym. Wykrycie ruchów saltacyjnych wykonywanych przez cząstki w obrębie strumienia cytoplazmatycznego u *Nitella* [2] i u *Paramecium* [34, 40] oraz poza obrębem strumienia [4] daje podstawy do przypuszczenia, że strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*, a być może również u innych organizmów, jest zbiorem jednostkowych oddziaływań mechanizmu napędowego. Jest to zapewne zbiór ruchów saltacyjnych [34]. Badania te mogą stanowić podstawę do opisu sposobów i mechanizmów przekazywania napędu z poziomu molekularnego na dostrzegalny.

Dla wyodrębnienia składowych elementów ruchu wytwarzanego przez mechanizm napędowy, najwygodniejszą z punktu widzenia eksperymentatora jest taka sytuacja, gdy efektor położony jest możliwie najbliżej podstawowych struktur biorących udział w przetwarzaniu energii chemicznej w mechaniczną oraz gdy funkcje systemu ruchowego są nieliczne i proste. Warunki te spełnia komórka mięśniowa jak również strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*. Punkty napędu są bowiem równomiernie rozproszone w całej strefie strumienia [41], ruch odbywa się w stałym kierunku [21], a funkcje ograniczone do transportu składników cytoplazmy i organelli [34]. Bardzo istotnym faktem jest to, że strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium* nie jest bezpośrednio związany z lokomocją całej komórki. Tym samym wpływ otaczającego środowiska na mechanizm napędowy jest znacznie ograniczony [35].

Szczegóły dotyczące właściwości dynamicznych strumienia, przypuszczalnego mechanizmu napędowego oraz kontroli są przedstawione w dwu kolejnych artykułach [34, 35].

Składam serdeczne podziękowanie prof. dr Leszkowi Kuźnickiemu za dyskusję i cenne uwagi w czasie opracowywania tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., ALLEN N., Cytoplasmic streaming in amoeboid movement, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**: 469-495, 1978.
- [2] — Cytoplasmic streaming in green plants, *Ann. Rev. Bioph. Bioeng.*, **7**: 497-526, 1978.
- [3] AMOS L. A., Substructure and symmetry of microtubules, [w] *Microtubules and Microtubular Inhibitors*, red. Borgers M., Brabander M., North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1975, 21-34.
- [4] AUFDERHEIDE K. J., Saltatory motility of uninserted trichocysts and mitochondria in *Paramecium tertarelia*, *Science*, **198**: 299-300, 1977.
- [5] CANDE W. Z., LAZARIDES E., McINTOSH J. R., A comparison of the distribution of actin and tubulin in the mammalian mitotic spindle as seen by indirect immunofluorescence, *J. Cell Biol.*, **72**: 552-567, 1977.
- [6] CHAO F. C., SHEPRO D., TULLIS J. L., BELAMARICH F. A., CURBY W. A., Similarities between platelet contraction and cellular motility during mitosis: role of platelet microtubules in clot retraction, *J. Cell Sci.*, **20**: 569-588, 1976.
- [7] DUSTIN P., *Microtubules*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1978, 1-452.
- [8] FRANKE W. W., Membrane - microtubule - microfilament - relationships in the ciliate pellicle, *Cytobiologie*, **4**: 307-316, 1971.
- [9] GRIFFITH L., POLLARD T. D., Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule - associated proteins, *J. Cell Biol.*, **78**: 958-965, 1978.
- [10] HAUSER M., VAN EYS H., Mikrotubules and associated mikrofilaments in the tentacles of the suctorian *Heliophrya erhardi* Matthes, *J. Cell Sci.*, **20**: 589-617, 1976.
- [11] HAUSER M., HAUSMANN K., JOCKUSCH B. M., Demonstration of tubulin, actin and alfa - actinin by immunofluorescence in the microtubule - microfilament complex of the cytopharyngeal basket of the ciliate *Pseudomicrothorax dubius*, *Expl. Cell Res.*, **125**: 265-274, 1980.
- [12] HAUSMANN K., PECK R. K., Microtubules and microfilaments as major components of a phagocytic apparatus: the cytopharyngeal basket of the ciliate *Pseudomicrothorax dubius*, *Differentiation* **11**: 157-167, 1978.
- [13] HEPLER P. K., PALEVITZ B. A., Microtubules and microfilaments, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 309-362, 1974.
- [14] JAHN T. L., BOVEE E. C., Protoplasmic movements and locomotion of protozoa, [w] *Physiology and Biochemistry of Protozoa*, red. S. H. Hutner, Academic Press, 3, New York 1964, 62-129.
- [15] — Motile behavior of protozoa, [w] *Research in Protozoology*, red. T. T. Chen, Pergamon, New York 1967, 41-200.
- [16] — Protoplasmic movements within cells, *Physiol. Rev.*, **49**: 793-862, 1969.
- [17] KAMIYA N., Protoplasmic streaming, *Protoplasmatologia*, **83a**: 1-199, 1959.
- [18] KAMIYA N., KURODA K., Velocity distribution of protoplasmic streaming in *Nitella* cells, *Botan. Mag. Tokyo*, **69**: 544-554, 1956.
- [19] KOENUMA A., The velocity distribution of the cyclosis in *Paramecium caudatum*, *Annotnes zool. jap.*, **36**: 66-71, 1963.
- [20] KOMNICK H., STOCKEM W., WOHLFARTH - BOTTERMANN K. E., Cell motility: mechanisms in protoplasmic streaming, *Intern. Rev. Cytol.*, **34**: 169-249, 1973.

- [21] KUŹNICKI L., SIKORA J., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*, I. Movements of crystals after immobilization by antiserum, *Acta Protozool.*, **8**: 439-446, 1971.
- [22] — Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. III. The effect of temperature on flow velocity, *Acta Protozool.*, **12**: 59-66, 1973.
- [23] KUŹNICKI L., SIKORA J., FABCZAK S., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. II. Cinematographic analysis of the course and reversible cessation of cyclosis, *Acta Protozool.*, **11**: 237-242, 1972.
- [24] LUBIŃSKA L., Axoplasmic flow, *Inter. Rev. Morphol.*, **17**: 241-296, 1975.
- [25] MERCER F., The submicroscopic structure of the cell, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**: 1-24, 1960.
- [26] OCHS S., Characteristics and a model for fast axoplasmic transport in nerve, *J. of Neurobiol.*, **2**: 331-345, 1971.
- [27] RINALDI R. A., JAHN T. L., On the mechanism of ameboid movement, *J. Protozool.*, **10**: 344-357, 1963.
- [28] ROTH L. E., SHIGENAKA Y., Microtubules in the heliozoan axopodium. II. Rapid degeneration by cupric and nickelous ions, *J. Ultrastruk. Res.*, **31**: 356-374, 1970.
- [29] SANGER J. W., Intracellular localization of actin with fluorescently labelled heavy meromyosin, *Cell Tiss. Res.*, **161**: 431-444, 1975.
- [30] SCHLIWA M., ENTENEUER U., HERZOG W., WEBER K., Evidence for rapid structural and functional changes of the melanophore microtubule - organizing center upon pigment movements, *J. Cell Biol.*, **83**: 623-632, 1979.
- [31] SEITZ K., Cytoplasmic streaming and cyclosis of chloroplasts, [w] *Physiology of Movements*, red. W. Haupt and M. E. Feinleib, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Ser., 7. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979, 150-169.
- [32] SHIGENAKA Y., MARUOKA T., TOYOHARA A., SUZAKI T., Microtubules in *Protozoan* cells. IV. Effects of sulfhydryl - blocking reagents on axopodial degeneration and reformation in *Heliozoa*, *Cell Struct. Funct.*, **4**: 23-34, 1979.
- [33] SIKORA J., Cytoplasmic streaming in *Paramecium*, *Ist. inter. Congress on Cell Biology*, Boston 1976, *J. Cell Biology* 70, No. 2, part 2: 399a, 1976.
- [34] — Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. II. Właściwości dynamiczne, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 45-64, 1981.
- [35] — Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. III. Wpływ czynników modyfikujących, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 65-85, 1981.
- [36] — Dane nie opublikowane.
- [37] SIKORA J., KUŹNICKI L., Cytoplasmic movements at conjugation of *Paramecium aurelia*, [w] *Progress in Protozool.*, IV - th inter. Congr. Protozool., Clermont - Ferrand 1973, 380.
- [38] — Cytoplasmic streaming during binary fission and conjugation, *J. Protozool.*, **22**: 74-75A, 1975.
- [39] — Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. IV. Cyclosis during binary fission and conjugation, *Acta Protozool.*, **15**: 173-178, 1976.
- [40] SIKORA J., WASIK A., ALLEN R. D., The role of single particle saltations in *Paramecium* cytoplasmic streaming, *Acta Protozool.*, **18**: 201, 1979.
- [41] SIKORA J., WASIK A., BARANOWSKI Z., The estimation of velocity distribution profile of *Paramecium* cytoplasmic streaming, *Europ. J. Cell Biol.*, **19**: 184-188, 1979.

- [42] TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, *Inter. Rev. Cytol.*, **56**: 57-144, 1979.
- [43] TILNEY L. G., Studies on the microtubules in *Heliozoa*. IV. The effect of colchicine on the formation and maintenance of the axopodia and the redevelopment of pattern in *Actinosphaerium nucleofilum* (Barret), *J. Cell Sci.*, **3**: 549-562, 1968.
- [44] TUCKER J. B., Microtubule - arms and propulsion of food particles inside a large feeding organelle in the ciliate *Phascolodon vorticella*, *J. Cell Sci.*, **10**: 883-903, 1972.
- [45] — Endocytosis and streaming of highly gelled cytoplasm alongside rows of arm - bearing microtubules in the ciliate *Nassula*. *J. Cell Sci.*, **29**: 213-232, 1978.
- [46] TUCKER J. B., MACKIE J. B., Configurational changes in helical microtubule frameworks in feeding tentacles of the suctorian ciliate *Tokophrya*, *Tissue and Cell*, **7**: 601-612, 1975.
- [47] WEBER K., Visualization of tubulin - containing structure by immunofluorescence microscopy: cytoplasmic microtubules, mitotic figures and vinblastine - induced paracrystals, [w] *Cell Motility*, red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Lab., 1976, 403-418.
- [48] WOHLFARTH - BOTTERMANN K. E., Tensiometric demonstration of endogenous, oscillating contractions in plasmodia of *Physarum policephalum*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **76I**: 14-27, 1975.
- [49] WOLOSEWICK J. J., PORTER K. R., Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality, *J. Cell Biol.*, **82**: 114-139, 1979.
- [50] YAMADA K., A comparative study on the cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div.*, **1**: 1-153, 1969.

Otrzymano: 4 sierpień 1980.

Przyjęto: 15 listopada 1980.

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

- 101) ...
- 102) ...
- 103) ...
- 104) ...
- 105) ...
- 106) ...
- 107) ...
- 108) ...
- 109) ...
- 110) ...
- 111) ...
- 112) ...
- 113) ...
- 114) ...
- 115) ...
- 116) ...
- 117) ...
- 118) ...
- 119) ...
- 120) ...

OKRĘŻNY STRUMIEŃ CYTOPLAZMATYCZNY
W KOMÓRCIE *PARAMECIUM*
II. WŁAŚCIWOŚCI DYNAMICZNE

ROTATIONAL CYTOPLASMIC STREAMING IN *PARAMECIUM* CELL
II. DYNAMIC PROPERTIES

Jerzy SIKORA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego w Warszawie

Streszczenie. U orzęsków rodzaju *Paramecium* występuje okrężny strumień cytoplazmatyczny obiegający komórkę po określonym torze, a unoszone cząstki (kryształy, mitochondria, nie osadzone trichocysty) w przeważającej liczbie zachowują stały kierunek. Stosując nowe metody immobilizacji komórki, obserwacji i rejestracji ruchu cytoplazmy ustalone zostały dynamiczne właściwości cząstek unoszonych przez cytoplazmę. Stwierdzono, że: rozkład prędkości współosiowych warstw cytoplazmy jest zbliżony do paraboli, przeciętna wydajność przepływu w różnych odcinkach strumienia jest stała, elementarny efekt napędowy przejawia się jako ruch saltacyjny, miejsca napędu rozproszone są w całej masie cytoplazmy, natomiast nieznanym jest mechanizm powodujący, że cytoplazma płynie w stałym kierunku.

Summary. *Paramecium*, among ciliates demonstrates rotational cytoplasmic streaming, where most of particles (crystals, mitochondria and uninserted trichocysts) flow along permanent route, in constant direction. By means of novel methods of immobilization, observation and recording of cytoplasmic streaming, some dynamic properties of particles being transported by cytoplasm have been stated: velocity distribution of coaxial layers of cytoplasmic streaming has paraboloidal shape, the mean flow efficiency of cytoplasm at different examined regions of streaming is constant, the saltations of particles are probably the result of randomly distributed primary propulsion effect in cytoplasm. The polarity guidance system of rotational cytoplasmic streaming remains unknown.

WPROWADZENIE

Jedną z form wewnątrzkomórkowej aktywności ruchowej niektórych komórek jest okrężny strumień cytoplazmatyczny, znany pod nazwą

cyklozy u roślin. Odkrywcą tego typu ruchu cytoplazmy w komórkach roślinnych był Corti [19]. Od ponad dwóch wieków widok strumienia cytoplazmatycznego fascynuje wielu badaczy, niemniej jego mechanizmy, a nawet funkcje nie są dotychczas w pełni wyjaśnione. W klasycznym wśród pierwotniaków obiekcie eksperymentalnym, jakim jest *Paramecium*, zjawisko zwane początkowo cyklozą zaobserwowali Gruithausen [28] i Ehrenberg [20], natomiast bardziej dokładny opis okrężnego strumienia cytoplazmy pochodzi z prac Wallengrena [97], Nirensteina [65] i Billsa [11]. Hipotezy tłumaczące mechanizm napędu okrężnego strumienia cytoplazmatycznego [44] pochodziły głównie od badaczy zajmujących się komórkami roślinnymi chwytników i międzywęzli *Chara* i *Nitella* [2, 12, 33, 74]. Badania Koenumy [49] nad okrężnym strumieniem cytoplazmatycznym u *Paramecium caudatum* sugerowały występowanie sigmoidalnego rozkładu prędkości ruchu cytoplazmy, analogicznego do stwierdzonego u *Nitella*. Tego typu rozkład sugerował, że mechanizm napędowy cytoplazmy u *Paramecium* oparty jest na aktywnym poślizgu na granicy ekto- i endoplazmy [45, 85]. Koncepcja ta na długie lata weszła do literatury naukowej, powtarzana w licznych opracowaniach przeglądowych i monograficznych [38, 39, 40, 41].

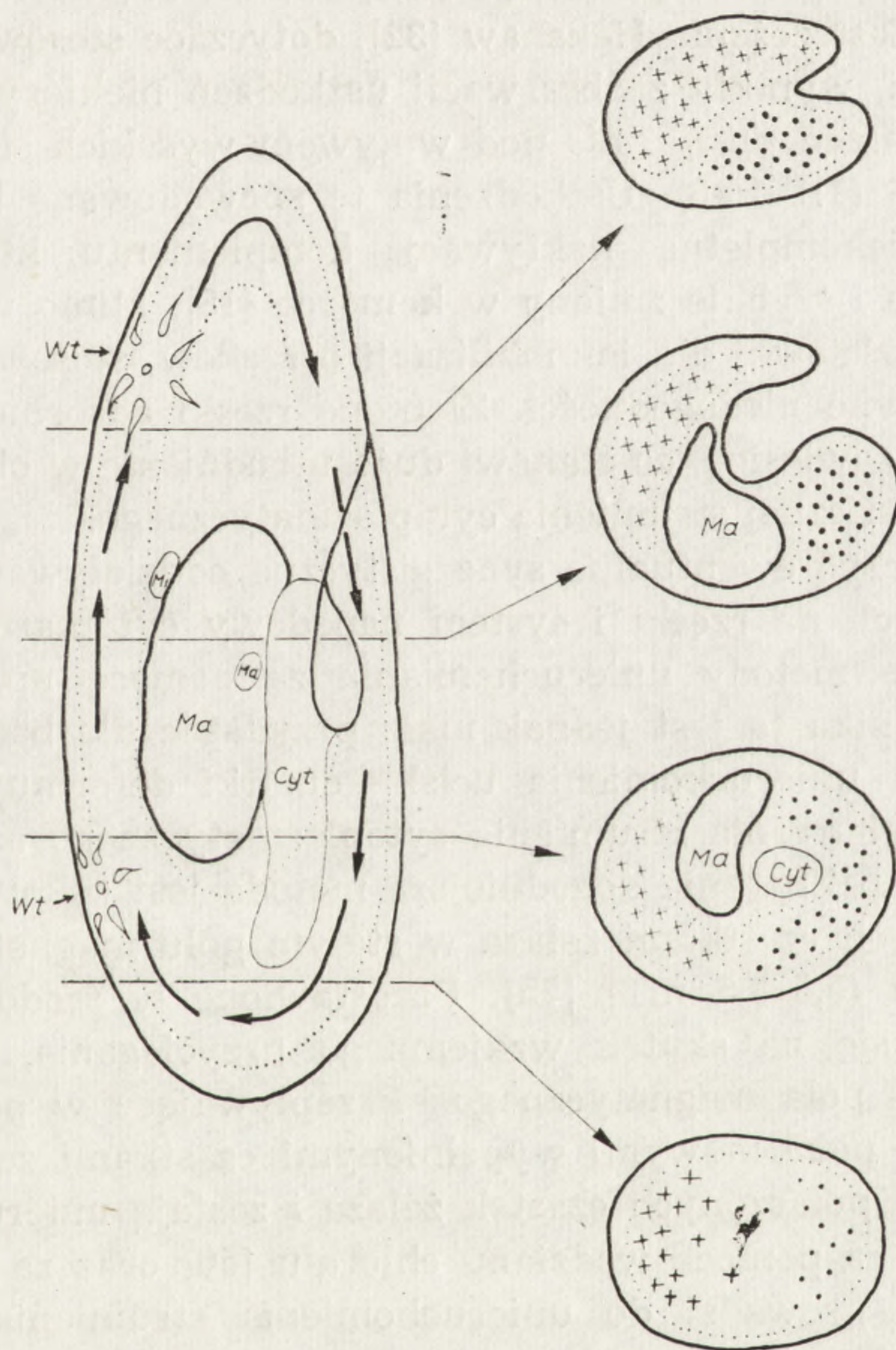
Dalsze prace służące wyjaśnieniu mechanizmów napędu cytoplazmy uzależnione były w dużym stopniu od rozwoju metod badawczych. Wprowadzając nowe techniki immobilizacji, rejestracji fotograficznej i filmowej Kuźnicki i Sikora [53–55, 57, 75–87, 98] znacznie rozszerzyli dotychczasową wiedzę o ruchu cytoplazmy u orzęsków. Stworzyło to podstawę do uogólnień i wysunięcia hipotezy o siłach napędzających cytoplazmę w układzie zamkniętej pętli, jaką jest okrężny strumień obiegający komórkę *Paramecium*.

ROZWÓJ METOD OBSERWACJI I REJESTRACJI STRUMIENIA CYTOPLAZMATYCZNEGO U *PARAMECIUM*

Bardzo dogodnym modelem dla badania własności dynamicznych strumienia cytoplazmatycznego są komórki orzęsków z rodzaju *Paramecium*. U osobników immobilizowanych można łatwo zaobserwować pod mikroskopem optycznym ruch cytoplazmy w postaci obiegającego komórkę strumienia w kształcie pętli (ryc. 1). Orzęski praktycznie przez cały czas swego życia pływają. Jedynie czasami, podczas intensywnego zerowania nieruchomieją, przywierając rzęskami do podłoża (tigmotaksja). Ten czas bezruchu jest jednak na tyle krótki, że nie ma możliwości wykonania dokładnych obserwacji lub dłuższych trwających pomiarów. W celu zwolnienia prędkości pływania orzęsków stosowano zazwyczaj środowiska o zwiększonej lepkości, takie jak 1–5% roztwory metylo-

celulozy [13, 60, 103–107]. Stwierdzono jednak, że roztwory o wyższych stężeniach metylocelulozy i związków pochodnych są toksyczne [101]. W roztworach o niższych stężeniach 1 - 1,2% powodują utratę rzęsek, o ile orzęski przebywały w tym środowisku przez dłuższy czas [52]. Stosowany przez Lubocką i Dębowskiego [59] dla uzyskania lepkiego środowiska śluz z wiśni nie był wprawdzie toksyczny, ale zaburzał obieg wodniczek pokarmowych [54].

Szereg związków chemicznych, zależnie od stosowanego stężenia, powoduje unieruchomienie rzęsek w mniejszym lub większym stopniu [29,



Ryc. 1. Schematyczna rekonstrukcja toru strumienia cytoplazmatycznego w komórce *Paramecium*

Po lewej, widok komórki częściowo od strony prawej krawędzi i częściowo od brzusznej strony ciała. Ma — makronukleus, Mi — mikronukleus, Cyt — cytostom, Wt — wodniczka tętniąca. Strzałkami oznaczono kierunek ruchu cytoplazmy. Po prawej, przekroje poprzeczne komórki na różnych poziomach, z zarysem „kanału”, przez który płynie strumień cytoplazmatyczny. Kierunek ruchu: kropki — skierowany w stronę patrzącego, krzyżyki — oddalający się od patrzącego

51, 69, 84, 90, 100]. Dla unieruchomiania pierwotniaków praktyczne zastosowanie znalazły jedynie alkohole propylowy i izopropylowy [11, 36, 48, 49], alkohol etylowy [90] oraz roztwory soli niklawych [5–7, 25–27]. Przestrzegając skrupulatnie procedurę immobilizacji jonami Ni^{2+} , można uzyskać wysoki procent osobników wykazujących nie zaburzony ruch cytoplazmy przy całkowitym bezruchu komórki [84, 86, 87].

Bardzo skuteczną metodą unieruchamiania *Paramecium* jest wykorzystanie homologicznej surowicy odpornościowej względem antygenów powierzchniowych komórki [53–57, 77, 80–83]. Surowica w dużym rozcieńczeniu (1:400–1:2000) powoduje sklejanie się rzęsek i unieruchomienie komórki. Zastrzeżenia Henshaw [32], dotyczące stosowania surowicy odpornościowej, wynikły z obserwacji uszkodzeń niektórych ultrastruktur u *Tetrahymena pyriformis* pod wpływem wysokich stężeń surowicy odpornościowej (1:1–1:40). Uszkodzenia te spowodowane były najprawdopodobniej niekompletną inaktywacją komplementu, który wywołuje bardzo rozległe i szybkie zmiany w komórce [18]. Mimo wielu zalet surowicy odpornościowej dla immobilizacji orzęsków, stosowanie jej stwarza jednak pewne niedogodności. Zlepione rzęski adsorbują z otaczającego roztworu zawiesinę, co stanowi duże utrudnienie w obserwacji i rejestracji fotograficznej strumienia cytoplazmatycznego.

Aby wykluczyć ewentualne synergistyczne oddziaływanie czynników immobilizujących na rzęski i system napędowy cytoplazmy, stosowane są mechaniczne metody unieruchamiania za pomocą np. rotokompresora [99]. Technika ta jest jednak mało przydatna dla badań, gdyż wystarczający dla unieruchomienia ucisk komórki deformuje ją na tyle, że następują zaburzenia strumienia cytoplazmatycznego aż do jego całkowitego zaniku. Znacznie dogodniejszą metodą jest zakotwiczenie orzęsków karmionych cząstkami żelaza w stałym polu magnetycznym o niskim natężeniu (5,5–8,5 mT) [75]. Pozostawione w środowisku cząstki żelaza, łącząc się na skutek wzajemnego przyciągania, ustawiają się wzdłuż linii sił pola magnetycznego. Przepływające w pobliżu orzęski z wodniczkami pokarmowymi wypełnionymi cząstkami żelaza przywierają do zespołu połączonych cząstek żelaza i zostają unieruchomione.

Odrzęsianie za pomocą wodzianu chloralu [50] oraz za pomocą dibukainy [72, 96] prowadzi do unieruchomienia strumienia cytoplazmatycznego, prawdopodobnie na skutek uszkodzenia komórek [47].

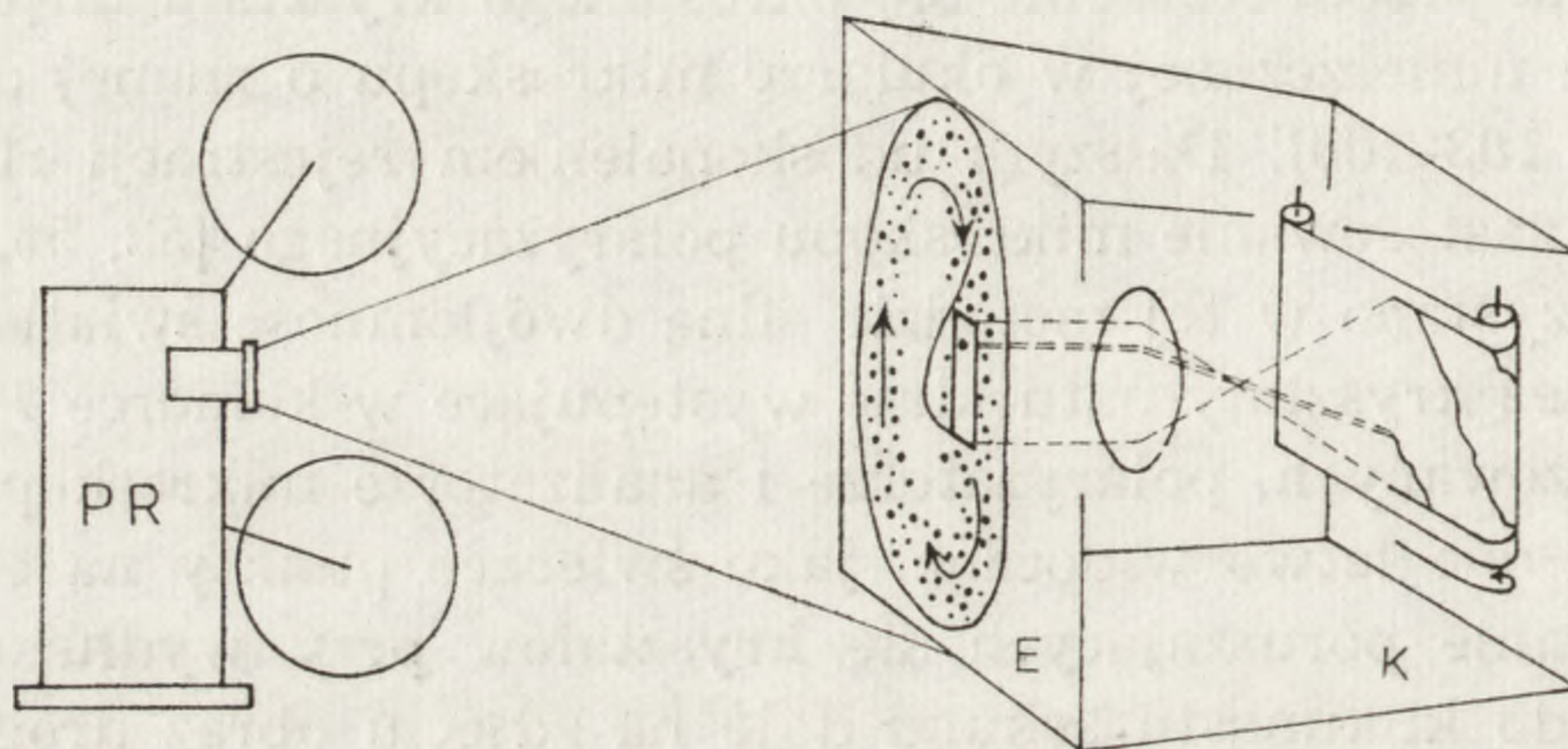
Wprawdzie każda z dotychczas opracowanych metod służących do unieruchamiania orzęsków wpływa w mniejszym lub większym stopniu zakłócająco na jego fizjologię, to jednak wybór kilku metod pozwala z dużym prawdopodobieństwem ocenić zakres oddziaływania immobilizacji na strumień cytoplazmatyczny.

Strumień cytoplazmatyczny można obserwować lub rejestrować za

pomocą wskaźników ruchu cytoplazmy, jakimi są: mitochondria, nie osadzone trichocysty, kryształy oraz w pewnych wypadkach wodniczki pokarmowe. Najprostszą i przez wielu badaczy stosowaną metodą jest bezpośrednia obserwacja pod mikroskopem świetlnym (w powiększeniach od około 100 razy) ruchu kryształów zawieszonych w cytoplazmie i unoszonych przez nią. Prędkość poruszania się kryształów może być dość łatwo, choć mało precyzyjnie, mierzona poprzez pomiar czasu potrzebnego na przemieszczenie się określonego kryształu między punktami na skali umieszczonej w okularze mikroskopu o znanej długości [48, 49, 53, 55, 103–106]. Dalszym udoskonaleniem rejestracji ruchu kryształów było zastosowanie mikroskopu polaryzacyjnego [53, 56, 57, 77, 80–83]. Wykorzystano w tej metodzie silną dwójłomność światła spolaryzowanego przez kryształy naturalnie występujące w komórce *Paramecium*. Przy skrzyżowanych, polaryzatorze i analizatorze mikroskopu polaryzacyjnego, są one łatwo widoczne, jako świecące punkty na czarnym tle. Fotografowanie poruszających się kryształów przy wydłużonym czasie ekspozycji do kilkunastu sekund daje na zdjęciu obraz dróg poruszających się kryształów. Z długości śladu można wnosić o prędkości ruchu cytoplazmy unoszącej kryształ. Ponadto, położenie śladów i nieruchomych kryształów pozwala na lokalizację poruszających się kryształów w stosunku do nieruchomych. Porównując położenie dróg na zdjęciu wykonanym w świetle spolaryzowanym, a następnie — w świetle białym, można z dużą dokładnością prześledzić przebieg strumienia w komórce. Ta metoda rejestracji może jednak dać fałszywy obraz śladu pojedynczych kryształów. Dwójłomność związana jest bowiem z określonymi osiami kryształu, który płynąc i obracając się może być przez pewien moment niewidoczny, znacząc ślad krótszy od rzeczywistej drogi. Ponadto, nie wszystkie kryształy są dobrymi wyznacznikami ruchu, gdyż część z nich stanowi stosunkowo duże struktury 3–5 μm długości.

Wykorzystanie mikroskopu interferencyjnego, a zwłaszcza systemu Nomarskiego, pozwala na śledzenie ruchu małych elementów jako wskaźników ruchu cytoplazmy, np. mitochondriów i nie osadzonych trichocyst [85–87]. Zdecydowanie najlepszym narzędziem rejestracyjnym jest kamera filmowa. Pomiar prędkości ruchu cząstek zarejestrowanych na filmie jest znacznym udoskonaleniem metod rejestracji ruchu cytoplazmy. Służy temu zestaw zastosowany przez Kamiyę [43] dla pomiaru prędkości strumienia cytoplazmatycznego u śluzowców. Udoskonalony zestaw służący do pomiaru prędkości ruchu cytoplazmy w różnych warstwach strumienia składa się z: projektora filmowego, urządzenia do obracania obrazu, ekranu z odpowiednią podłużną szczeliną zaopatrzona w matówkę oraz z kamery fotograficznej o ciągłym i regulowanym przesuwie błony negatywowej (ryc. 2). Obrazy cząstek płynących wraz ze

strumieniem cytoplazmatycznym na tle szczeliny w ekranie zostają utrwalone na przesuwanym się ze stałą prędkością negatywie kamery o ciągłym przesuwie błony. Ponieważ błona negatywowa w kamerze o przesuwie ciągłym porusza się pod kątem prostym względem położenia szczeliny w ekranie, to obrazy cząstek poruszających się wzdłuż tej szczeliny na błonie negatywowej są widoczne jako mniej lub bardziej ukośnie prze-



Ryc. 2. Schemat zestawu dla rejestracji prędkości ruchu cząstek w różnych miejscach strumienia cytoplazmatycznego *Paramecium*

PR — projektor filmowy zaopatrzony w obiektyw z wbudowanym urządzeniem do obracania obrazu, E — ekran z półprzezroczystą szczeliną, K — kamera fotograficzna o ciągłym, regulowanym przesuwie negatywu

biegające ślady względem podstawy. Prędkość poruszania się cząstek V łatwo można wyliczyć ze wzoru: $V = k \operatorname{tg} \alpha$, gdzie k jest współczynnikiem proporcjonalności wyrażającym wartość pomiaru w $\mu\text{m s}^{-1}$, kąt α jest kątem zawartym między śladem poruszającej się cząstki a krawędzią błony negatywowej kamery o przesuwie ciągłym [86, 87]. Prędkość ruchu cytoplazmy zarejestrowana na filmie daje więc nieocenioną możliwość przeprowadzenia, równoległej w sensie czasowym, analizy właściwości dynamicznych strumienia w różnych jego miejscach i różnych rejonach komórki.

Stosując odpowiednie z wymienionych metod, można było ustalić geometrię „kanału”, którym cytoplazma przepływa w komórce, wyznaczyć prędkość przepływu w różnych miejscach obiegu i we współsiowych warstwach, poznać wydajność przepływu [86, 87] oraz wartość siły potrzebnej dla napędu. Obserwacje zaburzeń w ruchu cząstek unoszonych przez strumień cytoplazmatyczny stały się podstawą dla przypuszczenia, że strumień cytoplazmatyczny jako całość jest wynikiem elementarnych ruchów saltacyjnych skierowanych zgodnie z polaryzacją strumienia [85].

STRUKTURA I DYNAMIKA STRUMIENIA CYTOPLAZMATYCZNEGO

ULTRASTRUKTURA CYTOPLAZMY W OBREBIE STRUMIENIA

Dotychczas nie udało się ujawnić zróżnicowania morfologicznego między tymi rejonami w komórce *Paramecium*, w których obserwuje się ruch w postaci strumienia, a tymi, gdzie cytoplazma nie płynie. Rejon, w którym płynie strumień cytoplazmatyczny, nazwano umownie „kanałem”, gdyż jego przybliżone granice mogły być ustalone jedynie na podstawie filmowej analizy ruchu cząstek unoszonych przez cytoplazmę [86, 87]. Przestrzeń, w której notuje się ruch cytoplazmy, ograniczona jest od strony zewnętrznej wewnętrzną powierzchnią pellikuli i strukturami do niej przyległymi, a od strony wewnętrznej — żelifikowaną cytoplazmą z osadzonymi w niej makronukleusem i mikronukleusami, przedsiódkiem, gardzielą i cytostomem (ryc. 1). Warstwa żelifikowana cytoplazmy o grubości do około 10 μm może znajdować się pod pellikulą.

Cytoplazma *Paramecium*, zdolna do ruchu w postaci okrężnego strumienia cytoplazmatycznego, nie była obiektem zbyt licznych badań, gdyż nie wyróżnia się swą budową w sposób istotny od innych komórek eukariotycznych. Zawiera ona: tubularne mitochondria, trichocysty, endoplazmatyczne retikulum, rybosomy, granule glikogenu, krople tłuszczu, symbiontyczne zoochlorelle (*Paramecium bursaria*), „parasymbiontyczne” cząstki, obłonione kryształy, wodniczki pokarmowe, nieliczne mikrotubule i ortotubule [22, 42, 101, 108]. Na granicy rozdzielczości mikroskopu elektronowego Jurand i Selman [42] wyróżniają między innymi ultrastrukturami nieregularne włókniste elementy. Większe skupienia mitochondriów spotyka się pod pellikulą w bezpośredniej bliskości fibrylarnych struktur oraz trichocyst, natomiast w pozostałej przestrzeni cytoplazmy brak widocznych skupień mitochondriów [42]. Endoplazmatyczne retikulum w postaci pojedynczych spłaszczonych pęcherzyków skupione jest również w strefie subpellikularnej. Według Sommerville i Sindena [89] około 70% rybosomów występuje w stanie wolnym nie związanym z retikulum endoplazmatycznym. Aparat Golgiego w słabo rozwiniętej postaci został opisany jako zbiór nielicznych diktiosomów [66]. Granule glikogenu o średnicy około 40 nm wypełniają obficie cytoplazmę [22, 42, 101]. Krople tłuszczu o nieregularnym kształcie [4, 73] mają średnicę około 0,5 μm [42]. W różnych szczepach *Paramecium* z grupy „aurelia” [91] występuje cała grupa parasymbiontów [88]. W odróżnieniu od symbiontycznych zoochlorelli u *Paramecium bursaria* [35], są to w większości bakterie lub bakteriopodobne „komensale” [88]. W pobliżu kanałów nefrydialnych wodniczek tętniących występują re-

gularnie ułożone pęczki tubuli o średnicy około 500 nm i długości około 1,3 μm . Ehret i de Haller [21] nazwali je systemem ortotubularnym. Występowanie ortotubuli stwierdzono ponadto w rejonie przewężenia podziałowego komórki *Paramecium*. Kryształy o niezidentyfikowanej budowie chemicznej występują u wszystkich gatunków i szczepów *Paramecium* z wyjątkiem mutantów o zredukowanej liczbie kryształów. Na ogół mają one kształt nieregularny, choć w niektórych wypadkach można wyróżnić cechy charakterystyczne dla określonego gatunku. Są one otoczone błoną, mniej lub bardziej ściśle przylegającą do konturu samego kryształu. Charakteryzują się różnymi wielkościami, choć zwykle nie przekraczają 5 μm długości. Silnie załamują światło spolaryzowane [53].

W przestrzeni upłynnionnej cytoplazmy występują wodniczki pokarmowe o różnej średnicy, zależnej m. in. od fazy w cyklu trawiennym i od rodzaju pokarmu [15–17, 61]. Pojawiają się również małe, o średnicy 0,2 μm , wtórne wodniczki trawienne [22, 42].

W całej cytoplazmie spotyka się nieliczne mikrotubule o przeciętnej średnicy 25 nm [68], natomiast ich skupiska tworzą ultrastrukturalne elementy subpellikularne [1, 22, 23, 42, 67]. Filamenty o średnicach od 8,5 do 45 nm stwierdza się jedynie w strefie subpellikularnej [37]. Można natomiast sądzić, że sieć włókien podrzęskowych rozciąga się głębiej w komórce, choć brak na to dotychczas dowodu, poza obserwacją Juranda i Selmana [42] włóknistych elementów na granicy rozdzielczości mikroskopu elektronowego.

Podsumowując, w strefie występowania strumienia cytoplazmatycznego występować mogą różne organelle: mitochondria, trichocysty, retikulum endoplazmatyczne, rybosomy, nieliczne mikrotubule oraz prawdopodobnie mikrofilamenty. Przynajmniej niektóre z tych struktur biorą udział aktywny lub bierny w generacji ruchu. Muszą więc ulegać ciągłej przebudowie i dlatego charakter struktury może być niezwykle labilny [10, 62]. Uchwycenie różnic morfologicznych między cytoplazmą w stanie ruchu i nieruchomą jest zatem bardzo trudne, a być może niemożliwe za pomocą obecnie dostępnych metod.

WZORZEC OBIEGU CYTOPLAZMY W KOMÓRCIE PARAMECIUM

Znamienną cechą okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u orzęsków rodzaju *Paramecium* (*Paramecium aurelia* — różnych szczepów, *P. caudatum*, *P. bursaria*, *P. multimicronucleatum* i *P. calkinsi*) jest to, że zasadniczy tor ruchu cytoplazmy jak i jej kierunek (ryc. 1) pozostają w okresie międzypodziałowym stałe. Odchylenia od tego wzorca polegają na zwolnieniu lub zatrzymaniu ruchu [57, 77] i występują bądź spontanicznie, bądź też podczas podziału lub koniugacji [77, 80, 82, 83].

Ponowne pojawienie się ruchu następuje w stałym kierunku i według stałego wzorca [53, 56, 77, 80-83]. Innym rodzajem odstępstwa od wzorca są zbliżone w swych przejawach do ruchów Browna oscylacyjne ruchy cząstek w cytoplazmie. Pojawiają się one po zatrzymaniu strumienia na skutek przekroczenia górnej granicy temperatury [55] oraz w czasie bezpośrednio poprzedzającym pojawienie się ukierunkowanego ruchu po zatrzymaniu spontanicznym [57, 77]. Zatrzymaniu strumienia na skutek obniżenia temperatury [55], działania cytochalazyną B, kolchicyną i lumikolchicyną [98] oraz chlorowodorkiem papaweryny [79] nie towarzyszą wspomniane ruchy oscylacyjne cząstek zawieszonych w cytoplazmie.

STRUMIEŃ CYTOPLAZMATYCZNY
W IZOLOWANYCH FRAGMENTACH KOMÓRKI *PARAMECIUM*

Przebieg strumienia cytoplazmatycznego można zmienić przez uszkodzenie różnych rejonów komórki *Paramecium*. Na przykład, naświetlając wiązką ultrafioletu wywołuje się lokalne zatrzymanie cytoplazmy w rejonie naświetlonym. Wówczas strumień cytoplazmatyczny opłynie „bardziej lepki” rejon [95]. W mikrochirurgicznie otrzymanych fragmentach *Paramecium caudatum* stwierdzono występowanie strumienia cytoplazmatycznego płynącego w kierunku zgodnym z wzorcem nie uszkodzonej komórki [36]. Podobny efekt obserwuje się w komórkach *Paramecium aurelia* (*tetraurelia*), *P. bursaria* i *P. multimicronucleatum*, jeżeli rozdzieli się strumień cytoplazmatyczny przez mechaniczny ucisk komórki. Z reguły tworzą się dwa odrębne obiegi, w dwu nierozłączonych fragmentach komórki, przy czym kierunek ruchu pozostaje identyczny jak w nie uszkodzonej komórce. Prędkość strumienia cytoplazmatycznego przepływającego wzdłuż mikrochirurgicznych przecięć nie różni się od prędkości w sąsiadujących nienaruszonych rejonach strumienia [36]. Przedstawione wyniki potwierdzają sugestię Hosoi [36], że napęd cytoplazmy jest najprawdopodobniej równomiernie rozmieszczony w obrębie samego strumienia i nie jest bezpośrednio uzależniony od warstwy subpellikularnej.

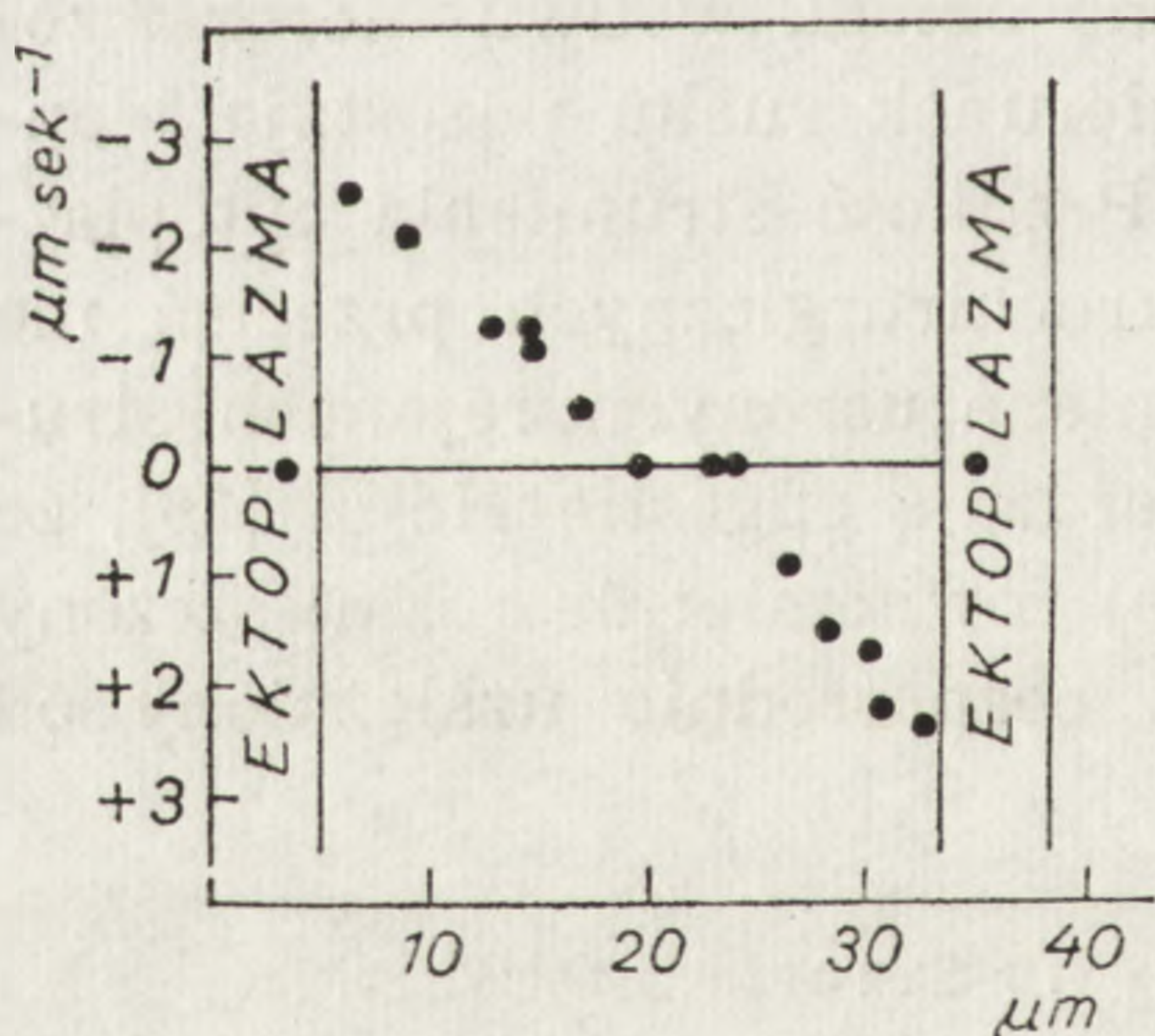
PROFIL ROZKŁADU PRĘDKOŚCI W STRUMIENIU CYTOPLAZMATYCZNYM

Przeciętna prędkość strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* według Yamady [103] wynosi: przy temperaturze 25–27°C u *P. bursaria* — 5,4 $\mu\text{m s}^{-1}$, *P. caudatum* — 3,4 $\mu\text{m s}^{-1}$, *P. aurelia* — 2,5 $\mu\text{m s}^{-1}$, *P. calkinsi* — 2,1 $\mu\text{m s}^{-1}$. Wartości te mogą zmieniać się w zależności od wielkości kryształów, które posłużyły jako wyznaczniki ruchu. Yamada [103] podaje, że u *P. caudatum* prędkość może różnić się od 3,5 do 2,7 $\mu\text{m s}^{-1}$, a u *P. bursaria* — od 5,5 do 3,6 $\mu\text{m s}^{-1}$, jeżeli wykonano pomiary prędkości za pomocą kryształów o długościach około 1 i powyżej

5 μm . Prędkość strumienia cytoplazmatycznego nie zależy od wielkości komórki danego gatunku *Paramecium* [48, 103], natomiast zależy od temperatury otoczenia [48, 55], stężenia i rodzaju jonów w środowisku [48, 103] oraz innych czynników oddziałujących na napęd lub konsystencję cytoplazmy [78, 79, 98].

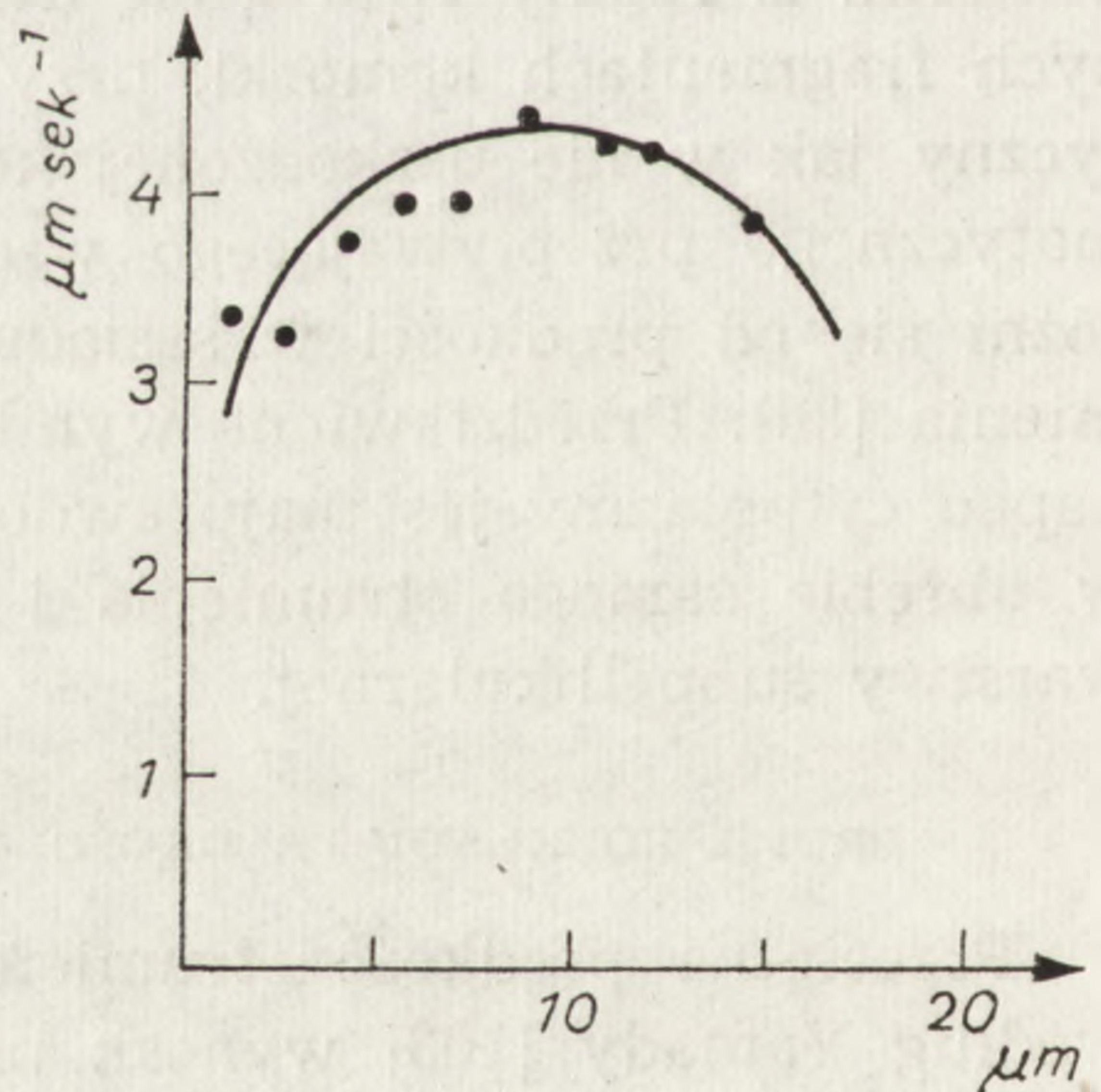
Jak zostało to już wspomniane w części dotyczącej metod badania strumienia cytoplazmatycznego, większość pomiarów prędkości strumienia wykonywana była jako pomiar czasu potrzebnego na pokonanie przez określoną cząstkę odcinka drogi o długości około 10–20 μm [48, 55, 103]. Przy rygorystycznym przestrzeganiu zarówno warunków środowiskowych, jak i miejsca pomiaru w komórce, można uznać tak prowadzone pomiary za porównywalne. Metoda ta pozwala wykonać pomiary jedynie na dłuższych prostych odcinkach strumienia. Bardziej precyzyjne pomiary wykonane na podstawie analizy filmowej wykazały, że prędkość strumienia cytoplazmatycznego nawet w stosunkowo bliższych rejonach komórki może być różna [86, 87] (tabela). Ponadto, trzeba dodać, że prędkość ruchu cząstek unoszonych przez okrężny strumień cytoplazmatyczny różni się w zależności od tego, w jakim miejscu przekroju poprzecznego znajduje się analizowana cząstka.

Przeprowadzona przez Koenumę [49] analiza rozkładu prędkości cząstek w strumieniu cytoplazmatycznym u *Paramecium* doprowadziła go do wniosku, że profil rozkładu prędkości ma postać sigmoidalną,



Ryc. 3. Rozkład prędkości ruchu kryształów w strumieniu cytoplazmatycznym *Paramecium caudatum*, według Koenumy [49], przytaczany jako dowód aktywnego poślizgu na granicy ekto- i endoplazmy

Oś rzędnych — prędkość strumienia, oś odciętych — odległość od jednej z krawędzi ciała komórki



Ryc. 4. Paraboidalny rozkład prędkości ruchu cytoplazmy w „kanale” u *Paramecium bursaria* [87]

Oś rzędnych — prędkość strumienia, oś odciętych — odległość od zewnętrznej krawędzi ciała komórki

podobną do profilu opisanego u *Nitella* [45]. Według Koenumy [49] prędkość strumienia cytoplazmatycznego w bezpośredniej bliskości wewnętrznej powierzchni komórki jest największa, a oddalając się w głąb ciała stopniowo spada, aż do wartości zerowej, np. w przedniej części komórki (ryc. 3).

Wprowadzenie nowych technik rejestracji ruchu cytoplazmy w świetle spolaryzowanym [53, 56, 57] dostarczyło szeregu nowych danych podważających koncepcję Koenumy [49]. Rejestracja ruchu kryształów w świetle spolaryzowanym nie mogła być jednak użyta dla ilościowej oceny prędkości przepływu warstw cytoplazmy w obrębie strumienia. Dopiero za pomocą analizy filmu udało się dosyć dokładnie ustalić u *Paramecium bursaria* i *P. aurelia* (*tetraurelia*) szczep 51, parametry ruchu cząstek unoszonych przez strumień w różnych rejonach komórki (tabela). Ponadto stwierdzono, że graficzny obraz rozkładu prędkości współosiowych warstw cytoplazmy w „kanale” przypomina spłaszczoną parabolę (ryc. 4) [86, 87].

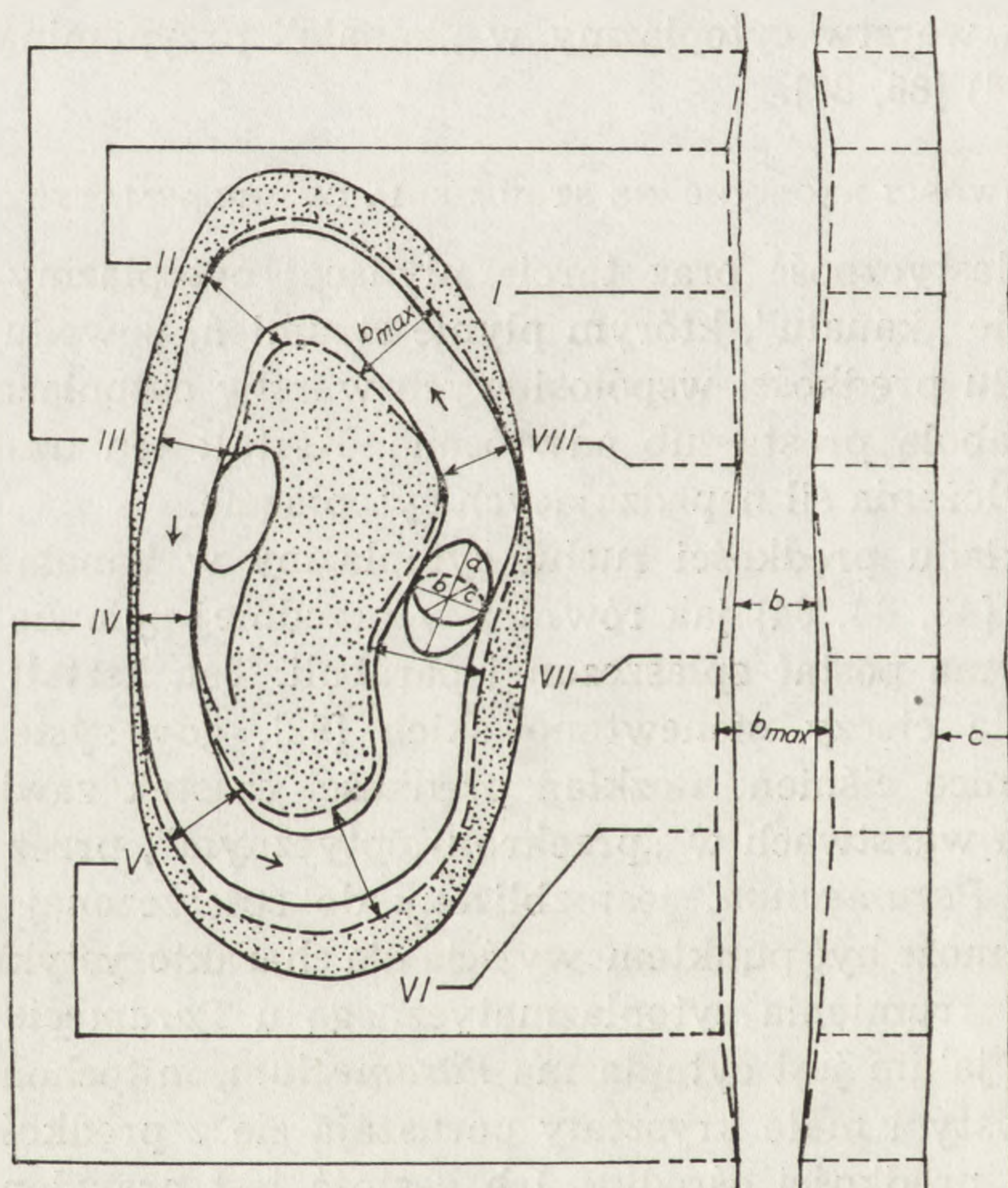
WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE STRUMIENIA CYTOPLAZMATYCZNEGO

Lepkość, elastyczność oraz tarcie płynącej cytoplazmy o zżelifikowane krawędzie „kanału”, którym płynie strumień, powodują, że kształt profilu rozkładu prędkości współosiowych warstw cytoplazmy może być sinusoidą, parabolą prostą lub odwróconą. Kształt ten uzależniony jest od miejsc przyłożenia sił napędzających cytoplazmę.

Profil rozkładu prędkości ruchu cytoplazmy w kanałach *Physarum polycephalum* [43, 44, 64] jak również w przedniej połowie poruszającej się ameby [3] ma postać spłaszczonej paraboli. Ten kształt jest charakterystyczny dla cieczy nienewtonowskich [92], gdy system napędowy wytwarza różnicę ciśnień. Rozkład prędkości cząstek zawieszonych we współosiowych warstwach w „przekroju optycznym”, przez który płynie cytoplazma u *Paramecium*, jest zbliżony do spłaszczonej paraboli [86, 87]. Fakt ten może być punktem wyjścia dla charakterystyki właściwości reologicznych strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium*. W środowisku lepkiem, jakim jest cytoplazma *Paramecium*, mitochondria, nie osadzone trichocysty i małe kryształy poruszają się z prędkościami bardzo zbliżonymi do prędkości ośrodka. Ich gęstość jest prawdopodobnie zbliżona do gęstości cytoplazmy, nie obserwuje się bowiem gromadzenia ich w określonych rejonach komórki w czasie immobilizacji na skutek działania siły grawitacyjnej.

Przestrzenną geometrię „kanału” *Paramecium*, przez który płynie cytoplazma, wyliczono na podstawie pomiarów dwu osi a i b (ryc. 5) wodniczki pokarmowej nie wypełnionej zawiesiną [87]. Wodniczka ta w czasie swego obiegu okrężnego w komórce przechodziła przez różne

odcinki „kanału”, które na skutek ucisku powodowały jej deformację i zmianę kształtu kolistego w elipsoidalny. W jednym z odcinków kanału wodniczka przyjmowała kształt niezwykle zbliżony do kolistego, a wartości średnic a i b były identyczne i zarazem najmniejsze spośród wykonanych w czasie obiegu wodniczki pomiarów. Ta obserwacja pozwoliła założyć, z dużym prawdopodobieństwem, że w tym rejonie „kanału” wszystkie trzy osie elipsoidy obrotowej a , b , c są sobie równe, a wodniczka pokarmowa przybrała kształt bardzo zbliżony do kuli. Na tej podstawie znając promień można było wyznaczyć objętość wodniczki pokarmowej. Wobec krótkiego czasu, w którym nastąpiły kolejne trzy obiegi wodniczki, ewentualne zmiany jej objętości związane z procesami trawiennymi [61] można było pominąć. Zakładając stałą objętość wodniczki pokarmowej w czasie wykonywania pomiarów oraz znając war-



Ryc. 5. Schematyczna rekonstrukcja geometrii „kanału” [87], którym płynie okrężny strumień cytoplazmatyczny (linia kreskowana) w różnych rejonach komórki *Paramecium bursaria*

Linia ciągłą oznaczono kolejne położenia krawędzi wodniczki trawiennej, która przemieszczała się w „kanale”. Wewnątrz wodniczki oznaczono trzy osie elipsoidy obrotowej. Bryła ta najlepiej oddaje rzeczywisty kształt wodniczki trawiennej. Komórka ułożona stroną grzbietową do patrzącego. Po prawej, zmiany średnic wodniczki pokarmowej oraz maksymalnego zasięgu strumienia cytoplazmatycznego. Obrazują one zmiany przekroju poprzecznego „kanału” w różnych miejscach komórki *Paramecium*

tości średnic a i b , bez trudu wyliczono wartość średnicy c elipsoidy obrotowej, gdyż do takiej bryły najbardziej zbliżony był kształt wodniczki. Zarysy kolejnych położenia wodniczki pokarmowej w „kanałach” nie we wszystkich rejonach pokrywały się z zarysem granicy poruszających się cząstek. Stąd, maksymalny zasięg strumienia cytoplazmatycznego został przyjęty jako średnica „kanału” b_{\max} i stanowił czynnik dla dalszych wyliczeń pola przekroju poprzecznego „kanału” i wydajności przepływu (tabela).

TABELA

Parametry „kanału” różnych rejonów okrężnego strumienia cytoplazmatycznego *Paramecium bursaria*, gdzie: b_{\max} — maksymalny zasięg strumienia w płaszczyźnie ryc. 5, c — średnica „kanału” w płaszczyźnie pionowej ryc. 5. Według [87]

Rejon	Średnica „kanału”		Pole powierzchni przekroju poprzecznego „kanału” $S = \frac{b_{\max} c \pi}{4}$ (μm^2)	Średnie prędkości strumienia v ($\mu\text{m s}^{-1}$)	Wydajność przepływu strumienia $Q = Sv 10^2$ ($\mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
	b_{\max} (μm)	c (μm)			
I	16,60	11,49	$149,8 \pm 8,8$	$2,77 \pm 0,44$	$4,1 \pm 0,6$
II	15,13	11,77	$139,9 \pm 8,8$	$3,30 \pm 0,44$	$4,6 \pm 0,7$
III	11,67	12,84	$117,9 \pm 8,8$	$3,20 \pm 0,24$	$3,8 \pm 0,4$
IV	10,33	14,39	$116,8 \pm 8,8$	$3,96 \pm 0,28$	$4,6 \pm 0,5$
V	14,57	12,25	$140,2 \pm 8,8$	$3,08 \pm 0,66$	$4,3 \pm 1,0$
VI	17,33	10,86	$147,8 \pm 8,8$	$2,86 \pm 0,66$	$4,2 \pm 1,0$
VII	16,00	10,26	$128,8 \pm 8,8$	$2,20 \pm 0,41$	$2,8 \pm 0,5$
VIII	11,87	13,73	$128,0 \pm 8,8$	$3,64 \pm 0,44$	$4,7 \pm 0,6$

Pomiary prędkości ruchu cytoplazmy w różnych rejonach „kanału” wykazały, że rozkład prędkości na poziomie „przekroju optycznego” ma kształt paraboliczny. Odpowiada to laminarnemu przepływowi cieczy nienewtonowskiej w rurze o przekroju kołowym, pod wpływem różnicy ciśnień. Chociaż najbardziej prawdopodobny kształt przekroju poprzecznego „kanału” odbiega od przekroju kołowego (ryc. 1), niemniej przyjęcie tego założenia nie ujmuje wiele wyników, które należy traktować jako wartości przybliżone. Przy takich założeniach wartość siły napędowej F można wyliczyć na podstawie równania Poiseuilla:

$$F = 8\pi\eta lv,$$

gdzie η — wartość lepkości dynamicznej (3 - 11 cP), l — długość „kanału”, przez który przepływa okrężnie cytoplazma w komórce *Paramecium* (247,5 μm), v — średnia prędkość (3,126 $\mu\text{m s}^{-1}$). W zależności od przyjętej wartości lepkości, siła napędzająca strumień wynosi od 5,8 do $21,3 \times 10^{-11}$ N.

Różnicę ciśnień P , jako wartość wypadkową działania siły napędzającej strumień cytoplazmatyczny, można wyliczyć ze wzoru Poiseuilla [63]:

$$Q = \frac{\Delta P R^4}{8\eta l},$$

gdzie Q jest wartością średnią wydajności przepływu, η — wartością lepkości dynamicznej (3 - 11 cP), l — długością „kanału”, R — średnią wartością promienia „kanału”. Wartość różnicy ciśnienia wywołanego siłą napędową wynosi od 1,36 do 4,99 Nm².

Z uwagi na przedstawione zastrzeżenia jak i na możliwość artefaktów przy pomiarach lepkości [63], ocena tej wartości jest niezwykle trudna i wzbudza wiele wątpliwości [92]. Pomiar lepkości cytoplazmy u *Paramecium* [13, 24] jak i w innych komórkach [8, 30, 34, 46, 102] wskazały, że wartości lepkości dynamicznej zawarte są między 3 a 11 cP. Niemniej wahania tych wartości zależą od stanu funkcjonalnego określonego rejonu cytoplazmy i całej komórki [31, 34] i mogą być duże, co może znaleźć odzwierciedlenie w dynamice zjawisk ruchowych. Umieszczenie napędu w samej masie okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* [78, 86, 87] jak i w modelach ameb [31, 93] podkreśla jej funkcjonalną autonomiczność. Dlatego też różnica ciśnień wywołana siłą napędową powinna być traktowana jako przejaw stanu kinetycznego bardzo wielu punktów napędu [87] cytoplazmy. Ponieważ obieg cytoplazmy jest zamkniętym pierścieniem, należy więc sądzić, że gradient ciśnienia jest wartością energii, której uwolnienie manifestuje się jednokierunkowym ruchem rozproszonych elementarnych jednostek strukturalnych cytoplazmy wzdłuż hipotetycznej sieci kierującej [85], a analogie z przepływem hydraulicznym są raczej pozorne.

RUCHY SALTACYJNE

Saltacyjne ruchy [70, 71] organelli komórkowych, mitochondriów i nie osadzonych trichocyst u *Paramecium aurelia*, wykazane w strefie subkortykalnej [9], zostały również stwierdzone w głębszych warstwach komórki, gdzie cytoplazma płynie w postaci strumienia [85]. Zaobserwowanie tych ruchów w strefie subpellikularnej jest możliwe na tle wielu nieruchomych struktur. Natomiast w strefie płynącej cytoplazmy można zauważyć to zjawisko jedynie wtedy, gdy kierunek ruchu cząstki jest niezgodny z kierunkiem większości cząstek poruszających się równolegle do podłużnej osi „kanału”. Tak wyróżniające się cząstki można najłatwiej zaobserwować w strumieniu cytoplazmatycznym utrwalonym na filmie, gdyż jest to zjawisko stosunkowo rzadkie. Prędkość ruchu saltacyjnego mitochondrium wynosi według Aufterheide [9] około 1 $\mu\text{m s}^{-1}$.

Natomiast ruchy saltacyjne cząstek o odmiennej polaryzacji niż większość cząstek płynących w strumieniu mają prędkość około $3,5 \mu\text{m s}^{-1}$ [85]. Wartość ta jest więc nieco niższa, choć zbliżona do przeciętnej prędkości cząstek w strumieniu cytoplazmatycznym u *Paramecium aurelia*. Można przypuszczać, że siły oddziaływające na cząstki poruszające się wzdłuż „kanału” o odmiennej polaryzacji w strumieniu oraz w strefie subpellikularnej są podobne, natomiast obserwowane prędkości zależą od oporów, na które natrafiają określone cząstki. W warstwie subpellikularnej będą one oczywiście większe.

Na podstawie tych obserwacji postawiona została robocza hipoteza [85] zakładająca, że strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium* należy traktować jako zbiór elementarnych oddziaływań między systemem napędowym [78] a organellami czy innymi cząstkami zawieszonymi w cytosolu, z tym że czas i miejsce ich wzajemnego oddziaływania nie są zbliżone. Tym samym dostrzeżenie elementarnego oddziaływania między strukturą napędzającą a napędzaną, np. mitochondrium, możliwe jest jedynie w przypadku błędu w polaryzacji ruchu.

LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*, *J. Cell Biol.*, **49**: 1–20, 1971.
- [2] ALLEN N., ALLEN R. D., Cytoplasmic streaming in green plants, *Ann. Rev. Bioph. Bioengm.*, **7**: 497–526, 1978.
- [3] ALLEN R. D., ROSLANSKY J. D., The consistency of amoeba cytoplasm and its bearing on the mechanism of ameboid movement. I. An analysis of endoplasmic velocity profiles of *Chaos chaos* (L), *J. Bioph. Bioch. Cytol.*, **6**: 437–446, 1959.
- [4] ANDRÉ J., VIVIER E., Quelques aspects ultrastructuraux de l'échange micronucléaire lors de la conjugaison chez *Paramecium caudatum*, *J. Ultrastructure Res.*, **6**: 390–406, 1962.
- [5] ANDRIVON C., Preuves de l'existence d'un transport actif de l'ion nickel a'trevers la membrane cellulaire de *Paramecium caudatum*, *Protistologica*, **6**: 445–455, 1970.
- [6] — The stopping of ciliary movements by nickel salts in *Paramecium caudatum*: the antagonism of K^+ and Ca^{++} ions, *Acta Protozoologica*, **11**: 373–386, 1972.
- [7] — La perméabilité a l'ion nickel chez *Paramecium*: ses rapport avec le renversement ciliaire, *Protistologica*, **10**: 175–183, 1974.
- [8] ASHTON F. T., Magnetic studies on cells and protoplasm, *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **113**: 319, 1957.
- [9] AUFDERHEIDE KARL J., Saltatory motility of uninserted trichocysts and mitochondria in *Paramecium tetraurelia*, *Science*, **198**: 299–300, 1977.
- [10] BEHNKE O., Introductory remarks: To move, or not to move, that is the question, [w] *Cell Motility*, Cold Sprin Harbor Conferences on Cell Proliferation **3**, 1976, 215–216.

- [11] BILLS C. E., Inhibition of locomotion in *Paramecium* and observations on certain structures and internal activities, *Biological Bulletin*, 42: 7-13, 1922.
- [12] BRADLY M. O., Microfilaments and cytoplasmic streaming: inhibition of streaming with cytochalasin, *J. Cell Sci.*, 12: 327-343, 1973.
- [13] BROWN R. H. J., The protoplasmic viscosity of *Paramecium*, *J. Expl. Biol.*, 17: 317-324, 1940.
- [14] BROWN R. B., On quieting *Paramecium* with methyl cellulose, *Science*, 100: 62, 1944.
- [15] BRUTKOWSKA M., Effect of pH on the food vacuole formation in *Paramecium caudatum*, *Acta Protozool.*, 1: 71-80, 1963.
- [16] — Immobilization effect of NiCl₂ and food vacuole formation in *Paramecium caudatum*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 15: 119-122, 1967.
- [17] — The effect of certain salt solutions and osmotic stimuli on ciliary movement and food intake in *Paramecium caudatum*, *Acta Protozool.*, 4: 353-364, 1967.
- [18] CAMPBELL A. K., DAW R. A., LUZIO J. P., Rapid increase in intracellular free Ca²⁺ induced by antibody plus complement, *FEBS Letters*, 107: 55-60, 1979.
- [19] CORTI B., Sur la circulation d'un fluide, de'couverte en diverses plantes, *Rosier Obs. sur la Physique, sur l'Histoire Nat.*, 8: 232, 1776.
- [20] EHRENBERG C. G., *Die Infusorienthierchen als vollkommene Organismen*, Felix, Leipzig 1838.
- [21] EHRET C. F., DeHALLER G., Origin, development and maturation of organelles and organelles systems of the cell surface in *Paramecium*, *J. Ultrastr. Res.*, 6: (suppl.) 3-42, 1963.
- [22] EHRET C. F., McARDLE E. W., The structure of *Paramecium* as viewed from its constituent levels of organization, [w] *Paramecium*, A Current Survey, red. W. J. Van Wagtendonk, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York 1974, 263-338.
- [23] EHRET C. F., POWERS E. L., The cell surface of *Paramecium*, *Inter. Rev. Cytol.*, 8: 97-133, 1959.
- [24] FETTER D., Determination of the protoplasmic viscosity of *Paramecium* by the centrifuge method, *J. Expl. Zool.*, 44: 279-283, 1926.
- [25] GELEI J., Ni-Infusorien im Dienste der Forschung und des Unterrichtes, *Biol. Zbl.*, 55: 57-74, 1935.
- [26] GRĘBECKI A., MIKOŁAJCZYK E., Ciliary reversal and re-normalization in *Paramecium caudatum* immobilized by Ni ions, *Acta Protozool.*, 5: 297-304, 1968.
- [27] GRĘBECKI A., KUŹNICKI L., MIKOŁAJCZYK E., Right spiralling in *Paramecium* by Ni ions and the hydrodynamics of the spiral movement, *Acta Protozool.*, 4: 389-408, 1967.
- [28] GRUITHAUSEN F. VON P., *Beytrage zur Physiognosie und Eautognosie für Freunde der Naturforschung*, Munchen, 1812.
- [29] HANSON E. D., Methods in the cellular and molecular biology of *Paramecium*, [w] *Methods in Cell Biology*, 8: Academic Press, Inc., 319-365, 1974.
- [30] HEILBRUNN L. V., The absolute viscosity of protoplasm, *Jour. of Expl. Zool.*, 44: 255-278, 1926.
- [31] HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., The contractile basis of amoeboid movement. VI. The solution-contraction coupling hypothesis, *J. Cell Biol.*, 83: 633-648, 1979.

- [32] HENSHAW R., Electron microscope observations of intracellular responses to immobilization antibody in *Tetrahymena pyriformis*, Proc. Iowa Acad. Sci., 68: 562-580, 1961.
- [33] HEPLER P. K., PALEVITZ B. A., Microtubules and microfilaments, Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 309-362, 1974.
- [34] HIRAMOTO Y., Rheological properties of sea urchin eggs, Biorheology, 6: 201-234, 1970.
- [35] HIRSON J. B., The response of *Paramecium bursaria* to potential endo-cellular symbionts, Biol. Bull., 136: 33-42, 1969.
- [36] HOSOI T., Protoplasmic streaming in isolated pieces of *Paramecium*, J. Facul. Asi., Sec. IV (Zool.), 4: 299-305, 1937.
- [37] HUFNAGEL L. A., Cortical structure of *Paramecium aurelia*, J. Cell Biol., 40: 779-801, 1969.
- [38] JAHN T. L., BOVEE E. C., Protoplasmic movements and locomotion of protozoa, [w] Physiology and Biochemistry of Protozoa, red. S. H. Hutner, Academic Press, New York 1964, 62-129.
- [39] — Movement and locomotion in microorganisms, Ann. Rev. Microbiol., 19: 21-58, 1965.
- [40] — Motile behavior of protozoa, [w] Research in Protozoology, 1, red. T. T. Chen, Pergamon, New York 1967, 41-200.
- [41] — Protoplasmic movements within cells, Physiol. Rev., 49: 793-862, 1969.
- [42] JURAND A., SELMAN G. G., The anatomy of *Paramecium aurelia*, Macmillan St. Martin's Press, London 1969, 1-218.
- [43] KAMIYA N., The rate of the protoplasmic flow in the myxomycete plasmodium, Cytologia, 15: 194-204, 1950.
- [44] — Protoplasmic streaming, Protoplasmatologia, 8: 3a, 1-199, 1959.
- [45] KAMIYA N., KURODA K., Velocity distribution of protoplasmic streaming in *Nitella* cells, Botan. Mag. (Tokyo), 69: 544-554, 1956.
- [46] KEITH A. D., SNIPES W., Viscosity of cellular protoplasm, Science, 186: 666-668, 1974.
- [47] KENEDY J. R. Jr., BRITTINGHAM E., Fine structure changes during chloral hydrate deciliation of *Paramecium caudatum*, J. Ultrastrukt. Res., 22: 530-545, 1968.
- [48] KOENUMA A., Study on cyclosis of *Paramecium*, J. Shinshu Univ., 4: 49-57, 1954.
- [49] — The velocity distribution of the cyclosis in *Paramecium caudatum*, Annotnes zool. jap., 36: 66-71, 1963.
- [50] KUŹNICKI L., Recovery in *Paramecium caudatum* immobilized by chloralhydrate treatment, Acta Protozool., 1: 177-185, 1963.
- [51] — Reversible immobilization of *Paramecium caudatum* evoked by nickel ions, Acta Protozool., 1: 301-312, 1963.
- [52] — Mechanisms of the motor responses of *Paramecium*, Acta Protozool., 8: 83-118, 1970.
- [53] KUŹNICKI L., SIKORA J., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. I. Movements of crystals after immobilization by antiserum, Acta Protozool., 8: 439-446, 1971.
- [54] — The hypothesis of inverse relation between ciliary activity and cyclosis in *Paramecium*, Acta Protozoologica, 11: 243-250, 1972.
- [55] — Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. III. The effect of temperature on flow velocity, Acta Protozool., 12: 59-66, 1973.

- [56] — Progress in understanding of the cytoplasmic streaming in *Paramecium aurelia*, Progress in Protozoology, IV-th inter. Congr. Protozool., Clermont-Ferrand 1973, 238.
- [57] KUŹNICKI L., SIKORA J., FABCZAK S., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. II. Cinematographic analysis of the course and reversible cessation of cyclosis, Acta Protozoologica, 11: 237–242, 1972.
- [58] LOEWY A. C., A theory of protoplasmic streaming, Proc. Am. Phil. Soc., 93: 326–329, 1949.
- [59] LUBOCKA A., DEMBOWSKI J., Circulation of food vacuole in *Paramecium caudatum*, Acta Biol. Expl., 15: 19–35, 1950.
- [60] MARSLAND D. A., Quieting *Paramecium* for the elementary student, Science, 98: 414, 1943.
- [61] MAST S. O., The food vacuole in *Paramecium*, Biol. Bull., 92: 31–72, 1947.
- [62] MERCER F., The submicroscopic structure of the cell, Ann. Rev. Plant Physiol., 11: 1–24, 1960.
- [63] MERRILL E. W., Rheology of blood, Physiol. Rev., 49: 863–888, 1969.
- [64] NEWTON S. A., FORD N. C., LANGLEY K. H., SATTELLE D. B., Laser light-scattering analysis of protoplasmic streaming in the slime mold *Physarum polycephalum*, Bioch. Bioph. Acta, 496: 212–224, 1977.
- [65] NIRENSTEIN E., Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten, Z. Allgem. Physiol., 5: 435–510, 1905.
- [66] PITELKA D. R., New observations on cortical ultrastructure in *Paramecium*, J. Microscopie, 4: 373–394, 1965.
- [67] — Fibrillar systems in *Protozoa*, [w] Research in Protozoology, 3 red. T. T. Chen, Pergamon Press, Oxford, New York 1969, 279–388.
- [68] PORTER K. R., Cytoplasmic microtubules and their functions, [w] Ciba Foundation Symposium on Principles of Biomolecular Organization, London: Churchill 1966, 308–345.
- [69] PUYTORAC P. de, ANDRIVON C., SERRE F., Sur l'action cytonarcotique des sels de nickel chez *Paramecium caudatum* Ehrb., J. Protozool., 10: 10–19, 1963.
- [70] REBHUN L. I., Saltatory particle movement in cells, [w] Primitive Motile Systems in Cell Biology, red. R. D. Allen and N. Kamiya, Academic Press, New York, London 1964, 503–525.
- [71] — Polarized intracellular particle transport: saltatory movements and cytoplasmic streaming, Inter. Rev. Cytol., 32: 93–139, 1972.
- [72] SATIR B., SALE W. S., SATIR P., Membrane renewal after dibucaine deciliation of *Tetrahymena*, Expl. Cell Res., 97: 83–91, 1976.
- [73] SCHNEIDER L., Neue Befunde über den Feinbau des Cytoplasmas von *Paramecium* nach Einbettung in Vestpal W, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 50: 61–77, 1959.
- [74] SEITZ K., Cytoplasmic streaming and cyclosis of chloroplasts, [w] Physiology of Movements, red. W. Haupt and M. E. Feinleib, Encyklopedia of Plant Physiology, New Ser., 7: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979, 150–169.
- [75] SIKORA J., A new method of locomotion arresting in some *Ciliates* without ciliary immobilization, Acta Protozool., 13: 421–424, 1975.
- [76] — Zastosowanie filmu w badaniach strumienia cytoplazmatycznego u *Ciliata*, Materiały z Konf. „Mikroskopia w Nauce i Technice”, 1976, 107–108.

- [77] — Cytoplasmic streaming in *Paramecium*, Ist. inter. Congress on Cell Biology, Boston 1976, J. Cell Biology 70, No 2, part 2, 399a, 1976.
- [78] Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. III. Wpływ czynników modyfikujących, Post. Biol. Kom., 8: 65–85, 1981.
- [79] SIKORA J., JURAND A., Control of cytoplasmic streaming in *Paramecium* by papaverine hydrochloride and ionophore A23187, w druku.
- [80] SIKORA J., KUŹNICKI L., Cytoplasmic movements at conjugation of *Paramecium aurelia*, Progress in Protozool., IV-th inter. Congr. Protozool., Clermont-Ferrand 1973, 380.
- [81] — Sposoby analizy ruchu cytoplazmy u *Paramecium*, XI Zjazd P.T. Zool., Białystok 1975, 159–160.
- [82] — Cytoplasmic streaming during binary fission and conjugation, J. Protozool., 22: 74–75A, 1975.
- [83] — Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. IV. Cyclosis during binary fission and conjugation, Acta Protozool., 15: 173–178, 1976.
- [84] SIKORA J., WASIK A., Cytoplasmic streaming within Ni²⁺ immobilized *Paramecium aurelia*, Acta Protozool., 17: 389–397, 1978.
- [85] SIKORA J., WASIK A., ALLEN R. D., The role of single particle saltations in *Paramecium cytoplasmic* streaming, Acta Protozool., 18: 201, 1979.
- [86] SIKORA J., WASIK A., BARANOWSKI Z., Velocity profile of cytoplasmic streaming in *Paramecium*, Acta Protozool., 18: 203–204, 1979.
- [87] — The estimation of velocity distribution profile of *Paramecium* cytoplasmic streaming, Europ. J. Cell Biol., 19: 184–188, 1979.
- [88] SOLDO A. T., Intracellular particles in *Paramecium*, [w] *Paramecium*, A Current Survey, red. W. J. Van Wagendonk, Elsevier Sci. Publ. Comp., Amsterdam, London, New York 1974, 377–442.
- [89] SOMMERVILLE J. SINDEN R., Protein synthesis by free and bound *Paramecium* ribosomes in vivo and in vitro, J. Protozool., 15: 644–651, 1968.
- [90] SONNEBORN T. M., Methods in *Paramecium* research, [w] Methods of Cell Physiology, 4: Academic Press, New York 1970, 242–335.
- [91] — *Paramecium aurelia*, [w] Handbook of Genetics, red. R. C. King, Plenum Press, 1974, 469–593.
- [92] TAYLOR D. L., CONDELIS J. S., Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, Inter. Rev. Cytol., 56: 57–144, 1979.
- [93] TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., MOORE P. L., ALLEN R. D., The contractile chemical control of motility in isolated cytoplasm. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm, J. Cell Biol., 59: 378–394, 1973.
- [94] TCHAKHOTINE S., Études physiologiques et embryologique au moyen de la méthode des microgouttes, Trav. Stat. Zool. Vimereux, 13: 647–663, 1938.
- [95] — Analyse du mécanisme de le cyclose chez la Paramécie au moyen de la microponcture ultra-violette, Societe de Biologie, 130: 738–740, 1939.
- [96] THOMPSON G. A., BAUGH L. C., WALKER L. F., Nonlethal deciliation of *Tetrahymena* by a local anesthetic and its utility as a tool for cilia regeneration, J. Cell. Biol., 61: 253–257, 1974.
- [97] WALLENGREN H. F. S., Inanitrionserscheinungen der Zelle, Z. allgem. Physiol., 1: 67–128, 1902.
- [98] WASIK A., SIKORA J., Effect of cytochalasin B and colchicine on cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*, Acta Protozool., 19: 103–110, 1980.

- [99] WICHTERMAN R., Cytogamy: A sexual process occurring in living joined pairs of *Paramecium caudatum* and its relation to other sexual phenomena, *J. Morphol.*, **66**: 423–451, 1940.
- [100] — The Biology of *Paramecium*, The Blakiston Comp. Inc., New York, Toronto 1953, 1–527.
- [101] VIVIER E., Morphology, taxonomy and general biology of the genus *Paramecium*, [w] *Paramecium*, A Current Survey, red. W. J. Van Wagtendonk, 1974, 1–89.
- [102] YAGI K., The mechanical and colloidal properties of *Amoeba proteus* and their relations to the mechanism of amoeboid movement, *Comp. Bioch. Physiol.*, **3**: 73–91, 1961.
- [103] YAMADA K., A comparative study on the cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ.*, B, Div. 1, 1–153, 1969.
- [104] — Influence of specific SH-blocking reagent, p-chloro-mercuribenzoate on cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ.*, Ser. B, Div. 1, **23**: 1–15, 1970.
- [105] — Effects of cyanide on cyclosis and vacuolar output of water in *Paramecium caudatum*, *J. Sci. Hirosh. Univ.*, Ser. B, Div. 1, **25**: 225–242, 1974.
- [106] — Effects of 2,4-dinitrophenol on cyclosis and vacuolar output of water in *Paramecium caudatum*, *J. Sci. Hirosh. Univ.* Ser. B, Div. 1, **25**: 243–257, 1974.
- [107] YAMASHITA Y., Effects of mechanical deformation and electric current on protoplasmic streaming in *Paramecium*, *Zool. Mag.*, **73**: 39–44, 1964.
- [108] YUSA A., An electron microscope study on regeneration of trichocysts in *Paramecium caudatum*, *J. Protozoology*, **10**: 253–262, 1963.

Otrzymano: 4 sierpnia 1980.

Przyjęto: 15 listopada 1980.

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

OKRĘŻNY STRUMIEŃ CYTOPLAZMATYCZNY W KOMÓRCIE PARAMECIUM

III. WPŁYW CZYNNIKÓW MODYFIKUJĄCYCH

ROTATIONAL CYTOPLASMIC STREAMING IN PARAMECIUM CELL

III. EFFECT OF MODIFYING AGENTS

Jerzy SIKORA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego w Warszawie

Streszczenie. Działanie czynników modyfikujących fizjologię komórki *Paramecium*, oceniane na podstawie zmian w dynamice strumienia cytoplazmatycznego, wskazuje na to, że glikoliza jest podstawowym procesem dostarczającym ATP dla napędu cytoplazmy, natomiast regulacja tego ruchu polega najprawdopodobniej na zmianach stężenia wolnych jonów wapnia. W napędzie okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* nie biorą udziału procesy związane z polimeryzacją i depolimeryzacją mikrotubuli. Mechanizm napędu cytoplazmy opiera się najprawdopodobniej na interakcji aktyny i miozyny w specyficznych warunkach, jakie występują w mikrorejonych (domenach) cytoplazmy. Lokalna zolifikacja żelu i skurcz, zbliżając sąsiednie zżelifikowane domeny, może spowodować przemieszczenia sąsiadujących domen. Ponieważ punkty napędu są rozproszone i działają niesynchronicznie, efekt napędowy przejawia się w postaci strumienia cytoplazmatycznego.

Summary. Effect of modifying agents on the physiology of the *Paramecium* cell, evaluated by means of changes in dynamics of cytoplasmic streaming, has shown that: glycolysis is the main source of ATP necessary for cytoplasm propulsion, while control of motility depends probably upon the level of free calcium ions. Polymerization and depolymerization of microtubules seem unlikely to be involved directly in propulsion of cytoplasmic streaming in *Paramecium*. Probably interaction of actin and myosin taking place in specific conditions appearing in microcompartments (domains) of cytoplasm, generate local solation and contraction which propagates on gelated neighbour domains. Places of elementary contractions are randomly distributed and act unsynchronously, therefore motile effect appears as a cytoplasmic streaming.

WPROWADZENIE

Jedną z cech wyróżniających orzęski z rodzaju *Paramecium* jest występowanie u nich okrężnego strumienia cytoplazmatycznego. Podstawową funkcją tego strumienia jest transport wewnątrzkomórkowy. Strumień ten unosi wodniczki pokarmowe [78], produkty podziału mikronukleusa w czasie poprzedzającym podział komórkowy [10, 117, 144], trichocysty [157] oraz fragmenty błon wbudowywanych w dno cytostomu w czasie wzrostu objętości kolejnej wodniczki pokarmowej [1, 2]. Ponadto spełnia on zapewne istotną rolę w dystrybucji innych ultrastruktur oraz metabolitów, choć funkcje te nie zostały jeszcze poznane.

Metody badania zarówno mechanizmów napędzających cytoplazmę, jak i regulujących tę aktywność polegającą m.in. na obserwacji zakłóceń spowodowanych przez czynniki modyfikujące aktywność strumienia, jak np. zmiany temperatury otoczenia, stężenie i skład jonowy środowiska, inhibitory metabolizmu bądź związki wiążące się z białkami systemów kurczliwych w sposób mniej lub bardziej specyficzny. Liczba jak i zakres działania tych czynników jest ograniczona zarówno barierą jaką stanowi błona komórkowa, jak i przeżywalnością komórki. Niemniej omówione badania dały pewne wskazówki dotyczące charakteru mechanizmów napędzających strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*. Biorąc pod uwagę właściwości dynamiczne cytoplazmy [155] należy przypuszczać, że są to białka typu aktyny i miozyny, które biorą udział w napędzie strumienia. Współdziałają one zapewne ze spolaryzowaną siecią [14], która stanowi system kierujący [119].

EFEKT ZMIANY TEMPERATURY

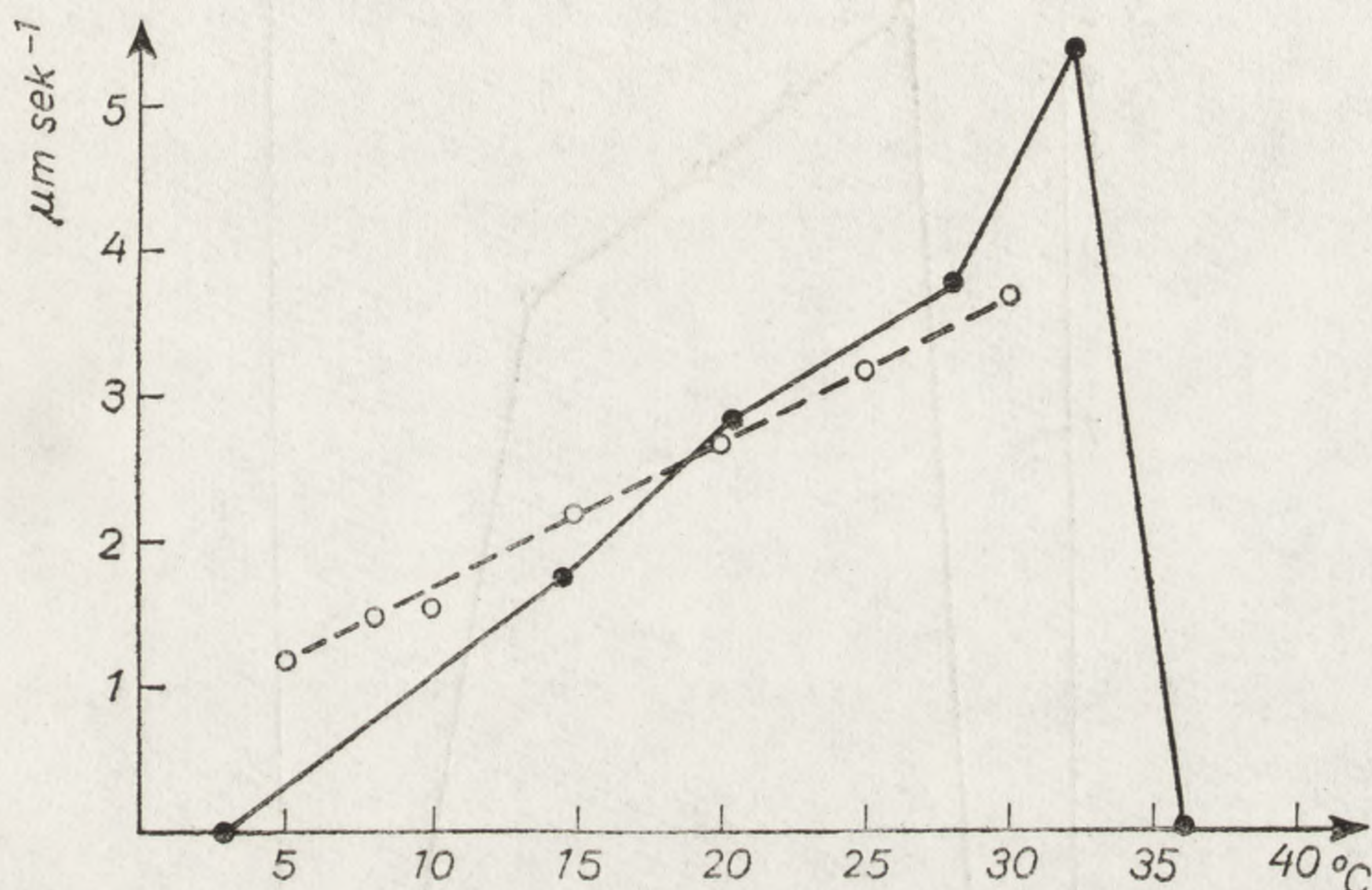
Badania zależności między temperaturą otoczenia a prędkością ruchu cytoplazmy u *Paramecium* zostały zapoczątkowane przez Koenumę [64]. Stwierdził on istnienie nieliniowej zależności między temperaturą a średnią prędkością cytoplazmy u *P. caudatum*, którą opisał równaniem:

$$V = at + b,$$

gdzie V — średnia prędkość strumienia cytoplazmy wyrażona w $\mu\text{m s}^{-1}$, a — 0,1, b — 0,7, t — temperatura wyrażona w $^{\circ}\text{C}$ w zakresie od 5 do 30°C (ryc.1).

Średnia prędkość cytoplazmy zależy ponadto, co wykazały późniejsze badania [69], od szybkości zmian temperatury. Przy zmianach temperatury otoczenia w tempie $0,3\text{--}1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, prędkości strumienia cytoplazmatycznego u *P. aurelia* [69] (ryc. 1) prawie pokrywają się z danymi Koenumy [64] i nie zależą od temperatury poprzedzającej pomiar. Przy

szybszych zmianach temperatury ($10-15^{\circ}\text{C min}^{-1}$) następują zaburzenia powodujące zahamowanie ruchu cytoplazmy już w temperaturach $6-9^{\circ}\text{C}$, podczas gdy przy powolnych zmianach dolną granicą występowania strumienia cytoplazmatycznego jest temperatura 3°C [69]. Okrężny strumień cytoplazmatyczny stwierdzono u *P. caudatum* nawet w temperaturze 0°C , ale tylko u osobników, które były szczególnie długo adaptowane do niskich temperatur [94].

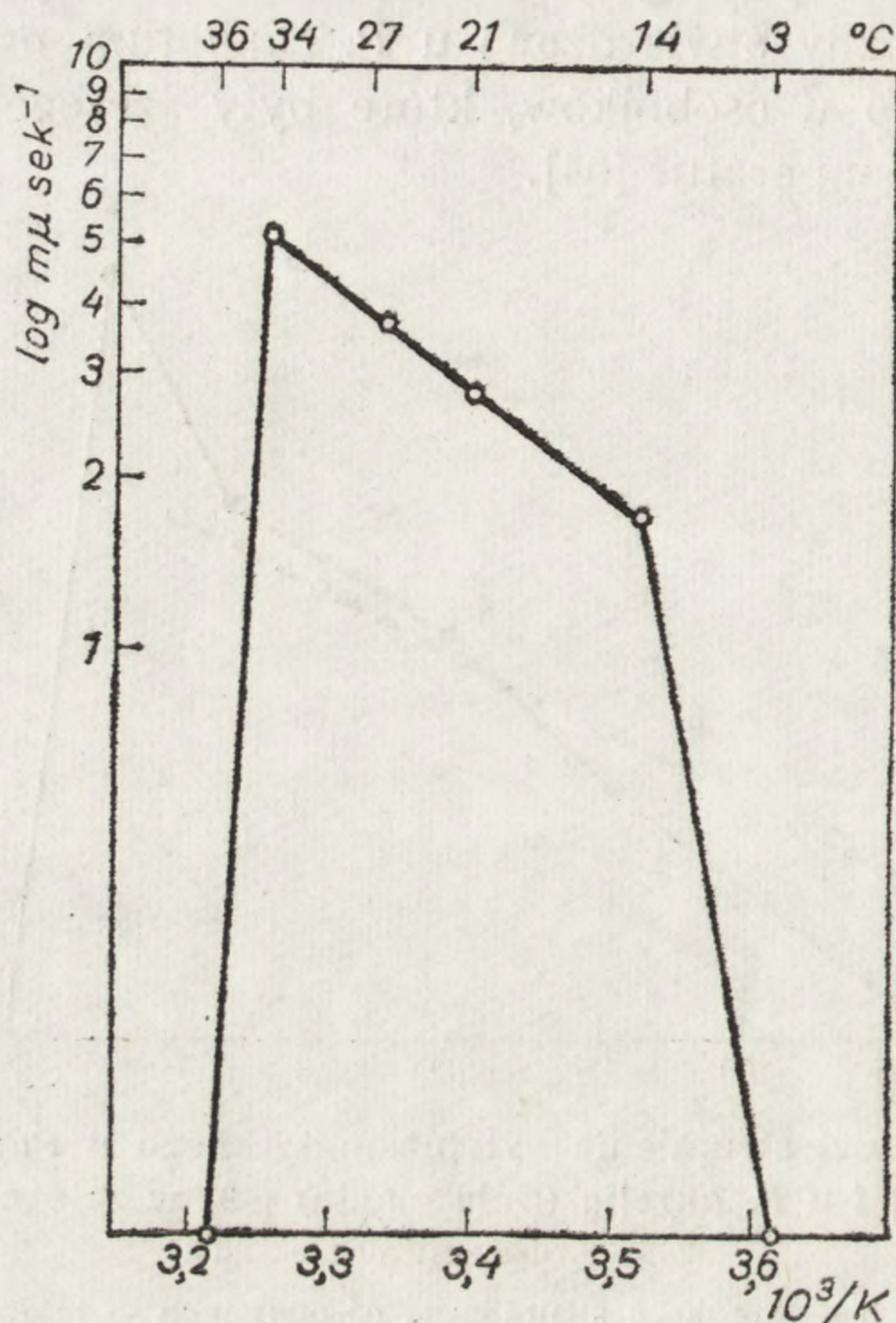


Ryc. 1. Średnie prędkości strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium caudatum* (linia przerywana) [64] i u *P. aurelia* (linia ciągła) [69] w zależności od temperatury otoczenia

Oś rzędnych — prędkość strumienia, oś odciętych — temperatura

Górną granicą temperatury, w której występuje jeszcze strumień cytoplazmatyczny, niezależnie od tempa w jakim została ta temperatura osiągnięta, jest $36-38^{\circ}\text{C}$. Renormalizacja strumienia u *P. aurelia* następuje dopiero po obniżeniu temperatury do $34-35^{\circ}\text{C}$ i w tych temperaturach utrzymuje się bez zakłóceń. W wyższych temperaturach ($36-37^{\circ}\text{C}$) następują po upływie $10-15$ min nieodwracalne zmiany w komórkach szczepu 51 *P. aurelia* (*tetraurelia*). Po zatrzymaniu strumienia występują charakterystyczne zmiany w rodzaju ruchu cząstek. Zanika ruch ukierunkowany strumienia, natomiast pojawiają się gwałtowne ruchy oscylacyjne cząstek przypominające ruchy Browna [115]. Zakłócenia ruchu spowodowane wysoką temperaturą wydają się świadczyć, że punkty przyłożenia siły napędzającej cytoplazmę są rozmieszczone równomiernie na całym obwodzie strumienia i działają, niesynchronicznie [115]. Po podniesieniu temperatury, w pierwszej fazie następuje najprawdopodobniej uszkodzenie systemu kierującego [119], wobec czego zanika polaryzacja ruchu, natomiast w drugiej — nieodwracalne uszkodzenie systemu napędowego.

Wykres (ryc. 2) według Arrheniusa zależności prędkości strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium aurelia* od temperatury otoczenia [69] jest prawie identyczny z wykresem obrazującym zależność aktyw-



Ryc. 2. Wykres według Arrheniusa [69] zależności średniej prędkości strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium aurelia* od temperatury otoczenia

Oś rzędnych — prędkość strumienia cytoplazmatycznego w skali logarytmicznej, oś odciętych — temperatura wyrażona w odwrotnościach stopni Kelvina

ności ATP - azy aktomiozynowej z mięśni szkieletowych królika od temperatury [47, 48]. Zbieżność ta jest być może zupełnie przypadkowa, trudno jednak wykluczyć możliwość, że jest ona przejawem funkcjonowania systemu aktomiozynowego napędzającego strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium aurelia*.

WPLYW ŚRODOWISKA JONOWEGO

Skład jonowy i stężenie składników środowiska w istotny sposób wpływają na błonę komórkową i za jej pośrednictwem mogą modyfikować stan komórki oraz procesy przebiegające w jej wnętrzu. Jednym z procesów czułych na zmiany środowiska zewnętrznego jest określony strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*. Efekt oddziaływania ekspery-

mentalnego składu środowiska można pośrednio ocenić badając zmiany prędkości ruchu cytoplazmy. Szeroko zakrojone badania porównawcze wykonane zostały przez Yamadę [152] na trzech gatunkach słodkowodnych: *Paramecium aurelia*, *P. caudatum* i *P. bursaria* oraz na słonawowodnym *P. calkinsi*. Zastosował on różne rozcieńczenia sztucznej wody morskiej (według Herbst) jako środowiska doświadczalne. Stwierdził, że prędkość strumienia cytoplazmatycznego u form słodkowodnych jest największa przy ciśnieniu osmotycznym zbliżonym do wartości $\pi = 0,1$. Obniżenie lub podwyższenie ciśnienia osmotycznego środowiska powodowało zmniejszenie prędkości strumienia. U słonawowodnego *P. calkinsi* najwyższe prędkości notowane były przy $\pi = 3,8$ o ile orzęski pochodziły z kultury, w której utrzymywano ciśnienie osmotyczne na tym samym poziomie co w doświadczeniu. Na podstawie badań wpływu adaptacji do środowisk o różnym ciśnieniu osmotycznym Yamada [152] stwierdził, że *P. caudatum* i *P. calkinsi* są bardziej osmolabilne, tj. najwyższe prędkości strumienia cytoplazmatycznego notuje się w środowiskach o ciśnieniu osmotycznym zbliżonym do adaptacyjnego. Natomiast *P. bursaria* jest orzęskiem osmostabilnym, u którego prędkość strumienia cytoplazmatycznego w małym stopniu zależała od ciśnienia osmotycznego środowiska adaptacyjnego.

Spośród przebadanych soli: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, na uwagę zasługuje jon K⁺, którego wzrost stężenia w środowisku przy jednoczesnym obniżeniu stężenia jonów Na⁺, Ca²⁺ lub Mg²⁺ powoduje u *P. caudatum* obniżenie prędkości strumienia aż do całkowitego jego zatrzymania [64]. Cytowane wyniki badań budzą jednak pewne wątpliwości ze względu na to, że Koenuma [64] wykonywał swoje obserwacje na orzęskach immobilizowanych alkoholem izopropylowym, a Yamada [152] — w środowisku 5% metylocelulozy, która w tym stężeniu nie jest obojętna dla *Paramecium* [115].

Niezależnie od tych zastrzeżeń można przyjąć, że środowisko jonowe w istotny sposób determinuje stan komórki i dynamikę strumienia cytoplazmatycznego. Zależność ruchu cytoplazmy u *Paramecium* od stężenia składników jonowych środowiska być może ma charakter dwustopniowy. W niższych stężeniach następuje oddziaływanie za pośrednictwem systemu regulującego napęd strumienia, a w wyższych przełamanie bariery osmoregulacyjnej błony komórkowej, powodując w konsekwencji bądź zmianę konsystencji cytoplazmy, bądź uszkodzenie mechanizmu napędowego. Efekt obserwowany — zwolnienie prędkości ruchu lub nawet całkowite zatrzymanie strumienia — jest w zasadzie identyczny niezależnie od tego czym został spowodowany. Charakterystycznym tego przykładem jest zjawisko plazmolizy *Paramecium* hamującej strumień cytoplazmatyczny, która może być indukowana zarówno

czynnikami działającymi osmotycznie, jak i nawet bardzo niskimi stężeniami soli metali ciężkich [70].

Immobilizujące działanie soli niklawych na aktywność rzęsek pierwotniaków zostało poznane i wykorzystane w latach trzydziestych [42, 132] naszego stulecia. Natomiast mechanizm działania jonów niklawych na procesy ruchowe nie doczekał się dotychczas zadowalającego wyjaśnienia. Immobilizacja nienaruszonych komórek *Paramecium* zachodzi nie bezpośrednio po wprowadzeniu ich do środowiska zawierającego jony Ni^{2+} , ale zawsze po upływie pewnego czasu. Nie jest więc to efekt natychmiastowy, dlatego należy przypuszczać, że jony Ni^{2+} najpierw muszą wniknąć do wnętrza komórki [9], a dopiero potem oddziałują, w nieznanym zresztą sposobem, na system napędowy rzęsek lub system regulujący ich aktywność. Pływające modele *Paramecium* otrzymane ekstrakcją Tritonem X-100 pod wpływem jonów Ni^{2+} również tracą ruchliwość rzęsek [84], choć czas potrzebny na ich immobilizację jest kilkaset razy dłuższy niż czas potrzebny dla immobilizacji komórek nienaruszonych [9]. Wydawałoby się, że perforacja błony prowadząca do otrzymania modeli komórek powinna ułatwić wnikanie jonów Ni^{2+} do miejsc wiązania, tymczasem jest odwrotnie [9]. Andrivon [5-9] tłumaczy ten fakt obecnością u *Paramecium* specjalnego systemu enzymatycznego aktywnie transportującego jony Ni^{2+} przez błonę do miejsc wiązania. Mimo zahamowania aktywności ruchowej rzęsek, przy pewnej równowadze stężeń Ni^{2+} i Ca^{2+} można utrzymać w komórkach *Paramecium* niezakłócony strumień cytoplazmatyczny [118]. Zachwianie wspomnianej równowagi, różnej dla różnych gatunków *Paramecium*, prowadzi do zahamowania strumienia, nie powodując śmierci komórki. Dzieje się tak najprawdopodobniej na skutek przeniknięcia przez błonę komórkową takiej ilości jonów Ni^{2+} , że stają się one konkurencyjnymi dla dwuwartościowych jonów znajdujących się w cytoplazmie [35] i wiążąc się np. z aktyną [123, 124] mogą prowadzić do zahamowania strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium*.

Zakłócenia równowagi w stosunkach ilościowych Ni^{2+} do Ca^{2+} jak i innych jonów dwuwartościowych w środowisku eksperymentalnym [5-9] prowadzi do nieodwracalnej immobilizacji rzęskowej u *P. caudatum* [45, 67]. Powoduje także zahamowanie pobierania wodniczek pokarmowych zarówno bezzawiesinowych, jak i zawierających zawiesinę [23] oraz zatrzymanie strumienia cytoplazmatycznego [118]. Należy więc podchodzić z dużą ostrożnością do interpretacji mechanizmu działania Ni^{2+} , skoro wiemy jak szeroki wachlarz możliwości posiada ten jon w oddziaływaniu na procesy ruchowe u pierwotniaków [102]. Wynika to, jak sądzi wielu badaczy [31, 58, 66, 68], z powszechnego udziału jonów Ca^{2+} w systemach regulacyjnych zarówno komórek mięśniowych, jak i niemięśniowych.

W świetle przytoczonych faktów wydaje się uzasadnione przypuszczenie, że mechanizm napędzający strumień cytoplazmatyczny może być związany z aktywną i regulowany stężeniem jonów wapniowych.

DZIAŁANIE INHIBITORÓW METABOLIZMU

CYJANEK POTASU

Ruch cytoplazmy w postaci strumienia cytoplazmatycznego, podobnie jak inne rodzaje ruchów komórkowych, jest niewątpliwie procesem wymagającym dostarczenia energii z hydrolizy adenozyntrójfosforanu (ATP) [62]. Modelowe systemy kurczliwe, pochodzące z komórek wykazujących ruch cytoplazmy w postaci strumienia [3, 65, 126, 129], w pełni potwierdziły to stwierdzenie. Cyjanek potasu, a konkretnie jon CN^- , specyficznie wiążąc się z jednym z cytochromów (aa_3) prowadzi do zablokowania transportu elektronów i w konsekwencji do zahamowania syntezy ATP. Cyjanek potasu u *Paramecium caudatum* powoduje wyraźne zahamowanie procesów oddechowych [16, 88], natomiast nie powoduje zahamowania strumienia cytoplazmatycznego ani aktywności skurczowej wodniczek tętniących [154]. Komórka *Paramecium* dysponuje zatem innym źródłem ATP. Humphrey i wsp. [41, 59] dostarczyli przekonujących dowodów na to, że u *Paramecium caudatum* zarówno glikoliza, jak i cykl kwasu cytrynowego mogą być źródłem ATP. Natomiast Yamada [154] sądzi, że glikoliza podobnie jak u roślin [62], jest u *Paramecium* głównym źródłem ATP.

2,4-DWUNITROFENOL (DNP)

Zaliczany jest on do substancji „rozprzegających” oksydacyjną fosforylację w błonie mitochondrialnej, wywołuje u *Paramecium*, podobnie jak u wielu roślin [62], szybkie zahamowanie strumienia cytoplazmatycznego [155]. Również aktywność kurczliwa wodniczek tętniących zostaje zahamowana. Procesy oddechowe nie tylko nie zostają zahamowane, ale w zakresie stężeń DNP od 5×10^{-4} do 10^{-4} M są stymulowane. Działaniu DNP towarzyszą bardzo szybkie i daleko idące zaburzenia osmoregulacji komórki [15], które według Yamady [155] są zasadniczą przyczyną zablokowania strumienia cytoplazmatycznego oraz kurczliwości wodniczki tętniącej. Wiadomo ponadto, że DNP w istotny sposób zmienia swą aktywność w stosunku do błony komórkowej w różnych warunkach środowiskowych [81, 120, 121]. Na podstawie efektów wywoływanych przez DNP nie można więc ocenić pochodzenia ATP wykorzystywanego w mechanizmie ruchowym strumienia cytoplazmatycznego *Paramecium*.

P-CHLORORTEĆCIOBENZOESAN (PCMB)

Odczynnik stosowany dla blokowania grup sulfhydrylowych ($-SH$), jeżeli zostanie wprowadzony do środowiska w stężeniu 10^{-3} M, to w ciągu paru minut wywołuje zahamowanie strumienia cytoplazmatycznego w komórkach międzywęzli *Nitella* oraz w komórkach innych roślin [62, 109]. Renormalizację strumienia cytoplazmatycznego w komórkach uzyskuje się jedynie po przemyciu komórek roztworem cysteiny o stężeniu 10^{-2} M [153].

Z badań Yamady [153] wynika, że komórki *Paramecium caudatum* są znacznie bardziej wrażliwe na działanie PCMB niż roślinne. Już w stężeniu 10^{-4} M PCMB powoduje natychmiastowe zatrzymanie określonego strumienia cytoplazmatycznego oraz zablokowanie aktywności skurczowej wodniczek tętniących w fazie rozkurczu. Śmierć komórki następuje po 15 minutach. Stężenie 10^{-5} M powoduje stopniowe zwolnienie prędkości strumienia, aż do całkowitego jego zatrzymania po upływie około 6 minut. Podobny efekt uzyskuje się stosując PCMB w stężeniu 10^{-6} M, z tym że komórka jest w stanie w tych warunkach powrócić do normalnej aktywności samodzielnie po około 6 godzinach. Renormalizację ruchu cytoplazmy i wodniczek tętniących po krótkotrwałej inkubacji komórek w PCMB o stężeniach 10^{-4} – 10^{-5} M uzyskuje się jedynie po przemyciu ich w roztworze zawierającym cysteinę w odpowiednich stężeniach 10^{-3} – 10^{-4} M. PCMB wywołuje nie tylko zatrzymanie strumienia cytoplazmatycznego i aktywności skurczowej wodniczek tętniących, ale powoduje także zmiany w błonie komórkowej. Dlatego też Yamada [153] wyraził przypuszczenie, że już sama tylko deformacja komórki, spowodowana zakłóceniami w osmoregulacji błony komórkowej *Paramecium*, może wywołać zahamowanie ruchu cytoplazmy. Możliwość renormalizacji ruchu za pomocą cysteiny świadczy jednak, że oprócz niespecyficznego oddziaływania PCMB wiąże jednak grupy sulfhydrylowe białek biorących udział w mechanizmie napędu cytoplazmy.

Jest więc bardzo prawdopodobne, że PCMB wiążąc grupy sulfhydrylowe białek kurczliwych blokuje działanie mechanizmu napędowego cytoplazmy, zwłaszcza wobec znanych możliwości interakcji PCMB z grupami sulfhydrylowymi aktyny [137].

Wspomnieć należy, że związki blokujące grupy sulfhydrylowe, PCMB w stężeniu 10^{-4} – 10^{-5} M oraz N,N-dwumetyloamid w stężeniu 10^{-3} M, powodują niezwykle gwałtowny rozpad mikrotubuli w akso-podiach *Heliozoa* [113]. Podobna wrażliwość *Paramecium caudatum* na działanie PCMB mogłaby sugerować, że mikrotubule współdziałają w generacji napędu strumienia cytoplazmatycznego. Badania wrażliwości strumienia cytoplazmatycznego na kolchicynę i lumikolchicynę wykluczyły jednak tę możliwość [142].

UDZIAŁ MIKROFILAMENTÓW I MIKROTUBULI
W GENERACJI STRUMIENIA CYTOPLAZMATYCZNEGO U *PARAMECIUM*

CYTOCHALAZYNA B

Mikrofilamenty i mikrotubule są niezwykle rozpowszechnionymi ultrastrukturami w komórkach eukariotycznych zwierząt i roślin. Niektóre z nich są ściśle związane ze zjawiskami ruchowymi, poczynając od powolnych — morfogenetycznych, aż po procesy skurczowe odbywające się w czasie liczonym w milisekundach.

W transporcie wewnątrzkomórkowym u pierwotniaków wyróżnia się co najmniej dwa systemy mechanizmów napędzających cytoplazmę. Wśród ameb funkcje lokomotoryczne są integralnie związane z cienkimi i grubymi mikrofilamentami [96, 129] zidentyfikowanymi jako agregaty aktyny i miozyny [3, 65, 129]. U szeregu gatunków *Heliozoa* [103, 111, 112, 138] oraz u niektórych *Ciliata* dla napędu cytoplazmy wykorzystywane są systemy mikrotubuli [11–13, 61, 139–141]. Istnieją ponadto dane wskazujące na współdziałanie obu systemów, tj. mikrofilamentów i mikrotubuli, w generacji siły napędzającej [26, 38, 46, 50–52, 104].

Cytochalazyna B powoduje zahamowanie strumienia cytoplazmatycznego u wielu roślin w stężeniach od $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ [57] do stężeń $20\text{--}50 \mu\text{g ml}^{-1}$ [25]. U *Paramecium* cytochalazyna B w stężeniu $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ powoduje również zatrzymanie określonego strumienia cytoplazmatycznego [142]. W ultrastrukturze *Paramecium* traktowanego cytochalazyną B nie następują wyraźne zmiany [114]. Sieć podrzęskowa, która być może jest siecią cienkich mikrofilamentów [115], podobnie jak w komórkach roślinnych, nie ulega dezintegracji [19, 25, 145, 146]. Mimo powszechnego przekonania o nieswoistym oddziaływaniu cytochalazyny B na mikrofilamenty [29, 30, 32–34, 37, 60, 86, 98, 105–107, 110, 127, 158], faktem jest, że w niektórych wypadkach oddziałuje ona dezintegrująco na cienkie mikrofilamenty [22, 27, 95, 122, 143], hamuje polimeryzację aktyny [20] bądź oddziałuje na błonę komórkową [134–136]. Za różnorodność efektów przypisywanych oddziaływaniu cytochalazyny B w dużym stopniu odpowiedzialny jest zapewne dwumetylo-sulfotlenek (DMSO) — rozpuszczalnik cytochalazyny B. Zwiększa on niezwykle przepuszczalność błon komórkowych [125] indukując różnorodne efekty [40, 44, 99, 114], natomiast niszczy błonę komórkową, gdy zostanie użyty w wyższym stężeniu [149]. DMSO działa hamująco na określony strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*. Słabiej jednak niż wówczas, gdy działa wspólnie z cytochalazyną B [142]. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że cytochalazyna B może oddziaływać bezpośrednio lub za pośrednictwem błony komórkowej na mechanizm napędowy strumienia cytoplazmatycznego *Paramecium* nie naruszając ultrastruk-

tur dostrzegalnych w mikroskopie elektronowym, którym przypisuje się udział w generacji siły napędowej.

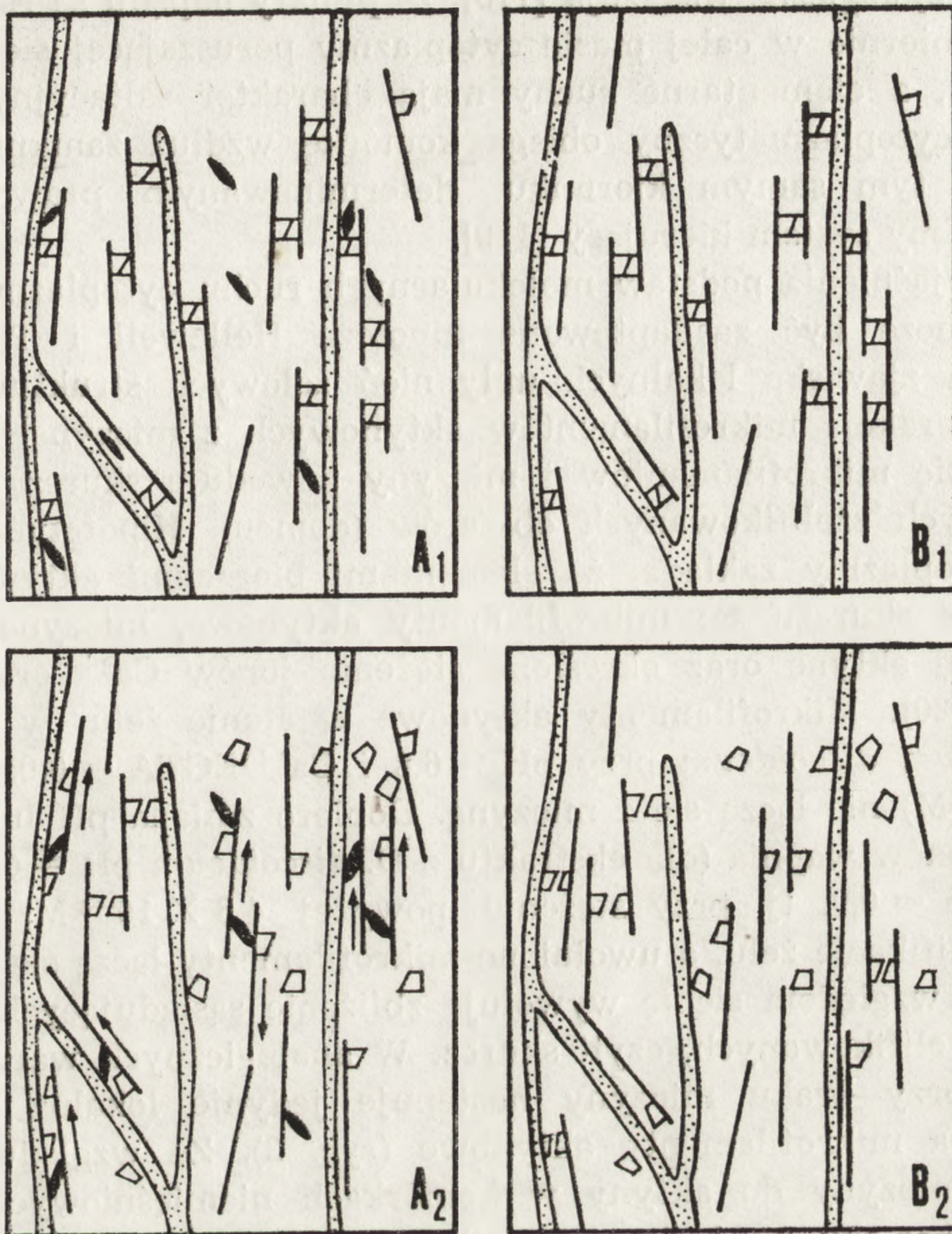
KOLCHICYNA I LUMIKOLCHICYNA

Istnieje w literaturze naukowej duża liczba danych wskazujących na specyficzne wiązanie się kolchicyny z podjednostkami labilnej tubuliny [71, 77, 147]. To powszechne przekonanie przyczyniło się do zmniejszenia krytycyzmu w interpretacji doświadczeń z zastosowaniem kolchicyny dla oceny roli mikrotubuli w zjawiskach ruchowych.

O ile nie budzą wątpliwości obserwacje wskazujące na jednoczesne zahamowanie procesu polimeryzacji mikrotubuli i zjawisk ruchowych [17, 18, 56, 63, 72, 89, 147], o tyle zastanawia sporadyczne stosowanie lumikolchicyny dla weryfikacji fizjologicznej specyficzności oddziaływania kolchicyny [142, 148]. Kolchicyna szybko wnika do komórki [128] i już w stężeniu 10^{-7} M powoduje zakłócenia polimeryzacji wrzeciona kariokinetycznego. U pierwotniaków kolchicyna hamuje polimeryzację mikrotubuli w stężeniach od 10^{-3} do 10^{-2} M [85, 101, 133, 134, 136, 138], natomiast strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium* zostaje zatrzymany przez nią w stężeniu około 5×10^{-3} M [142]. Tak wysokie stężenia kolchicyny wydają się świadczyć o jej niespecyficznym oddziaływaniu na komórkę [36, 150, 151]. Przekonywającym tego dowodem jest to, że lumikolchicyna, która nie ma zdolności hamowania polimeryzacji podjednostek tubuliny [148], wywołuje podobnie jak kolchicyna zahamowanie strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* [142]. Sugeruje to, że procesy napędowe okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium* nie są bezpośrednio związane z polimeryzacją mikrotubuli, a działanie kolchicyny i lumikolchicyny jest niespecyficzne. Wniosek taki zwiększa prawdopodobieństwo bezpośredniego udziału mikrofilamentów aktynowych w mechanizmie napędu strumienia cytoplazmatycznego.

MOLEKULARNE PODSTAWY NAPĘDU STRUMIENIA CYTOPLAZMATYCZNEGO U PARAMECIUM

Dotychczas brak bezpośrednich danych wyjaśniających molekularne podłoże mechanizmu generacji siły napędzającej okrężny strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium*. Jedynie na podstawie danych pośrednich można przypuszczać, że system napędzający strumień cytoplazmatyczny opiera się na interakcji aktyny i miozyny z wykorzystaniem ATP pochodzącym głównie z glikolizy. Regulacja aktywności tego procesu zależy najprawdopodobniej od poziomu wolnych jonów wapnia.



Ryc. 3. Schematyczna ilustracja czterech możliwych stanów mikrodomen cytoplazmy według Hellewell i Taylora [55] — zmodyfikowane

Proste odcinki — mikrofilamenty aktynowe (strzałki oznaczają kierunek ruchu), soczewki — miozyna, trapezy — czynnik żelujący mikrofilamenty aktynowe, fragmenty zakropkowane — hipotetyczna sieć kierująca ruchem mikrofilamentów. A₁ — Mikrofilamenty są związane ze sobą wzajemnie lub z siecią kierującą, za pośrednictwem czynnika żelującego. Cały układ pozostaje nieruchomy (w stanie żelu), mimo obecności miozyny. A₂ — W odpowiednich warunkach jonowych następuje zolifikacja żelu, uwolnienie mikrofilamentów aktynowych i ich interakcja z miozyną (często przytwierdzoną do sieci kierującej). W efekcie lokalny ruch cytoplazmy oddziałuje na sąsiednie mikrodomeny zilustrowane na schematach A₁, B₁ i B₂. B₁ — Mikrofilamenty podobnie jak w schemacie A₁ pozostają nieruchome, ponieważ są związane czynnikiem żelującym. Brak miozyny. Sytuacja taka jest stosunkowo częsta ze względu na niski stosunek miozyny do aktyny. B₂ — Odpowiednie warunki jonowe inicjują zolifikację żelu, natomiast brak aktywnego ruchu wobec lokalnego braku miozyny. Przedstawiony schemat może ilustrować warunki generacji siły i wzajemnej relacji między mikrodomenami cytoplazmy w „kanale” okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium*

Dane fizjologiczne wskazują [115], że punkty napędu są rozmieszczone równomiernie w całej masie cytoplazmy poruszającej się w postaci strumienia, a elementarne ruchy mają charakter saltacyjny. Ponadto strumień cytoplazmatyczny obiega komórkę wzdłuż zamkniętej pętli, zawsze w tym samym kierunku, determinowanym prawdopodobnie przez odrębny system kierujący [119].

Dla wyjaśnienia podstaw molekularnych ruchu cytoplazmy u *Paramecium* może być zaadaptowana hipoteza Hellewell i Taylor [55]. Wiąże ona zjawiska lokalnych upłynnień żelowych struktur z jednoczesną interakcją mikrofilamentów aktynowych z miozyną. Wzajemne ślizganie się mikrofilamentów i miozyny powoduje skurcz i zbliżenie sąsiadujących żelifikowanych obszarów (domen). Hipotetyczny model ruchu cytoplazmy zakłada, że elementami biorącymi aktywny udział w procesie skurczu są: mikrofilamenty aktynowe, miozyna, czynniki żelifikujące aktynę oraz określone stężenie jonów Ca^{2+} oraz pH [28, 55, 129, 130]. Mikrofilamenty aktynowe w stanie żelu (w ekstrakcie *Dictyostelium discoideum* przy pH = 6,8 i $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA} = 0,05$, tj. około $3,0 \times 10^{-8}$ M) nie łączą się z miozyną. Dopiero zmiana pH lub poziomu wolnych jonów wapnia (dla ekstraktu z *D. discoideum* pH = 6,8 - 7,0 lub $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA} = 0,9$, tj. przy stężeniu powyżej $4,6 \times 10^{-6}$ M) powodują lokalną zolifikację żelu, a uwolnione mikrofilamenty łączą się z miozyną i ślizgając względem siebie wywołują zbliżenie sąsiadujących obszarów (domen) żelifikowanych, czyli skurcz. W analogicznych warunkach jonowych, przy braku miozyny następuje jedynie lokalna zolifikacja uwalniająca mikrofilamenty aktynowe (ryc. 3). Ze względu na niski stosunek miozyny do aktyny w komórkach mięśniowych, procesy zolifikacji bez skurczu będą zachodziły odpowiednio częściej. Małe zmiany w stężeniach środowiska jonowego inicjują przejście żelu w zol i ponowny powrót do stanu żelu. Procesy zolifikacji, skurczu, żelifikacji mogą więc zachodzić w bliskim sąsiedztwie w całej objętości cytoplazmy.

Tak więc, istotą hipotezy Hellewell i Taylora [55] jest przypuszczenie, że potencjalne możliwości interakcji mikrofilamentów aktynowych z miozyną nie we wszystkich mikrorejonych cytoplazmy mogą być wykorzystane jednocześnie. Wynika to przede wszystkim z dwu powodów: z braku odpowiednio dużej ilości miozyny w bezpośredniej bliskości mikrofilamentów aktynowych lub z powodu żelifikacji mikrofilamentów. Aby mógł nastąpić skurcz, niezbędna jest miozyna oraz upłynnienie żelu. Umożliwia to swobodne przesuwanie się mikrofilamentów aktynowych względem struktur, do których przylegała miozyna, np. do sąsiadujących mikrofilamentów. Skurcz w obrębie mikrorejony cytoplazmy dopiero wówczas będzie efektywny, gdy sąsiadujące mikrorejony

będą w stanie żelu i będą stanowiły punkty podparcia, a transmisja skurczu może propagować się na zasadzie dyslokacji. Oczywiście model takiego procesu napędowego musi być rozumiany jako dynamiczny system. Ten sam mikrorejon cytoplazmy, w miarę upływu czasu, może pełnić funkcje zarówno aktywne, jak i pasywne, tj. kurczyć się, stanowić sztywny element lub być płynnym środowiskiem zmniejszającym tarcie.

Autorzy hipotezy [55] zdają sobie sprawę, że kluczowym problemem pozostaje sposób kontroli „in vivo” w proponowanym mechanizmie napędowym. Sądzą, że decydującą rolę odgrywają wolne jony wapnia [49, 53, 54, 76, 82, 87, 131, 156].

Strumień cytoplazmatyczny u *Paramecium* można zatrzymać wprowadzając orzęski do roztworu chlorowodoru papaweryny 200–400 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a następnie spowodować jego ponowne pojawienie się za pomocą jonów wapnia w obecności jonoforu A23187 [116]. Papaweryna powoduje prawdopodobnie zmianę zawartości wapnia w błonie [83] lub jego przemieszczenia poprzez błonę [4, 21, 108]. Bezpośrednim źródłem wolnych jonów wapnia mogą być struktury korteksu [79, 90–93] lub mitochondria [24, 75, 100]. Znaczna większość mitochondriów u *Paramecium* ułożona jest bezpośrednio pod pellikulą, toteż penetracja jonów wapnia do odległych o kilkanaście μm miejsc w cytoplazmie możliwa byłaby na zasadzie tzw. „fali wapniowej” rozprzestrzeniającej się z prędkością do 90 $\mu\text{m s}^{-1}$ [43]. Istnieją więc podstawy dla przypuszczenia, że u *Paramecium* jony Ca^{2+} same kontrolują ruch cytoplazmy bądź stanowią element w ciągu czynników pośredniczących w przekazywaniu informacji [66, 74, 80].

Zasadnicze przesłanki hipotezy Hellewell i Taylora [55] najlepiej tłumaczą właściwości okrężnego strumienia cytoplazmatycznego u *Paramecium*. Wyróżniającym bowiem założeniem tej hipotezy jest przyjęcie, że procesy skurczowe zachodzące w samej cytoplazmie wystarczają dla jej własnego napędu. Sąsiadujące blisko siebie domeny cytoplazmy mogą znajdować się w danym momencie w trzech stanach determinujących ich aktualną funkcję: w stanie kurczenia się w środowisku upłynnionym, powodując zbliżenie sąsiadujących zżelifikowanych domen, w stanie upłynnienia bez skurczu oraz w stanie żelu. Ta sama cytoplazma jako całość może więc stanowić mozaikę domen kurczących się, ułatwiających przemieszczanie się sąsiadującym domenom, lub stanowić żelową podpórę, np. w postaci sieci [14, 39]. Manifestacją tych zjawisk może być strumień cytoplazmatyczny w postaci zamkniętej pętli, w którym rozkład prędkości współosiowych warstw cytoplazmy oraz zbliżona wydajność przepływu na całym obwodzie strumienia sugeruje funkcjonowanie rozproszonego systemu napędzającego, działającego niesynchronicznie [115].

LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., Food vacuole membrane growth with microtubule — associated membrane transport in *Paramecium*, *J. Cell Biol.*, **63**: 904–922, 1974.
- [2] — Evidence for firm linkages between microtubules and membrane-bounded vesicles, *J. Cell Biol.*, **64**: 497–503, 1975.
- [3] ALLEN R. D., ALLEN N., Cytoplasmic streaming in amoeboid movement, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**: 469–495, 1978.
- [4] ALLEN R. D., ECKERT R., A morphological system in ciliates comparable to the sarcoplasmic reticulum transverse system in striated muscle, *J. Cell Biol.*, **43**: 4a, 1969.
- [5] ANDRVION C., Preuves de l'existence d'un transport actif de l'ion nickel à trevers la membrane cellulaire de *Paramecium caudatum*, *Protistologica*, **6**: 445–455, 1970.
- [6] — The stopping of ciliary movements by nickel salts in *Paramecium caudatum*: the antagonism of K^+ and Ca^{++} ions, *Acta Protozoologica*, **11**: 373–386, 1972.
- [7] — La perméabilité a l'ion nickel chez *Paramecium*: ses rapport avec le renversement ciliaire, *Protistologica*, **10**: 175–183, 1974.
- [8] — Regulation de la pénétration du nickel chez *Paramecium* par des enzymes de la membrane cellulaire, *Protistologica*, **10**: 509–516, 1974.
- [9] — Inhibition of ciliary movements by Ni^{2+} ions in triton-extracted models of *Paramecium caudatum*, *Arch. Inter. Physiol. Bioch.*, **82**: 843–852, 1974.
- [10] AUFDERHEIDE K. J., Genetic aspects of intracellular motility: cortical localization and insertation of trichocysts in *Paramecium tetraurelia*, *J. Cell Sci.*, **31**: 259–273, 1978.
- [11] BARDELE C. F., Microtubule model systems: cytoplasmic transport in the suctorian tentacle and the centrohelidian axopod, [w] 29th Ann. EMSA Meeting, red. C. J. Arceneaux, Baton Rouge: Claitor's Publish. Div., 1971, 334–335.
- [12] — A microtubule model for ingestion and transport in the suctorian tentacle, *Z. Zellforsch.*, **126**: 116–134, 1972.
- [13] — Transport of materials in the suctorian tentacle, *Symp. Soc. Expl. Biol.*, **28**: 191–208, 1974.
- [14] BEHNKE O., Introductory remarks: To move, or not to move, that is the question, [w] *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, **3**: 1976, 215–216.
- [15] BIELAWSKI J., THOMPSON T. E., LENINGER A. L., The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membranes, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **24**: 6, 1966.
- [16] BOELL E. J., The effect of respiratory inhibitors on the oxygen consumption of *Paramecium calkinsi*, *Anat. Rec.*, **84**: 493–494, 1942.
- [17] BORISY G. G., TAYLOR E. W., The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine- 3H to cellular protein, *J. Cell Biol.*, **34**: 525–534, 1967.
- [18] — The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus, *J. Cell Biol.*, **34**: 535–548, 1967.
- [19] BRADLY M. O., Microfilaments and cytoplasmic streaming: inhibition of streaming with cytochalasin, *J. Cell Sci.*, **12**: 327–343, 1973.
- [20] BRAY D., Cytochalasin action, *Science*, **282**: 671, 1979.
- [21] BREHM P., DUNLAP K., ECKERT R., Calcium-dependent repolarization in *Paramecium*, *J. Physiol.*, **274**: 639–654, 1978.

- [22] BROWN S. S., SPUDICH J. A., Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments, *J. Cell Biol.*, **83**: 657-662, 1979.
- [23] BRUTKOWSKA M., Immobilization effect of NiCl₂ and food vacuole formation in *Paramecium caudatum*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **15**: 119-122, 1967.
- [24] BYGRAVE F. L., Calcium movements in cells, [w] TIBS — August 1978, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978, 175-178.
- [25] CANDE W. Z., GOLDSMITH M. H. M., RAY P. M., Polar auxin transport and auxin-induced elongation in the absence of cytoplasmic streaming, *Planta*, **111**: 279-296, 1973.
- [26] CANDE W. Z., LAZARIDES E., McINTOSH J. R., A comparison of the distribution of actin and tubulin in the mammalian mitotic spindle as seen by indirect immunofluorescence, *J. Cell Biol.*, **72**: 552-567, 1977.
- [27] CHEN J. C. W., Observations of protoplasmic behavior and motility of protoplasmic fibrils in cytochalasin B treated *Nitella rhizoid*, *Protoplasma*, **77**: 427-435, 1973.
- [28] CONDEELIS J. S., TAYLOR D. L., The contractile basis of ameboid movement. V. The control of gelation, solation and contraction in extracts from *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Biol.*, **74**: 901-927, 1977.
- [29] COPELAND M., The cellular responses to cytochalasin B. A critical review, *Cytologia*, **39**: 709-727, 1974.
- [30] DAVIS A. T., ESTENSEN R., QUIE P. G., Cytochalasin B. III. Inhibition of polymorphonuclear leucocyte phagocytosis, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **137**: 161-164, 1971.
- [31] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Post. Bioch.*, **22**: 467-481, 1976.
- [32] DILON R. D., BUCHLER J. A., Growth effects of vitamin E, DMSO and cytochalasin B on two species of paramecia, *Paramecium bursaria* and *Paramecium multimicronucleatum*, *Proc. S. D. Acad. Sci.*, **54**: 183-187, 1975.
- [33] ESTENSEN R. D., PLAGEMANN P. G. W., Cytochalasin B: Inhibition of glucose and glucosamine transport, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1430-1434, 1972.
- [34] ESTENSEN R. D., ROSENBERG M., SHERDAN J. D., Cytochalasin B: microfilaments and „contractile” processes, *Science*, **173**: 356-357, 1971.
- [35] FISHER G., KANESHIRO E. S., PETERS P. D., Divalent cation affinity sites in *Paramecium aurelia*, *J. Cell Biol.*, **69**: 429-442, 1976.
- [36] FLANAGAN D. J., WARR J. R., Colchicine binding of cell extracts from colchicine resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardi*, *Expl. Cell Res.*, **116**: 474-477, 1978.
- [37] FORER A., EMMERSEN J., BEHNKE O., Cytochalasin B: Does it affect actin-like filaments? *Science*, **175**: 774-776, 1972.
- [38] FRANKE W. W., Membrane-microtubule-microfilament-relationship in the ciliate pellicle, *Cytobiologie*, **4**: 307-316, 1971.
- [39] FREY-WYSSLING A., Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives, Elsevier Publ. Co. Inc., New York, Amsterdam, London, Brussels 1948, 1-225.
- [40] FUKUI Y., KATSUMARU H., Nuclear actin bundles in *Amoeba*, *Dictyostelium* and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide, *Exp. Cell Res.*, **120**: 451-455, 1979.
- [41] GEDDES M., HUMPHREY G. F., Glycolysis in *Paramecium caudatum*, *Austr. J. Expl. Biol.*, **29**: 187-193, 1951.

- [42] GELEI J., Ni-Infusorien im Dienste der Forschung und des Unterrichtes, Biol. Zbl., **55**: 57-74, 1935.
- [43] GILKEY J. C., JAFFE L. F., RIDGWAY E. B., REYNOLDS G. T., A free calcium wave tranverses the activating egg of the medaka *Oryzias latipes*, J. Cell Biol., **76**: 448-466, 1978.
- [44] GRĘBECKA L., KALININA L. V., Effects of DMSO on the motory behaviour of *Amoeba proteus*, Acta Protozool., **18**: 327-332, 1979.
- [45] GRĘBECKI A., KUŹNICKI L., MIKOŁAJCZYK E., Right spiralling in *Paramecium* by Ni ions and the hydrodynamics of the spiral movement, Acta Protozool., **4**: 389-408, 1967.
- [46] GRIFFITH L., POLLARD T. D., Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins, J. Cell Biol., **78**: 958-965, 1978.
- [47] HARTHSHORNE D. J., BARNS E. M., PARKER L., FUCHS F., The effect of temperature on actomyosin, Bioch. Bioph. Acta **267**: 190-202.
- [48] HASSELBACH W., Die Umwandlung von Aktomyosin-ATPase in L-Myosin-ATPase durch Aktivatoren und die resultierenden Aktivierungseffekte, Z. Naturforsch., **7b**: 163-174, 1952.
- [49] HAUSER M., ATP und Ca^{2+} induzierte actomyosinartige kontraktion glycerinisierte Makronuklei, Protoplasma, **102**: 53-62, 1980.
- [50] HAUSER M., VAN EYS H., Mikrotubules and associated mikrofilaments in the tentacles of the suctorian *Heliophrya erhardi* Matthes, J. Cell Sci., **20**: 589-617, 1976.
- [51] HAUSER M., HAUSMANN K., JOCKUSCH B. M., Demonstration of tubulin, actin and alfa-actinin by immunofluorescence in the microtubule-microfilament complex of the cytopharyngeal basket of the ciliate *Pseudomicrothorax dubius*, Expl. Cell Res., **125**: 265-274, 1980.
- [52] HAUSMANN K., PECK R. K., Microtubules and microfilaments as major components of a phagocytic apparatus: the cytopharyngeal basket of the ciliate *Pseudomicrothorax dubius*, Differentiation, **11**: 157-167, 1978.
- [53] HAYAMA T., TAZAWA M., Ca^{2+} reversibly inhibits active rotation of chloroplasts in isolated cytoplasmic droplets of *Chara*, Protoplasma, **102**: 1-9, 1980.
- [54] HAYAMA T., SHIMMEN T., TAZAWA M., Participation of Ca^{2+} in cessation of cytoplasmic streaming induced by membrane excitation in *Characeae internodal* cells, Protoplasma, **99**: 305-321, 1979.
- [55] HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., The contractile basis of amoeboid movement. VI. The solation-contraction coupling hypothesis, J. Cell Biol., **83**: 633-648, 1979.
- [56] HEPLER P. K., PALEVITZ B. A., Microtubules and microfilaments, Ann. Rev. Plant. Physiol., **25**: 309-362, 1974.
- [57] HERTH W., FRANKE W. W., VANDERWONDE W. J., Cytochalasin stops tip growth in plants, Naturwissenschaften, **59**: 38-39, 1972.
- [58] HITCHCOCK S. E., Regulation of motility in nonmuscle cells, J. Cell Biol., **74**: 1-15, 1977.
- [59] HOLLAND J., HUMPHREY G. F., The metabolism of *Paramecium caudatum*. II. The effect of respiratory inhibitors, Austr. J. Expl. Biol. **31**: 299-310, 1953.
- [60] HOLTZER H., SANGER J. W., Cytochalasin-B: microfilaments, cell movement and what else? Developmental Biology, **27**: 444-446, 1972.
- [61] HYAMS J. S., STIBBINGS H., Microtubule associate cytoplasmic transport,

- [w] Microtubules, red. K. Roberts, J. S. Hyams, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco 1979, 487-530.
- [62] KAMIYA N., Protoplasmic streaming, *Protoplasmatologia*, **8**: (3a), 1-199, 1959.
- [63] KENEDY J. R., ZIMMERMANN A. M., The effects of high hydrostatic pressure on the microtubules of *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **47**: 568-576, 1970.
- [64] KOENUMA A., Study on cyclosis of *Paramecium*, *J. Shinshu Univ.*, **4**: 49-57, 1954.
- [65] KORN E. D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**: 588-599, 1978.
- [66] KRETSINGER R. H., The informational role of calcium in the cytosol, [w] *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 11, red. P. Greengard, G. A. Robinson, Raven Press, New York 1979, 1-26.
- [67] KUŹNICKI L., Reversible immobilization of *Paramecium caudatum* evoked by nickel ions, *Acta Protozool.*, **1**: 301-312, 1963.
- [68] KUŹNICKI L., KUŹNICKI J., Speculations on evolution of mechanisms regulating actin and myosin interaction, *Acta Protozool.*, **18**: 91-107, 1979.
- [69] KUŹNICKI L., SIKORA J., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. III. The effect of temperature on flow velocity, *Acta Protozool.*, **12**: 59-66, 1973.
- [70] — Dane nie opublikowane.
- [71] KWIATKOWSKA M., Mikrotubule. I. Budowa i skład chemiczny mikrotubul, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 237-253, 1974.
- [72] — Mikrotubule. II. Funkcje mikrotubul, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 255-275, 1974.
- [73] LAZARIDES E., Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, **283**: 249-255, 1980.
- [74] LINDBERG U., CARLSSON L., MARKEY F., NYSTRÖM L. E., The unpolymerised form of actin in non-muscle cells, *Meth. Achiev. exp. Pathol.*, **8**: 143-170, 1979.
- [75] LOEWENSTEIN W. R., ROSE B., Calcium in (junctional) intercellular communication, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **307**: 265-305, 1978.
- [76] MAIHE N. J., SATIR B. H., Indirect immunofluorescent localization of calmodulin in *Paramecium tetraurelia*, *J. Protozool.*, **26**: 3/1, 10A, 1979.
- [77] MARGULIS L., Colchicine-sensitive microtubules, *Inter. Rev. Cytol.*, **34**: 333-361, 1973.
- [78] MAST S. O., The food vacuole in *Paramecium*, *Biol. Bull.*, **92**: 31-72, 1947.
- [79] MATT H., BILINSKI M., PLATTNER H., Adenosinetriphosphate, calcium and temperature requirements for the final steps of exocytosis in *Paramecium* cells, *J. Cell Sci.*, **32**: 67-86, 1978.
- [80] MEANS A. R., DEDMAN J. R., Calmodulin — an intracellular calcium receptor, *Nature*, **285**: 73-77, 1980.
- [81] MIKOŁAJCZYK E., Effect of some chemical factors on the euglenoid movements in *Euglena gracilis*, *Acta Protozool.*, **12**: 133-142, 1973.
- [82] MIMURA N., ASANO A., Ca²⁺-sensitive gelation of actin filaments by a new protein factor, *Nature*, **282**: 44-48, 1979.
- [83] MORAN D., RICE R. W., Action of papaverine and ionophore A23187 on neurulation, *Nature*, **261**: 497-499, 1976.
- [84] NAITOH Y., KANEKO H., Control of ciliary activities by adenosinotri-

- phosphate and divalent cations in triton-extracted models of *Paramecium caudatum*, *J. Exp. Biol.*, **58**: 657–676, 1973.
- [85] NELSEN E. M., Division delays and abnormal oral development produced by colchicine in *Tetrahymena*, *J. Exp. Zool.*, **175**: 69–84, 1970.
- [86] NILSON J. R., RICKETTS T. R., ZEUTHEN E., Effects of cytochalasin B on the cell division and vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL, *Exp. Cell Res.*, **79**: 456–459, 1973.
- [87] NUCCITELLI R., POO M. M., JAFFE L. F., Relations between ameboid movement and membrane-controlled electrical currents, *J. Gen. Physiol.*, **69**: 743–763, 1977.
- [88] PACE D. M., The effect of cyanide on respiration in *Paramecium caudatum* and *Paramecium aurelia*, *Biol. Bull.*, **89**: 76–83, 1945.
- [89] PITELKA D. R., Fibrillar systems in *Protozoa*, [w] *Research in Protozoology*, red. T. T. Chen, Pergamon Press, Oxford, New York 1969, 279–388.
- [90] PLATTNER H., Ciliary granule plaques: membrane intercalated particle aggregates associated with Ca^{2+} -binding sites in *Paramecium*, *J. Cell Sci.*, **18**: 257–269, 1975.
- [91] — Membrane disruption, fusion and resealing in the course of exocytosis in *Paramecium* cells, *Expl. Cell Res.*, **103**: 431–435, 1976.
- [92] PLATTNER H., FUCHS S., X-ray microanalysis of calcium binding sites in *Paramecium* with special reference to exocytosis, *Histochemistry*, **45**: 23–47, 1975.
- [93] PLATTNER H., WOLFRAM D., BACHMANN L., WACHTER E., Tracer and freeze-etching analysis of intra-cellular membrane-junctions in *Paramecium*. With a note on a new heme-nonpeptide tracer, *Histochemistry*, **45**: 1–21, 1975.
- [94] POLJANSKI G. I., POSNANSKAJA T. M., Dlitielnoje kultiwirowanije *Paramecium caudatum* pri 0°C, *Acta Protozool.*, **2**: 271–278, 1964.
- [95] POLLACK R., RIFKIN D. B., Modification of mammalian cell shape: Redistribution of intracellular actin by SV40 virus, proteases, cytochalasin B and dimethylsulfoxide, [w] *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, **3**: 1976, 389–401.
- [96] POLLARD T. D., WEIHING R. R., Actin and myosin and cell movement, *C. R. C. Critical Rev. Biochem.*, **2**: 1–65, 1974.
- [97] PORTER K. R., Cytoplasmic microtubules and their functions, [w] *Ciba Foundation Symposium on Principles of Biomolecular Organization*, London: Churchill 1966, 308–345.
- [98] RATHKE C. P., SCHMID E., FRANKE W. W., The action of the cytochalasins at the subcellular level. I. Effects and binding of cytochalasin B in cells of a line derived from a rat mammary adenocarcinoma and in rat erythrocytes, *Cytobiologie*, **10**: 366–396, 1975.
- [99] REISNER A. H., BUCHOLTZ C., The in vivo effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on protein synthesis and the polyribosome profile in *Paramecium*, *J. Cell Physiol.*, **90**: 169–178, 1977.
- [100] ROSE B., LOEWENSTEIN W. R., Calcium ion distribution in cytoplasm visualized by aequorin: diffusion in cytosol restricted by energized sequestering, *Science*, **190**: 1204–1206, 1975.
- [101] ROSENBAUM J. L., CARLSON K., Cilia regeneration in *Tetrahymena* and its inhibition by colchicine, *J. Cell Biol.*, **40**: 415–425, 1969.

- [102] ROTH L. E., SHIGENAKA Y., Microtubules in the heliozoan axopodium. II. Rapid degeneration by cupric and nickelous ions, *J. Ultrastruk. Res.* **31**: 356-374, 1970.
- [103] ROTH L. E., PIHLAJA D. J., SHIGENAKA Y., Microtubules in the heliozoan *Axopodium*. I. The gradient hypothesis of the allosterism in structural proteins, *J. Ultrastruct., Res.*, **30**: 7-37, 1970.
- [104] SANGER J. W., Intracellular localization of actin with fluorescently labelled heavy meromyosin, *Cell Tiss. Res.*, **161**: 431-444, 1975.
- [105] SANGER J. W., HOLTZER H., Cytochalasin B: Effects on cell morphology, cell adhesion and mucopolysaccharide synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci., (Wash.)*, **69**: 253-257, 1972.
- [106] — Cytochalasin B: Effects on cell morphology cell adhesion and mucopolysaccharide synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 253-257, 1973.
- [107] SANGER J. W., HOLTZER S., HOLTZER H., Effects of cytochalasin B on muscle cells in tissue culture, *Nature New Biol.*, **229**: 121-123, 1971.
- [108] SATIR B. H., OBERG S. G., *Paramecium* fusion rosettes: possible function as Ca^{2+} gates, *Science*, **199**: 536-538, 1978.
- [109] SCHÖNBOHM E., Experiments on the mechanism of chloroplast movement in light oriented chloroplast arrangement, *Acta Protozool.*, **11**: 211-224, 1972.
- [110] SCHROEDER T. E., The contractile ring. I. Fine structure of dividing mammalian (HeLa) cells and the effects of cytochalasin B. *Z. Zellforschung*, **109**: 431-449, 1970.
- [111] SHIGENAKA Y., Microtubules in protozoan cells. II. Heavy metal ion effects on degradation and stabilization of heliozoan microtubules, *Annot. Zool. Jap.*, **49**: 164-176, 1976.
- [112] SHIGENAKA Y., TADOKORO I., KANEDA M., Microtubules in protozoan cells. I. Effect of light metal ions on the heliozoan microtubules and their kinetic analysis, *Anot. Zool. Jap.*, **48**: 227-241, 1975.
- [113] SHIGENAKA Y., MARUOKA T., TOYOHARA A., SUZAKI T., Microtubules in Protozoan cells. IV. Effects of sulfhydryl-blocking reagents on axopodial degeneration and reformation in *Heliozoa*, *Cell Struct. Funct.*, **4**: 23-34, 1979.
- [114] SIBLEY J. T., MATTHEW D. P., HANSON E. D., Subcellular effects of cytochalasin B and dimethylsulfoxide on *Paramecium aurelia*, *J. Protozool.*, **24**: 595-604, 1977.
- [115] SIKORA J., Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. II. Właściwości dynamiczne, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 45-64, 1981.
- [116] SIKORA J., JURAND A., Control of cytoplasmic streaming in *Paramecium* by papaverine hydrochlorine and ionophore A23187, w druku.
- [117] SIKORA J., KUŹNICKI L., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. IV. Cyclosis during binary fission and conjugation, *Acta Protozool.*, **15**: 173-178, 1976.
- [118] SIKORA J., WASIK A., Cytoplasmic streaming within Ni^{2+} immobilized *Paramecium aurelia*, *Acta Protozool.*, **17**: 389-397, 1978.
- [119] SIKORA J., WASIK A., ALLEN R. D., The role of single particle saltations in *Paramecium* cytoplasmic streaming, *Acta Protozool.*, **18**: 201, 1979.
- [120] SIMON E. W., Mechanisms of dinitrophenol toxicity, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, **28**: (4), 453-479, 1953.
- [121] SIMON E. W., BLACKMAN G. E., The significance of hydrogen-ion concentration in the study of toxicity, *Symp. Soc. Expl. Biol.*, **3**: 253-264, 1949.

- [122] SPUDICH J. A., LIN S., Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin from muscle, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **69**: 442-446, 1972.
- [123] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., PRÓCHNIEWICZ E., DRABIKOWSKI W., Interaction of actin with divalent cations. 1. The effect of various cations on the physical state of actin, *Europ. J. Bioch.*, **88**: 219-227, 1978.
- [124] — Interaction of actin with divalent cations. 2. Characterization of protein-metal complexes, *Europ. J. Bioch.*, **88**: 229-237, 1978.
- [125] SZMANT H. H., Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **243**: 20-23, 1975.
- [126] TAKATA M., Studies on the protoplasmic streaming in the marine alga *Acetabularia calyculus*, *Ann. Rep. of Sci. Works, Osaka Univ.*, **9**: 63-70, 1961.
- [127] TAMM S. L., Properties of a rotary motor in eucaryotic cells, [w] *Cell Motility, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation*, **3**: 1976, 949-967.
- [128] TAYLOR E. W., The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H³-colchicine, *J. Cell Biol.*, **25**: 145-160, 1965.
- [129] TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, *Inter. Rev. Cytol.*, **56**: 57-144, 1979.
- [130] TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., RHODES J. A., The contractile basis of amoeboid movement. III. Structure and dynamics of motile extracts and membrane fragments from *Dictyostelium discoideum*, [w] *Proc. Conf. on Cell Shape*, A. Liss Inc., N. Y., 1977, 313-340.
- [131] TAYLOR D. L., REYNOLDS G. T., BLINKS J. R., Spontaneous aequorin luminescence in *Chaos carolinensis*, *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **155**: 469, 1978.
- [132] TCHAKHOTINE S., Études physiologiques et embryologiques au moyen de la methode des microgouttes, *Trav. Stat. Zool. Vimereux*, **13**: 647-663, 1938.
- [133] TILNEY L. G., Studies on the microtubules in Heliozoa. IV. The effect of colchicine on the formation and maintenance of the axopodia and the re-development of pattern in *Actinosphaerium nucleofilum* (Barret), *J. Cell Sci.*, **3**: 549-562, 1968.
- [134] TOŁŁOCZKO B., Endocytosis in *Paramecium*. III. Effect of cytochalasin B and colchicine, *Acta Protozool.*, **16**: 185-193, 1977.
- [135] — Cytochalasin B induced inhibition of food ingestion in *Dileptus anser*, *Acta Protozool.*, w druku.
- [136] — Effect of colchicine on food ingestion in *Dileptus anser*, *Acta Protozool.*, w druku.
- [137] TONOMURA Y., YOSHIMURA J., Binding of p-chloromercuribenzoate to actin, *J. Bioch.*, **51**: 259-266, 1962.
- [138] TOYOHARA A., SHIGENAKA Y., MOHRI H., Microtubules in protozoan cells. III. Ultrastructural changes during disintegration and reformation of heliozoan microtubules, *J. Cell Sci.*, **32**: 87-98, 1978.
- [139] TUCKER J. B., Microtubule-arms and propulsion food particles inside a large feeding organelle in the ciliate *Phascolodon vorticella*, *J. Cell Sci.*, **10**: 883-903, 1972.
- [140] — Endocytosis and streaming of highly gelled cytoplasm alongside rows of arm-bearing microtubules in the ciliate *Nassula*, *J. Cell Sci.*, **29**: 213-232, 1978.
- [141] TUCKER J. B., MACKIE J. B., Configurational changes in helical microtubule

- frameworks in feeding tentacles of the suctorian ciliate *Tokophrya*, *Tissue and Cell*, **7**: 601–612, 1975.
- [142] WASIK A., SIKORA J., Effect of cytochalasin B and colchicine on cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*, *Acta Protozool.*, **19**: 103–110, 1980.
- [143] WEBER K., RATHKE P. C., OSBORN M., FRANKE W. W., Distribution of actin and tubulin in cells and in glycerinated cell models after treatment with cytochalasin B (CB), *Expl. Cell Res.*, **102**: 285–297, 1976.
- [144] WICHTERMAN R., Cytogamy: A sexual process occurring in living joined pairs of *Paramecium caudatum* and its relation to other sexual phenomena, *J. Morphol.*, **66**: 423–451, 1940.
- [145] WILLIAMSON R. E., A light-microscope study of the action of cytochalasin B on the cells and isolated cytoplasm of the *Characeae*, *J. Cell Sci.*, **10**: 811–819, 1972.
- [146] — Cytoplasmic streaming in *Chara*: A cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin B, *J. Cell Sci.*, **17**: 655–668, 1975.
- [147] WILSON L., BRYAN J., Biochemical and pharmacological properties of microtubules, [w] *Adv. Cell and Mol. Biol.*, **3**, red. E. J. DuPraw, Acad. Press, N. Y., San Francisco, London 1974, 22–72.
- [148] WILSON L., FRIEDKIN M., The biochemical events of mitosis. I. Synthesis and properties of colchicine labelled with tritium in its acetyl moiety, *Biochemistry*, **5**: 2463–2468, 1966.
- [149] WOOD D. C., WOOD J., Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **243**: 7–19, 1975.
- [150] WUNDERLICH F., HEUMANN H. G., In vivo reassembly of microtubules in the presence of intracellular colchicine, *Cytobiologie*, **10**: 140–151, 1974.
- [151] WUNDERLICH F., MULLER R., SPETH V., Direct evidence for a colchicine-induced impairment in the mobility of membrane components, *Science*, **182**: 1136–1137, 1973.
- [152] YAMADA K., A comparative study on the cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, 1–153, 1969.
- [153] — Influence of specific SH-blocking reagent, p-chloro-mercuribenzoate on cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **23**: 1–15, 1970.
- [154] — Effects of cyanide on cyclosis and vacuolar output of water in *Paramecium caudatum*, *J. Sci., Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **25**: 225–242, 1974.
- [155] — Effects of 2,4-dinitrophenol on cyclosis and vacuolar output of water in *Paramecium caudatum*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **25**: 243–257, 1974.
- [156] YIN H. L., STOSSEL T. P., Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin a calcium-dependent regulatory protein, *Nature*, **281**: 583–586, 1979.
- [157] YUSA A., An electron microscope study on regeneration of trichocysts in *Paramecium caudatum*, *J. Protozool.*, **10**: 253–262, 1963.
- [158] ZIGMOND S. H., HIRSCH J. G., Cytochalasin B: Inhibition of D-2-deoxyglucose. Transport into leucocysts and fibroblasts, *Science*, **176**: 1432–1434, 1972.

Otrzymano: 4 sierpnia 1980.

Przyjęto: 15 listopada 1980.

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

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach — zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie, przed tekstem, należy podać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, ryc. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 41–48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press, London, New York 1977, 60–64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

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

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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”.

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

ARS POLONA

00-068 Warszawa. Krakowskie Przedmieście 7. Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

W. BARTNIKOWA, Polimerazy DNA komórek eukariotycznych i rewertazy onkowirusów	1
E. ANUSZEWSKA, Rola uszkodzeń DNA i ich reperacji w procesach nowotworowych	21
J. SIKORA, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce <i>Paramecium</i> . I. Ogólna charakterystyka	37
J. SIKORA, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce <i>Paramecium</i> . II. Właściwości dynamiczne	45
J. SIKORA, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce <i>Paramecium</i> . III. Wpływ czynników modyfikujących	65