

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 13-NR 4**

**1986 (415-516)**

# Postępy Biologii Komórki

<http://sin.pwn.pl>  
PWN WARSZAWA-WROCŁAW

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

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

Rada Redakcyjna

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

Adres Redakcji

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

---

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 545 + 105 egz. Ark. wyd. 8,25. Ark. druk. 6 3/8 + 0,25 wkł. kredowa. Papier druk. sat.  
kl. III, 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lipcu 1986 r. Podpisano do druku w grud-  
niu 1986 r. Druk ukończono w styczniu 1987 r. Zam. 1368/86. Cena 120 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## REAKCJE FOTOFOWE WICIOWCÓW EUGLENOIDALNYCH

## PHOTOPHOBIC RESPONSES IN EUGLENOID FLAGELLATES

Ewa MIKOŁAJCZYK

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN,  
WARSZAWA

*Streszczenie.* Przedstawiono aktualne poglądy na temat struktur komórkowych i mechanizmów odpowiedzialnych za reakcje fotofobowe wiciowców euglenoidalnych — *Euglena gracilis*, *Astasia longa* i *Peranema trichophorum*. Przedstawiono rolę reakcji fotofobowych w fototaksjach u *E. gracilis*. Omówiono zagadnienia fotorecepcji, transdukcji bodźców oraz molekularne podłoże reakcji fotofobowych. Podkreślono również rolę reakcji fotofobowych w aspekcie ewolucji wiciowców. Zwrócono uwagę na powiązanie systemów foto-, chemo- i mechanosensorycznego.

*Summary.* Recent concepts concerning the cell structures and mechanisms responsible for photophobic responses of euglenoid flagellates — *Euglena gracilis*, *Astasia longa* and *Peranema trichophorum* are presented. The role of the photophobic responses in the phototaxis of *E. gracilis* is described. The mechanism of the photoreception, phototransduction and molecular basis of the photophobic responses, as well as the significance of the photophobic responses in the evolution of flagellates are discussed. Interactions between photo-, chemo- and mechanosensory systems are emphasized.

## Stosowane skróty

CCCP	— m-chlorofenylohydrazon cjanku karbonylu
CTAB	— bromek cetylo-trójmetylo-amonowy
DCMU	— 3-(3,4-dwuchlorofenylo)-1, 1-dwumetylomocznik
TPMP <sup>+</sup>	— jon trójfenylo-metylo-fosfoniowy
PFB	— ciało przywiciowe
PFR	— pałeczka przywiciowa

## I. WSTĘP

Światło — to energia dla żywych organizmów, która, w zależności od natężenia, może być niezbędna bądź niebezpieczna zarówno dla auto-, jak i heterotrofów. Wydaje się więc w pełni zrozumiałe, że pierwotniaki rozwinęły mechanizmy umożliwiające odszukanie najdogodniejszych do życia warunków świetlnych i przebywanie w nich.

Na podstawie wieloletnich badań sięgających początku XIX w. (podsumowanych w pracach [23-26, 38, 39, 46, 53, 60, 61, 66, 81, 83, 103, 104]) wyróżniono następujące zasadnicze rodzaje reakcji wiciowców euglenoidalnych:

1. Fotokineza — reakcja polegająca na zmianie szybkości poruszania się komórki w zależności od natężenia światła. Podczas fotokinezy pierwotniak nie adaptuje się do nowych warunków świetlnych, tzn. reakcja fotokinetyczna trwa tak długo, jak długo utrzymuje się niższy lub wyższy od poprzedniego poziom natężenia światła.

2. Reakcje fotofobowe — reakcje organizmu na nagłe zmiany natężenia światła stymulującego (powyżej lub poniżej progu adaptacyjnego). Reakcja komórki na nagłe zwiększenie natężenia światła zwana jest, zgodnie z terminologią Diehna i wsp. [40], reakcją step-up, natomiast na nagłe zmniejszenie natężenia światła — step-down. Polegają one na zmianie położenia wici i rotacji komórki, co prowadzi do gwałtownej zmiany kierunku ruchu. Reakcje te są przejściowe; komórki adaptują się do nowych warunków oświetlenia i powracają do zwykłego dla nich sposobu poruszania się. Czas adaptacji zależy od typu i siły bodźca.

3. Fototaksja — reakcja polegająca na ukierunkowanym poruszaniu się pierwotniaków w stosunku do źródła światła. Organizmy mogą płynąć w kierunku światła, wykazując fototaksję dodatnią, lub od niego oddalać, wykazując fototaksję ujemną. Do lat osiemdziesiątych badanie fototaksji u *Euglena gracilis* sprowadzało się w rzeczywistości do badania zjawisk fotoakumulacji i fotodispersji. Dopiero badania zachowania się komórek metodą mikrowideografii pozwoliły na obserwację u *Euglena gracilis* rzeczywistej fototaksji zarówno dodatniej, jak i ujemnej [23, 63]. Fototaksja dodatnia jest szczególnie trudna do obserwacji, ponieważ zwykle jedynie około 50% komórek jest zorientowanych dokładnie w kierunku padającego światła [63].

Zjawiska fotoakumulacji i fotodispersji nie są równoznaczne z pojęciem fototaksji. Akumulacja, działająca na zasadzie pułapki świetlnej, polega na gromadzeniu się komórek pływających ruchem nieukierunkowanym, w oświetlonym polu. Komórka, która wpłynęła tu przypadkowo, już go nie opuszcza, gdyż w momencie zetknięcia się z jego granicą pojawia się u niej reakcja step-down, zawracająca ją, natomiast dispersja



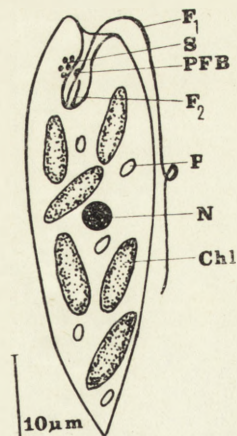
polega na tym, że komórki znajdujące się w zbyt silnie oświetlonym polu, po wypłynięciu z niego, nie wpływają tam ponownie, zwracane na jego granicy reakcją step-up.

W tej pracy uwaga skupiona będzie na reakcjach fotofobowych trzech pierwotniaków z gromady *Euglenida*: wiciowca fotosyntetyzującego — *Euglena gracilis* i wiciowców bezbarwnych — *Astasia longa* i *Peranema trichophorum*. Wiciowce te były obiektami moich prac doświadczalnych [91-100, 133].

## II. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA OBIEKTÓW BADAŃ

Do gromady *Euglenida* (synonimy — *Euglenophyta*, *Euglenoidina*) należą zarówno organizmy zielone — fotosyntetyzujące np. *Euglena gracilis*, jak i bezbarwne, np. *Astasia longa* lub *Peranema trichophorum*. Jest oczywiste, że wszystkie zielone, fotosyntetyzujące wiciowce są zdolne do odbierania bodźców świetlnych. Zdolność tę wykazują również wiciowce bezbarwne. U *Peranema trichophorum*, organizmu fagotroficznego, poruszającego się ruchem pełzającym, wrażliwość na światło była obserwowana przez Masta [87], a potem szczegółowo badana przez Shettlesa [120] i Shortessa [121]. *Astasia longa*, bezbarwny, naturalny mutant *Euglena gracilis* [114, 115, 117, 121, 137], przez wiele lat uchodził za organizm pozbawiony zdolności do reagowania na światło [59, 85, 117]. W ostatnich latach wykazano jednak, że reaguje ona na zwiększanie jego natężenia [92, 99, 128].

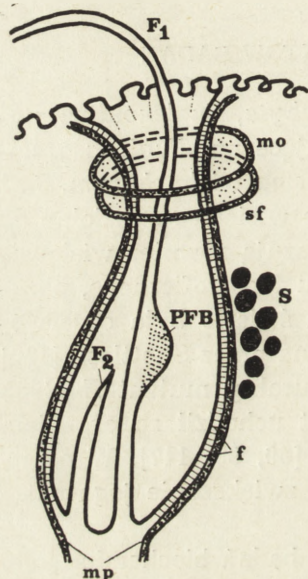
*Euglena gracilis* jest obiektem modelowym do badań biochemicznych, ewolucyjnych i fizjologicznych wiciowców z gromady *Euglenida* (ryc. 1). Na niej przeprowadzono większość badań dotyczących reakcji fotofobowych, fotoakumulacji i fotodispersji, fototaksji, mechanizmów fotore-



Ryc. 1. Schemat budowy *Euglena gracilis*

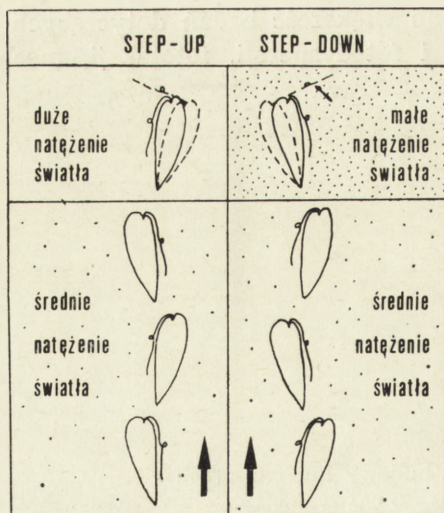
F<sub>1</sub> — wici lokomotoryczna; F<sub>2</sub> — wici zredukowana; S — stigma;  
PFB — ciało przywiciowe; P — paranylon; N — jądro;  
Chl — chloroplast

akcji i transdukcji bodźców świetlnych. W normalnych warunkach komórka płynie do przodu, zataczając helisę i spiralizując wokół podłużnej osi ciała. Oś helisy określa kierunek ruchu (ryc. 3, część dolna). Organellami odpowiedzialnymi za zachowanie się organizmu, w zależności od rodzaju i natężenia światła, są stigma i ciało przywiciowe (paraflagellar body), nazywane w skrócie PFB (ryc. 1, 2, 10, 11, 13), któremu przypisuje się rolę fotoreceptora. U innych wiciowców nieznane są struktury



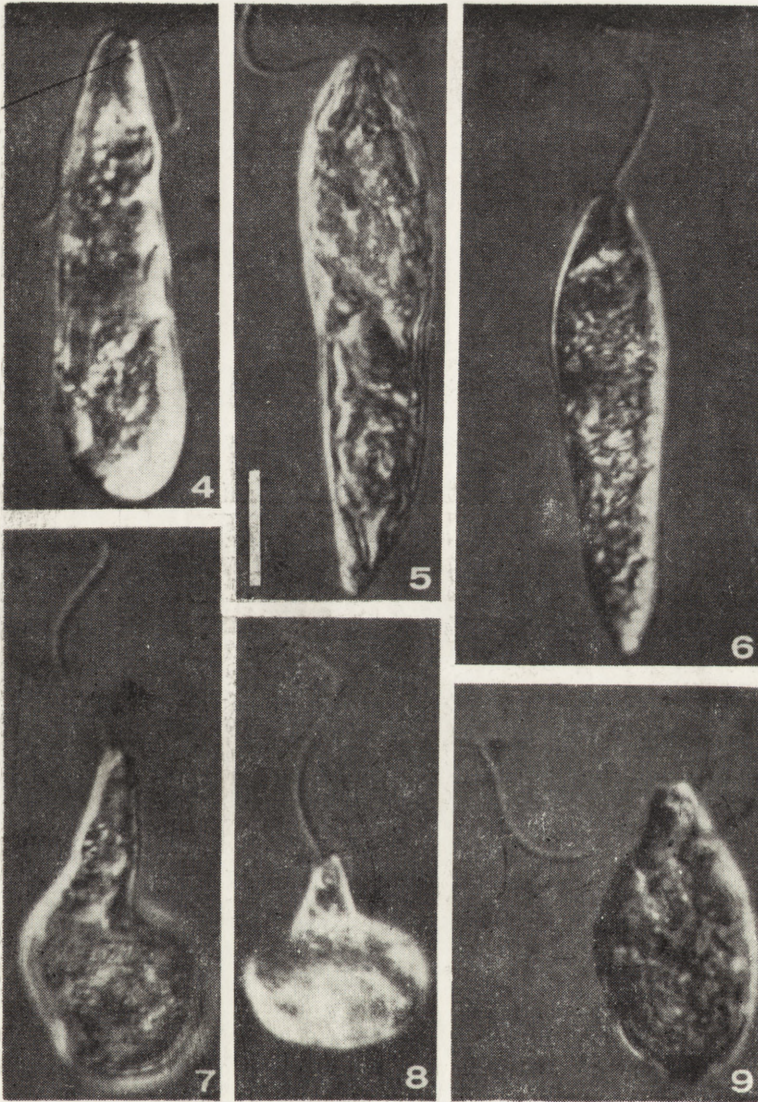
Ryc. 2. Schemat rezerwuaru *Euglena gracilis*

F<sub>1</sub> — wici lokomotoryczna; F<sub>2</sub> — wici zredukowana; PFB — ciało przywiciowe; S — stigma; mo — mikrotubule okrężne; mp — mikrotubule podłużne; sf — struktura fibrylarna; f — filamenty łączące mikrotubule podłużne z błoną rezerwuaru



Ryc. 3. Schemat reakcji fotofobowych u *Euglena gracilis* [99]  
strzałki wskazują kierunek płynięcia

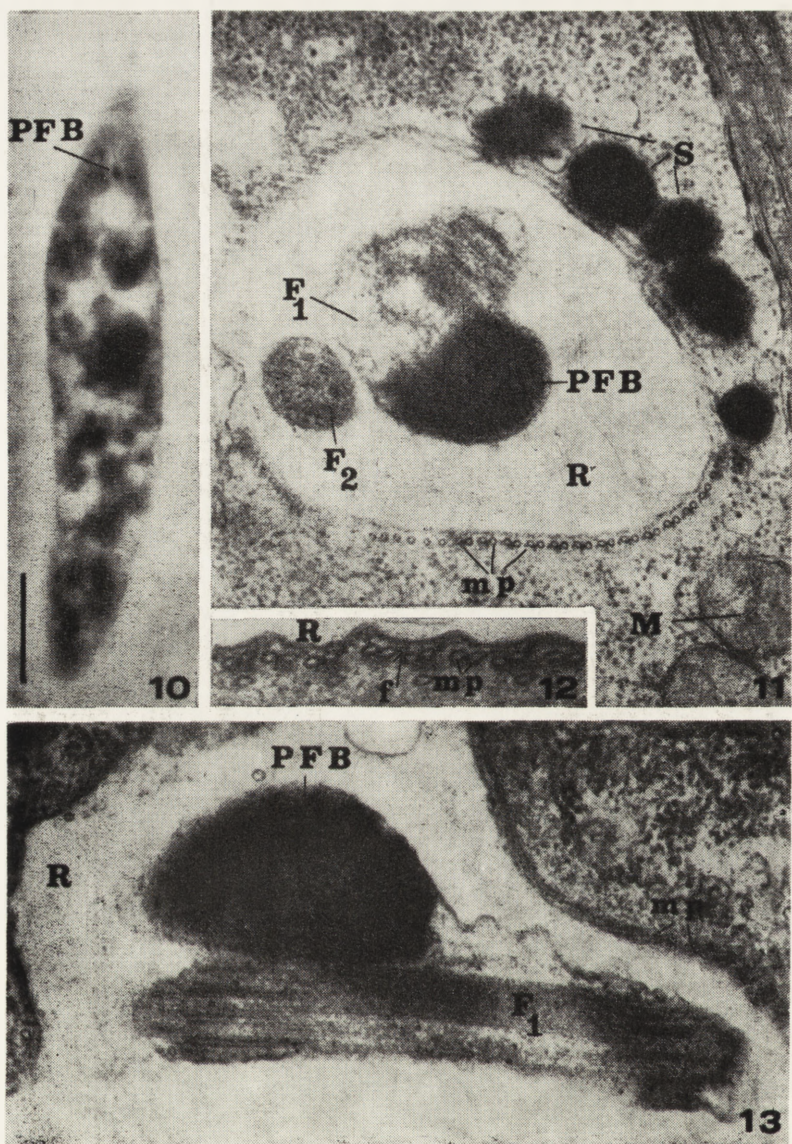




Ryc. 4-9. Reakcja fotofobowa step-up u *Euglena gracilis*

4 — wić w położeniu wzdłuż ciała; 5 — minimalna reorientacja wici; 6 — maksymalna reorientacja wici; 7, 8 — skurcz komórki; 9 — renormalizacja — powrót wici do położenia wzdłuż ciała i wydłużanie się komórki; obrazy uzyskane w mikroskopie świetlnym, skala — 10  $\mu$ m





Ryc. 10. Ciało przywiciowe (PFB) widoczne w utrwalonej osmem komórce *Euglena gracilis*

obraz uzyskany w mikroskopie świetlnym, skala — 10  $\mu$ m

Ryc. 11. Przekrój poprzeczny przez rezerwuuar *Euglena gracilis* na poziomie stigmaty i PFB

obraz uzyskany w mikroskopie elektronowym,  $\times 30\ 000$

Ryc. 12. Fragment przekroju poprzecznego rezerwuuaru u *Euglena gracilis*. Widoczne filamenty łączące mikrotubule podłużne z błoną rezerwuuaru

obraz uzyskany w mikroskopie elektronowym,  $\times 60\ 000$

Ryc. 13. Przekrój podłużny przez rezerwuuar, wić lokomotoryczną i PFB, obraz uzyskany z mikroskopu elektronowego,  $\times 54\ 000$

oznaczenia do ryc. 11, 12, 13: F<sub>1</sub> — wić lokomotoryczna; F<sub>2</sub> — wić zredukowana; R — rezerwuuar; PFB — ciało przywiciowe; S — stigma; M — mitochondria; mp — mikrotubule podłużne; f — filamenty łączące mikrotubule podłużne z błoną rezerwuuaru



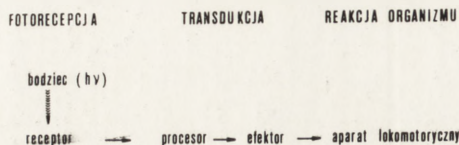


Ryc. 14. *Astasia longa* widoczna w mikroskopie świetlnym  
(skala 10  $\mu\text{m}$ )

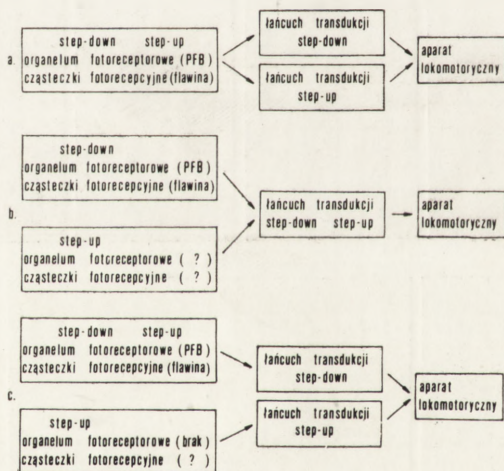
Ryc. 15-17. Reakcja fotofobowa *Peranema trichophorum*  
15 — komórka normalnie pływająca; 16, 17 — kurcząca się

Ryc. 18-20. Różne położenia wici u *Astasia longa*

18 — położenie wzdłuż ciała; 19 — minimalna reorientacja; 20 — maksymalna reorientacja;  
komórki impregnowane protargolem, obrazy uzyskane w mikroskopie świetlnym [92],  $\times 1000$



Ryc. 21. Łańcuch fotosensoryczny u *Euglena gracilis*



Ryc. 22. Hipotezy dotyczące fotorecepcji i fototransdukcji u *Euglena gracilis*

a — jeden rodzaj cząsteczek fotorecepcyjnych (flawina) i jedno organelum fotoreceptorowe (PFB) odpowiedzialne za obydwie reakcje fotofobowe; b — oddzielne cząsteczki fotorecepcyjne i organela fotoreceptorowe dla każdej z reakcji fotofobowych; c — jeden rodzaj cząsteczek fotorecepcyjnych (flawina) i jedno organelum fotoreceptorowe (PFB), odpowiedzialne za obydwie reakcje fotofobowe oraz dodatkowe cząsteczki fotorecepcyjne dla reakcji step-up



homologiczne do PFB. Tak więc *Euglena gracilis* jest szczególnym wiciowcem mającym fotoreceptor w postaci wyspecjalizowanego organelum.

*Astasia longa* nie różni się wyglądem zewnętrznym od *Euglena gracilis* (ryc. 14), nie ma jednak chloroplastów, stigmy i PFB (ryc. 18-20). Po odkryciu zdolności do reagowania na bodźce świetlne, *Astasia* stała się szczególnie interesującym obiektem badań mechanizmów fotoreakcji. Poznanie bowiem jej fotobehavioru rzuca światło nie tylko na zagadnienia mechanizmów kierujących fotoreakcjami innych wiciowców bezbarwnych, ale pozwala lepiej poznać istotę fotoreakcji organizmów fotosyntetyzujących.

*Peranema trichophorum* jest wiciowcem bezbarwnym (ryc. 15), którego głównym sposobem poruszania się jest pełzanie, choć również może pływać w toni wodnej. Pełzanie polega na tym, że komórka, wzdłuż której przebiegają fale perystaltyczne, ciągnięta jest po podłożu przez wić lokomotoryczną. Podobnie jak *Euglena gracilis* i *Astasia longa*, *P. trichophorum* ma dwie wici, z których jedna jest wicią lokomotoryczną. U wici lokomotorycznej, skierowanej do przodu, pracuje jedynie część dystalna, zgięta pod kątem  $90^\circ$  w stosunku do reszty [20, 73, 84].

### III. REAKCJE FOTOFOBOWE

*Euglena gracilis* reaguje zarówno na gwałtowne obniżenie, jak i zwiększenie natężenia światła, czyli wykazuje obydwie reakcje fobowe: step-up i step-down. Obie reakcje przejawiają się w podobny sposób: wić z położenia wzdłuż ciała, charakterystycznego dla komórki normalnie pływającej (ryc. 3, 4), przechodzi do położenia prostopadłego do podłużnej osi komórki (ryc. 3, część górna, 5). Taka minimalna reorientacja wici powoduje, że komórka nie może płynąć do przodu. Ponieważ wić w dalszym ciągu pracuje normalnie, jak w komórce niestymulowanej [41], zmiana jej położenia powoduje więc rotację całej komórki (ryc. 3, część górna). W środowisku wodnym o normalnej lepkości minimalna reorientacja wici (ryc. 5) wystarcza, aby komórka rotowała i szybko zmieniała kierunek ruchu. W pewnych okolicznościach, np. w obecności czynnika mechanicznego, utrudniającego pływanie (w środowisku o podwyższonej lepkości), lub pod wpływem silnego bodźca świetlnego (jeśli trwa on wystarczająco długo) zachodzi maksymalna reorientacja wici [95]. Polega ona na ustawieniu wici z przodu komórki (ryc. 6). Do reakcji wici dołączają się skurcze ciała eugleny (ryc. 7, 8). Skurczona komórka, w środowisku o niskiej lepkości, rotuje. Renormalizacja rozpoczyna się od powrotu wici do pozycji wzdłuż ciała, po którym następuje wydłużanie się komórki (ryc. 9).

*Astasia longa* reaguje jedynie na nagłe zwiększenie natężenia światła

stymulującego. Sama jednak reakcja step-up w środowisku o niskiej i podwyższonej lepkości przejawia się podobnie jak u *Euglena gracilis* [92, 128]. Reorientacja wici przedstawiona jest na ryc. 18-20.

*Peranema trichophorum*, podobnie jak *Astasia longa*, reaguje tylko na nagłe zwiększenie natężenia światła [93, 120, 121]. Odpowiedzią *Peranemy* na bodziec świetlny jest zmiana charakteru pracy wici, prowadząca do zatrzymania pełzania i pojawienie się skurczu ciała komórki (ryc. 15-17).

#### IV. ŁAŃCUCH FOTOSENSORYCZNY U *EUGLENA GRACILIS*

Łańcuchem fotosensorycznym nazywamy proces fizjologiczny, który rozpoczyna się absorpcją światła przez organizm a kończy jego reakcją lokomotoryczną (ryc. 21). Dotychczas u żadnego pierwotniaka nie zidentyfikowano wszystkich komponentów łańcucha fotosensorycznego. W każdym jednak systemie bodziec — reakcja muszą być zawarte następujące elementy:

1. Fotoreceptor (wyodrębniony morfologicznie bądź rozproszony) absorbujący światło i przetwarzający je w sygnał fizjologiczny.

2. Procesor, połączony z komparatorem, decydujący o tym, czy impuls otrzymany przez komórkę zapoczątkuje reakcję lokomotoryczną, czy nie. A więc procesor odpowiedzialny jest za progi reakcji, a w przypadku organizmów zdolnych do reakcji fotofobowych, które wymagają od komórki zdolności „pamiętania” natężenia poprzedniego bodźca, za porównanie natężeń impulsów.

3. Efektor powodujący na sygnał procesora reorientację wici. Nie należy efektora utożsamiać z mechanizmem napędowym wici, który może działać niezależnie od tego, czy jest stymulowany, czy nie. U *Euglena gracilis* i innych wiciowców nie poznano struktur, które pełniłyby rolę efektora.

##### IV. 1. FOTORECEPCJA

Podstawowymi elementami każdego fotoreceptora są cząsteczki fotorecepcyjne. Informacji o naturze chemicznej fotoreceptora dostarcza przede wszystkim porównanie widma czynnościowego z widmem absorpcji znanych pigmentów, mimo że nie zawsze ustalenie aktywności widmowej pozwala na definitywne określenie charakteru cząsteczek fotorecepcyjnych. Dzieje się tak np. wówczas, gdy aktywny zakres widma jest absorbowany przez kilka różnych barwników. Ma to miejsce np. u *E. gracilis*, gdzie niebieskie światło jest absorbowane nie tylko przez żółty barwnik — flawinę (podejrzaną o udział w fotorecepcji), ale również



przez obydwu barwniki fotosyntetyzujące — chlorofil i karotenoidy. Dlatego wielu autorów używało do badań komórek pozbawionych chlorofilu i częściowo lub całkowicie barwników stigmaty (przede wszystkim karotenoidów) [14, 17, 43, 59, 91, 136].

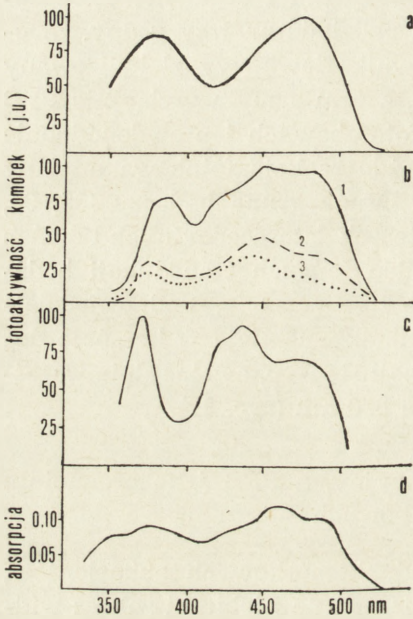
Poglądy dotyczące cząsteczek fotorecepcyjnych i organeli fotoreceptorowych w komórkach *E. gracilis* można podzielić na trzy grupy. Zwolennicy pierwszej [17, 26] sądzą, że barwnik flawinowy zlokalizowany w PFB jest barwnikiem fotorecepcyjnym, a tym samym wyłącznie PFB jest fotoreceptorem dla obydwu reakcji fotofobowych i prawdopodobnie w ogóle fotobehawioru tego wiciowca. Każda reakcja fotobowa miałaby natomiast oddzielny łańcuch transdukcji. Druga grupa badaczy [35, 94, 95] zakłada obecność dwóch rodzajów cząsteczek fotorecepcyjnych i dwóch organeli fotoreceptorowych, natomiast jeden łańcuch transdukcji bodźca. Mikołajczyk [91] wysunęła hipotezę, że flawina w PFB odpowiedzialna jest za obydwie reakcje fotofobowe, jednakże istnieją w komórce dodatkowe cząsteczki fotorecepcyjne dla reakcji step-up, ewolucyjnie wcześniejsze, których widmo czynnościowe sięga 550 nm (ryc. 22).

#### IV. 1. 1. Flawina jako barwnik fotorecepcyjny, a PFB jako organelum fotoreceptorowe dla obydwu reakcji fotofobowych

*Euglena gracilis*, jak wiele innych jednokomórkowych eukariontów, jest od dawna znana ze szczególnej wrażliwości na niebieski zakres widma [21, 51]. Obserwowano również, że najwrażliwszy na światło jest przedni koniec [74, 127], a więc tam należy doszukiwać się fotoreceptora niebieskiego światła. Pod uwagę brane były zarówno stigma, jak i ciało przywiciowe (PFB) jako bezspornie biorące udział w fotoreakcjach *Euglena gracilis* [3, 86, 130].

W 1956 roku Pringsheim [116], po zbadaniu fotobehawioralnej wrażliwości widmowej *E. gracilis*, wskazuje na flawinę jako pigment fotorecepcyjny. Późniejsze, dokładniejsze badania potwierdzają tę hipotezę [4, 18, 19, 24, 32, 33, 42, 46, 56, 108, 129, 135]. Checcucci i wsp. [17] porównali widma czynnościowe zarówno fotoakumulacji komórek zielonych i etiolowanych, a więc pozbawionych chlorofilu i częściowo barwników stigmaty, jak i fotodyspersji komórek odbarwionych streptomycyną — pozbawionych zarówno chlorofilu, jak i barwników karotenoidowych (ryc. 23b) z widmem absorpcji flawoproteiny (ryc. 23d). Należy podkreślić, że wszystkie trzy rodzaje komórek miały nie naruszone PFB. Uzyskane krzywe widmowe nie różniły się zasadniczo od siebie. Pozwoliło to autorom na wysunięcie wniosku, że za obydwie reakcje fotofobowe, a prawdopodobnie i za wszystkie inne fotoreakcje, odpowiedzialny jest barwnik flawinowy. Krzywe widm czynnościowych dla reakcji step-down (ryc. 23c), uzyskane przez Barghigianiego i wsp. [4], i fotoakumulacji

(ryc. 23a), otrzymane przez Diehna [33], są w podobne do widm uzyskanych przez Checcuccię i wsp. [17]. Ukazała się praca Lenciego i wsp. [82] dostarczająca dowodów na flawinowy charakter barwnika warunkującego ujemną fototaksję u *E. gracilis*.



Ryc. 23. Widma czynnościowe u *Euglena gracilis* [26]

a — fotoakumulacji komórek zielonych badanej przez Diehna [33]; b — fotoakumulacji komórek zielonych — 1, fotoakumulacji komórek etiolowanych — 2, fotodispersji komórek odbarwionych streptomycyną — 3, badanych przez Checcuccię i wsp. [17]; c — reakcji step-down u pojedynczych komórek, Barghigiani i wsp. [4]; d — absorpcji flawoproteiny określonej przez Colombettiego i wsp. [27]

Badania in vivo fluorescencji komórek *E. gracilis* [10, 11, 58] wykazały, że przednia część komórki, w miejscu gdzie znajduje się PFB, wykazuje żółtozieloną fluorescencję charakterystyczną dla flawiny. Wskazywałoby to na flawinę jako barwnik fotorecepcyjny i ponadto na PFB jako na organelum fotoreceptorowe. Potwierdzeniem hipotezy o istnieniu jednego fotoreceptora — PFB u *E. gracilis* były doświadczenia nad stymulacją różnych obszarów komórki wiązką laserową [26]. Okazało się, że obydwie reakcje fotofobowe można było wywołać jedynie wówczas, gdy naświetlano obszar, gdzie znajduje się PFB.

IV. 1. 2. Prawdopodobieństwo występowania dwóch rodzajów cząsteczek fotorecepcyjnych i dwóch organeli fotoreceptorowych.

Możliwość występowania w komórce *E. gracilis* dwóch rodzajów cząsteczek fotorecepcyjnych: flawiny (w PFB) dla reakcji step-down i fotoakumulacji, cząsteczek fotorecepcyjnych o niezidentyfikowanej naturze dla reakcji step-up i fotodispersji, oraz dwóch fotoreceptorów oddziel-



nych dla każdej z tych reakcji (jednym z nich jest PFB), zakładał Diehn [35]. Uczynił to na podstawie wyników wcześniejszych badań nad wpływem jodku potasu na fotoakumulację komórek [42] i porównaniu widma absorpcji ryboflawiny z widmem czynnościowym fotoakumulacji [33].

Absorpcja światła przez flawinę prowadzi do jej elektronowego wzbudzenia. Proces ten nie występuje u barwników karotenoidowych [123]. Jeśli więc w komórkach *E. gracilis* miałyby miejsce wzbudzenie flawiny, to substancje, które wygaszają ten stan, powinny wpływać hamująco na jej fotoreakcje. Nie powinny natomiast wpływać na zachowanie się komórek, gdyby barwnikiem były np. karotenoidy. Znanym czynnikiem, który wygasza stan wzbudzenia flawiny, nie wpływając na karotenoidy, jest właśnie jodek potasu [109, 123]. Związek ten istotnie hamuje fotoakumulację euglen, a widmo czynnościowe dla tej reakcji pokrywa się z widmem absorpcji ryboflawiny. Dalsze badania nad wpływem na reakcje fotofobowe KJ [94] i detergentów [96] potwierdzały tę hipotezę. Oba czynniki działały bowiem wybiórczo, hamując reakcję step-down, nie wywierały natomiast wpływu na reakcję step-up. Wydawało się więc prawdopodobne, że za reakcję step-down odpowiedzialna jest flawina wypełniająca PFB, a za step-up odpowiedzialne są jakieś inne, nieflawinowe cząsteczki fotorecepcyjne, umieszczone poza PFB. Obydwie reakcje fotofobowe miałyby natomiast jeden wspólny łańcuch transdukcji.

#### IV. 1. 3. Prawdopodobieństwo istnienia dodatkowych cząsteczek fotorecepcyjnych dla reakcji step-up

Wiadomo, że komórki zielone i etiolowane *E. gracilis* mają różny próg wrażliwości dla reakcji step-up [17]. Komórki etiolowane są znacznie wrażliwsze na światło i reagują reakcją step-up na natężenie światła powodujące u komórek zielonych reakcję step-down. Szczegółowe badania przy zastosowaniu światła o różnej długości fali, przeprowadzone przez Mikołajczyk [91] wykazały, że obniżeniu progu dla reakcji step-up u komórek etiolowanych towarzyszy rozszerzenie widma czynnościowego dla tej reakcji do 535 nm, podczas gdy komórki zielone wykazują reakcję step-up w zakresie widma nie przekraczającym 520 nm (tab. 1). Obniżenie progu obserwowane jest u obydwu rodzajów komórek po zmianie środowiska zewnętrznego z hodowlanego na buforowe. Zjawisku temu towarzyszy rozszerzenie widma czynnościowego dla reakcji step-up w komórkach zielonych do 535 nm, a etiolowanych — do 550 nm. Ponieważ wiadomo, że flawina nie absorbuje światła powyżej 520 nm, muszą więc być w komórce dodatkowe cząsteczki fotorecepcyjne. Potwierdzać to mo-

że udowodniona przez Hädera i Melkoniana [64] wrażliwość zielonej *E. mutabilis* na światło o długości fali do 660 nm.

Lokalizacja dodatkowych cząsteczek fotorecepcyjnych w komórkach *E. gracilis* nie jest pewna. Ponieważ, jak wykazały doświadczenia Colombettiego i wsp. [26], stymulacja wiązką laserową jedynie regionu PFB wywołuje pojawienie się obydwu reakcji fotofobowych, wydaje się więc, że cząsteczki fotorecepcyjne umieszczone mogą być w błonie wici na poziomie PFB. Jest to tym bardziej możliwe, że błona na poziomie PFB jest inaczej zbudowana niż błona pozostałej części wici [118].

TABELA 1

Widmo czynnościowe dla reakcji step-up u <i>E. gracilis</i> [nm]	<u>zielone</u>	<u>etiolowane</u>
	środowisko hodowlane	350-520
po przepłukaniu	350-535	350-550

Wydawało się, że dowodów na którąś z omówionych tu hipotez dostarczy zbadanie wpływu pronazy na reakcje fotofobowe *E. gracilis* [133]. Było to o tyle obiecujące, że pronaza ma bardzo silny wpływ na PFB u utrwalonych komórek *E. gracilis* [2]. Niestety, wyniki uzyskane *in vivo* nie rozstrzygnęły tego problemu. Pronaza nie powodowała widocznych zmian morfologicznych w PFB (jak przy stosowaniu *in vitro*), hamowała natomiast reakcję step-down, gdy wpływ jej na reakcję step-up był znacznie mniejszy. Powrót zdolności komórek do reagowania na zwiększenie natężenia światła (step-up) po usunięciu pronazy ze środowiska zachodzi w ciągu kilku minut, natomiast na zmniejszenie natężenia światła (step-down) dopiero po około 2 godz. od chwili przepłukania. Możliwe jest więc działanie pronazy w kilku miejscach łańcucha fotosensorycznego. Pronaza może oddziaływać zarówno na fotoreceptor, łańcuch transdukcji, jak i na aparat lokomotoryczny. Jeśli przyjmiemy, że PFB jest fotoreceptorem dla obydwu reakcji fotofobowych, to wpływ na nie pronazy powinien być podobny. Ponieważ pronaza znacznie silniej wpływa na reakcję step-down, wydaje się więc, że zaatakowany jest łańcuch transdukcji odpowiedzialny za tę reakcję. Jeśli przyjmiemy hipotezę o istnieniu dwóch rodzajów cząsteczek fotorecepcyjnych (oddzielnych dla reakcji step-down i step-up), to uzyskane wyniki wskazują, że pronaza działa destrukcyjnie na cząsteczki odpowiedzialne za reakcję step-down.



Sprawę komplikuje fakt, że pronaza wpływa hamująco na szybkość pływania komórek, a więc może również oddziaływać na błonę wici lokomotorycznej. Sprawa więc liczby organeli fotoreceptorowych, jak i rodzajów cząsteczek fotorecepcyjnych pozostaje w dalszym ciągu w sferze nie rozstrzygniętych hipotez.

#### IV.1.4. Budowa PFB

Ciało przywiciowe (PFB) leży pod błoną wici lokomotorycznej nie-daleko jej podstawy (ryc. 1, 2, 10, 11, 13). Wewnętrzna struktura PFB u *E. gracilis* była badana przez wielu biologów [2, 10, 34, 54, 75, 76, 79, 80, 111, 112, 132]. Ma ono formę krystaliczną o wymiarach  $8,9 \times 7,7 \times 8,3$  nm o lekko zaburzonym wzorze heksagonalnym [111]. Wiele badań wskazuje, że ma ono właściwości dwójłomne [10, 31, 33, 135]. Jego położenie jest stałe, o określonej orientacji w stosunku do aksonemy i tzw. pałeczki przywiciowej (paraflagellar rod — PFR), biegnącej wzdłuż aksonemy od podstawy do końca wici. Ustalono metodami cytochemicznymi, że barwnik flawinowy w PFB związany jest z białkami, nie stwierdzono natomiast obecności ani lipidów, ani wielocukrów.

Robenek i Melkonian [118], badając PFB metodą kriorytownictwa (freeze fracturing) wykazali nie tylko różną budowę błony wici na poziomie PFB, ale wykryli połączenie, w ich przekonaniu stałe, na krótkim odcinku między PFB i plazmolemą. Wskazywałyoby to na specjalne właściwości fragmentu błony, która mogłaby odgrywać istotną rolę w transdukcji bodźców. Mogłoby więc to być miejsce, gdzie, według Doughty i wsp. [50], pompa Na/K jest związana z procesem fototransdukcji u *E. gracilis*. Wyniki te nie są zaskakujące. Powiązanie bowiem barwnika fotoreceptora ze strukturami błonowymi sugerował również Haupt [66].

#### IV.1.5. Rola stigmaty w fotobehawiorze *Euglena gracilis*

Stigma jest drugim, obok PFB, organelum warunkującym fotobehawior *E. gracilis*. Stigmą nazywa się skupisko obłonionych, osmofilnych, czerwonopomarańczowych kropli zawierających głównie karotenoidy [6, 8, 9, 13, 68, 69, 131, 134]. Krople stigmaty ułożone są wzdłuż ściany rezerwuaru (ryc. 1, 2, 11) na długości 2-3  $\mu\text{m}$ . Oprócz karotenoidów, Sperling-Pagni i wsp. [126] wykazali obecność w stigmatie niewielkich ilości flawiny. Wielkość stigmaty i natężenie jej barwy są zależne od obecności barwnych karotenoidów [70]. Tworzenie ich uwarunkowane jest obecnością światła.

#### IV.1.5.1. Ekranizująca funkcja stigmy

Spór o to, czy stigma gra czynną rolę jako fotoreceptor, czy bierną jako ekran osłaniający PFB przed światłem, toczył się dość długo. Obecnie przeważa opinia o jej biernej, ekranizującej roli w fotobehawiorze *E. gracilis*. Badania spektroskopowe i fotochemiczne stigmy [67, 14, 125] wykazały, że karotenoidy nie mogą pełnić roli barwnika fotorecepcyjnego u eugleny, nie są bowiem zdolne do zainicjowania pierwszej fotoreakcji w łańcuchu sensorycznym. Wykrycie jednak flawiny w stigmie przyczyniło się do wysunięcia hipotezy, że stigma mogłaby, oprócz osłaniania PFB, pełnić czynną rolę w procesach fotorecepcji u *E. gracilis*.

Dalszych dowodów na ekranizującą rolę stigmy dostarczyły badania fotoreakcji komórek etiolowanych. Zielone, fotosyntetyzujące komórki *E. gracilis*, ze stigmą o głębokiej, czerwonopomarańczowej barwie reagują zarówno na zmniejszenie, jak i na zwiększenie natężenia światła. Inaczej zachowują się komórki hodowane w ciemności, w których przepuszczalność światła przez krople stigmy zwiększa się do około 70% [9]. Wprawdzie w dalszym ciągu mają zachowaną zdolność do reakcji step-down i step-up, jednak fotoakumulacja w porównaniu do fotoakumulacji komórek zielonych zredukowana jest do 50%. Komórki pozbawione na stałe (pod wpływem streptomycyny) zarówno chlorofilu, jak i barwników stigmy, nie wykazują ani reakcji step-down, ani fotoakumulacji. Zdolne są jedynie do reakcji step-up i fotodispersji [17, 28]. Z danych tych wynika, że stigma jest konieczna dla reakcji step-down, fotoakumulacji i prawdopodobnie fototaksji dodatniej, niekonieczna natomiast dla reakcji step-up, fotodispersji i być może fototaksji ujemnej.

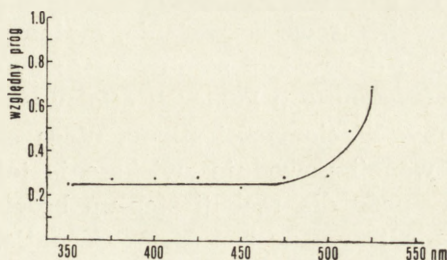
#### IV.1.5.2. Wpływ zabarwienia stigmy na próg wrażliwości dla reakcji step-up

Badania ostatnich lat wykazały, że próg wrażliwości euglen dla reakcji step-up obniża się w zależności od zabarwienia stigmy [17, 28]. Bezbarwne (odbarwione streptomycyną) komórki *E. gracilis* wykazują reakcję step-up w całym zakresie badanego natężenia światła [17], a u komórek hodowanych w ciemności próg wrażliwości dla reakcji step-up obniża się do poziomu progu reakcji step-down komórek zielonych [28].

Szczegółowe badania różnic we wrażliwości na światło euglen zielonych i etiolowanych, przy różnych długościach fali światła stymulującego, przeprowadzone przez Mikołajczyk [91] wykazały, że wrażliwość komórek etiolowanych jest kilkakrotnie większa niż zielonych w zakresie widma 350-475 nm. Powyżej tego zakresu wrażliwość komórek etiolowa-



nych obniża się, a przy 525 nm są one już tylko niewiele wrażliwsze od zielonych (ryc. 24). Odbarwieniu stigmaty towarzyszy lekkie, do 535 nm, rozszerzenie widma czynnościowego dla reakcji step-up. Zagadnienie to zostało omówione już w jednym z poprzednich rozdziałów.



Ryc. 24. Różnice między wrażliwością na światło zielonych i etiolowanych komórek *Euglena gracilis* [91]. Względny próg oznacza stosunek progowego natężenia światła dla reakcji step-up komórek etiolowanych do progowego natężenia światła dla tej reakcji komórek zielonych

Jak już było powiedziane, odbarwieniu stigmaty i całej komórki towarzyszy zanik reakcji step-down [17]; może on jednak występować w różnych okolicznościach, nie zawsze związanych ze stopniem odbarwienia stigmaty, zawsze natomiast towarzyszy mu obniżenie progu wrażliwości dla reakcji step-up. A więc np. obniżenie progu wrażliwości dla reakcji step-up występuje u komórek będących w logarytmicznej fazie wzrostu, kiedy, według interpretacji Colombettiego i wsp. [28], nie działa łańcuch fototransdukcji dla reakcji step-down. Wraz ze starzeniem się hodowli, przy tym samym natężeniu światła stymulującego, zwiększa się procent komórek wykazujących reakcję step-down, a zmniejsza procent komórek wykazujących reakcję step-up (podnosi się bowiem próg wrażliwości dla tej reakcji). Zahamowanie zaś reakcji step-down pod wpływem detergentów powoduje jednoczesne obniżenie progu wrażliwości dla reakcji step-up [96]. A więc przy natężeniu światła, dla którego u komórek kontrolnych występowała reakcja step-down, u traktowanych detergentem CTAB występowała reakcja step-up.

Innym, interesującym przykładem warunków, w których wraz z zanikiem reakcji step-down występuje obniżenie progu dla reakcji step-up, jest zmiana środowiska zewnętrznego z hodowlanego na np. roztwór buforowy, zawierający jedynie jony konieczne do normalnego funkcjonowania wici, a więc  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  [91, 101]. Zjawisko czasowe (na kilka godzin) zaniku reakcji step-down u komórek przepłukanych buforem po raz pierwszy obserwowali Doughty i Diehn [45]. Nie zależy ono od środowiska hodowlanego i nie jest spowodowane szokiem mechanicznym przy wirowaniu komórek w czasie przepłukiwania. Zarówno szyb-

kość powracania tej reakcji, jak i jej siła zależą w dużym stopniu od obecności w środowisku jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^+$ , nie zależą natomiast od jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  [48]. Wraz z powrotem reakcji step-down próg dla reakcji step-up podnosi się do poziomu sprzed przepłukania. Podłoże molekularne tego zjawiska do tej pory nie jest znane.

Podsumowując dotychczasowe rozważania, można stwierdzić, że obniżenie progu wrażliwości dla reakcji step-up może być stałe lub czasowe [91]. Obniżenie stałe występuje u komórek etiolowanych i jest związane z zabarwieniem stigmaty. W ciemności stigma ulega częściowemu odbarwieniu, co w konsekwencji powoduje zwiększenie jej przepuszczalności dla światła. Obniżony próg dla reakcji step-up będzie trwał tak długo, jak długo komórki będą trzymane bez dostępu światła. Czasowym, trwającym zwykle kilka godzin obniżeniem progu będzie np. obniżenie wywołane wymianą środowiska zewnętrznego. Z chwilą samoistnego powrotu reakcji step-down, próg dla reakcji step-up podniesie się do stanu wyjściowego.

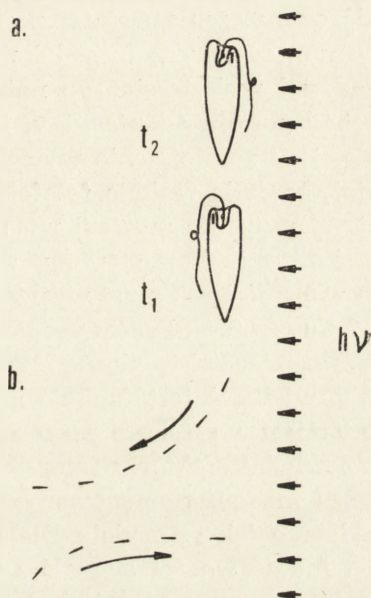
Zjawisko obniżenia progu dla reakcji step-up obserwowano również u *Astasia longa* [92]. Spowodowane ono było, podobnie jak u *E. gracilis*, zmianą środowiska zewnętrznego. Można więc wnioskować, że obniżenie progu dla reakcji step-up, spowodowane zmianą środowiska, nie zależy od obecności ani stigmaty, ani PFB.

#### IV.1.6. Mechanizm fototaksji

Przyjmuje się, że fototaksja u *Euglena gracilis* jest wynikiem serii reakcji fotofobowych step-down i step-up, korygujących kierunek ruchu [15, 26, 32, 38]. Komórka musi więc umieć rozpoznawać położenie źródła światła [52]. Przy bocznym oświetleniu, w obecności stigmaty i przy helikalnym poruszaniu się organizmu światło periodycznie oświetla fotoreceptor. W czasie  $t_1$  będzie więc on np. znajdował się pod bezpośrednim wpływem światła, aby za chwilę, w czasie  $t_2$ , być od niego osłoniętym przez stigmę (ryc. 25a). Stigma absorbuje część padającego na nią światła, w konsekwencji czego mniej światła może zaabsorbować fotoreceptor. Fotoreceptor ma zdolności porównywania natężeń światła odebranych w różnym czasie [52]. *Euglena* odbierając więc dwa różne sygnały może określić z której strony pada światło i skorygować, poprzez reakcję fobową, swoją pozycję. W przypadku fototaksji dodatkowo, za każdym razem, kiedy stigma jest ustawiona między źródłem światła a fotoreceptorem, pojawia się reakcja step-down, która powoduje zmianę położenia komórki. Taka stopniowa korekcja trwa dopóty, dopóki komórka nie będzie zorientowana w kierunku światła, a więc dopóki fotoreceptor nie będzie stale oświetlony (ryc. 25b). W przypadku fototaksji ujemnej eugleny,



poprzez reakcję step-up, ustawiają się tylnym końcem ciała do źródła światła, co powoduje, że chloroplasty spełniać mogą dodatkowo rolę osłaniającą PFB [9]. Foster i Smyth [55] wskazali na analogię między śledzeniem przez komórkę kierunku padania światła a działaniem radaru.



Ryc. 25. Mechanizm fototaksji u *Euglena gracilis*

a — położenie komórki w stosunku do źródła światła w czasie  $t_1$  i  $t_2$ ; b — stopniowa korekcja poprzez reakcje fotofobowe, kierunku pływania od źródła światła i do niego

Omówiony tu mechanizm fototaksji oparty jest na założeniu, że za orientację komórek w stosunku do padającego światła odpowiedzialne są reakcje fobowe. Nie można jednak pominąć stwierdzenia, że fototaksje mogą być niezależne od reakcji fotofobowych [23]. Okazało się, że fototaksja ujemna może być wywołana światłem o natężeniu znacznie mniejszym od tego, jakie jest potrzebne do wywołania reakcji step-up [23]. Ponadto  $\text{NaN}_3$  — hamujący fototaksję ujemną, a  $\text{TPMP}^+$  — dodatnią, nie mają żadnego wpływu na reakcje fotofobowe [5]. Tak więc mechanizm orientacji komórek w stosunku do źródła światła ponownie stał się zagadnieniem otwartym.

#### IV.1.7. Molekularne podłoże fotorecepcji i transdukcji bodźców

Penzer i Radda [109] oraz Song i Moore [123] wykazali, że absorpcja światła powoduje elektronowe wzbudzenie flawiny do stanu tripletowego. Na tej podstawie oraz na podstawie badań własnych nad wpływem jodku potasu na fotobehawior *E. gracilis*, Diehn i Kint [42] wysunęli hipotezę o flawinowym podłożu fotorecepcji (omówione w jednym z poprzednich rozdziałów). Pozostaje jednak problemem otwartym, w jaki sposób sygnał

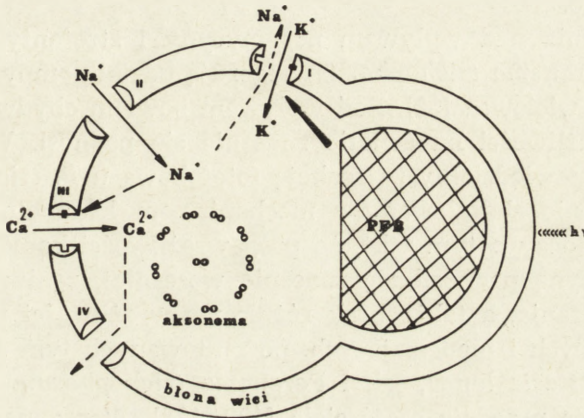
z fotoreceptora jest przenoszony do efektora zawiadującego mechanizmem kontrolującym pracę wici. Najbardziej przekonującą hipotezę transdukcji przedstawił Diehn [35-37]. Według niej system transdukcji u euglen adaptuje się do zewnętrznych warunków świetlnych. W celu wywołania reakcji fotofobowej, natężenie światła stymulującego musi znacznie się różnić od natężenia światła poziomu adaptacyjnego. Wiciowiec z zaadaptowanym systemem transdukcji do światła o niskim natężeniu będzie wykazywał reakcję step-up natychmiast po zwiększeniu natężenia znacznie ponad poziom adaptacyjny, i odwrotnie, po adaptacji do dużego natężenia, jego zmniejszenie wywoła reakcję step-down. Diehn podkreśla również, że dwie reakcje fotofobowe nie mogą wystąpić jednocześnie. Reakcja step-up nie wystąpi więc u komórek, które właśnie zaczęły wykazywać silną reakcję step-down. Takie zachowanie się organizmu wskazuje, że w komórkach musi występować przetwarzanie sygnałów dostarczanych z fotoreceptora. Procesor, według Diehna, może więc być traktowany jako urządzenie elektroniczne. Wejście jego zawiera sygnał elektryczny, którego wielkość jest funkcją natężenia padającego na fotoreceptor światła, natomiast wyjście z procesora zawiera już „rozkazy”, które aktywują odpowiedni efektor.

W modelu proponowanym przez Piccini i Omodeo [112] zakłada się, podobnie jak w modelu Diehna, że komórka zdolna jest do porównywania intensywności sygnałów wysyłanych przez fotoreceptor, a więc ma zdolność porównywania kolejnych sygnałów. Reakcja fotofobowa pojawia się wówczas, gdy komórka jest w stanie wykryć różnice w zmianach natężenia światła. Różnice w natężeniu sygnałów byłyby rozróżniane przez komparator (nazywany przez Diehna procesorem). Komparator umiejscowiony byłby u podstawy wici. Rolę efektoru pełniłyby z kolei fibryle o naturze, być może, aktomiozynowej, leżące między podłużnymi a okrężnymi mikrotubulami na wysokości szyjki rezerwuaru (ryc. 2). Ich skurcz zmieniałyby kształt rezerwuaru, co w konsekwencji prowadziłoby do reorientacji wici i reakcji całej komórki. Na istnienie u *E. gracilis* F-aktyny wskazują doświadczenia przeprowadzone przez Bassi i Domini [7]. Poli i wsp. [113], stosując te same metody, nie potwierdzili jednak tego. Wcześniejsze badania nad wpływem cytochalazyny B i C [29] na komórki *E. gracilis* również nie wskazywały na aktywny charakter fibryli u tych wiciowców. Aktynopodobne białka zidentyfikowano natomiast w komórkach innego wiciowca euglenoidalnego — *Distigma proteus* [57]. Rolę efektoru przypisuje się również PFR [16, 77] lub aksonemie wici lokomotorycznej [77]. Znalazienie w PFR aktywnej ATP-azy [110] silnie wspiera hipotezę o roli tej struktury jako efektoru w łańcuchu fototransdukcji u *E. gracilis*.

Próbie znalezienia jonowego mechanizmu reakcji step-down podjęli



Doughty i Diehn [45, 47, 49] oraz Doughty i wsp. [50]. Uważają oni, że w tej reakcji fotofobowej bierze udział pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  w błonie wici lokomotorycznej. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawili model jonowego mechanizmu kierującego reakcją step-down (ryc. 26). Według



Ryc. 26. Schemat zaproponowanego przez Doughty i Diehna [45] oraz Doughty i wsp. [50] jonowego mechanizmu reakcji step-down [26, 83] (zmieniony)

tego modelu światło zaabsorbowane przez flawinę w PFB aktywuje pompę  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (poziom adaptacyjny — I). W momencie kiedy obniża się natężenie światła, pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  staje się nieaktywna. W następstwie tego w przestrzeni wewnątrzwiciowej zwiększa się stężenie jonów  $\text{Na}^+$  (II), które inicjują następnie otwarcie specyficznych kanałów wapniowych (III), co z kolei powoduje zwiększenie stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wokół aksonemy i reorientację wici. Po reakcji fobowej kanały wapniowe zamykają się i pompa wapniowa (IV) przywraca w wici normalne, niskie ( $10^{-8}$  M) stężenie  $\text{Ca}^{2+}$ .

## V. ŁAŃCUCH FOTOSENSORYCZNY U WICIOWCÓW BEZBARWNYCH

Niejasna jest do tej pory nie tylko natura fotorecepcji dla reakcji step-up u *E. gracilis*, ale również u wiciowców bezbarwnych — *Astasia longa* i *Peranema trichophorum*. Widmo czynnościowe dla reakcji step-up u *A. longa* określone przez Suzaki i Williamsona [128] wskazuje na flawinowy charakter tych cząstek. Po zmianie środowiska z hodowlanego na buforowe, *A. longa*, podobnie jak *E. gracilis*, wykazuje wzrost wrażliwości na światło. Obniżeniu progu dla reakcji step-up u komórek *E. gra-*

*cilis* towarzyszy rozszerzenie widma czynnościowego do 550 nm [91]. Należy sądzić, że to samo zjawisko występuje również u *A. longa*. Jest więc prawdopodobne, że cząsteczki fotorecepcyjne, które u *E. gracilis* odgrywają rolę dodatkową do flawiny w PFB, u *A. longa* są głównymi i jedy-nymi cząsteczkami fotorecepcyjnymi, odpowiedzialnymi za jej wrażliwość na światło.

Doświadczenia nad wpływem perymycyny i strofantyny na reakcję fotofobową *Peranema trichophorum* sugerują udział pompy  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  w fotoreakcji tego wiciowca [92]. Pod wpływem bowiem obydwu tych związków próg wrażliwości na światło znacznie się podnosi. Wydaje się, że mechanizm odpowiedzialny za reakcję fotofobową u *P. trichophorum* nie jest bezpośrednio skorelowany z mechanizmem lokomotorycznym tych komórek. Świadczy o tym fakt, że próg wrażliwości komórek traktowanych perymycyną podnosił się znacznie wcześniej, zanim obserwowano zwolnienie pełzania, a także brak różnic we wrażliwości na światło komórek pełzających i niepełzających, potraktowanych tym antybiotykiem.

Zarówno *Astasia longa*, jak i *Peranema trichophorum* najwrażliwszą na światło mają przednią część ciała [120, 128]. W przypadku *P. trichophorum* nawet wici, które są oderwane od komórki, reagują na światło [120]. Można więc przypuszczać, że najwięcej cząsteczek fotorecepcyjnych będzie zlokalizowanych u tych komórek w błonie wici lokomotorycznej i rezerwuaru [92, 93].

## VI. POWIĄZANIA SYSTEMÓW FOTOSENSORYCZNEGO I FOTOSYNTETY

*Euglena gracilis* należy do autotrofów, u których aparat fotosyntetyzujący nie działa jako fotoreceptor. Powstaje więc pytanie, czy występuje u tego wiciowca jakieś powiązanie między systemami kontrolującymi fotosyntezę i fotoreakcje. Niektórzy badacze zajmujący się tym problemem uzyskali wyniki pozytywne. Stwierdzono m. in., że reakcja step-down i fotoakumulacja są powiązane z fotosyntezą [44, 129]. Wykazano bowiem, że reakcja step-down zahamowana jest pod wpływem DCMU — związku hamującego przepływ elektronów między fotosystemem II a plasto-chinonem [30], jak i CCCP — rozpręgacza fotofosforylacji [1]. Na powiązanie natomiast reakcji step-up z glikolizą lub cyklem oddechowym wskazuje fakt, że reakcję tę mogą wykazywać komórki z upośledzoną fotosyntezą i bezbarwne [36, 38].

Wykazano, że zależności te nie są tak proste. Stwierdzono bowiem, że ogólny inhibitor metabolizmu, jakim jest KCN, nie wpływa na fototaksję ujemną [82], a  $\text{NaN}_3$  — który wprawdzie wygasza stan wzbudzony flawiny, ale znany jest również jako silny rozpręgacz zarówno foto-



jak i oksydatywnej fosforylacji [122], nie ma wpływu na reakcję step-down [5], hamuje natomiast fototaksję ujemną [23]. Powiązanie fotoreakcji z procesami metabolicznymi nie jest nadal wyjaśnione.

## VII. POWIĄZANIA SYSTEMU FOTOSENSORYCZNEGO Z INNYMI SYSTEMAMI SENSORYCZNYMI

### VII. 1. POWIĄZANIE Z SYSTEMEM MECHANOSENSORYCZNYM

Powiązanie systemów foto- i mechanosensorycznych u *Euglena gracilis* było badane przez Mikołajczyk i Diehna [95]. Jednym z przeprowadzonych doświadczeń było badanie zachowania się komórek na granicy faz środowiska o niskiej i wysokiej lepkości (podwyższonej przy użyciu metylcelulozy). W czerwonym świetle (nie percepowanym przez komórki) eugleny dotykające granicy faz prostopadle do niej wpływały do środowiska o dużej lepkości, bez reakcji mechanofobowej. Eugleny w środowisku metylcelulozy były immobilizowane, zachowując swój wydłużony kształt. Doświadczenie to wskazuje, że samo przeniesienie komórek do roztworu metylcelulozy nie powoduje reakcji fobowej organizmu. Gdy takie komórki oświetlimy silnym białym światłem, obserwujemy u wszystkich maksymalną reorientację wici, po której następował skurcz ciała. To samo natężenie światła w środowisku o niskiej lepkości powoduje minimalną reorientację wici i rotowanie komórki, przy czym skurcze ciała nie pojawiają się.

Mikołajczyk i Diehn [96] stwierdzili zróżnicowany wpływ detergentów na błonę komórkową *Euglena gracilis*. Zdjęcia uzyskane z mikroskopu elektronowego wskazują, że detergenty niszczą błonę rezerwuaru i wici, pozostawiając błonę ciała nienaruszoną. Na tej podstawie wysunęli hipotezę o istnieniu u *E. gracilis* dwóch rodzajów błony: typowej, cytoplazmatycznej pokrywającej wici i rezerwuar, oraz błony o odmiennej strukturze, okrywającej resztę komórki. Równolegle ukazały się prace nad błonami komórek *E. gracilis*, u których, za pomocą innych technik, potwierdzono zróżnicowanie w strukturze i we właściwościach błon powierzchniowych [12, 72, 102, 119]. Wydaje się, na podstawie tych prac oraz zachowania się komórek w środowisku o podwyższonej lepkości, że miejsce mechanorecepcji powinno znajdować się w błonie rezerwuaru. Stymulacja mechaniczna błony rezerwuaru powodowałaby przeniesienie impulsów do filamentów łączących błonę z mikrotubulami podłużnymi [2, 12] i (zakładając aktywny charakter filamentów) skrócenie mikrotubul, co prowadziłoby w konsekwencji do zmiany kształtu rezerwuaru, reorientacji wici oraz skurczu całej komórki.

Podobnie jak w przypadku *Euglena gracilis*, lepkie środowisko powoduje, że skurcze ciała towarzyszą reakcji step-up u *Astasia longa* [92, 128]. Niestety, brak jest jakichkolwiek doniesień na temat zależności między fotoreakcjami a czynnikami mechanicznymi u *Peranema trichophorum*.

#### VII. 2. POWIĄZANIE Z SYSTEMEM CHEMOSENSORYCZNYM

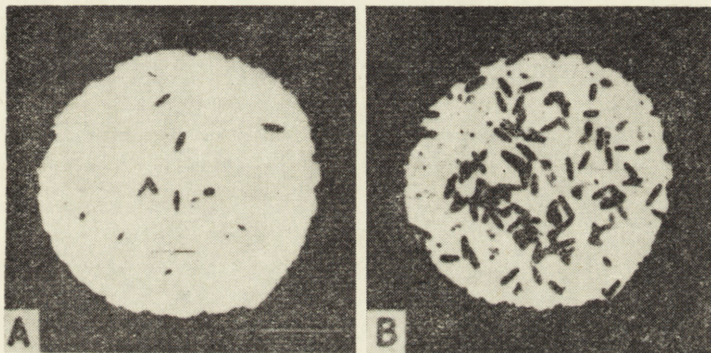
Zależnością systemów foto- i chemosensorycznych zajmowali się Colombetti i Diehn [22]. Badali oni wpływ światła na obrączkę chemotaktyczną utworzoną przez zielone lub etiolowane komórki *Euglena gracilis* wokół pęcherzyków powietrza ( $O_2$ ). Słabe, niebieskie światło powoduje, że komórki zielone przestają reagować na gradient bodźca chemicznego i zaczynają pływać we wszystkich kierunkach. Autorzy interpretowali zanik obrączki chemotaktycznej jako chwilowe przestawienie systemu kontrolującego pracę wici z chemosensorycznego na fotosensoryczny. Ponowne tworzenie się obrączki (po 30-60 s), mimo że w dalszym ciągu komórki były stymulowane niebieskim światłem, wskazuje, że mechanizm kontrolujący aparat lokomotoryczny powrócił do systemu chemosensorycznego. Komórki etiolowane mają również zdolność do chemoakumulacji. Stymulacja silnym, białym światłem wywołuje u nich reakcję step-up i zacieśnianie się obrączki. Stymulacja natomiast słabym, niebieskim światłem nie wpływa na obrączkę chemotaktyczną, przeciwnie więc niż w przypadku komórek zielonych.

Warto wspomnieć o badaniach zachowania się wiciowców bezbarwnych w obecności tzw. fotouczulaczy, mimo że, jak się okazało, reakcja komórek na światło w ich obecności jest natury czysto chemo-, a nie fotosensorycznej, i nie występuje żadne powiązanie między systemami foto- i chemosensorycznym. Wiadomo, że wprowadzenie do środowiska z pierwotniakami barwników absorbujących światło (fotouczulaczy) zwiększa wrażliwość komórek na światło i prowadzić może nawet do ich zniszczenia. Znanymi fotouczulaczami są ryboflawina, błękit metylenowy, toluidynowy i eozyna. Naświetlanie takich barwników światłem powyżej 300 nm powoduje ich przejście do tripletowego stanu wzbudzenia i zapoczątkowanie reakcji fotochemicznych. Hoffmann i Meneghini [71] wykryli, że zniszczenie komórek nie jest spowodowane wpływem samego fotouczulacza, lecz jego fotoproduktu tworzącego się podczas naświetlania —  $H_2O_2$ . Fotouczulacze nie są więc dodatkowymi fotoreceptorami, jak to było wcześniej sugerowane [88-90].

Badano również wpływ fotouczulaczy na zachowanie się nie reagujących na światło, bezbarwnych wiciowców *Polymella magna* [78, 105, 106, 107] i *Peridiniopsis berolinensis* [65]. W przypadku *Polytomella*



*magna* dodanie do środowiska zewnętrznego ryboflawiny powoduje dyspersję komórek z naświetlanego pola, a w przypadku *Peridiniopsis berolinensis* — akumulację przy niższych, a dyspersję przy wyższych natężeniach światła. Stwierdzono, że reakcja wywołana światłem jest natury chemotaktycznej w stosunku do tworzącej się w oświetlonym polu  $H_2O_2$ . Mikołajczyk i wsp. [98] badali zachowanie się *Astasia longa* naświetlanej białym światłem, w obecności ryboflawiny i błękitu metylenowego. Wiciowce w obecności w środowisku zewnętrznym fotouczulaczy skupiają się w oświetlonej części preparatu (ryc. 27). Potwierdzono również hipotezę, że mamy do czynienia ze zjawiskiem chemo-, a nie fotoakumulacji. Atraktantem jest, podobnie jak w przypadku opisanych już tu wiciowców, woda utleniona.



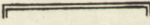
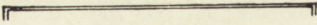
Ryc. 27. Skupianie się komórek *Astasia longa* w obecności błękitu metylenowego, w polu oświetlonym białym światłem [100]. A — w chwili rozpoczęcia naświetlania; B — po 90 s naświetlania (obrazy uzyskane w mikroskopie świetlnym)

### VIII. PODSUMOWANIE

Wiele zagadnień dotyczących reakcji fotofobowych jest jeszcze nie rozwiązanych. Dalecy jesteśmy od choćby powierzchownego poznania mechanizmów przenoszenia impulsów świetlnych od fotoreceptora do aparatu lokomotorycznego wici nawet u tak powszechnie badanego wiciowca jak *Euglena gracilis*. Zapoczątkowane są również dopiero badania mechanizmów fotorecepcji wiciowców bezbarwnych, mimo że zainteresowanie tym tematem sięga początków tego wieku. Odkrycie w ostatnich latach, że *Astasia longa*, gatunek blisko spokrewniony z *E. gracilis*, jest wrażliwa na światło, może się przyczynić do poznania ogólnych mechanizmów kierujących fotoreakcjami wiciowców.

Znacznie większy postęp obserwuje się w zakresie reakcji fotofobowych wiciowców barwnych. Reakcje fotofobowe można rozważać w perspektywie ich znaczenia biologicznego i ewolucji pierwotniaków. Ich rola

biologiczna polega na ochronie przed szkodliwym promieniowaniem i utrzymaniem organizmu w optymalnych warunkach świetlnych, co ma istotne znaczenie w przypadku organizmów fotosyntetyzujących. Wydaje się prawdopodobne, że pierwotną reakcją, chroniącą komórki przed nadmiernym, szkodliwym promieniowaniem słonecznym, była reakcja fotofobowa step-up. Mogła ona zachodzić dzięki obecności cząsteczek fotorecepcyjnych o widmie czynnościowym do 550 nm. Ten typ reakcji obserwuje się w dalszym ciągu u wiciowców bezbarwnych (*Astasia longa*). W miarę rozwoju ewolucyjnego i po pojawieniu się mechanizmów umożliwiających fotosyntezę, reakcje fotofobowe pełniły nie tylko funkcję obronną, ale również umożliwiającą funkcjonowanie tych mechanizmów. Wymagało to jednak wykształcenia odpowiednich struktur, które pozwoliłyby na precyzyjniejsze funkcjonowanie układu fotosensorycznego. Rolę tych struktur pełnią wyspecjalizowane organele — PFB i stigma (ryc. 28). Pozwalają one komórkom reagować nie tylko na zwiększenie natę-

	<u>SYSTEM</u>	<u>FOTORECEPCYJNY</u>
	<u>PIERWOTNY</u>	
	A. longa	
		
		<u>ROZWIINIETY</u>
		E. gracilis
		
cząsteczki fotorecepcyjne	nie zidentyfikowane	flawina
organellum fotoreceptorowe	brak	PFB
reakcje fotofobowe	step-up	step-up step-down

Ryc. 28. Powiązanie systemów fotorecepcyjnych *Euglena gracilis* i *Astasia longa*

żenia światła (reakcja step-up), ale również na jego zmniejszenie (reakcja step-down); umożliwiającą ustalenie położenia źródła światła i odpowiednie kierowanie ruchem komórek do (fototaksja dodatnia) lub od światła (fototaksja ujemna). Utrzymywanie się organizmu w optymalnych warunkach świetlnych oparte jest na delikatnej równowadze między dodatnią a ujemną fototaksją [62]. Rolę fotoreceptora odgrywa, wy-



pełnione flawiną, PFB. W porównaniu z innymi strukturami komórkowymi, PFB jest prawdopodobnie strukturą stosunkowo młodą [77, 99]. Stigma pełni rolę osłaniającą fotoreceptor. Od jej zabarwienia zależy zdolność do reakcji step-down, próg wrażliwości dla reakcji step-up, fotoakumulacja i fototaksja dodatnia, nie zależy natomiast występowanie reakcji step-up i fototaksja ujemna. Pierwotne cząsteczki fotorecepcyjne pełniłyby dla reakcji step-up, po wykształceniu się PFB, funkcję dodatkową.

## LITERATURA

- [1] BAMBERGER E. S., BLACK C. C., FEWSON C. A., GIBBS M., Inhibitor studies of carbon dioxide fixation, adenosine-triphosphate formation, and triphosphopyridine nucleotide reduction by spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **38**: 483-487, 1963.
- [2] BANCHETTI R., ROSATI G., VERNI F., Cytochemical analysis of the photoreceptor in *Euglena gracilis* Klebs (*Flagellata Euglenoidina*), *Monit. Zool. Ital.* (N. S.), **14**: 165-171, 1980.
- [3] BANCROFT W., Heliotropism, differential sensibility, and galvanotropism in *Euglena*, *J. Exp. Zool.*, **15**: 383-428, 1915.
- [4] BARGHIGIANI C., COLOMBETTI G., FRANCHINI B., LENCI F., Photobehavior of *Euglena gracilis*: action spectrum for the step-down photophobic response in individual cells, *Photochem. Photobiol.*, **29**: 1015-1019, 1979.
- [5] BARGHIGIANI C., COLOMBETTI G., LENCI F., BANCHETTI R., BIZZARRO M. P., Photosensory transduction in *Euglena gracilis*: effect of some metabolic drugs on the photophobic response, *Arch. Microbiol.*, **120**: 239-245, 1979.
- [6] BARTLETT C. M., WALNE P. L., SCHWARZ O. J., BROWN D. H., Large scale isolation and purification of eyespot granules from *Euglena gracilis*, *Plant Physiol.*, **49**: 881-885, 1972.
- [7] BASSI M., DONINI A., Phallotoxin — visualization of F-actin in normal and chromium-poisoned *Euglena* cells, *Cell Biol. Int. Rep.*, **8**: 867-871, 1984.
- [8] BATRA P. P., TOLLIN G., Phototaxis in *Euglena*. I. Isolation of the eyespot granules and identification of the eyespot pigment, *Biochim. Biophys. Acta*, **79**: 371-378, 1964.
- [9] BENEDETTI P. A., BIANCHINI G., CHECCUCCI A., FERRARA R., GRASSI S., PERCYVAL D., Spectroscopic properties and related functions of the stigma measured in living cells of *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.*, **111**: 73-76, 1976.
- [10] BENEDETTI P. A., CHECCUCCI A., Paraflagellar body (PFB) pigments studied by fluorescence microscopy in *Euglena gracilis*, *Plant Sci. Lett.*, **4**: 47-51, 1975.
- [11] BENEDETTI P. A., LENCI F., In vivo microspectrofluorometry of photoreceptor pigments in *Euglena gracilis*, *Photochem. Photobiol.*, **26**: 315-318, 1977.
- [12] BOUICK G. B., ROGALSKI A., VALAITIS A., Surface organization and composition of *Euglena*. II. Flagellar mastigonemes, *J. Cell Biol.*, **77**: 805-826, 1979.

- [13] BUETOW D. E., Morphology and ultrastructure of *Euglena*, [w] The Biology of *Euglena*, red. D. E. Buetow, Acad. Press New York and London, 1: 1968, 110-184.
- [14] BÜNNING E., TAWADA M., Über die negative-phototaktische Reaktion von *Euglena*, Arch. Mikrobiol., 27: 306-310, 1957.
- [15] CHECCUCCI A., Molecular sensory physiology of *Euglena*, Naturwissenschaften, 63: 412-417, 1976.
- [16] CHECCUCCI A., COLOMBETTI G., FERRARA R., LENCI F., Modelli molecolari per la fototassi in *Euglena gracilis*, Proc. Natl. Congr. Biophys. Cybernet., 3: 275-282, 1974.
- [17] — Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments, Photochem. Photobiol., 23: 51-54, 1976.
- [18] — Further analysis of the mass photoresponses of *Euglena gracilis* Klebs (*Flagellata Euglenoidina*), Monit. Zool. Ital. (N. S.), 10: 271-277, 1976.
- [19] CHECCUCCI A., FAVATI L., GRASSI S., PIAGGESI T., The measurement of photoactivity in *Euglena gracilis* Klebs, Monit. Zool. Ital. (N. S.), 9: 83-98, 1975.
- [20] CHEN Y. T., Investigations of the biology of *Peranema trichophorum* (*Eugleninae*), Quart. J. Microscop. Sci., 91: 279-308, 1950.
- [21] COHN F., Über die Gesetze der Bewegung der Mikroskopischen Pflanzen und Thiere unter Einflusse der Lichtes, Hedwigia, 5: 161-168, 1866.
- [22] COLOMBETTI G., DIEHN B., Chemosensory responses toward oxygen in *Euglena gracilis*, J. Protozool., 25: 211-217, 1978.
- [23] COLOMBETTI G., HÄDER D.-P., LENCI F., QUAGLIA M., Phototaxis in *Euglena gracilis*: effect of sodium azide and triphenylmethyl phosphonium ion on the photosensory transduction chain, Current Microbiol., 7: 281-284, 1982.
- [24] COLOMBETTI G., LENCI F., Identification and spectroscopic characterization of photoreceptor pigments, [w] Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms, red. F. Lenci, G. Colombetti, Plenum Press, New York, London, 173-188, 1980.
- [25] — Photoreception and photomovements in microorganisms, [w] The Biology of Photoreception, red. D. J. Cosens, D. Vince-Price, Society for Exp. Biol. Symp. 36: 399-422, 1983.
- [26] COLOMBETTI G., LENCI F., DIEHN B., Responses to photic, chemical, and mechanical stimuli, [w] The Biology of *Euglena*, red. D. E. Buetow, Academic Press, New York, 3: 169-195, 1982.
- [27] COLOMBETTI G., LENCI F., McKELLAR J. F., PHILLIPS G. O., Lightinduced effects in a flavoprotein: D-amino acid oxidase, Photochem. Photobiol., 21: 303-306, 1975.
- [28] COLOMBETTI G., LENCI F., PASSARELLI V., QUAGLIA M., RINALDIFORNACA G., Are there two separate photosensory transduction chains in *Euglena*? [w] Progress in Protozool., 6 Int. Congr. Protozool. Warszawa, 61, 1981.
- [29] COPPELLOTTI O., PICCINNI E., COLOMBETTI G., LENCI F., Responses of *Euglena gracilis* to cytochalasins B and D, Boll. Zool., 46: 72-75, 1979.
- [30] CRAMER W. A., HORTON P., Recent studies on the chloroplast cytochrome b-559, Photochem. Photobiol., 22: 304-307, 1975.
- [31] CREUTZ C., DIEHN B., Motor responses to polarized light and gravity sensing in *Euglena gracilis*, J. Protozool., 23: 552-556, 1976.
- [32] DIEHN B., Phototactic response of *Euglena* to single and repetitive pulses



- of actinic light: orientation time and mechanism, *Exp. Cell Res.*, **56**: 375-381, 1969.
- [33] — Action spectra of the phototactic responses in *Euglena*, *Biochim. Biophys. Acta*, **177**: 136-143, 1969.
- [34] — Two perpendicularly oriented pigment system involved in phototaxis of *Euglena*, *Nature (London)*, **221**: 366-367, 1969.
- [35] DIEHN B., The receptor-effector system of phototaxis in *Euglena*, *Acta Protozool.*, **11**: 325-332, 1972.
- [36] — Phototaxis and sensory transduction in *Euglena*, *Science*, **181**: 1009-1015, 1973.
- [37] — Cybernetics and the behavior of microorganisms, [w] *Aneural Organisms in Neurobiology*, red. E. M. Eisenstein, Plenum Publ. Corp., New York, 1974, 41-57.
- [38] — Photic responses and sensory transduction in protists, [w] *Handbook of Sensory Physiology*, red. H. Autrum, Springer Verlag, Berlin, New York, **7**: 6A, 1979, 23-68.
- [39] — Experimental determination and measurement of photoresponses, [w] *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms*, red. F. Lenzi, G. Colombetti, Plenum Publ. Corp., New York, 1980, 107-125.
- [40] DIEHN B., FEINLEIB M. E., HAUPT W., HILDEBRAND E., LENZI F., NULTSCH W., Terminology of behavioral responses in motile microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **26**: 559-560, 1977.
- [41] DIEHN B., FONSECA J. R., JAHN T. L., High speed cinemicrography of the direct photophobic response of *Euglena* and the mechanism of negative phototaxis, *J. Protozool.*, **24**: 492-494, 1975.
- [42] DIEHN B., KINT B., The flavin nature of the photoreceptor pigment for phototaxis in *Euglena*, *Physiol. Chem. Phys.*, **2**: 483-488, 1970.
- [43] DIEHN B., TOLLIN G., Phototaxis in *Euglena*. III. Lag phenomena and the overall mechanism of the tactic response to light, *Photochem. Photobiol.*, **5**: 839-844, 1966.
- [44] — Phototaxis in *Euglena*. IV. Effect of inhibitor of oxidative and photophosphorylation on the rate of phototaxis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**: 169-177, 1967.
- [45] DOUGHTY M. J., DIEHN B., Photosensory transduction in the flagellated alga, *Euglena gracilis*. I. Action of divalent cations, Ca antagonists and Ca ionophore on motility and photobehavior, *Biochim. Biophys. Acta*, **588**: 148-168, 1979.
- [46] — Flavins as photoreceptor pigments for behavioral responses in motile microorganisms, especially in the flagellated alga, *Euglena* sp., *Structural Bonding*, **41**: 45-70, 1980.
- [47] DOUGHTY M. J., DIEHN B., Photosensory transduction in the flagellated alga, *Euglena gracilis*. III. Induction of  $Ca^{2+}$  — dependent responses by monovalent cation ionophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **682**: 32-43, 1982.
- [48] — Photosensory transduction in the flagellated alga, *Euglena gracilis*. IV. Long term effects of ions and pH on the expression of step-down photobehavior, *Arch. Microbiol.*, **134**: 204-207, 1983.
- [49] — Anion sensitivity of motility and step-down photophobic responses of *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.*, **138**: 329-332, 1984.
- [50] DOUGHTY M. J., GRIESER R., DIEHN B., Photosensory transduction in the flagellated alga *Euglena gracilis*. II. Evidence that blue light affects altera-

- tion in Na-K permeability of the photoreceptor membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **602**: 10-23, 1980.
- [51] ENGELMANN T. W., Über Licht- und Farbenperzeption niederster Organismen, *Arch. Ges. Physiol.*, **29**: 387-400, 1882.
- [52] FEINLEIB M. E., Phototactic response of *Chlamydomonas* to flashes of light. I. Response of cell population, *Photochem. Photobiol.*, **21**: 351-354, 1975.
- [53] — Photomotile responses in flagellates, [w] *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms*, red. F. Lenci, G. Colombetti, Plenum Press, New York 1980, 45-68.
- [54] FERRARA R., BANCHETTI R., Effect of streptomycin on the structure and function of the photoreceptor apparatus of *Euglena gracilis*, *J. Exp. Zool.*, **198**: 393-402, 1976.
- [55] FOSTER K., SMYTH R. D., Light antennas in phototactic algae, *Microbiol. Rev.*, **44**: 572-630, 1980.
- [56] FROELICH O., DIEHN B., Photoeffects in a flavin-containing lipid bilayer membrane and implications for algal phototaxis, *Nature*, **248**: 802-804, 1974.
- [57] GALLO J-M., KARSENTI E., BORNENS M., DELACOURTE A., SCHREVEL J., Euglenoid movement in *Distigma proteus*. II. Presence and localization of an actin-like protein, *Biol. Cell*, **44**: 149-156, 1982.
- [58] GHETTI F., COLOMBETTI G., LENCI F., CAMPAHI E., POLACCO E., QUAGLIA M., Fluorescence of *Euglena gracilis* photoreceptor pigment: an in vivo microspectrofluorometric study, *Photochem. Photobiol.*, **42**: 29-33, 1985.
- [59] GÖSSEL I., Über das Actionspektrum der Phototaxis chlorophyllfreier Euglenen und über die Absorption des Augenflecks, *Arch. Microbiol.*, **27**: 288-305, 1957.
- [60] HÄDER D.-P., Photomovement, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, new ser., 7, *Physiology of Movements*, red. W. Haupt, M. E. Feinleib, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1979, 268-309.
- [61] — Photosensory transduction chains in procaryotes, [w] *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms*, red. F. Lenci, G. Colombetti, Plenum Press, New York 1980, 355-372.
- [62] — Effects of uv-B on motility and photobehavior in the green flagellate, *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.*, **141**: 159-163, 1985.
- [63] HÄDER D.-P., COLOMBETTI G., LENCI F., QUAGLIA M., Phototaxis in the flagellates, *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica*, *Arch. Microbiol.*, **130**: 78-82, 1981.
- [64] HÄDER D.-P., MELKONIAN M., Phototaxis in the gliding flagellate, *Euglena mutabilis*, *Arch. Microbiol.*, **135**: 25-29, 1983.
- [65] HÄDER M., Light-induced chemotactic reactions in the dinoflagellate, *Peridiniopsis berolinensis*, *Photochem. Photobiol.*, **40**: 533-537, 1984.
- [66] HAUPT W., Localization and orientation of photoreceptor pigments, [w] *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms*, red. F. Lenci, G. Colombetti, Plenum Press, New York 1980, 155-172.
- [67] HEELIS D. V., HEELIS P. F., BRADSHAW F., PHILLIPS G. O., Does the stigma of *Euglena gracilis* play an active role in the photoreception processes of this organism? A photochemical investigation of isolated stigma, *Photochem. Photobiol.*, **3**: 77-82, 1981.
- [68] HEELIS D. V., HEELIS P. F., KERNICK W. A., PHILLIPS G. O., The stigma of *Euglena gracilis* strain Z: an investigation into the possible occurrence of carotenoproteins and nucleic acids, *Cytobios*, **29**: 135-143, 1980.



- [69] HEELIS D. V., KERNICK W., PHILLIPS G. O., DAVIES K., Separation and identification of the carotenoid pigments isolated from light-grown cells of *Euglena gracilis* strain Z, Arch. Microbiol., **121**: 207-211, 1979.
- [70] HILENSKY L. L., WALNE P. L., SNYDER F., Aliphatic chains of esterified lipids in isolated eyespots of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, Plant Physiol., **57**: 645-646, 1976.
- [71] HOFFMANN M. E., MENEGHINI R., DNA strand breaks in mammalian cells exposed to light in the presence of riboflavin and tryptophan, Photochem. Photobiol., **29**: 299-303, 1979.
- [72] HOFMANN C., BOUCK G. B., Immunological and structural evidence for patterned intussusceptive surface growth in a unicellular organism. A postulated role for submembranous proteins and microtubules, J. Cell Biol., **69**: 693-715, 1976.
- [73] JAHN T. L., FONSECA J. R., LANDMAN M., Mechanisms of locomotion of flagellates. III. *Peranema*, *Petalomonas* and *Entosiphon*, J. Protozool., **10** (Suppl.): 11, 1963.
- [74] JENNINGS H. S., Behavior of lower organisms, Indiana University Press, Bloomington, Indiana, 366, 1906.
- [75] KIVIC P. A., VESK M., Structure and function in the euglenoid eyespot apparatus: the fine structure, and response to environmental changes, Planta, **105**: 1-14, 1972.
- [76] — The structure of the eyespot apparatus in bleached strains of *Euglena gracilis*, Cytobiologie, **10**: 88-101, 1974.
- [77] KIVIC P. A., WALNE P. L., Algal photosensory apparatus probably represent multiple parallel evolutions, Biosystems, **16**: 31-38, 1983.
- [78] KUMAR H. D., NULTSCH W., Effects of saffron extract and carotenoid preparation on the photodynamically induced chemotactic response of *Polytomella magna*, Photobiochem. Photobiophys., **9**: 39-42, 1985.
- [79] LEEDALE G. F., The Euglenoid Flagellates, Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., New Jersey 1967, 242.
- [80] LEEDALE G. F., MEEUSE B. J. D., PRINGSHEIM E. G., Structure and physiology of *Euglena spirogyra*, Arch. Mikrobiol., **50**: 68-102, 1965.
- [81] LENCI F., COLOMBETTI G., Photobehavior of microorganisms: a biophysical approach, Ann. Rev. Biophys. Bioeg., **7**: 341-361, 1978.
- [82] LENCI F., COLOMBETTI G., HÄDER D.-P., Role of flavin quenchers and inhibitors in the sensory transduction of the negative phototaxis in the flagellate, *Euglena gracilis*, Current Microbiol., **9**: 285-290, 1983.
- [83] LENCI F., HÄDER D.-P., COLOMBETTI G., Photosensory responses in freely motile microorganisms, [w] Membranes and Sensory Transduction, red. G. Colombetti, F. Lenci, Plenum Press, New York-London 1984, 199-229.
- [84] LOWNDES A. G., Flagella movement, Nature, **138**: 210-211, 1936.
- [85] MAINX F., Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen. I. Morphologische Beobachtungen, Methoden und Erfolge der Reinkultur, Arch. Protistenk., **60**: 305-354, 1927.
- [86] MAST S. O., Light and the Behavior of Organisms, New York, Wiley, 1911, 80.
- [87] — The reactions of the flagellate *Peranema*, J. Animal Behav., **2**: 91-97, 1912.
- [88] METZNER P., Über die Wirkung photodynamischer Stoffe auf *Spirillum volutans* und die Beziehungen der photodynamischen Erscheinung zur Phototaxis. I. Mitteilung, Biochem. Z., **101**: 33-53, 1920.

- [89] — Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinung. II. Mitteilung: die induzierte Phototaxis bei *Paramecium caudatum*, *Biochem. Z.*, **113**: 145-175, 1921.
- [90] — Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinung. III. Mitteilung: über die Bindung der wirksamen Farbstoffe in der Zelle, *Biochem. Z.*, **148**: 498-523, 1924.
- [91] MIKOŁAJCZYK E., Photophobic responses in *Euglenina*. 1. Effects of excitation wavelength and external medium on the step-up response of light- and dark-grown *Euglena gracilis*, *Acta Protozool.*, **23**: 1-10, 1984a.
- [92] — Photophobic responses in *Euglenina*. 2. Sensitivity to light of the colorless flagellate *Astasia longa* in low and high viscosity medium, *Acta Protozool.*, **23**: 85-92, 1984.
- [93] — Na/K transport and photosensitivity of the colorless flagellate *Peranema trichophorum* (Euglenida), *Photochem. Photobiol.*, **43**.
- [94] MIKOŁAJCZYK E., DIEHN B., The effect of potassium iodide on photophobic responses in *Euglena*: evidence for two photoreceptor pigments, *Photochem. Photobiol.*, **22**: 269-271, 1975.
- [95] — Light-induced body movement of *Euglena gracilis* coupled to flagellar photophobic response by mechanical stimulation, *J. Protozool.*, **23**: 144-147, 1976.
- [96] — Morphological alterations in *Euglena gracilis* induced by treatment with CTAB (Cethyltrimethyl ammonium bromide) and Triton X-100: correlations with effects on photophobic behavioral responses, *J. Protozool.*, **25**: 461-470, 1978.
- [97] — Mechanosensory responses and mechanoreception in *Euglena gracilis*, *Acta Protozool.*, **18**: 591-602, 1979.
- [98] MIKOŁAJCZYK E., HÄDER D.-P., NULTSCH W., Photodynamically induced chemoresponses of the colorless flagellate, *Astasia longa*, in the presence of riboflavin, *Arch. Microbiol.*, **142**: 397-402, 1985.
- [99] MIKOŁAJCZYK E., KUZNICKI L., Speculation on the origin of two photoreception systems in *Euglena*, *Postępy Biol. Kom.*, **11**: 411-413, 1984.
- [100] MIKOŁAJCZYK E., NULTSCH W., HÄDER D.-P., Chemoaccumulation of the colorless flagellate, *Astasia longa*, in the presence of the photosensitizer methylene blue, *Acta Protozool.*, **25**: 179-186, 1986.
- [101] MIKOŁAJCZYK E., PADO R., The kinetics of photobehavior modification upon change of the suspension medium of *Euglena gracilis*, [w] *Progress in Protozoology*, Abstr. 6 Int. Congr. Protozool., Warszawa 1981, 253.
- [102] MILLER K. R., MILLER G. J., Organization of the cell membrane in *Euglena*, *Protoplasma*, **95**: 11-24, 1978.
- [103] NULTSCH W., Photomotile responses in gliding organisms and bacteria, [w] *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms*, red. F. Lenzi, G. Colombetti, Plenum Press, New York, London 1980, 69-88.
- [104] NULTSCH W., HÄDER D.-P., Photomovement of motile microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **29**: 423-437, 1979.
- [105] NULTSCH W., HÄDER M., Light-induced chemotactic responses of the colorless flagellate, *Polytomella magna*, in the presence of photodynamic dyes, *Arch. Microbiol.*, **139**: 21-27, 1984.
- [106] — Photodynamically induced behavioral responses of the colourless flagellate *Polytomella magna*: effects of methylene blue, *Proc. Indian Acad. Sci.*, **94**: 475-485, 1985.
- [107] NULTSCH W., KUMAR H. D., Effects of quenching agents on the photody-



- namically-induced chemotactic response of the colorless flagellate *Polytomella magna*, Photochem. Photobiol., **40**: 539-543, 1984.
- [108] OMODEO P., The photoreceptive apparatus of flagellated algal cells: comparative morphology and some hypothesis on functioning, [w] Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms, red. F. Lenci, G. Colombetti, Plenum Press, New York, London 1979, 127-153.
- [109] PENZER G. R., RADDA G. K., The chemistry and biological function of isoalloxazines (flavines), Q. Rev. Chem. Soc., **21**: 43-65, 1967.
- [110] PICCINNI E., ALBERGONI V., COPPELLOTTI O., ATPase activity in flagella from *Euglena gracilis*, Localization of the enzyme and effects of detergents, J. Protozool., **22**: 331-335, 1975.
- [111] PICCINNI E., MAMMI M., Motor apparatus of *Euglena gracilis*: ultrastructure of the basal portion of the flagellum and the paraflagellar body, Boll. Zool., **45**: 405-414, 1978.
- [112] PICCINNI E., OMODEO P., Photoreceptors and phototactic programs in protista, Boll. Zool., **42**: 57-79, 1975.
- [113] POLI F., PANCALDI S., DALL'OLIO G., VANNINI G. L., Cytoskeletal structures in *Euglena gracilis* after Triton X-100 extraction and dry cleaving, Protoplasma, **128**: 218-223, 1985.
- [114] PRINGSHEIM E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten, Cytologia, Jujii Jubilaumsband, 234-255, 1937.
- [115] — The loss of chromatophores in *Euglena gracilis*, New Phytol., **47**: 52-87, 1948.
- [116] — Contributions towards a monograph of the genus *Euglena*, Nova Acta Leopoldina, **125**: 1-168, 1956.
- [117] PRINGSHEIM E. G., HOVASSE R., Les relations de parente entre Astasiacées et Euglenacées, Arch. Zool. Exp. Gen., **86**: 499-549, 1950.
- [118] ROBENEK H., MELKONIAN M., Structural specialization of the paraflagellar body membrane of *Euglena*, Protoplasma, **117**: 154-157, 1983.
- [119] ROGALSKI A., BOUCK G. B., A flagellar membrane glycoprotein does not extend over the cell surface in *Euglena*, J. Cell Biol., **79**: 281a, 1978.
- [120] SHETTLES L. B., Response to light in *Peranema trichophorum* with special reference to dark-adaptation and light-adaptation, J. Exp. Zool., **77**: 215-249, 1937.
- [121] SHORTESS G. S., The relation between temperature, light, and rate of locomotion in *Peranema trichophorum* and response to changes in temperature, Physiol. Zool., **15**: 184-195, 1942.
- [122] SIMONIS W., Untersuchungen zur Photosynthese — Phosphorylierung an intakten Pflanzellen, Ber. Deut. Bot. Gesel., **77**: 5-13, 1964.
- [123] SONG P. S., MOORE T. A., Mechanism of the photodephosphorylation of menadiol diphosphate. A model for bioquantum conversion, J. Am. Chem. Soc., **90**: 6507-6514, 1968.
- [124] — On the photoreceptor pigment for phototropism and phototaxis: is a carotenoid the most likely candidate? Photochem. Photobiol., **19**: 435-441, 1974.
- [125] SONG P. S., MOORE T. A., SUN M., Excited states of some plant pigments, [w] The Chemistry of Plant Pigments, red. C. O. Chichester, New York 1972, 33-74.
- [126] SPERLING-PAGNI P. G., WALNE P. L., WERHY E. L., Fluorometric evidence for flavins in isolated eyespots of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, Photochem. Photobiol., **24**: 373-375, 1976.

- [127] STAHL E., Über den Einfluss von Richtung und Stärke der Beleuchtung auf einige Bewegungsercheinungen im Pflanzenreiche, *Botan. Zeitung*, **38**: 409-412, 1880.
- [128] SUZAKI T., WILLIAMSON R. E., Photoresponse of a colorless euglenoid flagellate, *Astasia longa*, *Plant Sci. Lett.*, **32**: 101-107, 1983.
- [129] TOLLIN G., ROBINSON M. J., Phototaxis in *Euglena*. V. Photosuppression of phototactic activity by blue light, *Photochem. Photobiol.*, **9**: 411-416, 1969.
- [130] WAGER H., On the eyespot and flagellum in *Euglena viridis*, *J. Linnean Soc. Lond. Zool.*, **27**: 463-481, 1900.
- [131] WALNE P. L., Comparative ultrastructure of eyespots in selected euglenoid flagellates, *Contrib. in Phycol.*, 107-120, 1971.
- [132] WALNE P. L., ARNOTT H. J., The comparative ultrastructure and possible function of eyespots: *Euglena granulata* and *Chlamydomonas eugametos*, *Planta*, **77**: 325-353, 1967.
- [133] WALNE P. L., LENCI F., MIKOŁAJCZYK E., COLOMBETTI G., Effect of pronase treatment on step-down and step-up photophobic responses in *Euglena gracilis*, *Cell Biol. Int. Rep.*, **8**: 1017-1027, 1984.
- [134] WOLKEN J., Photoreceptors: comparative studies, [w] *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems*, red. M. B. Allen, Acad. Press New York-London, 1960, 145-167.
- [135] — *Euglena*. The photoreceptor system for phototaxis, *J. Protozool.*, **24**: 518-522, 1977.
- [136] WOLKEN J., SHIN E., Photomotion in *Euglena gracilis*. I. Photokinesis. II. Phototaxis, *J. Protozool.*, **5**: 39-46, 1958.
- [137] ZUMSTEIN H., Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs., *Jb. wiss. Bot.*, **34**: 149-198, 1900.

Otrzymano: 24 marca 1986.

Przyjęta 28 maja 1986.

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



APARAT GOLGIEGO. I. FUNKCJA BIOLOGICZNA. STRUKTURALNA  
I FUNKCJONALNA NIEJEDNORODNOŚĆ TEJ ORGANELI.  
ROLA W WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM TRANSPORCIE

THE GOLGI APPARATUS. I. THE BIOLOGICAL FUNCTION. THE STRUCTURAL  
AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF THIS ORGANELLE. ROLE IN THE  
INTRACELLULAR TRANSPORT

Anna Maria KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

*Streszczenie.* Przedstawiono poglądy na udział aparatu Golgiego w biosyntezie wewnątrzkomórkowej. Podkreślono funkcjonalną i strukturalną niejednorodność tej organeli. Omówiono rolę opłaszczonych pęcherzyków w transporcie, w którym uczestniczy aparat Golgiego. Przedstawiono poglądy na asymetrię ułożenia fosfolipidów i cholesterolu w błonach aparatu Golgiego oraz rolę tej organeli w biosyntezie glikosfingolipidów.

*Summary.* The importance of Golgi apparatus for the intracellular, biosynthetic processes is presented with the emphasis on the functional and structural heterogeneity of this organelle. The role coated vesicles in intracellular transport in which participate the Golgi apparatus is reviewed. The aspects of assymetrical distribution of membrane phospholipids and cholesterol, as well as the role of Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis are discussed.

**Stosowane skróty**

AG — aparat Golgiego, ER — siateczka śródplazmatyczna, RER — ziarnista siateczka śródplazmatyczna, PM — błona plazmatyczna, cv — opłaszczony pęcherzyk, cp — opłaszczona dołka, GlcNAc-N — acetyloglukozoamina, Gal — galaktoza, NANA — kwas N-acetyloneuraminowy, Fuc — fukoza, Glc — glukoza, Man-6-P — mannozo-6-fosforan, CMP-NANA — cytydylomonofosforan kwasu N-acetyloneuraminowego, GDP-Fuc — gwanozynodifosforan fukozy, UDP-GlcNAc — urydylodifosforan

N-acetyloglukozoaminy, PAPS — adenozy-3'fosforo-5'fosfosiarczan, ADP — adenozydifosforan, PL — fosfolipidy, PS — fosfatydyloseryna, PE — fosfatydyloetanoloamina, PC — fosfatydylocholina, PI — fosfatydyloinozytol, S — sfingomielina, LDL — lipoproteiny o małej gęstości, HDL — lipoproteiny o dużej gęstości, VLDL — lipoproteiny o bardzo małej gęstości, TPP-aza — pirofosfataza tiaminy (=difosfataza nukleozydowa), wirus VSV — wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej.

## WSTĘP

Od opisanego przez Camillo Golgi (1898 r.) nowej organeli komórkowej, nazwanej na cześć odkrywcy aparatem Golgiego (AG), jest ona intensywnie badana przez morfologów, analityków, fizjologów i biochemików, czego wyrazem są liczne prace, które ukazują się każdego roku. Udało się również dokonać pewnych uogólnień dotyczących struktury i funkcji tej organeli w żywej komórce. Świadczą o tym monografie, artykuły przeglądowe oraz rozdziały w podręcznikach wydrukowane po 1970 r. zarówno w języku polskim [np. 43, 46, 62, 82], jak i angielskim [np. 26, 27, 61, 63, 64, 66, 84, 105, 114]. Niniejsza praca jest próbą przedstawienia wyników doświadczeń opublikowanych w okresie 1979-1985 i dotyczących badań funkcji biologicznej aparatu Golgiego.

## UDZIAŁ APARATU GOLGIEGO W BIOSYNTYZIE GLIKOPROTEIN I BIAŁEK. STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA NIEJEDNORODNOŚĆ TEJ ORGANELI

Niejednorodność aparatu Golgiego (cysterny, wakuole sekrecyjne, pęcherzyki wydzielnicze gładkie i opłaszczone) oraz polaryzacja tej organeli przy jednoczesnych jakościowych i ilościowych różnicach składu fosfolipidów, cholesterolu, glikoprotein, białek enzymatycznych oraz grubości samych błon strony cis i trans [20, 24, 27, 34, 54, 64, 67, 81, 89, 94, 105, 111, 114] sugerują polaryzację funkcjonalną tej organeli. Tartakoff [103, 106] wyróżnia strukturalną i histochemiczną heterogenność AG i jego enzymatyczną i funkcjonalną specjalizację. Pogląd tego autora na rolę AG w systemie błon wewnątrzkomórkowych i procesach transportu materiału wydzielniczego oraz poszczególnych etapach glikozylacji białek przedstawiono szczegółowo w [52]. Rothman [87] stwierdza, że AG to co najmniej „dwie organelle komórkowe w tandemie”. Po stronie cis zachodzi odszczepienie zewnętrznych reszt mannozy, dodawanie kwasów tłuszczowych do seryny oraz fosforanu N-acetyloglukozoaminy do białek



przeznaczonych dla lizosomów. Strona trans (zdaniem Rothmana jedna lub dwie ostatnie cysterny diktiosomu) jest „odbieralnikiem”. Następuje tu dodanie końcowych reszt cukrowych (Gal, NANA, Fuc), odłączenie końcowej GlcNAc, która maskuje reszty fosforanowe w przypadku glikoprotein lizosomowych, wprowadzenie reszt siarczanowych oraz ograniczona proteoliza propeptydów białek [27, 87].

Schachter [90] na podstawie wbudowywania różnych reszt cukrowych do syntetyzowanej glikoproteiny wyodrębnia trzy funkcjonalnie różne rejony AG (cis, środkowy i trans). Po stronie cis i/lub środkowej jest wprowadzana GlcNAc, natomiast Gal i NANA w części trans AG. Funkcjonalną niejednorodność potwierdza również różne rozmieszczenie enzymów znaczników i badania w mikroskopie elektronowym [18]. Po stronie cis obserwuje się nagromadzenie osmu, stosowanego w kontrastowaniu, natomiast w części trans zlokalizowane są transferaza galaktozyłowa oraz difosfataza nukleozydowa (początkowo nazywana TPP-azą i będąca pierwszym cytochemicznym znacznikiem AG [27]). W rejonie tworzenia pierwotnych lizosomów (GERL) zlokalizowana jest kwaśna fosfataza.

W komórkach wydzielniczych AG spełnia kluczową rolę w sortowaniu białek syntetyzowanych na RER [22] oraz uczestniczy w końcowych etapach glikozylacji wydzielanych glikoprotein [56]. W innych komórkach bierze udział w biosyntezie i transporcie kolagenu [60], glukozy [95], glikoprotein wirusów Semliki forest [88] czy pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. vesicular stomatitis virus, VSV), a także albuminy i transferyny [101].

Wprowadzenie końcowych reszt cukrowych odbywa się przy udziale swoistych transferaz glikozyłowych, które jako białka błon są skierowane do światła cystern AG [12, 30, 77, 90, 96]. Jak zatem substraty, tj. nukleotydowe pochodne cukrów, syntetyzowane w jądrze lub cytoplazmie docierają do enzymów przez nieprzepuszczalne dla nich błony AG [12, 30, 77]? Problem ten dotyczy również nukleozydowych pochodnych fosfosiarczanów, które są donorem reszt siarczanowych, związanych kowalencyjnie z glikoaminoglikanami, np. siarczanem chondroityny, siarczanem dermatanu, siarczanem keratanu, heparyną i jej siarczanem oraz występują w niektórych glikosfingolipidach, hormonach sterydowych lub kwasach żółciowych [11, 12, 92].

Istnieją zasadniczo dwa poglądy: Hirschberg i jego współpracownicy [12, 55, 76, 92, 96] oraz Fleischer i wsp. [6, 30, 31] zakładają obecność przenośnika białkowego w błonach. Persat i wsp. [77] uważają, że Glc transportowana jest przez błony AG przez pirofosforylase związaną z tymi błonami, natomiast Bergeron i wsp. [1, 2, 70] proponują dolicholowy pośrednik dla reszt Gal, który odbiera cukier z UDP-Gal po stronie

cytozolowej. Według tych autorów dolicholowa pochodna Gal wnika następnie z cytozolu do wnętrza cystern AG wskutek zwiększonej fuzji błon.

Udział aparatu Golgiego w procesie sortowania i wydalania na powierzchnię komórki jej produktów nie budził zastrzeżeń [22], natomiast nie było wiadomo, czy wszystkie glikoproteiny opuszczają komórkę w taki sam sposób. Doświadczenia Strousa i wsp. [101] potwierdzają, że różne glikoproteiny są wydalone tą samą drogą. Jedynie szybkość, z którą białka opuszczają komórkę, jest różna [18, 35, 58, 91, 100]. Na przykład w komórkach HeLa okres, w którym połowa glikoprotein wydzielanych opuszcza AG wynosi 20-60 min, natomiast dla transferazy galaktozylowej wynosi aż 20 godz. [100]. Większość glikoprotein wydzielanych oraz białek błony plazmatycznej opuszcza komórkę wątroby w ciągu 2 godz. [35, 58]. W trzustce obserwuje się szybki transport nieglikozylowanych białek — trypsynogenu, chymotrypsynogenu 2, lipazy 2 i prokarboksypeptydazy A 2 (ok. 100 min), oraz wolny — amylazy (148 min) i prokarboksypeptydazy B (180 min) [91]. Fries i wsp. [33] sugerują w hepatocytach selektywny transport białek wydzielanych (albumina, transferyna, prealbumina, białko wiążące retinol). Czas transportu połowy każdego z tych białek z ER do AG (14-137 min) zachodzi przy udziale swoistych receptorów.

## 2. ROLA APARATU GOLGIEGO W TRANSPORCIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM

Aparat Golgiego uczestniczy w przenoszeniu i sortowaniu białek lizosomowych, glikoprotein wydzielanych oraz glikoprotein błon plazmatycznych [34, 83]. Bierze także udział w krążeniu i powrocie fragmentów błon z powierzchni błony plazmatycznej do wnętrza komórki [prace przeglądowe 43 i 75 oraz 25, 36]. Proces ten zachodzi przy udziale struktur zwanych opłaszczonymi dołkami (cp) i opłaszczonymi pęcherzykami (cv) [45, 69]. Używane są również pojęcia opłaszczone klatryną dołki i pęcherzyki [9, 45, 49, 69, 98]. W artykule przeglądowym Hinek [43] bardzo dokładnie przedstawił obecne poglądy na temat rodzajów i mechanizmów endocytozy. Opisane zostały również m. in. morfologia, komórkowa lokalizacja i współzależność cp i cv z innymi organelami komórkowymi, również z AG.

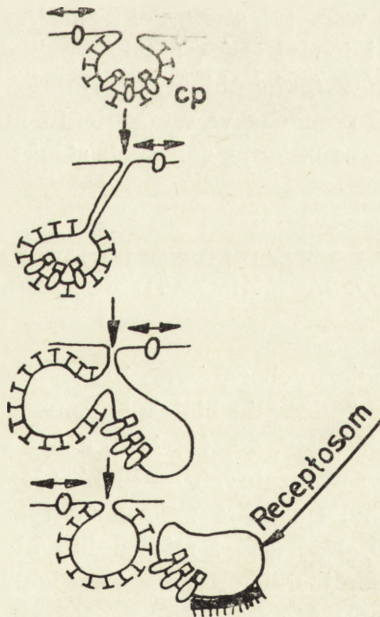
Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że LDL,  $\alpha_2$  makroglobulina, epidermalny czynnik wzrostu,  $\beta$ galaktozydaza, transferyna, interferon, egzotoksyna *Pseudomonas*, asjaloglikoproteiny oraz wirusy mięsaka Rousa, VSV czy Semliki forest wnikają do komórki przez cp [10, 37, 73, 98]. U Eukaryota cv uczestniczą w transporcie nowo syntety-



zowanych glikoprotein przez region Golgiego do miejsc docelowych [49]. Pośredniczą w transporcie produktów między przedziałami wewnątrz komórki, np. immunoglobulin, enzymów lizosomowych, insuliny, receptorów Man-6-P oraz w krążeniu błon podczas endo- i egzocytozy [7, 8, 10, 23, 59, 68, 121]. W fibroblastach cv pośredniczą w przenoszeniu LDL, epidermalnego czynnika wzrostu,  $\alpha_2$ makroglobuliny i insuliny, w hepatocytach przenoszą asjaloglikoproteiny. W komórkach nerki cv aparatu Golgiego uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie glikoprotein wirusów VSV oraz Semliki forest [38, 88], chociaż Rogalski i Singer [85, 86] uważają, że w procesie tym uczestniczą mikrotubule zasocjowane z AG. Również Wehland i wsp. [112, 113] przypisują ważną rolę mikrotubulom fibroblastów ludzkich.

Pilch i wsp. [78] sądzą, że insulina wprowadzana jest do hepatocytu za pośrednictwem endocytozy, w której uczestniczą receptory. Według nich podobny mechanizm wprowadzania tego hormonu zachodzi w adipocytach i limfocytach ludzkich, niezależnie od tego, czy komórka znajduje się w organizmie, czy w hodowli tkankowej. Tą drogą wnikają do komórek również hormony polipeptydowe [37].

Sposób tworzenia i rolę tzw. receptosomów w tym procesie przedstawił również Hinek [43]. Pastan i Willingham [73] podają graficzny schemat hipotetycznego tworzenia się receptosomu, który przedstawiono na rycinie.



Ryc. Hipotetyczny sposób tworzenia się receptosomu z opłaszczonego dołka (cp) w błonie plazmatycznej (PM)

Uważa się, że receptosomy są większe niż pozostałe cv, ich średnica wynosi 200-400 nm [73], a powstają w wyniku endocytozy, w której pośredniczą receptory [36]. Należy dodać, że Kolb-Bachofen [50] sądzi, że to, czy dany pęcherzyk jest zwykłym cv, czy receptosomem zależy od typu badanej komórki.

Strukturę „opłaszczającą” dołek, pęcherzyk czy receptosom tworzą tzw. triskeliony, z których każdy zbudowany jest z kompleksu o masie 630 kd (3 łańcuchy klatryny o  $M_r = 180$  kd każdy oraz 3 łańcuchy lekkie o  $M_r = 33$  kd) [9, 49]. W strukturze opłaszczającej wykazano również polipeptydy o  $M_r = 100-110$  kd oraz tubulinę o  $M_r = 55$  kd [39, 97]. Pearse, która po raz pierwszy oczyściła frakcję cv i wprowadziła nazwę klatryna dla opłaszczającego białka [74] uważa, że polipeptyd ten jest konieczny do tworzenia swoistych struktur opłaszczających, natomiast inni badacze uważają, że fragment klatryny pozostający po częściowej proteolizie trypsyną o  $M_r = 100-110$  kd wystarczy do utworzenia tej struktury [10, 79, 108, 121]. Klatryna jest białkiem pozbawionym komponenty cukrowej; jej sekwencję aminokwasową cechuje duża konserwatywność międzygatunkowa [74, 75]. Może oddziaływać z lipidami, co wykazano w doświadczeniach z użyciem błon modelowych zbudowanych z dipalmitylglicerofosfocholiny [80], dioleilofosfatydylocholiny [4] lub obu tych związków [97]. Przy niskim stosunku białka do lipidów (1:500) tworzy ona stabilne kompleksy z pęcherzykami fosfolipidowymi. Steer i wsp. [97] oraz Blumenthal i wsp. [4] stwierdzili zależność oddziaływań klatryny z lipidami od pH i jonów  $Ca^{2+}$ , a także pobudzenie przez klatrynę fuzji małych pęcherzyków fosfolipidowych. Dalsze badanie oddziaływań klatryna-lipid może być pomocne w wyjaśnieniu mechanizmu tworzenia cp i cv, jak i lepszym zrozumieniu roli tych struktur w żywej komórce.

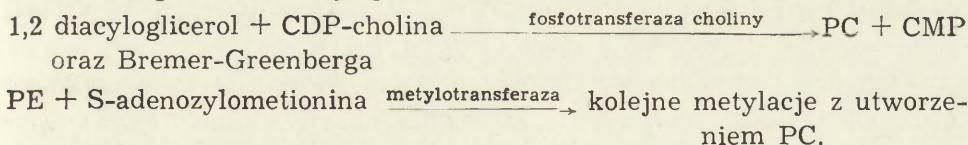
### 3. ASYMETRYCZNY ROZKŁAD FOSFOLIPIDÓW I CHOLESTEROLU W BŁONACH APARATU GOLGIEGO

Większość błon biologicznych zarówno komórkowych, jak śródkomórkowych ma asymetryczne ułożenie białek enzymatycznych [19] — glikoprotein [116] i fosfolipidów [16, 40, 42, 115], które wchodzi w ich skład. Dotyczy to zarówno błon naturalnych — błona plazmatyczna, wewnętrzna błona mitochondrialna, siateczka śródplazmatyczna czy aparat Golgiego [16, 32, 40, 42, 65, 116], jak i mieszaniny błon izolowanych z komórki w postaci tzw. frakcji mikrosomów gładkich [16, 42], w skład której wchodzi również błony AG.

Vance i wsp. [109] stwierdzili asymetryczny rozkład enzymów biorą-



cych udział w syntezie PL wątroby szczura. Te które uczestniczą w syntezie PC i PE są położone po stronie zewnętrznej błon mikrosomów. Według Stremmela i Debucha [99] skład fosfolipidowy frakcji pęcherzyków i diktiosomów AG jest różny. Nilsson i Dallner [65] uważają, że w AG wątroby (podobnie jak w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, błonie lizosomów oraz otoczce jądrowej) po stronie zewnętrznej, odpowiadającej cytoplazmatycznej w żywej komórce, leżą PS, PE i PC, natomiast PI i S (a w przypadku błony mitochondrialnej — kardiolipina) leżą po stronie wewnętrznej. Higgins i wsp. [41, 42] we wcześniejszych badaniach określali procentowy rozkład poszczególnych fosfolipidów w błonach frakcji mikrosomowej i stwierdzili ilościowe różnice w procentowej zawartości poszczególnych PL po obu stronach tych błon. Według ostatnich badań [40], są różnice w rozmieszczeniu PL w błonach AG wątroby szczura, ponadto rozkład tych związków jest inny po stronie cis i trans AG. W błonach cystern strony cis PE jest rozmieszczona równomiernie, natomiast PC leży głównie po stronie zewnętrznej (cytoplazmatycznej). W błonach cystern trans PE leży głównie po stronie wewnętrznej, po której znajduje się 25% PC. Według autorki, prosty przepływ 2-warstwowej błony z ER do AG i PM nie może zachodzić. Tego zdania są również Chang i wsp. [14, 15], którzy już w 1977 r. stwierdzili, że hipoteza prostego przepływu błon w komórce nie może być w pełni słuszna, gdyż błony aparatu Golgiego wątroby szczura są zdolne do syntezy PE i PC. Stwierdzili to wbrew panującemu powszechnie przekonaniu, popartemu poglądami Palade'a [71] czy Sjöstranda [93], że AG jest pozbawiony enzymów syntetyzujących fosfolipidy, które tworzone są w siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach, skąd już jako składniki błon wędrują do innych organeli komórkowych. W badaniach in vitro mieszaniny błon, którą stanowią mikrosomy, ustalono, że synteza PC zachodzi w wątrobie dwoma drogami: Kennedy'ego



Hoffman i wsp. [44] sugerują, że stwierdzony przez nich spadek aktywności metylotransferaz PE i fosfatydylodimetyloetanoloaminy tłumaczy stwierdzony przez innych w cukrzycy wywołanej alloksanem spadek zawartości PC [102]. Według tych autorów wynika to z ograniczenia drugiej drogi biosyntezy PC.

Jergil i Sundler [47] stwierdzili, że fosforylacja PI może zachodzić w błonach AG wątroby szczura, które mają aktywną kinazę fosfatydy-

loinozytolu. Aktywność tego enzymu jest dodatnio skorelowana z aktywnością transferazy galaktozylowej.

Skład fosfolipidowy, zawartość cholesterolu, metabolizm tych związków w AG, jak również zmiany procentowego składu PL w cukrzycy wywołanej podaniem streptozotocyny lub alloxanu zostały już dość dobrze poznane [5, 13, 51, 53, 72, 99, 110, 117, 122], chociaż ich wpływ na inne defekty metaboliczne, stwierdzane w obu modelach cukrzycy, wymaga dalszych badań.

#### 4. UDZIAŁ APARATU GOLGIEGO W BIOSYNTEZIE I WYDZIELANIU GLIKOSFINGOLIPIDÓW

Glikosfingolipidy są kompleksami lipidów i cukrowców. W osoczu są transportowane przez lipoproteiny głównie beta LDL [17]. Te ostatnie zaś są metabolizowane przy udziale receptorów LDL. Strukturę i nomenklaturę glikosfingolipidów w osoczu ludzkim przedstawiono w tabeli 1.

Miejsce biosyntezy i dokładny mechanizm ich transportu przez komórkę do różnych błon nie jest jeszcze wyjaśniony. Przykładem tego mogą być sfingolipidy, których głównym przedstawicielem w różnych komórkach jest sfingomielina [57]. Lipski i Pagnano [57] użyli fluorescencyjnego analogu C<sub>6</sub>-NBD-ceramidu (N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazolo) aminokaproilosingozyny do wykazania, że sfingomielina nie jest syntetyzowana, jak sądzono powszechnie, w błonie plazmatycznej, lecz że raczej jest syntetyzowana środkomórkowo i za pośrednictwem AG przenoszona na powierzchnię komórki. Fishman [28] już w 1974 r. stwierdził, że skład gangliozydów zależy od aktywności swoistych glikozylotransferaz AG Biosynteza gangliozydów jest regulowana podczas wzrostu i różnicowania, a potem związki te funkcjonują jako swoiste receptory powierzchniowe. Wykazano zdolność AG wątroby szczura do wprowadzania znakowanego NANA z CMP-NANA do wewnętrznych akceptorów lipoproteinowych, podobnie jak GlcNAc z jej urydylowej pochodnej. Prawie całą ilość nowo syntetyzowanych związków stanowią VLDL i HDL [3].

Fleischer [29] wykazała, że enzymy odpowiedzialne za początkowe etapy glikozylacji ceramidów, tj. galaktozylo- i sjalylotransferazy są obecne w AG nerki szczura. Coste i wsp. [21] wykazali, że w gruczołach podszczękowych świni przeniesienie glukozy na endo- i egzogenne ceramidy zachodzi w AG, a rozkład aktywności glukozylo- i galaktozylotransferazy jest podobny. Również aktywność sulfotransferazy jest wiązana z AG nerek i układu nerwowego. Tennekoon i wsp. [107] zlokalizowali ten enzym po stronie „światła” pęcherzyków AG, co sugeruje, że synteza sulfatydów w mózgu szczura zachodzi po tej stronie. W komórkach nerwowych zaburzenie aktywności glikozylotransferaz AG prowadzi do zmian



TABELA 1  
Struktura i nomenklatura glikosfingolipidów osocza człowieka (wg [17])

Klasa	Struktura chemiczna	Nazwa	Skrót
Glikosfingomeliny obojętne	Glc $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Glukozyloceramid	GlcCer
	Gal $\beta_1 \rightarrow 4$ Glc $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Laktozyloceramid	LacCer
	Gal $\alpha_1 \rightarrow 4$ Gal $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Globotriazyloceramid	GbOse <sub>3</sub> Cer
	GalNAc $\beta_1 \rightarrow 3$ Gal $\alpha_1 \rightarrow 4$ Gal $\beta_1 \rightarrow 4$ Glc $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Globotetraazyloceramid	GbOse <sub>4</sub> Cer
	Gal $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Galaktozyloceramid	GalCer
Gangliozyd	Gal $\alpha_1 \rightarrow 4$ Gal $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	Galabiozyloceramid	GalOse <sub>2</sub> Cer
	NeuAc $\alpha_2 \rightarrow 3$ Gal $\beta_1 \rightarrow 4$ Glc $\beta_1 \rightarrow 1'$ Cer	II <sup>a</sup> -N-acetylonauraminylo-laktozyloceramid	GM <sub>3</sub>

gangliozydów pełniących funkcję swoistych receptorów powierzchniowych. Wynikają stąd zmiany morfologiczne czasami patologiczne, np. zmiany biosyntezy gangliozydów stwierdzono w hodowlach komórek transformowanych różnymi onkogenami [28].

W AG wątroby szczura są aktywne dwa enzymy przenoszące reszty Gal na gangliozyd GM<sub>2</sub> [48]. Biosynteza gangliozydów w wątrobie jest hamowana przez tunikamycynę [119]. Według Yusufa i wsp. [120] jest to spowodowane blokowaniem transportu nukleotydów cukrowców przez błonę pęcherzyków. Autorzy ci sądzą, że synteza GM<sub>1</sub> i GM<sub>2</sub> w nienaruszonych pęcherzykach AG w wątrobie szczurzej jest stymulowana przez fosfatydyloglicerol, a także Triton X-100 i oktyloglukozyd. Ani hamowanie, ani stymulacja nie polega na bezpośrednim oddziaływaniu na glikozylotransferazy [118], lecz raczej na przenośniki nukleotydowe cukrowców, których obecność w błonach AG została stwierdzona przez Hirscherga i wsp. [12, 76, 92, 96].

Z przytoczonych danych można wnioskować, że zróżnicowana struktura aparatu Golgiego oraz jego wewnątrzkomórkowe położenie odpowiadają spełnianej wielozadaniowej roli w komórce. Coraz lepsze zrozumienie współzależności struktury i funkcji AG ułatwiają badania stanów patologicznych. Można wywołać je sztucznie u zwierząt doświadczalnych lub przez podanie do hodowli komórkowej substancji toksycznych.

#### LITERATURA

- [1] BERGERON J. J. M., PAIEMENT J., RACHUBINSKI R., NG YING KIN N. M., SIKSTROM R., Membrane fusion and the mechanism of terminal glycosylation within the Golgi apparatus of rat liver hepatocytes, *Biophys J.*, **37**: 121-122, 1982.
- [2] BERGERON J. J. M., RACHUBINSKI R. A., SIKSTROM R. A., POSNER B. J., PAIEMENT J., Galactose transfer to endogenous acceptors within Golgi fractions of rat liver, *J. Cell Biol.*, **92**: 139-146, 1982.
- [3] BIZZI A., MARSH J. B., Further observations on the attachment of carbohydrate to lipoproteins by rat liver Golgi membranes, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **144**: 762-765, 1973.
- [4] BLUMENTHAL R., HENKART M., STEER C. J., Clathrin-induced pH-dependent fusion of phosphatidylcholine vesicles, *J. Biol. Chem.*, **258**: 3409-3415, 1983.
- [5] BOGGS J. M., Intramolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes, *Can. J. Biochem.*, **58**: 755-770, 1980.
- [6] BRANDAN E., FLEISCHER B., Orientation and role of nucleosidediphosphatases and 5'-nucleotidase in Golgi vesicles from rat liver, *Biochemistry*, **21**: 4640-4645, 1982.
- [7] BROWN W. J., FARQUHAR M. G., The mannose-6-phosphate receptor for



- lysosomal enzymes in concentrated in cis Golgi cisternae, *Cell*, **36**: 295-307, 1984.
- [8] — Accumulation of coated vesicles bearing mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes in the Golgi region of I-cell fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5135-5139, 1984.
- [9] CAMPBELL C. H., FINE R. E., SQUICCIARINI J., ROME L. H. Coated vesicles from rat liver and calf brain contain cryptic Mannose 6-phosphatic receptors, *J. Biol. Chem.*, **258**: 2628-2633, 1983.
- [10] CAMPBELL C. H., ROME L. H. Coated vesicles from rat liver and calf brain contain lysosomal enzymes bound to mannose 6-phosphate receptors, *J. Biol. Chem.*, **258**: 13347-13352, 1983.
- [11] CAPASSO J. M., HIRSCHBERG C. B., Effect of atractylosides, palmitoyl-coenzyme A, and anion transport inhibitors on translocation of nucleotide sugars and nucleotide sulfate into Golgi vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**: 4263-4266, 1984.
- [12] — Effects of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphate into Golgi apparatus vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **777**: 133-139, 1984.
- [13] CASU A., PRONZATO M. A., COTTALASSO D. Phospholipids of Golgi sub-fractions determined with an enzymatic method, *Exp. Path.*, **26**: 107-111, 1984.
- [14] CHANG P. L., RIORDAN J. R., MOSCARELLO M. A., STURGESS J. M., Incorporation in vivo of (<sup>32</sup>P) orthophosphate and (Me-<sup>3</sup>H) choline into rough microsomal and plasma membranes of rat liver, *Can. J. Biochem.*, **55**: 876-885, 1977.
- [15] CHANG P. L., STURGESS J. M., MOSCARELLO M. A., Biosynthesis of phosphatidylethanolamine from CDP-ethanolamine by the Golgi complex of rat liver in vitro, *Experientia*, **33**: 1136-1137, 1977.
- [16] CHARALAMPOUS F. C., Levels and distributions of phospholipids and cholesterol in the plasma membrane of neuroblastoma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **556**: 38-51, 1979.
- [17] CHATTERJEE S., KWITEROVICH P. O. Jr., Glycosphingilipids and plasma proteins, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**: 385-397, 1984.
- [18] CHICHEPORTICHE Y., VASSALI P., TARTAKOFF A. M., Characterization of cytoplasmically oriented Golgi proteins with a monoclonal antibody, *J. Cell Biol.*, **99**: 2200-2210, 1984.
- [19] COLEMAN R. A., BELL R. M., Enzyme assymetry in hepatic microsomal vesicles. Criteria for localization of luminal enzymes with proteases, *Biochim. Biophys. Acta*, **595**: 184-188, 1980.
- [20] COLLOT M., KALFF M., REMACLE J. Relationship between endoplasmic reticulum and Golgi membranes; evidence for a heterogenous localization of cytochrome b<sub>5</sub> in the Golgi membranes, *Eur. J. Cell Biol.*, **29**: 34-42, 1982.
- [21] COSTE H., MARTEL M. B., AZZAR G., GOT R., UDPglucose-ceramide glucosyltransferase from porcine submaxillary glands is associated with the Golgi apparatus, *Biochim. Biophys. Acta*, **814**: 1-7, 1985.
- [22] DAUTRY-VARSAT A., LODISH H. F., The Golgi complex and the sorting of membrane and secreted proteins, *TINS*, **6**: 484-490, 1983.
- [23] DEUTSCHER S. L., CREEK K. E., MERION M., HIRSCHBERG C. B., Sub-fractionation of rat liver Golgi apparatus: separation of enzyme activities involved in the biosynthesis of the phosphomannosyl recognition marker in lysosomal enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3938-3942, 1983.

- [24] DOINE A., OLIVER C., HAND A. R. The Golgi apparatus and GERL during postnatal differentiation of rat parotid acinar cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **32**: 477-485, 1984.
- [25] FARQUHAR M. G., Multiple pathways of exocytosis, endocytosis and membrane recycling: validation of a Golgi route, *Federation Proc.*, **42**: 2407-2413, 1983.
- [26] FAVARD P., The Golgi apparatus, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima, De Faria, Nordt Holland Publ. Comp. Amsterdam London 1969, 1131-1155.
- [27] — Membranes of the Golgi apparatus, [w] *Mammalian Cell Membranes. The diversity of membranes*, red. G. A. Jamieson, D. M. Robinson Butterwarths Co. 1977, 108-140.
- [28] FISHMAN P. H. Normal and abnormal biosynthesis of gangliosides, *Chem. Phys. Lipids*, **13**: 305-326, 1974.
- [29] FLEISCHER B., Localization of some glycolipid glycosylating enzymes in the Golgi apparatus of rat kidney, *J. Supramolec. Structure*, **7**: 79-89, 1977.
- [30] — The nucleotide content of rat liver Golgi vesicles, *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**: 602-610, 1981.
- [31] — Orientation of glycoprotein galactosyltransferase and sialyltransferase enzymes in vesicles derived from rat liver Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **89**: 246-255, 1981.
- [32] FLESCH I., ECKER B., FERBER E., Acyltransferase-catalyzed cleavage of arachidonic acid from phospholipids and transfer to lysophosphatides in macrophages derived from bone marrow, *Eur. J. Biochem.*, **139**: 431-437, 1984.
- [33] FRIES E., GUSTAFSSON L., PETERSON P. A. Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates, *EMBO J.*, **3**: 147-152, 1984.
- [34] FUJITA H., SAWANO F., On the internal polarity of the Golgi apparatus with special regard to its relationship to GERL, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 227-229 1983.
- [35] GEUZE H. J., SLOT J. W., STROUS G. J., LUZIO J. P., SCHWARTZ A. L. Acyloheximide-resistant pool of receptors for asialoglycoproteins and mannose 6-phosphate residues in the Golgi complex of hepatocytes, *EMBO J.*, **3**: 2677-2685, 1984.
- [36] GONATAS N. K., STEIBER A., HICKEY W. F., HERBERT S. H., GONATAS O. J. Endosomes and Golgi vesicles in adsorptive and fluid phase endocytosis, *J. Cell Biol.*, **99**: 1379-1390, 1984.
- [37] GORDEN P., CARPENTIER J. L., FAN J. Y., ORCI L., Receptor mediated endocytosis of polypeptide hormones: mechanism and significance, *Metabolism*, **31**: 664-669, 1982.
- [38] GUAN J. L., ROSE J. K., Conversion of a secretory protein into a transmembrane protein results in its transport to the Golgi complex but not to the cell surface, *Cell*, **37**: 779-787, 1984.
- [39] HARRISON S. C., KIRCHHAUSEN T., Clathrin, cages and coated vesicles, *Cell*, **33**: 650-652, 1983.
- [40] HIGGINS J. A., The transverse distribution of phospholipids in the membranes of Golgi subfractions of rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **219**: 261-272, 1984.
- [41] HIGGINS J. A., DAWSON R. M. C., Asymmetry of the phospholipid bilayer



- of rat liver endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **470**: 342-356, 1977.
- [42] HIGGINS J. A., EVANS W. H., Transverse organization of phospholipids across the bilayer of plasma membrane subfractions of rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **174**: 563-567, 1978.
- [43] HINEK A., Endocytoza adsorpcyjna i receptosomy, *Post. Biol. Kom.*, **10**: 23-42, 1983.
- [44] HOFFMAN D. R., HANING J. A., CORNATZER W., Effect of alloxan diabetes on phosphatidylcholine biosynthetic enzymes, *Proc. Coc. Exptl. Biol. Med.*, **167**: 143-146, 1981.
- [45] IRACE G., LIPPOLDT R. E., EDELHOCH H., NANDI P. K. Properties of clathrin coat structures, *Biochemistry*, **21**: 5764-5769, 1982.
- [46] JASIŃSKI A., KILARSKI W., *Ultrastruktura komórki*, Warszawa 1984, 128-155, Wyd. Szkolne i Pedagogiczne.
- [47] JERGIL B., SUNDLER R., Phosphorylation of phosphatidylinositol in rat liver Golgi, *J. Biol. Chem.*, **258**: 7968-7973., 1983.
- [48] KAPLAN F., HECHTMAN P., Purification and properties of two enzymes catalyzing galactose transfer to G<sub>M2</sub> ganglioside from rat liver Golgi, *J. Biol. Chem.*, **258**: 770-776, 1983.
- [49] KINNAN C., OWEN M. J., Clathrin-coated vesicles purified from a human B lymphocyte cell line contain newly synthesised glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **258**: 8470-8474, 1983.
- [50] KOLB-BACHOFEN V., Coated vesicles or receptosomes? It depends on the cell type studied, *TIBS*, **3**: 107-108, 1985.
- [51] KORDOWIAK A., The phospholipid contents of Golgi-rich membrane fraction from streptozotocin-or alloxan-diabetic rats and in rat livers after streptozotocin treatment, *Bull Acad. Pol. Sci.*, **32**: 165-171, 1984.
- [52] — Rola wewnętrznych błon komórki w procesie glikozylacji białek, *Zeszyty Naukowe UJ-Prace z Biologii Molekularnej*, **14** (w druku)
- [53] KAWAMOTO T., AKINO T., NAKAMURA M., MORI M., Metabolism of individual molecular species of phosphatidylcholine in the liver subcellular membranes and bile, *Biochim. Biophys Acta*, **619**: 35-47, 1980.
- [54] KUROSUMI K., INOUE K., Cytochemistry and ultrastructure of Golgi apparatus and GERL of certain secretory cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 233-234, 1983.
- [55] LEE R. W. H., SUCHANEK C., HUTTNER W. B., Direct photoaffinity labeling of proteins with adenosine 3'(<sup>32</sup>P) phosphate 5'-phosphosulfate, *J. Biol. Chem.*, **259**: 11153-11156, 1984.
- [56] LENNARZ W., Overview: role of intracellular membrane systems in glycosylation of proteins [w] *Methods in Enzymology*, ed. S. Fleischer, B. Fleischer Acad. Press Inc N. York, **98**: 91-97, 1983.
- [57] LIPSKY N. G., PAGNANO R. E., Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: endogenously synthesized sphingomyelin and glucocerebroside analogues through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **100**: 27-34, 1985.
- [58] LODISH H. F., KONG N., Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex, *J. Cell Biol.*, **98**: 1720-1729, 1984.
- [59] LODISH H. F., KONG N., SNIDER M., STROUS G. J. A. M., Hepatoma

- secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates, *Nature*, **304**: 80-83, 1983.
- [60] MARCHI E., LEBLOND C. P., Radioautographic characterization of successive compartments along the rough endoplasmic reticulum-Golgi pathway of collagen precursors in foot pad fibroblasts of  $^3\text{H}$  proline injected rats, *J. Cell Biol.*, **98**: 1705-1709, 1984.
- [61] MILLS J. T., ADAMANY A. M., The role of phosphorylated dolichols in membrane glycoprotein biosynthesis: relation to cholesterol biosynthesis, *Int. Review of Cytol.*, **73**: 120-125, 1981.
- [62] MIRECKA J., Siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego i wydzielanie komórkowe, [w:] *Podstawy cytofizjologii, praca zbiorowa*, red. J. Kawiak, Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J., PWN, Warszawa 1985, 217-234.
- [63] MORRÉ D. J., KARTENBECK J., FRANKE W. W., Membrane flow and intraconversions among endomembranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**: 71-152, 1979.
- [64] MORRÉ D. J., MOLLENHAUER H. H., BRACKER C. E., Origin and continuity of Golgi apparatus, [w:] *Origin and continuity of cell organelles* red. J. Reinert and H. Ursprung, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N. York 1971, 82-126.
- [65] NILSSON O. S., DALLNER G., Transverse assymetry of phospholipids in subcellular membranes of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **464**: 453-458, 1977.
- [66] NORTHCOTE D. H., The involvement of the Golgi apparatus in the biosynthesis and secretion of glycoproteins and polysaccharides, [w:] *Biomembranes*, red. L. A. Manson, Plenum Press N. York, London, vol. **10**: 51-76, 1979.
- [67] OLIVER C., HAND A. R., Enzyme modulation of the Golgi apparatus and GERL. A cytochemical study of parotid acinar cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 1041-1048, 1983.
- [68] ORCI L., HALBAN P., AMHERDT M., RAVAZZOLA M., VASSALLI J. D., PERRELET A., Nonconverted, amino-acid analog modified proinsulin stays in a Golgi derived clathrin-coated membrane compartment, *J. Cell Biol.*, **99**: 2187-2192, 1984.
- [69] ORCI L., RAVAZZOLA M., LOUVARD D., PERRELET A., Distribution asymetrique de la clathrine au niveau de l'appareil de Golgi de cellules secretoires a polypeptides., *C. R. Acad. Sc. Paris*, **299**: 697-702, 1984.
- [70] PAIEMENT J., RACHUBINSKI R. A., NG YING KIN N. M. K., SIKSTROM R. A., BERGERON J. J. M., Membrane fusion and glycosylation in rat hepatic Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **92**: 147-154, 1982.
- [71] PALADE G. E. *Subcellular Particles*, red. T. Hayashi, Ronald Press, N. York 1959, 64-83.
- [72] PASCAUD A., AULIAC P., PASCAUD M., Renouvellement du cholesterol libre endogene des sinusoides de la membrane plasmique hepatiche, *Biochimie*, **61**: 1065-1071, 1979.
- [73] PASTAN J., WILLINGHAM M. C., Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi, *TIBS*, **8**: 250-254, 1983.
- [74] PEARSE B. M. F., Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1255-1259, 1976.
- [75] PEARSE B. M. F., BRETSCHER M. S., Membrane recycling by coated vesicles, *Ann Rev. Biochem.*, **50**: 85-101, 1981.



- [76] PEREZ M., HIRSCHBERG C. B., Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, *J. Biol. Chem.*, **260**: 4671-4678, 1985.
- [77] PERSAT F., AZZAR G., MARTEL M. B., GOT R., Evidence for coupling between transport of UDP-glucose and its synthesis by membrane-bound pyrophosphorylase in Golgi apparatus of cat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**: 377-380, 1984.
- [78] PILCH P. F., SHIA M. A., BENSON R. J. J. FINE R. E. Coated vesicles participate in the receptor-mediated endocytosis of insulin, *J. Cell Biol.*, **93**: 133-138, 1983.
- [79] PRASAD K., ALFSEN A., LIPPOLDT R. E., NANDI P. K., EDELHOCH H., Structural characterization of labelled clathrin and coated vesicles, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**: 403-410, 1984.
- [80] RALSTAN E., ROBINSON J., FINSKY R., ENGELBORGH S. Y., Interactions of clathrin coat with model lipid membranes, *Eur. J. Biochem.*, **134**: 305-308, 1983.
- [81] RAMBOURG A., SEGRETAIN D., CLERMONT Y., Tridimensional architecture of the Golgi apparatus in the arterial muscle cell of the rat, *Am. J. Anat.*, **170**: 163-179, 1984.
- [82] ROBERTIS E. D. P., NOWINSKI W. W., SAEZ F. A., *Biologia komórki*, przekł. zbiorowy red. J. Michejda, PWN, Warszawa 1974.
- [83] ROBERTSON J. G., LYTTLETON P., Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacterial membranes in root hairs and nodules of white clover, *J. Cell Sci.*, **58**: 63-78, 1982.
- [84] ROBINSON D. G., KRISTEN U., Membrane flow via the Golgi apparatus of higher plant cells w Int, *Review of Cytol.*, **77**: 89-127, 1982.
- [85] ROGALSKI A. A., BERGMANN J. E., SINGER S. J., Effect of microtubule assembly status on the intracellular processing and surface expression of an integral protein of the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **99**: 1101-1109, 1984.
- [86] ROGALSKI A. A., SINGER S. J., Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules, *J. Cell Biol.*, **99**: 1092-1100, 1984.
- [87] ROTHMAN J. E., The Golgi apparatus: two organelle in tandem, *Science*, **213**: 1212-1219, 1981.
- [88] SARASTE J., KUISMANEN E., Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest Virus membrane glycoproteins to the cell surface, *Cell*, **38**: 535-549, 1984.
- [89] SASAKI T., Ultrastructure and cytochemistry of the Golgi apparatus and related organelles of the secretory ameloblasts of the rat incisor, *Arch. Oral. Biol.*, **28**: 895-905, 1983.
- [90] SCHACHTER H., Coordination between enzyme specificity and intracellular compartmentation in the control of protein-bound oligosaccharide biosynthesis, *Biol. Cell*, **51**: 133-146, 1984.
- [91] SCHEELE G., TARTAKOFF A., Exit of nonglycosylated secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum is asynchronous in the exocrine pancreas, *J. Biol. Chem.*, **260**: 926-931, 1985.
- [92] SCHWARZ J. K., CAPASSO J. M., HIRSCHBERG C. B., Translocation of adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into rat liver Golgi vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**: 3554-3559, 1984.

- [93] SJÖSTRAND F. S., The membranes, red. A. J. Dalton, F. Haquenan, Acad. Press N. York, 1968, 151-210.
- [94] SLOT J. W., GEUZE H. J., Immunoelectron microscopic exploration of the Golgi complex, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 1049-1056, 1983.
- [95] SMITH M. M., ROBINSON F. W., WATANABE T., KONO T., Partial characterization of the glucose transport activity in the Golgi-rich fraction of fat cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**: 121-128, 1984.
- [96] SOMMERS L. W., HIRSCHBERG C. B., Transport of sugar nucleotides into rat liver Golgi. A new Golgi marker activity, *J. Biol. Chem.*, **257**: 10811-10817, 1982.
- [97] STEER C. J., KLAUSNER R. D., BLUMENTHAL R., Interaction of liver clathrin coat protein with lipid model membranes, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8533-8540, 1982.
- [98] STONE D. K., XIE X. S., RACKER E., An ATP-driven proton pump in clathrin coated vesicles, *J. Biol. Chem.*, **258**: 4059-4062, 1983.
- [99] STREMMEL W., DEBUCH H. The lipids of the Golgi apparatus subfractions from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **573**: 301-307, 1979.
- [100] STROUS G. J., Van KERKHOF P., WILLEMSSEN R., GEUZE H. J., BERGER E. G., Transport and topology of galactosyltransferase in endomembranes of HeLa cells, *J. Cell Biol.*, **97**: 723-727, 1983.
- [101] STROUS G. J., WILLEMSSEN R., Van KERKHOF P., SLOT J. W., GEUZE H. J., LODISH H. F., Vesicular stomatitis virus glycoprotein albumin and transferrin are transported to the cell surface via the same Golgi vesicles, *J. Cell Biol.*, **97**: 1815-1822, 1983.
- [102] SUGAHARA K., EZAKI K., KANEKO T., MORIOKA T., MAEDA H., Studies of the lungs in Diabetes mellitus. II. Phospholipid analyses on the surfactant from broncho-alveolar lavage fluid of alloxan-induced diabetic rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 163-168, 1981.
- [103] TARTAKOFF A. M. The role of subcompartments of the Golgi complex in protein intracellular transport, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **300**: 173-184, 1982.
- [104] — Simplifying the complex Golgi. *TIBS*, **7**: 174-176, 1982.
- [105] — The confined function model of the Golgi complex center for ordered processing of biosynthetic products of the rough endoplasmic reticulum, [w:] *Int. Review of Cytol.*, **85**: 221-252, 1983.
- [106] TARTAKOFF A., VASSALLI P., Lectin-binding sites as markers of Golgi subcompartments: proximal to distal maturation of oligosaccharides, *J. Cell Biol.*, **97**: 1243-1248, 1983.
- [107] TENNEKON G., ZARUBA M., WOLINSKY J., Topography of cerebroside sulfotransferase in Golgi-enriched vesicles from rat brain, *J. Cell Biol.*, **97**: 1107-1112, 1983.
- [108] UNGEWICKELL E., BRANTON D., Triskelions: the building blocks of clathrin coats, *TIBS*, **7**: 358-361, 1982.
- [109] VANCE D. E., CHOY P. C., FARREN S. B., LIM P. H., SCHNEIDER W. J., Asymmetry of phospholipid biosynthesis, *Nature*, **270**: 268-269, 1977.
- [110] VAN LE A., DOYLE D., General theory of membrane structure and function, [w] *Membranes, detergents and receptor solubilization*, Alan R. Liss inc. N. York 1984 1-25.
- [111] WANG J. J., CHANG J. P., HSU C. Y., LIANG H. M., MOLLER P. C., A, cytochemical study of acid phosphatase, thiamine pyrophosphatase and hor-



- seradish peroksidase in the Golgi-GERL complex of hepatoma ascites cells, *Cell Tissue Res.*, **233**: 367-376, 1983.
- [112] WEHLAND J., WILLINGHAM M. C., SANDOVAL I. V., A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of  $\alpha$ -tubulin. I. Biochemical characterization, effects of microtubule polymerization in vitro and microtubule polymerization and organization in vivo, *J. Cell Biol.*, **97**: 1467-1475, 1983.
- [113] WEHLAND J., WILLINGHAM M. C. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of  $\alpha$ -tubulin. II. Effects on cell movement organization of microtubules and intermediate filaments and arrangement of Golgi elements, *J. Cell Biol.*, **97**: 1476-1490, 1983.
- [114] WHALEY W. G., *The Golgi apparatus*, Springer Verlag Wien, N. York 1975.
- [115] WILLIAMSON, D., SCHLEGEL R., Maintenance of phospholipid asymmetry and its role in erythrocyte pathology, [w] *Erythrocyte Membranes 3: Recent Clinical and Experimental Advances*, Alan R. Liss Inc. N. York 1984, 123-136.
- [116] WISE G. E., Identification and function of transmembrane glycoproteins — the red cell model, *Tissue and Cell*, **16**: 665-676, 1984.
- [117] YUNGHANS W. Y., KEENAN T. W., MORRÉ D. J., Isolation of Golgi apparatus from rat liver III Lipid and protein composition, *Expt. Molec Path.*, **12**: 36-45, 1970.
- [118] YUSUF H. K. M., POHLENTZ G., SCHWARZMANN G., SANDHOFF K., Ganglioside biosynthesis in Golgi apparatus of rat liver. Stimulation by phosphatidyl glycerol and inhibition by tunicamycin, *Eur. J. Biochem.*, **134**: 47-54, 1983.
- [119] YUSUF H. K. M., POHLENTZ G., SANDHOFF K., Tunikamycin inhibits ganglioside biosynthesis in rat liver Golgi apparatus by blocking sugar nucleotide transport across the membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **80**: 7075-7079, 1983.
- [120] YUSUF H. K. M., POHLENTZ G., SANDHOFF K., Ganglioside biosynthesis in Golgi apparatus: New Perspectives on its mechanism. *J. Neurosci. Res.*, **12**: 161-178, 1984.
- [121] ZAREMBA S., KEEN J. H., Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats, *J. Cell Biol.*, **97**: 1339-1347, 1983.
- [122] ZAMBRANO F., FLEISCHER S., FLEISCHER B., Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles, *Biochim. Biophys Acta*, **380**: 357-369, 1975.

*Otrzymano: 23 grudnia 1985.*

*Przyjęto: 23 czerwca 1986.*

*Adres: ul. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.*





APARAT GOLGIEGO. II. WPŁYW RÓŻNYCH SUBSTANCJI NA  
STRUKTURĘ I FUNKCJĘ TEJ ORGANELI. ZMIANY AKTYWNOŚCI  
BIOCHEMICZNEJ ORAZ MORFOLOGII APARATU GOLGIEGO W CU-  
KRZYCY DOŚWIADCZALNEJ

THE GOLGI APPARATUS. II. INFLUENCE OF SOME DRUGS ON THE STRUC-  
TURE AND FUNCTION OF THIS ORGANELLE. ALTERATIONS OF BIOCHE-  
MICAL ACTIVITY AND MORPHOLOGY OF THE GOLGI APPARATUS IN  
EXPERIMENTAL DIABETES

Anna Maria KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

*Streszczenie.* Zebrano wyniki badań nad wpływem różnych substancji na strukturę i funkcję aparatu Golgiego. Przedstawiono wpływ kolchicyny i winblastyny, cytochalazyn i jonoforów, etanolu i czterochlorku węgla oraz inhibitorów glikozylacji glikoprotein na aparat Golgiego różnych komórek. Podsumowano również wyniki doświadczeń nad wpływem streptozotocyny i alloxanu na aktywność biochemiczną i morfologię aparatu Golgiego wątroby szczura.

*Summary.* The results of investigations concerning the effect of some drugs on structure and function of the Golgi apparatus are summarized. The colchicine and vinblastine, cytochalasins and ionophores, acute ethanol or carbon tetrachloride intoxication, as well as inhibitors of glycoprotein synthesis influences on the Golgi apparatus from different cells are presented. The experimental studies of results on streptozotocin or alloxan action on the biochemical activity and morphology of the rat liver Golgi apparatus are recapitulate.

**Stosowane skróty**

AG — aparat Golgiego, PM — błona plazmatyczna, RER — ziarnista siateczka śródplazmatyczna, PL — fosfolipidy, PS — fosfatydyloseryna, PE — fosfatydyloetanolamina, PC — fosfatydylocholina, PI — fosfatydyloinozytol, S — sfingomielina, TPP-aza — priofosfataza tiaminy = di-

fosfataza nukleozydowa, AspaAT — aminotransferaza asparaginianowa, AlAT — aminotransferaza alaninowa, LDH — dehydrogenaza mleczanowa, ATP-aza — adenozynotrifosfataza, CMP-NANA — cytydylomonofosforan kwasu N-acetyloneuraminowego, GDP-Fuc — guanozynyldifosforan fukozy, UDP-GlcNAc — urydyldifosforan N-acetyloglukozoaminy, PAPS — adenozyno3'fosforo5'fosfosfianozyn, ADP — adenozynodifosforan, 3'5 — ADP — 3'5'adenozynodifosforan, CoQ — ubichinon, SZ — streptozotocyna, VLDL — lipoproteiny o bardzo małej gęstości, LDL — lipoproteiny o małej gęstości, kd — kilodalton.

#### 1. WPŁYW RÓŻNYCH SUBSTANCJI NA FUNKCJĘ I STRUKTURĘ APARATU GOLGIEGO

Czynniki zewnętrzne wpływają na aktywność AG [31], co wyraża się zmienioną aktywnością enzymów i innym składem produktów biosyntezy w tej okolicy. Zwykle towarzyszą temu zmiany struktury AG. Już zmiana diety zwierzęcia, np. wzbogacenie jej w cholesterol, powoduje modyfikację surowiczych lipoprotein, przede wszystkim VLDL, pochodzących z AG jelita szczura [78]. Romagnoli [65] stwierdził zmienioną morfologię AG w trzustce szczura. Po 10 min od ponownego nakarmienia zwierząt zaobserwował znaczne powiększenie cystern oraz istotne zwiększenie wakuoli kondensacyjnych i lizosomów w stosunku do kontroli. Po 60 min zmiany te cofały się.

Polienowy antybiotyk filipina posłużyła do zbadania nierównomiernego rozłożenia cholesterolu w błonach AG. W rejonie tworzenia ziarenek wydzielniczych stwierdzono brak cholesterolu [59].

Mikroiniekcja guanozyny5'(α, β-metyleno)trifosforanu komórkom linii Pt K<sub>2</sub>, A 549, Swiss 3T3 powodowała drastyczne zmiany w tworzeniu mikrotubuli, ruchu komórek i organizacji AG[86]. Podanie cykloheksimidu szczurom umożliwiło uzyskanie błon AG bez otoczonych przez nie produktów wydzielania [79]. Poza tym w ciągu 60 min synteza białka spadała do 12% kontroli, natomiast wiązanie Ca<sup>2+</sup> było zredukowane do 50%. Ilość wolnych kwasów tłuszczowych, które są prawdopodobnie miejscem wiązania jonów Ca<sup>2+</sup>, w tej frakcji błon spadała również pod wpływem tego związku do 48% w tym samym czasie [14].

Doustne podanie szczurom 0,02% 2-acetyloaminofluorenu (hepatokarcinogen) powodowało spadek wiązania epidermalnego czynnika wzrostu do frakcji błon gładkich, tzw. mikrosomów i AG[28]. Uzyskano również frakcję błon AG pochodzących z guzów wątroby, indukowanych



podaniem tej substancji. Proporcje fosfolipidy: białko oraz cholesterol: białko w tej frakcji były podobne do kontroli. Jednak we frakcji tkanki nowotworowej stwierdzono 2-krotny wzrost PI i zmniejszenie zawartości PC [18].

Dicykloheksylokarbodiimid hamował aktywność ATP-azy AG wątroby szczura, co według Zhanga i Schneidera [88] było przyczyną 3-krotnie większego nagromadzenia się nowo syntetyzowanych białek w AG.

Działalność wydzielniczą AG w komórkach ślinianki przyusznej stymulował isoproterenol. Wpływał on na aktywność TPP-azy i kwaśnej fosfatazy w rejonie GERL. Obserwowano również liczne niedojrzałe ziarenka wydzielnicze. Zmiany te cofały się w ciągu 16-24 godz. [21].

Kupfer i wsp. [44] potwierdzili współzależność AG i centrum organizującego mikrotubule w klonach mysich komórek NK. W wielu typach komórek stwierdzono asocjację mikrotubuli z AG, np. w hepatocytach szczurzych po doświadczalnej nekrozie spowodowanej aminonukleozydem puromycyny [52].

Po podaniu 4-procentowej cholestyraminy doustnie lub wywołaniu chronicznej przetoki żółciowej zaobserwowano 2-krotny wzrost objętości AG wątroby szczura [15]. Hypertrofię AG obserwowano również w stanach zapalnych [50] oraz przy podwyższonej syntezie cholesterolu i kwasów żółciowych [21].

Na transport CMP-NANA, GDP-Fuc, UDP-GlcNAc oraz PAPS przez błony AG działały hamująco takie związki jak 3'5'ADP, CoA, estry kwasów tłuszczowych, palmitoylCoA i atraktylozydy [8, 71].

#### 1. 1. WPŁYW KOLCHICYNY I WINBLASTYNY NA AG

Wpływ kolchicyny i winblastyny na strukturę aparatu Golgiego oraz jego funkcję w takich komórkach jak chondrocyty, komórki A i B trzustki świnki morskiej czy komórki zwojów rdzeniowych zarodków kury, a także współzależność AG z mikrotubulami, wykazali, wspólnie z innymi, już w latach siedemdziesiątych polscy badacze Moskalewski [56-58] oraz Hinek [26, 57, 81]. Moskalewski i wsp. [58] stwierdzili, że zarówno kolchicyna, jak i winblastyna powodują gwałtowny zanik mikrotubuli w cytoplazmie hodowanych chondrocytów. Towarzyszy temu rozsianie diktiosomów w cytoplazmie. Zmiany te pojawiają się już po 40 min od podania kolchicyny i po 4 godz. uzyskują poziom utrzymujący się aż do 11 dnia. Wiele diktiosomów ma krótsze i mniej liczne cysterny niż w kontroli. Diktiosomom towarzyszy niewiele wakuoli; małe pęcherzyki występują w ograniczonej liczbie. Według tych badaczy, oddziaływanie win-

blastyny jest nieco słabsze, gdyż powoduje zwiększoną autofagocytozę, a zmiany dotyczą przede wszystkim lizosomów i makrotubuli. Również w komórkach zwojów rdzeniowych zarodków kury [81] kolchicina oddziaływała silniej niż winblastyna na zanik mikrotubuli i na zmiany struktury AG. Dalsze badania Moskalewskiego i wsp. [56] dotyczyły wpływu kolchicyny na komórki A i B świeżo wyizolowanych wysepek trzustki świnki morskiej. Wydaje się, że komórki te są bardziej odporne na działanie tej substancji niż chondrocyty. 4 godz. po dodaniu kolchicyny o stężeniu  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  M do środowiska hodowlanego obserwowano zanik mikrotubuli bez rozpraszania diktiosomów. Efekt tego związku był wyraźniejszy w hodowli komórek A i B. Zależność prawidłowej struktury AG od normalnie funkcjonującego w danej komórce układu mikrotubularnego udowodniły badania tych samych autorów [57] nad AG chondrocytów świnki morskiej w różnych stadiach podziału komórkowego, a także badania Hinka i wsp. [26] nad AG prawidłowych komórek zwojów rdzeniowych zarodków kury.

Kolchicina i winblastyna użyte zostały przez Reaven i Reaven [61] do badania udziału AG w procesach wydzielania w hepatocytach. Według tych autorów, obie substancje zmniejszają wydzielanie VLDL i powodują zmianę morfologii AG, tj. około 15% redukcję błon diktiosomów w odniesieniu do kontroli, z równoczesnym pokryciem zajmowanego obszaru przez elektronowo gęste ziarenka. Wehland i wsp. [85] stwierdzili, że po depolimeryzacji mikrotubuli przez winblastynę następuje fragmentacja AG, a jego elementy nie wykazują asocjacji z nietypowymi polimerami tubuliny. Po inkubacji komórek A 549 z taksolem, AG był pofragmentowany, a jego elementy znajdowały się w części cytoplazmy bogatej w mikrotubule. W doświadczeniach tych autorów [85] inkubacja komórek z kolcemidem prowadził do depolimeryzacji mikrotubuli i fragmentacji AG. Brodie [6, 7] stwierdził, że w AG komórek owadów po podaniu im kolchicyny, siarczanu winblastyny lub obniżeniu temperatury następuje blokada wewnątrzkomórkowego transportu między AG i PM. Czynniki te nie wpływały natomiast na transport między RER i AG. Według tego autora, odpowiedź komórki na działanie obu tych substancji zależy od typu komórki.

Azhar i wsp. [3] stwierdzili, że kolchicina w dawce 0,8 mg na 1 kg masy ciała lub winblastyna w dawce 20 mg na 1 kg masy ciała, podane szczurom *in vivo*, powodowały spadek aktywności glikozylotransferaz tej organeli głównie galaktozylo-, sjalylo- i N-acetyloglukozoaminylo-transferaz. Aktywność mannozylo- i N-acetaloglukozoaminylo-transferaz siateczki śródplazmatycznej, podobnie jak 5'nukleotyduazy, glukozo-6-fosfatazy czy dehydrogenazy burztynianowej, nie uległa zmianie.



## 1. 7. WPŁYW CYTOCHALAZYN JONOFORÓW ETANOLU I CZTEROCHLORKU WĘGLA ORAZ INHIBITORÓW GLIKOZYLACJI NA AG

Cytochalazyna B powodowała zbijanie się mitochondriów oraz nagromadzenie pęcherzyków w obszarze otaczającym diktiosomy [43, 48]. W komórkach owadów cytochalazyny B i D, uszkadzając mikrofilamenty, nie wpływały jednak na transport między RER i AG [6, 7].

Pod wpływem takich czynników jak epinefryna, acetylocholina, pilokarpina oraz jonofor A 23187 w AG gruczołów podszczękowych szczura, cysterny ściśle przylegały do siebie, a wydłużone pęcherzyki łatwo agregowały [4]. W celu wykazania aktywności kinazy kazeiny w błonach AG gruczołów mlecznych użyto tego samego jonoforu. Powodował on utratę  $\text{Ca}^{2+}$  z tych pęcherzyków i obniżał fosforylację kazeiny, natomiast inny jonofor — alametycyna, powodowała zwiększenie tuneli śródbłonowych oraz wzrost fosforylacji kazeiny [87].

Etanol podany szczurom doustnie powodował już po 6 godz. spadek zawartości CoQ we frakcji błon AG wątroby i nerki szczura [9, 10]. Ponadto spadała w tej frakcji zawartość fosfolipidów [11]. Równolegle w ER i AG powstawały zmiany morfologiczne, polegające na proliferacji błon, poza tym wzrastała liczba i rozmiary diktiosomów, wakuoli i pęcherzyków oraz zawartość VLDL w AG wątroby [51].

Wydzielanie lipoprotein w wątrobie było hamowane przez  $\text{CCl}_4$ . Stosowano następujące dawki tego związku: w hodowli hepatocytów  $\text{CCl}_4$  dodawano do końcowego stężenia 129  $\mu\text{M}$ , natomiast w doświadczeniach *in vivo* podawano go jako 50% v/v roztwór w oleju mineralnym, jednocześnie, dozoławkowo natomiast w dawce 250  $\mu\text{g}/100$  g masy ciała szczura. Związek ten zaburzał również wbudowywanie heksoz do lipoprotein i wydzielanie ich przez AG. Zmiany te dotyczyły zarówno strony cis, jak trans AG [60]. Podanie witaminy E przed  $\text{CCl}_4$  normalizowało wbudowywanie cukrowców, natomiast tylko w nieznacznym stopniu wydzielanie lipoprotein [12].

Problem stanowi wpływ inhibitorów glikozylacji białek na AG. Substancje te, będąc inhibitorami swoistych glikozylotransferaz, zmieniają funkcję tej organeli i zarazem jej strukturę. Przegląd najważniejszych inhibitorów biosyntezy glikoprotein podał Elbein [16]; spośród nich w badaniu funkcji AG najczęściej stosowano monezynę [1, 5, 13, 25, 47, 53, 66, 77] i swainsoninę [47, 82-84].

Monenzyna zaburza glikozylację białek wiążących cukier N- i O-glikozydowo oraz wewnątrzkomórkowy transport różnych makromolekuł. Według Andersona i Pathaka [1], podstawą różnic w sortowaniu materiału w obrębie AG, którą sugerował Rothman [66], była różnica pH. Jest możliwe, że przez analogię do receptorów powierzchniowych, różne makrocząsteczki wymagają swoistych receptorów do przeniesienia ze

strony cis do trans AG. W obecności monenzyny transport wewnątrzkomórkowy był blokowany w cysternach trans AG. Glikoproteina wirusa VSV, transferyna czy albumina nagromadzały się w rozdęciach cystern [77], a same białka były mniej kwaśne niż te, które były syntetyzowane bez monenzyny. Użycie monenzyny w badaniach syntezy i wydzielania lipoprotein przez hodowlę hepatocytów szczurzych wykazało, że wydzielanie fosfolipidów, apolipoprotein E i A<sub>1</sub> oraz HDL było silnie przez nią hamowane [53]. Stwierdzono ponadto, że wydzielanie immunoglobulin, prokolagenu i białek błon było hamowane bez wpływu na ich biosyntezę. Proteoglikany i IgM były wydzielane, ale glikozylowane niekompletnie lub bez wbudowania reszt siarczanowych. Uważa się, że VLDL oraz LDL mają podobny mechanizm wydzielania komórkowego, hamowany przez monenzynę [53].

Monenzyna powodowała wakuolizację AG, bez wpływu na rozkład diktiosomów wokół jądra [25, 47]. Również w komórkach roślinnych powodowała zwijanie dojrzałych cystern AG [5] na zasadzie tworzenia gradientu protonów, jak sądzą autorzy. Jedynie Craig i Goodchild [13] w liścieniach grochu nie stwierdzili ani zwiększonej liczby wakuoli, ani zahamowania ich ruchu pod wpływem monenzyny.

Drugim z inhibitorów stosowanym w badaniach AG jest swainsonina, toksyczny alkaloid roślinny. Hamuje ona swoicie mannozydazę II AG, nie wpływając na inne enzymy. Powoduje nagromadzenie się Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Asn-białko, z którego może powstać hybrydowy oligosacharyd [84]. Obecność takich oligosacharydów stwierdzono w alfa<sub>1</sub>antytrypsynie oraz glikoproteinach wirusów syntetyzowanych w obecności tego inhibitora [49]. Tulsiani i Touster [83] wykazali, że swainsonina nie działała na alfa-D-mannozydazy lizosomów wątroby i mózgu szczura i powodowała wzrost aktywności kilku kwaśnych hydrolaz osocza. Nie działała również na alfa-D-mannozydazę cytozolową [82].

## 2. WPLYW STREPTOZOTOCYNY I ALLOKSANU NA AKTYWNOŚĆ BIOCHEMICZNĄ I MORFOLOGIĘ APARATU GOLGIEGO WĄTROBY SZCZURA. OCHRONNE DZIAŁANIE PROSTAGLANDYN

Do substancji wywierających wpływ na aktywność biochemiczną i morfologię AG należą streptozotocyna i alloksan, stosowane powszechnie do wywołania cukrzycy doświadczalnej u zwierząt. W latach 1975-1984 badano wpływ obu tych związków na aktywność biochemiczną oraz morfologię AG wątroby. W badaniach biochemicznych obliczano wydajność izolowania frakcji błon AG w mg/g wątroby i oznaczano aktywność enzymów znacznikowych (galaktozylotransferaza, 5'-nukleotydaza, ATP-aza



stymulowana  $Mg^{2+}$ , kwaśna fosfataza, glukoza-6-fosfataza we frakcjach błon śródkomórkowych). Określano również zawartość RNA. W celu stwierdzenia, czy i w jakim stopniu streptozocyna uszkadza hepatocyty, oznaczano aktywność enzymów wskaźnikowych, jak aminotransferazy AspAT i ALAT, LDH, glukoza-6-fosfataza osocza. We frakcji wzbogaconej w błony AG określano również skład polipeptydowy i fosfolipidowy. Równoległe wykonywane były badania morfologiczne w mikroskopie elektronowym.

W 10-11 dniu od podania SZ stwierdzono drastyczne obniżenie wydajności izolowania frakcji wzbogaconej w błony Golgiego wątroby szczura, czemu towarzyszyło istotne statystycznie obniżenie aktywności transferazy galaktozylowej i brak pasm polipeptydowych o masie powyżej 76 kd [40, 69]. W badaniach morfologicznych AG in situ stwierdzono u tych zwierząt zaokrąglanie i zamykanie cystern w diktiosomach oraz zanik ich brzeźnych rozcięć oraz brak wakuoli i pęcherzyków wydzielniczych [68].

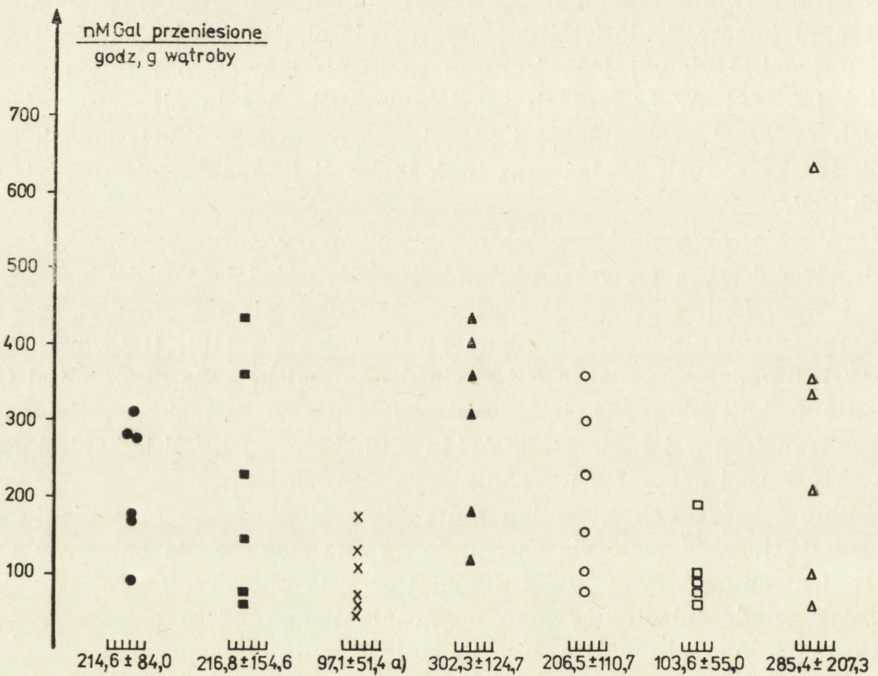
Obniżenie aktywności galaktozylotransferazy mikrosomów wątroby szczura z cukrzycą wywołaną SZ potwierdziły późniejsze badania Tepperman i wsp. [80]. Aktywność tego enzymu obniżała się również w nerkach myszy z cukrzycą wywołaną streptozotocyną [19]. U zwierząt zaś zabitych 6 godz. po podaniu SZ stwierdzono zwiększenie wydajności izolowania frakcji błon AG, istotny statystycznie wzrost aktywności galaktozylotransferazy i hipertrofię AG in situ, bez zmiany składu białkowego i aktywności enzymów wskaźnikowych osocza [38].

Żadne z opisanych tu zmian nie zostały stwierdzone po podaniu aloksanu [41]. Wydawało się zatem, że są one swoiste dla cukrzycy wywołanej streptozotocyną lub dla samej streptozotocyny. Dlatego w dalszych doświadczeniach używano wyłącznie tego modelu cukrzycy.

Postanowiono sprawdzić, czy podanie insuliny zwierzętom z wywołaną uprzednio cukrzycą, w dawkach proporcjonalnych do tych, które stosuje się w leczeniu chorych, zapobiegnie opisanym już tu zmianom. Z wcześniejszych doświadczeń wiadomo było, że sama insulina podawana nawet przez 30 dni nie powodowała zmian aktywności transferazy galaktozylowej, podobnie jak nie wpływała na poziom i skład seromukoidu [20]. Podanie insuliny nie normalizowało aktywności galaktozylotransferazy, ani wydajności izolowania frakcji błon AG, zapobiegało natomiast zaokrąglaniu cystern w diktiosomach [29] i poprawiało proporcje między cukrami obojętnymi w seromukoidzie [42]. Wyniki te podsumowano w pracy [32].

Opisane fakty nasuwają pytania. Po pierwsze, czy na aktywność galaktozylotransferazy ma wpływ głódzenie, gdyż cukrzyca insulinozależna u ludzi przypomina do pewnego stopnia stan braku pożywienia. Stwier-

dzono, że aktywność tego enzymu we frakcji błon wzbogacona w AG nie zależała od ilości pokarmu, którą otrzymały przed zabiciem zwierzęta doświadczalne. U szczurów głodzonych stwierdzono natomiast spadek wydajności izolowania błon AG [33]. Po drugie, kiedy stan pobudzenia i hipertrofii AG (6 godz. po SZ) przechodzi w atrofię tej organeli, stwierdzoną w 10-11 dniu. Ze względu na niemożliwość prześledzenia tego zjawiska w sposób ciągły, wybrano okres średni, tj. 6 dni po podaniu SZ. Stwierdzono, w odniesieniu do kontroli, zmiany przypominające te, które występowały w cukrzycy 10-11-dniowej, chociaż jeszcze nie tak wy-



Ryc. Aktywność transferazy galaktozylowej w siedmiu badanych grupach zwierząt

1 — ● — szczury kontrolne, nie głodzone; 2 — ■ — szczury, którym podano 3-krotnie podskórnie 16,16'-dimetyloprostoglandynę  $E_2$  (dmPGE<sub>2</sub>) w dawce 5  $\mu$ g/kg masy ciała w roztworze 0,9% NaCl w czasie 0 oraz 24 i 48 godz. po pierwszej iniekcji, szczury zabito w narkozie eterowej po 6 dniach od pierwszego zastrzyku; 3 — X — szczury, którym podano dootrzewnowo streptozotocynę w dawce 65 mg/kg masy ciała w buforze cytrynianowym o pH 4,5, wybrano zwierzęta o poziomie cukru we krwi wyższym niż 250 mg w 100 ml (250—370 mg w 100 ml), zwierzęta zabito w narkozie eterowej w 6 dniu po podaniu streptozotocyny,  $t = 2,921$ ,  $0,01 \leq p < 0,05$  w odniesieniu do grupy 1; 4 — ▲ — szczury, którym podano streptozotocynę jak w grupie 3, przy czym w dawkach i w sposób identyczny jak w grupie 2 otrzymywały roztwór dmPGE<sub>2</sub> (tj. 30 min przed oraz 24 i 48 godz. po iniekcji streptozotocyny); 5 — ○ — szczury kontrolne, głodzone około 12 godz. przed zabiciem; 6 — □ — szczury, którym podano 0,5 ml 0,9% NaCl podskórnie 30 min przed oraz 24 i 48 godz. po dootrzewnowym podaniu streptozotocyny w dawce 65 mg/kg masy ciała w buforze cytrynianowym o pH 4,5, szczury zabito 11 dni po podaniu SZ; 7 — △ — szczury, którym 3-krotnie podano dmPGE<sub>2</sub> w dawce 15 g/kg masy ciała rozpuszczone w 0,5 ml 0,9% NaCl jak w grupie 6, następnie zwierzęta otrzymały streptozotocynę w ilości i w sposób jak w grupie 6



rażnie zaznaczone [34]. Po trzecie, ponieważ insulina jedynie w części wyrównywała zmiany powstałe w cukrzycy wywołanej streptozotocyną, czy istnieje substancja, która osłoni wątrobę szczura przed opisanymi we wstępie zmianami. Wiadomo było, że prostoglandyny (PG) działały cytoprotekcyjnie na żołądek [45, 62, 64] i wątrobę [76]. Postanowiono sprawdzić działanie trwałej pochodnej prostaglandyny, tj. 16,16'dimetyloprostaglandyny  $E_2$  (dm  $PGE_2$ ) podanej 3-krotnie, tj. 30 min przed oraz 24 i 48 godz. po iniekcji streptozotocyny. Zarówno w 6, [34] jak i w 11 dniu po podaniu SZ [35] podanie dm  $PGE_2$  powodowało, że drastyczne zmiany funkcji i struktury AG w wątrobie nie pojawiły się. Należy podkreślić, że cytoprotekcyjne działanie prostaglandyny jest wyraźne w 11 dniu od podania SZ zarówno w odniesieniu do aktywności transferazy galaktozylowej, jak i morfologii AG badanej w mikroskopie elektronowym. W odniesieniu do kontroli w grupie zwierząt, którym nie podawano prostaglandyn, lecz wyłącznie 0,9% NaCl, obniżenie aktywności transferazy galaktozylowej, wyrażone w nM Gal/godz., całej wątroby było istotne statystycznie ( $t = 2,267$ ,  $0,01 < p < 0,05$ , a morfologia AG zmieniona [35]).

Na rycinie zestawiono wyniki oznaczeń aktywności transferazy galaktozylowej w 7 badanych grupach zwierząt, wyrażone w nM Gal/godz. i na 1 g wątroby.

Znane są trzy propozycje ochronnego działania prostaglandyn. Pierwsza, dotycząca śluzówki żołądka, zakłada stymulację wydzielania dwuwęglanów oraz śluzu [62]. Dodatkowo PG, zwiększając przepływ krwi w żołądku [63], mają działać cytoprotekcyjnie. Druga z hipotez dotyczy nerek i wątroby i sugeruje, że  $PGE_2$  powodują wzrost oporności komórkowej na czynniki uszkadzające, zmieniają liczbę i/lub własności receptorów PG [46], stymulują pompę sodową, aktywność cyklazy adenyłowej oraz chronią integralność błon komórkowych [76]. Jednakże autorzy stwierdzają zgodnie, że precyzyjny mechanizm cytoprotekcyjnego działania nie jest jeszcze znany. Trzecia hipoteza Lichtenbergera i wsp. [45] sugeruje, że  $PGE_2$  działa poprzez lokalny wzrost stężenia PL, które, wpływając na hydrofobowość śluzówki żołądka, chroni ją przed uszkodzeniami. Wydaje się, że dopiero dalsze badania pozwolą wyjaśnić ten bardzo ważny biologicznie mechanizm. Czwarte pytanie dotyczyło fosfolipidowego składu frakcji wzbogaconych w błony AG uzyskiwanych z wymienionych grup zwierząt. Z poprzednich badań wiadomo było, że w cukrzycy insulinozależnej u ludzi [39, 70, 75], jak i cukrzycy doświadczalnej u szczurów [73, 74] zmieniony był skład chemiczny oraz niektóre fizykochemiczne własności błon erytrocytów. Zmianie ulegały także proporcje poszczególnych fosfolipidów we frakcji błon Golgiego wątroby szczura [36]. Poza tym wiadomo, że aktywność galaktozylotransferazy

[2, 23, 24, 55], podobnie jak wielu innych enzymów błon [17, 22, 27, 30, 54, 67, 72], zależy od lipidowego otoczenia. Biorąc pod uwagę stwierdzoną zmienność aktywności tego enzymu pod wpływem SZ oraz ochronne działanie PG należało oczekiwać zmian w składzie PL badanych frakcji [37]. Nie uzyskano wprawdzie zmian składu całkowicie zgodnych z hipotezą Lichtenbergera i wsp. [45], gdyż tylko w grupie zwierząt w 11 dniu po podaniu SZ z równoczesnym podawaniem dm PGE<sub>2</sub> stwierdzono istotny statystycznie wzrost procentowej zawartości PC. Należy jednak podkreślić, że w tej właśnie grupie ochronne działanie prostaglandyn było najwyraźniejsze. Inne wyniki nie potwierdziły hipotezy Lichtenbergera i wsp. [45]. Badania dotyczą jednak różnych narządów (żołądek, wątroba) i różnych poziomów (cały narząd, komórka, a nawet jej organela). W przypadku hepatocytu główne zmiany zawartości fosfolipidów mogły dotyczyć błony plazmatycznej, która jest pierwszym miejscem działania zarówno streptozotocyny, jak prostaglandyn.

#### PODZIĘKOWANIE

Pragnę wyrazić wdzięczność Panu prof. drowi Aleksandrowi Kojowi, Kierownikowi Zakładu Biochemii Zwierząt IBM, UJ, za uwagi dotyczące obu przygotowanych artykułów.

#### LITERATURA

- [1] ANDERSON R. G. W., PATHAK R. K., Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell*, **40**: 635-643, 1985.
- [2] ANTTINEN H., Stimulation of collagen galactosyltransferase activities by lysophosphatidylcholine, *Biochem. J.*, **160**: 29-39, 1976.
- [3] AZHAR S., HWANG S. F., REAVEN E. P., Effect of antimicrotubule agents on terminal glycosyltransferases and other enzymes associated with rat liver subcellular fractions, *Biochem. J.*, **212**: 721-731, 1983.
- [4] BLOMFIELD J., SIMSON J. A., MARTINEZ A. M., MARTINEZ J. R., Ultrastructural responses by Golgi apparatus of rat submandibular gland to  $\beta$ -adrenergic,  $\alpha$ -adrenergic and cholinergic stimulation, *Expt. Molec. Pathol.*, **38**: 170-182, 1983.
- [5] BOSS W. F., MORRÉ D. J., MOLLENHAUER H. H., Monensin-induced swelling of Golgi apparatus cisternae mediated by a proton gradient, *Eur. J. Cell Biol.*, **34**: 1-8, 1984.
- [6] BRODIE D. A., Golgi complex beads in vertebrates and their relationship with clathrin coats, *Tissue Cell*, **14**: 253-262, 1982.
- [7] — The arrangement of the Golgi complex beads is not controlled by the cytoskeleton, *Tissue Cell*, **14**: 263-271, 1982.
- [8] CAPASSO J. M., HIRSCHBERG C. B., Effect of atractylosides, palmitoyl Coenzyme A and anion transport inhibitors on translocation of nucleotide sugars and nucleotide sulfate into Golgi vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**: 4263-4266, 1984.



- [9] CASU A., COTTALASSO D., PRONZATO M. A., MARINARI U. M., NANNI G., Ubiquinone determination in the Golgi subfractions of rat liver after acute ethanol intoxication, *IRCS Med. Sci.*, **11**: 73-74, 1983.
- [10] — Rapid modification of ubiquinone behaviour in rat liver Golgi apparatus subfractions after acute ethanol intoxication, *IRCS Med. Sci.*, **12**: 382-383, 1984.
- [11] — Phospholipids, vitamin A and ubiquinone of the Golgi apparatus subfractions from rat liver after acute ethanol intoxication, *Exp. Path.*, **25**: 251-255, 1984.
- [12] COTTALASSO D., PRONZATO M. A., ROLLAC., MARINARI U. M., NANNI G., CHIARPOTTO E., BIASI F., ALBANO E., POLI G., DIANZANI M. K., Effect of vitamin E pretreatment on CCl<sub>4</sub>-induced impairment in vivo of glycosylation and lipoprotein secretion by rat liver apparatus, *IRCS Med Sci.*, **12**: 904-905, 1984.
- [13] CRAIG S., GOODCHILD D. J., Golgi mediated vicilin accumulation in *Pea cotyledon* cells is redicted by monensin and nigericin, *Protoplasma*, **122**: 91-97, 1984.
- [14] DASMAHAPATRA A., WALTERS J. R. F., WEISER M. M., BLOOR J. H., KLOHS W. D., Decrease by cycloheximide of calcium binding and nonestrified fatty acids in rat-intestinal Golgi-enriched membrane fractions, *Biochim. Biophys Acta*, **813**: 19-24, 1985.
- [15] DUBUISSON L., THINES-SEMPOUX D., BIOULAC-SAGE P., LAPOSTOLLE V., BALABAUD C., Hypertrophy of rat Golgi complex during enhancement of cholesterol and bile acid synthesis., *J. Submicrosc. Cytol.*, **16**: 721-726, 1984.
- [16] ELBEIN A. D., Inhibitors of glycoprotein synthesis, [w] *Methods in Enzymology*, vol. 98, red. B. Fleischer, S. Fleischer, Acad. Press Inc., 135-154, 1983.
- [17] ENDO T., HIDAKA H., Phospholipids and regulation of protein kinase reaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**: 108-112, 1981.
- [18] ERIKSSON L. C., TORNDAL U. B., ANDERSSON G. N., Isolation and characterization of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus from hepatocyte nodules in male Wistar rats, *Canc. Res.*, **43**: 3335-3347, 1983.
- [19] GUAN J. L., ROSE J. K., Conversion of secretory protein into a transmembrane protein results in its transport to the Golgi complex but not to cell surface, *Cell*, **37**: 779-787, 1984.
- [20] GUZDEK A., KORDOWIAK A., SARNECKA-KELLER M., The level and composition of seromuroid and nondialysable serum sugar peptide fraction compared with the activity of galactosyl transferase (EC 2.4.1.38) of liver Golgi membranes in insulin treated rats, *Clin. Chim. Acta*, **72**: 393-399, 1976.
- [21] HAND A. R., OLIVER C., Effects of secretory stimulation on the Golgi apparatus and GERL of rat parotid acinar cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **32**: 403-412, 1984.
- [22] HENIS Y. J., RIMON G., FELDER S., Lateral mobility of phospholipids in turkey erythrocytes. Implications for adenylate cyclase activation, *J. Biol. Chem.*, **257**: 1407-1411, 1982.
- [23] HIGGINS J. A., The transverse distribution of phospholipids in the membranes of Golgi subfractions of rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **219**: 261-272, 1984.
- [24] HIGGINS J. A., EVANS W. H., Transverse organization of phospholipids across the bilayer of plasma membrane subfractions of rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **174**: 563-567, 1978.
- [25] HILLER G., WEBER K., Golgi detection in mitotic and interphase cells by

- antibodies to secreted galactosyltransferase, *Exp. Cell Res.*, **142**: 85-94, 1982.
- [26] HINEK A., THYBERG J., FRIBERG U., Electron microscopic studies on embryonic chick spinal ganglion cells: relationship between microtubules and the Golgi complex, *J. Neurocytol.*, **6**: 13-25, 1977.
- [27] HOLLOWAY C. T., GARFIELD S. A., Effect of diabetes and insulin replacement on the lipid properties of hepatic smooth endoplasmic reticulum, *Lipids*, **16**: 525-532, 1981.
- [28] JOSEFSBERG Z., CARR B. J., HWANG G., BARSEGHIAN G., TOMKINSON C., LEV-RAN A., Effect of 2-acetyloamino-fluorene on the binding of epidermal growth factor to microsomal and Golgi fractions of rat liver cells, *Canc. Res.*, **44**: 2754-2757, 1984.
- [29] KACZMARSKI F., KORDOWIAK A., SARNECKA-KELLER M., Influence of insulin on galactosyltransferase activity and morphology of the rat liver Golgi apparatus in control and streptozotocin-diabetic rats, *Path. Res. Pract.*, **172**: 130-137, 1981.
- [30] KIMELBERG H. K., PAPAHAZIOPOULOS D., Phospholipid requirements for (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATP-ase activity: head group specificity and fatty acid fluidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **282**: 277-292, 1972.
- [31] KORDOWIAK A., Aparat Golgiego. Izolowanie, charakterystyka i funkcja, *Post. Biol. Kom.*, **5**: 17-47, 1978.
- [32] — Aktywność biochemiczna aparatu Golgiego wątroby szczura w cukrzycy doświadczalnej, *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biol. Molek.*, **9**: 93-103, 1982.
- [33] — Influence of starvation on the activity UDP-Gal→GlcNAc transferase from rat liver Golgi apparatus., *Post. Biol. Kom.*, **11**: 295-297, 1984.
- [34] — Activity of UDP-Gal→GlcNAc transferase of rat liver Golgi apparatus on sixth day after streptozotocin injection and/or prostaglandin treatment., *Acta Biochim. Polon.* (przesłane do druku).
- [35] KORDOWIAK A. M., Cytoprotective effect of 16,16'-dimethylprostaglandin E<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>) on streptozotocin-induced biochemical alterations of Golgi-rich membrane fraction in comparison with rat liver Golgi apparatus morphology in situ, *Path. Res. Pract.*, **181**: 397-401, 1986.
- [36] KORDOWIAK A., The phospholipid contents of Golgi-rich membrane fraction from streptozotocin- or alloxan-diabetic rats and in rat liver after streptozotocin treatment, *Bull. Pol. Acad. Sci.*, **32**: 165-171, 1984.
- [37] — The phospholipids contents in rat liver Golgi-rich membrane fractions after streptozotocin and/or prostaglandin treatment., *Folia Histochem. Cyto-biol.*, **24**, 39-46, 1986.
- [38] KORDOWIAK A., KACZMARSKI F., Short-term action of streptozotocin on biochemical activity and morphology of the rat liver Golgi apparatus, *Folia Histochem. Cytochem.*, **18**: 3-12, 1980.
- [39] KORDOWIAK A., MOLOCHKINA E. M., The phospholipid composition of erythrocyte ghosts in Juvenile Diabetes. Preliminary report, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **28**: 675-679, 1980.
- [40] KORDOWIAK A., SARNECKA-KELLER M., The protein patterns of Golgi-rich membrane preparations from the livers of control, insulin-treated and streptozotocin diabetic rats, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **25**: 205-209, 1977.
- [41] KORDOWIAK A., SARNECKA-KELLER M., KACZMARSKI F., Biochemical activity and morphology of the Golgi apparatus in alloxan diabetic rats, *Folia Histochem. Cytochem.*, **16**: 89-96, 1978.
- [42] KORDOWIAK A., TURZYNA B., KACZMARSKI F., SARNECKA-KELLER M., Comparison of rat plasma glycoprotein composition with biochemical activity



- and morphology of liver Golgi apparatus in streptozotocin diabetes treated with insulin, *Folia Histochem. Cytochem.*, **19**: 181-188, 1981.
- [43] KRISTEN U., LOCKHAUSEN J., Estimation of Golgi membrane flow rates in ovary glands of *Aptenia cordifolia* using cytochalasin, *B. Eur. J. Cell Biol.*, **29**: 262-267, 1983.
- [44] KUPFER A., DENNERT G., SINGER S. J., Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 7224-7228, 1983.
- [45] LICHTENBERGER L. M., GRAZIANI L. A., DIAL E. J., BUTLER B. D., HILLS B. A., Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection, *Science*, **219**: 1327-1329, 1983.
- [46] LIMAS C., LIMAS C. J.: Prostaglandin receptors in rat kidney, *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**: 32-42, 1984.
- [47] LIPSKY N. G., PAGNANO R. E., A vital stain for the Golgi apparatus, *Science*, **228**: 745-747, 1985.
- [48] LOCKHAUSEN J., KRISTEN U., Effects of cytochalasin B on the mitochondria and the Golgi apparatus in ovary gland cells of *Aptenia cordifolia*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **110**: 191-199, 1983.
- [49] LODISH H. F., KONG N., Glucose removal from N-linked oligosaccharide is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex, *J. Cell Biol.*, **98**: 1720-1729, 1984.
- [50] LOMBART C., STURGESS J., SCHACHTER H., The effect of turpentine induced inflammation on rat liver glycosyltransferases and Golgi complex ultrastructure, *Biochim. Biophys. Acta*, **629**: 1-12, 1980.
- [51] MARINARI U. M. CASU A., AVERAME M. M., COTTALASSO D., PRONZATO M., NANNI G., Role of Golgi apparatus on lipid metabolism in ethanol-induced liver injury, *Front. Gastrointest. Res.*, **8**: 24-45, 1984.
- [52] MAURICE M., BELLON B., MAHU J. L., FELDMANN G., Relationship between microtubules and Golgi apparatus in hepatocyte: a quantitative study during experimental nephrosis, *Biol. Cell*, **49**: 69-78, 1983.
- [53] MELIN B., KELLER G., GLASS C., WEINSTEIN D. B., STEINBERG D., Lipoprotein synthesis and secretion by cultured rat hepatocytes. Parallel inhibition of secretion of VLDL, HDL and albumin by monensin, *Biochim. Biophys. Acta*, **795**: 574-588, 1984.
- [54] MITRANIC M. M., BOGGS J. M., MOSCARELLO M. A., The effect of linoleic acid and benzylalcohol on the activity of glycosyl transferases of rat liver Golgi membranes and some soluble glycosyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta*, **693**: 75-84, 1982.
- [55] MOOKERJEA S., YUNG J. W. M., A study on the effect of lysolecithin and phospholipase A on membrane-bound galactosyltransferase, *Can. J. Biochem.*, **52**: 1053-1066, 1974.
- [56] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., FRIBERG U., In vitro influence of colchicine on the Golgi complex in A- and B-cells of quinea pig pancreatic islets, *J. Ultrastruct. Res.*, **54**: 304-317, 1976.
- [57] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., HINEK A., FRIBERG U., Fine structure of the Golgi complex during mitosis of cartilaginous cells in vitro, *Tissue & Cell*, **9**: 185-196, 1977.
- [58] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., LOHMANDER S., FRIBERG U., Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition

- on chondrocyte aggregates. An ultrastructural study *Exptl. Cell Res.*, **95**: 440-454, 1975.
- [59] ORCI L., MONTESANO R., MALAISSE-LAGAE F., BROWN D., PERRELET A., VASSALLI P., Heterogenous distribution of filipin-cholesterol complex across the cisternae of the Golgi apparatus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**: 293-297, 1981.
- [60] POLI C., CHIARPOTTO E., ALBANO E., COTTALASSO D., NANNI G., MARINARI U. M., BASSI A. M., DIANZANI M. U., Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury, *Life Sci.*, **36**: 533-539, 1985.
- [61] REAVEN E. P., REAVEN G. M. Evidence that microtubules play a permissive role in hepatocyte very low density lipoprotein secretion, *J. Cell Biol.*, **84**: 28-39, 1980.
- [62] REICHSTEIN B. J., COHEN M. M., Effect of acetazolamid on rat gastric mucosal protection and stimulated bicarbonate secretion with 16,16'dimethyl PGE<sub>2</sub>, *J. Lab. Clin. Med.*, **104**: 797-804, 1984.
- [63] ROBERT A., On the mechanism of cytoprotection by prostaglandins, *Annals Clin. Research.*, **16**: 335-338, 1984.
- [64] ROBERT A., NEZAMIS J. E., LANCASTER C., HANCHAR A. J., Cytoprotection by prostaglandins in rats. Preventions of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury, *Castroenterology*, **77**: 433-443, 1979.
- [65] ROMAGNOLI P., The Golgi apparatus and lysosomes of rat pancreatic acinar cells following refeeding, *Histochem. J.*, **16**: 855-868, 1984.
- [66] ROTHMAN J. E., The Golgi apparatus: two organelle in tandem, *Science*, **213**: 1212-1219, 1981.
- [67] SAWAKI K., TAGUCHI R., IKEZAWA H., Studies on the interactions between phospholipids and membrane-bound enzymes in microsomes. Effects of phospholipases C on the glucose-6-phosphatase system of rat liver microsomes, *J. Biochem.*, **93**: 525-535, 1983.
- [68] SARNECKA-KELLER M., KACZMARSKI F., KORDOWIAK A., Morphology of the Golgi apparatus in streptozotocin-diabetic rat liver, *Path. Res. Pract.*, **168**: 126-133, 1980.
- [69] SARNECKA-KELLER M., KORDOWIAK A., The activity of Golgi-membrane galactosyltransferase in the liver of streptozotocin-diabetic rats, *Acta Biochim. Polon.*, **24**: 179-185, 1977.
- [70] SARNECKA-KELLER M., KORDOWIAK A., CIBA T., Erythrocyte membrane cholesterol content in juvenile diabetes. Preliminary communications, *Acta Med. Pol.*, **21**: 253-256, 1980.
- [71] SCHWARZ J. K. CAPASSO J. M., HIRSCHBERG C. B., Translocation of adenosine 3'-phosphate 5'phosphosulfate into rat liver Golgi vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**: 3554-3559, 1984.
- [72] SHIER W. T., TROTTER III J. T., Stimulation of liver microsomal sialyltransferase activity by lysolecithin, *FEBS Lett.*, **62**: 165-168, 1976.
- [73] SOSIN D., KORDOWIAK A., Fizykochemiczne własności błon erytrocytów w cukrzycy naturalnej i doświadczalnej, *Zeszyty Nauk. UJ, Prace z Biol. Molek.*, **9**: 103-109, 1982.
- [74] SOSIN D., KORDOWIAK A., SARNECKA-KELLER M., Osmotic resistance of rat erythrocytes in hyperinsulinism and streptozotocin diabetes as compared with cholesterol and sialic acid contents of erythrocyte ghosts, *Hormone Metab. Research*, **16**: 89-92, 1984.



- [75] — Osmotic fragility of erythrocytes in insulin-dependent diabetes, *Acta Med. Pol.*, **23**: 29-35, 1982.
- [76] STACHURA J., TARNAWSKI A., SZCZUDRAWA J., MACH T., KIRCHMAYER S., KLIMCZYK B., Cytoprotective effect of 16,16'dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> and some drugs on an acute galactosamine induced liver damage in rat, *Folia Histochem. Cytochem.*, **18**: 311-318, 1980.
- [77] STROUS G. J. A. M., WILLEMSEN R., VAN KERKHOF P., SILOT J. W., GEUZE H. J., LODISH H. F., Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein, albumin and transferrin are transported to the cell surface via the same Golgi vesicles, *J. Cell Biol.*, **97**: 1815-1822, 1983.
- [78] SWIFT L. L., SOULÉ P. D., GRAY M. E., LE QUIRE V. S., Intestinal lipoprotein synthesis. Comparison of nascent Golgi lipoproteins from chow-fed and hypercholesterolemic rats, *J. Lipid Res.*, **25**: 1-13, 1984.
- [79] TAYLOR J. A., LIMBRICK A. R., ALLAN D., JUDAH J. D., Isolation of highly purified Golgi membranes from rat liver use of cycloheximide in vivo to remove Golgi contents, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**: 171-178, 1984.
- [80] TEPPERMAN H. M., DE WITT J., TEPPERMAN J., The effects of streptozotocin diabetes on the activities of rat liver glycosyltransferases, *Diabetes*, **32**: 412-415, 1983.
- [81] THYBERG J., HINEK A., Electron microscopic studies on embryonic chick spinal ganglion cells. In vitro effects of antimicrotubular agents on the Golgi complex, *J. Neurocytol.*, **6**: 27-38, 1977.
- [82] TULSIANI D. R. P., BROQUIST H. P., TOUSTER O., Marked differences in the swainsonine inhibition of rat liver lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase, rat liver Golgi mannosidase II and Jack Bean  $\alpha$ -D-mannosidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**: 427-434, 1985.
- [83] TULSIANI D. R. P., TOUSTER O., Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase, decreases Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase II and increases the plasma levels of several acid hydrolases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 594-600, 1983.
- [84] TULSIANI D. R. P., TOUSTER O., Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations, *J. Biol. Chem.*, **258**: 7578-7585, 1983.
- [85] WEHLAND J., HENKART M., KLAUSNER R., SANDOVAL J. V., Role of microtubules in the distribution of the Golgi apparatus: effect of taxol and microinjected anti- $\alpha$ -tubulin antibodies., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4286-4290, 1983.
- [86] WEHLAND J., SANDOVAL J. V., Cells injected with quanosine 5'-[ $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene] triphosphate, an  $\alpha$ , $\beta$ -nonhydrolyzable analog of GTP, show anomalous patterns of tubulin polymerization affecting cell translocation, intracellular movement, and the organization of Golgi elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1938-1941, 1983.
- [87] WEST D. W., CLEGG R. A., Casein kinase activity in rat mammary gland Golgi vesicles, *Biochem. J.*, **219**: 181-187, 1984.
- [88] ZHANG F., SCHNEIDER D. L., The bioenergetics of Golgi apparatus function: evidence for an ATP-dependent proton pump, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**: 620-625, 1983.

Otrzymano: 23 grudnia 1985.

Przyjęto: 23 czerwca 1986.

Adres: ul. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.





## MOLEKULARNE PODSTAWY USZKODZEŃ MROZOWYCH W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

### MOLECULAR BASIS OF FREEZING INJURIES IN PLANT CELLS

Alina KACPERSKA

Zakład Fizjologii Odporności Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski

*Streszczenie.* Przedstawiono przegląd współczesnych danych literaturowych wskazujących na kompleksowość skutków działania temperatury powodującej krystalizację wody w tkankach roślin. Omówiono warunki, które sprzyjają powstawaniu lodu wewnątrz komórek oraz skutki tego zjawiska. Szczegółowo przeanalizowano fizyczne i/lub chemiczne aspekty dehydratacji protoplastu, wywołanej pozakomórkową krystalizacją wody. Przedyskutowano również skutki działania samej temperatury ( $<0^{\circ}\text{C}$ ) na lipidowe i białkowe składniki błon. Podkreślono kluczową rolę plazmolemy w powstawaniu uszkodzeń mrozowych. Skonfrontowano poglądy podkreślające fizyczne lub metaboliczne skutki tych uszkodzeń i przedstawiono schemat systematyzujący różne aspekty uszkodzeń mrozowych w komórkach roślinnych.

*Summary.* The current literature data indicating a high complexity of freezing temperature effects on a plant cell are reviewed. The conditions and results of intracellular ice formation are discussed. The detailed analysis of physical and/or chemical effects of protoplast dehydration, due to extracellular ice formation, is given. The effects of low temperature ( $<0^{\circ}\text{C}$ ) itself on plant membrane constituents (lipids and proteins) are discussed. The key role of plasma membrane in freezing injuries is pointed out. The physical or metabolic consequences of the frost-induced membrane alterations are compared and a scheme systematizing different aspects of freezing on a plant cell is presented.

### WSTĘP

Problem odporności na zamarzanie (tzn. na działanie temperatury niższej niż temperatura krystalizacji wody) doczekał się wielu opracowań w ciągu ostatnich kilku lat. Są to zarówno opracowania zbiorowe, przy-

gotowane pod redakcją czołowych specjalistów z dziedziny odporności roślin [29, 30, 34, 49, 53], jak i opracowania przeglądowe, dotyczące wzajemnych relacji między odpornością na mróz a innymi stresami [25, 27, 28], skutków działania mrozu i odporności komórek na zamarzanie [52], zjawisk fizykochemicznych, zachodzących w trakcie zamarzania i tania oraz ich znaczenia dla przeżycia stresu przez komórkę [38], zjawiska głębokiego przechłodzenia i problemu unikania zamarzania przez tkanki i organy roślinne [2]. Ostatnie opracowanie tego typu dotyczy roli plazmolemy w uszkodzeniach mrozowych i aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury [78]. W opracowaniach tych podano poglądy różnych autorów na mechanizm uszkodzeń mrozowych. Zjawisko to, aczkolwiek obszernie dyskutowane na łamach czasopism naukowych, jest stosunkowo słabo prezentowane w podręcznikach akademickich. Do dziś budzi dużo kontrowersji i nawet emocji, gdy ścierają się poglądy różnych indywidualności naukowych, stanowiące rozwinięcie lub zaprzeczenie dotychczas znanych hipotez.

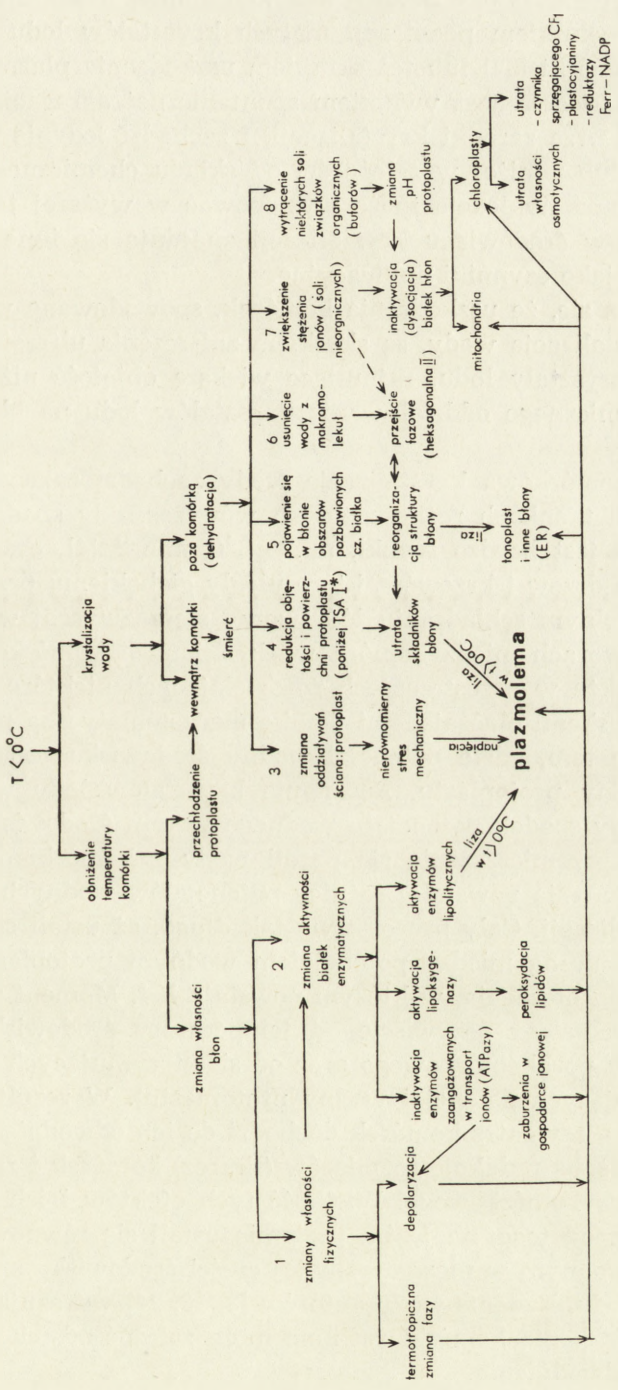
Opracowanie niniejsze jest próbą usystematyzowania ostatnio prezentowanych poglądów na mechanizm uszkodzeń mrozowych, zachodzących na terenie komórki roślinnej, i jednocześnie próbą ustosunkowania się autorki artykułu do tych poglądów.

#### PROCES ZAMARZANIA I JEGO SKUTKI

W wyniku obniżenia się temperatury środowiska poniżej punktu krystalizacji wody zachodzą w tkankach roślinnych dwa zjawiska: 1) obniżenie temperatury protoplastów, 2) w tkankach lub komórkach tworzą się kryształy lodu. W pierwszym przypadku zachodzi zmiana własności struktur budujących komórki i tkanki, w drugim — dochodzi do mechanicznego oddziaływania kryształów lodu na struktury tkankowe lub komórkowe, czemu towarzyszy wtórny efekt: odwodnienie protoplastu, o ile lód powstaje pozakomórkowo. Te różnorodne efekty zamarzania sprawiają, iż uszkodzenia mrozowe są zjawiskiem bardzo kompleksowym (patrz schemat). Jest to zapewne przyczyną wielu kontrowersji między badaczami tego zjawiska.

Nie budzi obecnie wątpliwości pogląd, że odporność tkanek roślinnych na zamarzanie polega na tolerowaniu pozakomórkowej krystalizacji wody [27, 28]. Powstanie lodu w obrębie komórki jest zawsze dla niej śmiertelne. Zachodzi wówczas, gdy spadek temperatury otoczenia jest bardzo szybki [4, 38, 40] lub też jest wynikiem przechłodzenia treści ko-





Ryc. Schemat wskazujący na możliwe miejsca i skutki działania temperatury poniżej 0°C (przygotowany na podstawie danych literaturowych przedstawionych w opracowaniu)

\* TSAI — tolerowane zwiększenie powierzchni

mórki poniżej temperatury hetero- lub homogennej nukleacji wody [39]. Może też być skutkiem penetracji małych kryształów lodu z zewnątrz do wnętrza komórki [37] lub też skutkiem uszkodzenia plazmolemy [82]. Homogenna nukleacja jest wynikiem spontanicznej agregacji cząsteczek wody, które tworzą zarodki krystalizacji, i zachodzi jedynie w temperaturze  $-39^{\circ}\text{C}$  lub poniżej w zależności od składu chemicznego roztworu [62]. Heterogenna nukleacja może występować w wyższej temperaturze wówczas, gdy w środowisku krystalizacji znajdują się inne substancje, które działają jako czynniki nukleacyjne.

Przypuszcza się, że uszkodzenia komórek, spowodowane wewnątrzkomórkową krystalizacją wody, są skutkiem zniszczenia ultrastruktury komórki przez kryształy lodu, zajmujące większą objętość niż woda [27], lub też mechanicznego oddziaływania kryształów lodu na błony komórkowe [78].

Wewnątrzkomórkowa krystalizacja wody zachodzi zazwyczaj w niezahartowanych tkankach roślin zielnych wówczas, gdy spadek temperatury otoczenia jest bardzo szybki, np.  $> 3^{\circ}\text{C min}^{-1}$  [4], oraz w niektórych tkankach drzew i krzewów, które uległy głębokiemu przechłodzeniu [2]. Przy powolnym schładzaniu lód tworzy się zazwyczaj w apoplaście, tzn. w przestworach międzykomórkowych, ścianach komórkowych i naczyń, a także w przestrzeniach rozdzielających niektóre organy [20, 63], np. pod łuskami otaczającymi tkankę merystematyczną pąków. Powstaje wszędzie tam, gdzie potencjał wodny środowiska jest wyższy niż potencjał wodny protoplastu. Powstanie kryształów lodu w apoplaście powoduje nagły spadek potencjału wodnego w tym środowisku, co z kolei powoduje przemieszczenie się porcji wody z komórki do apoplastu (w celu wyrównania powstałej różnicy potencjałów wodnych), gdzie ulega ona krystalizacji. Cały proces trwa tak długo, aż ustali się równowaga termodynamiczna między potencjałem wodnym protoplastu a potencjałem wodnym otoczenia, w którym powstaje lód. Moment ustalenia się tej równowagi zależy oczywiście od temperatury środowiska, osmolalności roztworu pozakomórkowego oraz od sił utrzymujących wodę w komórce (obniżających potencjał wodny protoplastu). W rezultacie krystalizacji wody na zewnątrz komórek dochodzi do ich odwodnienia, co z kolei pociąga za sobą redukcję rozmiarów (skurcz) komórek i zatężenie roztworu wewnątrzkomórkowego. Wielkość tych efektów i ich skutki zależą, oczywiście, od tego, na jakim poziomie ustali się równowaga między potencjałem wodnym w niezamarzniętej części środowiska a chemicznym potencjałem lodu. Badania wielu autorów [3, 13, 24] wskazują, że tolerancja zamarzania przez komórki roślinne może zależeć od ich zdolności do tolerowania odwodnienia.

Pogląd, że uszkodzenia mrozowe są spowodowane dehydratacją komór-



rek, po raz pierwszy sugerowany przez Müller-Thurgau'a w 1886 r. [48], był następnie przyjęty przez wielu badaczy, np. Åkerman [1], Maksimow [35, 36] i Molisch [46]. Skutki dehydratacji obejmowane są często wspólną nazwą efektów roztworu (ang. solution effects) [38, 39]. Trzeba sobie jednak zdawać sprawę z tego, że fizyczne i chemiczne następstwa dehydratacji są bardzo różnorodne: zachodzi skurcz komórek (a więc znaczne zmniejszenie objętości i powierzchni protoplastów), czemu towarzyszy wzrost stężenia substancji rozpuszczonych w roztworach wewnątrz- i pozakomórkowych, zmiany pH soku komórkowego, a także może dojść do usunięcia wody z makromolekuł komórkowych (patrz schemat). Ta różnorodność skutków dehydratacji mrozowej doprowadziła do wielu hipotez dotyczących mechanizmu tych uszkodzeń, przedstawionych w wielu opracowaniach przeglądowych [18, 28, 38, 43, 76, 77, 86]. Niektóre z tych hipotez nie znalazły pełnego potwierdzenia doświadczalnego (np. hipoteza dotycząca tzw. krytycznej, minimalnej objętości komórek Merymana [41]), inne, np. hipoteza sulfhydrylowa Levitta [26, 27], są ostatnio bardzo krytykowane. Istnieje jednak całkowita zgodność poglądów, że pierwotnym miejscem uszkodzeń mrozowych są błony, przy czym coraz więcej faktów przemawia za tym, że uszkodzenia nieodwracalne dotyczą w pierwszym rzędzie plazmolemy [78]. Według Steponkusa [78], konsekwencją indukowanej zamrażaniem modyfikacji struktury plazmolemy są uszkodzenia, które rozwijają się w czasie tajania. Stout [88] stwierdził jednak, że stres mrozowy powoduje uszkodzenia nie tylko plazmolemy, ale i tonoplastu. Ponadto wykazał, że krytyczny dla struktury tonoplastu moment występuje wówczas, gdy komórka pozostaje zamrożona, mimo że warunki temperaturowe, w jakich przebiega proces rozmrażania i w jakich przebywa tkanka po odtajaniu, mają wpływ na wielkość powstałych uszkodzeń.

#### FIZYCZNE ASPEKTY DEHYDRATAcji MROZOWEJ

Badania skutków dehydratacji mrozowej polegają na obserwacji skutków odwodnienia całych komórek albo skutków dehydratacji protoplastów uwolnionych ze ścian komórkowych. To pierwsze podejście pozwoliło na sformułowanie w latach trzydziestych hipotezy, iż pierwotną przyczyną uszkodzeń mrozowych jest mechaniczne rozerwanie protoplastu na skutek nierównomiernych napięć, powstających w czasie tajania i szybkiego wnikania wody do skurczonej uprzednio komórki [19]. Ważne w tej hipotezie jest, że wektory napięć i ich rozkład w komórce zależą

od obecności ściany komórkowej, której rozkurcz w czasie tajania jest szybszy niż ekspansja przytwierdzonego do niej odwodnionego protoplastu. Hipoteza Iljina była często kwestionowana przez badaczy, którzy obserwując skutki zamarzania i tajania w komórkach zwierzęcych lub protoplastach izolowanych ze ścian komórkowych wykazali, że te obiekty również ulegają uszkodzeniom mrozowym spowodowanym dehydratacją [28, 42, 78]. Jednakże badania Tao i innych [89] potwierdzają znaczenie ściany komórkowej w mechanizmie uszkodzeń mrozowych roślin (punkt 3 na schemacie) i wskazują, że jej obecność może zwiększyć zakres tych uszkodzeń w odwodnionych komórkach liści i kalusa ziemniaka: w komórkach tych nie dochodzi do plazmolizy protoplastu, a więc do oddzielenia się protoplastu od ściany komórkowej i przyjęcia przez niego postaci sferycznej, lecz zachodzi cytoryza, tzn. cytoplast wraz ze ścianą przyjmuje nieregularny kształt. Prowadzi to do zróżnicowania napięć powstających w czasie tajania, kiedy następuje szybka ekspansja skurczonej komórki.

Grupa badaczy, zajmujących się uszkodzeniami wywołanymi zamarzaniem w komórkach zwierzęcych lub w izolowanych protoplastach roślinnych, zakłada, iż bezpośrednią przyczyną uszkodzeń jest drastyczna redukcja objętości komórki lub protoplastu [42, 90], której towarzyszy drastyczna redukcja powierzchni błony komórkowej — plazmolemy (punkt 4 na schemacie), na co przede wszystkim zwracają uwagę Steponkus i jego współpr. (5, 78, 79, 80, 83, 85, 92]. W czasie tajania zachodzi gwałtowna ekspansja protoplastu i plazmolemy. Zanim protoplast osiągnie swoje początkowe rozmiary, następuje jego liza. Możliwość ekspansji protoplastu bez uszkodzenia nie zależy ani od zakresu uprzedniego jego skurczu, ani od jakiejś krytycznej wartości powierzchni plazmolemy, ale od wartości charakteryzującej zdolność protoplastu do powiększenia powierzchni, tzw. tolerowalnego zwiększenia powierzchni (ang. Tolerable Surface Area Increment, TSAI) [92]. Wartość  $TSAI_{50}$  określa takie zwiększenia powierzchni plazmolemy, które powodują lizę 50% protoplastów w badanej populacji. Jest to wartość stała dla gatunku, ale zależy od pH i składu jonowego ośrodka, w którym przemrażane są protoplasty. Wartość ta rośnie znacznie w czasie hartowania [4]. Zarówno Meryman i jego współpr. [43, 44, 93, 94], jak i Steponkus i jego koledzy [78, 95] uważają, że w czasie skurczu protoplastu zachodzi utrata materiału budującego błonę komórkową. Różnią się jednak poglądami na temat mechanizmu tego zjawiska. Williams i inni [94] utrzymują, że jest ono spowodowane ogromnym wzrostem ciśnienia w poprzek błony, powstającym w wyniku skurczu protoplastu, natomiast Wolfe i Steponkus [95-97] dowodzą, że jest to konsekwencja niewielkiego spadku napięcia powierzchniowego błony.



Obserwacje mikroskopowe wskazują, że w niezahartowanych komórkach i protoplastach poddanych przemrażaniu plazmolema wykazuje liczne wpuklenia, a ponadto tworzą się z niej na terenie cytoplazmy liczne drobne pęcherzyki świadczące o endocytozie [9, 51, 87]. W zahartowanych protoplastach zamiast endocytozy zachodzi egzocytoza [10, 82], co — zdaniem badaczy — umożliwia w czasie tajania i ekspansji protoplastu szybkie ponowne wchłonięcie fragmentów błony wydzielonych na powierzchni plazmolemy i zapobiega uszkodzeniom. Według tych autorów, różnice w zachowaniu się plazmolemy protoplastów niezahartowanych i zahartowanych stanowią podstawę ich zróżnicowanej odporności na zamarzanie.

Rozważając inne ewentualne skutki dehydratacji komórek i destabilizacji błon, spowodowanych pozakomórkową krystalizacją wody, należy wrócić do dawnej propozycji Maksimowa [35]; uszkodzenia mrozowe są spowodowane usunięciem wody z powierzchni komórki. Ostatnie badania, dotyczące przejścia fazowego w sztucznych i naturalnych błonach, wykazały, że wiele fosfolipidów podlega mezomorficznej zmianie fazy w wyniku dehydratacji: z układu dwuwarstwowego tworzy się układ heksagonalny II, o ile zawartość wody w tym układzie spadnie poniżej 20% [33, 72]. W układzie tym fosfolipidy tworzą długie cylindry, których wnętrze, zbudowane z grup polarnych, wypełnione jest wodą. Składniki hydrofobowe fosfolipidów (łańcuchy kwasów tłuszczowych) tworzą natomiast amorficzną hydrofobową strukturę. Taka zmiana struktury błony pozwala na łatwy przepływ wody wraz z jonami; błona traci własności selektywne i dochodzi do wycieku elektrolitów z komórek. Ostatnia praca Gordon-Kamma i Steponkusa [11] wskazuje, że dehydratacja mrozowa spowodowała faktycznie przejście fazowe w plazmolemie protoplastów izolowanych z niezahartowanych liści żyta: w błonie tej wykryto obszary lipidowe, pozostające w układzie heksagonalnym II (punkt 6 na schemacie). Jednakże wyniki badań Pearce'a i Willisona [60] nie potwierdzają występowania struktur heksagonalnych w błonach komórek liści pszenicy poddanych przemrażaniu. Autorzy ci stwierdzili natomiast, że w błonach tych zachodzi segregacja występujących w nich cząstek białkowych (ang. Intramembrane Particles, IMP) i pojawiają się obszary pozbawione tych cząstek (ang. IMP-free regions) — punkt 5 na schemacie. Obszary te wykrywano na terenie błony komórkowej, błon cytoplazmatycznych, a także tonoplastu. Analizując szczegółowo uzyskane obrazy błon i ewentualne przyczyny powstawania w błonach obszarów wolnych od IMP, autorzy dochodzą do wniosku, że zjawisko to nie jest spowodowane ani termotropiczną zmianą fazy lipidów, ani przejściem z układu dwuwarstwowego w heksagonalny. Nie może też być spowodo-

wane agregacją białek, wywołaną według Levitta [26] utlenianiem wolnych grup sulfhydrylowych i powstaniem mostków siarczkowych między poszczególnymi łańcuchami polipeptydowymi białek. Według Levitta [28], tworzenie się mostków siarczkowych między polipeptydami różnych cząstek białka mogłoby być przyczyną powstawania dużych agregatów białkowych w odwodnionych komórkach i prowadzić do denaturacji białek w czasie uwadniania. Pearce i Willison [60] wysuwają hipotezę, że pierwotną przyczyną reorganizacji struktury błon są zaburzenia w systemie wiążącym IMP z cytoszkieletem komórki. Uważają też, że pozbawione IMP obszary błon mogłyby być miejscami, w których zachodzi utrata lipidowego materiału błon w trakcie zamarzania, zgodnie z propozycją Steponkusa [78].

#### CHEMICZNE SKUTKI DEHYDRATACJI MROZOWEJ

Dehydratacja mrozowa, poza omówionymi już tu efektami, za które odpowiedzialna jest silna redukcja objętości i powierzchni komórki, powoduje również zwiększenie stężenia substancji i jonów rozpuszczonych w soku komórkowym. Wielu dawnych badaczy ujemnych skutków przemrażania [12, 15, 31, 50] sugerowało, że uszkodzenia dehydratacyjne są spowodowane chemicznym oddziaływaniem zwiększonego stężenia soli i/lub kwasów na protoplazmę (punkty 7 i 8 na schemacie). Liczne doświadczenia wykazały, że w wyniku wzrostu stężenia elektrolitów, zmian pH i usunięcia wody na skutek krystalizacji eutektyku następuje denaturacja kompleksów białkowo-lipidowych. Heber i Santarius [16, 17, 18] zgromadzili dużą liczbę danych na temat skutków oddziaływania elektrolitów nieorganicznych, kwasów organicznych, aminokwasów, cukrów i różnych krioprotektantów na błony tylakoidów. Z badań tych wynika, że utrzymanie nie zmienionej struktury błon w systemie składającym się z potencjalnie toksycznych dla błon soli oraz związków obojętnych, np. polialkoholi, zależy przede wszystkim od oddziaływań koligatywnych w roztworach (polialkohole zapobiegają w sposób niespecyficzny wzrostowi stężenia elektrolitów w niezamarzniętej frakcji wody). Niskocząsteczkowe węglowodany mogą chronić strukturę tylakoidów również w inny sposób — na drodze bezpośredniego oddziaływania ze składnikami tych błon [64]. W uszkodzeniach mrozowych tych błon odgrywają rolę też inne czynniki, takie jak ilość utworzonego lodu, ostateczne stężenie elektrolitów i błon w nie zamrożonej części roztworu, ostateczna objętość tej frakcji, temperatura i okres przemrażania [65, 66]. Wyniki badań



Steponkusa i jego kolegów wykazały, że uszkodzenia tylakoidów powstają w wyniku uwolnienia z błon (dysocjacji) specyficznych białek, takich jak czynnik sprzęgający (ang. Coupling Factor, CF<sub>1</sub>) i plastocyjanina [32, 75, 84]. Volger i inni [91] wykazali ponadto, że z przemrażanych tylakoidów następowało również uwolnienie reduktazy ferredoksyna-NADP. Z badań Herbera i współpracowników, którzy badali zachowania się tylakoidów w czasie przemrażania wynika, że destabilizacja tych błon spowodowana jest albo bezpośrednią interakcją składników błony z substancjami rozpuszczonymi w środowisku, albo też obniżeniem uporządkowania struktury wody na skutek działania rozpuszczonych w niej substancji chaotropicznych [78]. Bezpośrednie oddziaływania soli z błoną są przyczyną dysocjacji białek, spowodowanej zniesieniem oddziaływań jonowych w obrębie błony, zmianami w oddziaływaniach hydrofobowych w błonie lub zobojętnieniem ładunku, natomiast spadek stopnia uporządkowania wody, spowodowany oddziaływaniem substancji chaotropicznych, zwiększa oddziaływania między częściowo polarnymi składnikami błon i fazą wodną, co ułatwia dysocjację struktury dwuwarstwowej. Ponadto dysocjacja białek, które są nośnikami ujemnych ładunków na zewnętrznej części błony, może prowadzić do zmiany dystrybucji ładunku na błonie, co z kolei powoduje otworenie kanałów hydrofilnych i w rezultacie może doprowadzić do zniszczenia struktury błony. Ostatnie badania Jensena i Oetmeiera [21] wykazują, że czynniki kriotoksyczne oddziałują lokalnie na pewne mikrostruktury w błonach tylakoidów, powodując pęcznienie tylakoidów (utrata własności osmotycznych) w wyniku nieodwracalnego otworenia kanałów protonowych, czemu towarzyszy przepływ soli i/lub cukrów do woreczka tylakoidu.

Wszystkie te obserwacje i rozważania wskazują na istotną rolę zwiększonego (w wyniku dehydratacji mrozowej) stężenia elektrolitów wewnątrzkomórkowych w uszkodzeniach mrozowych błon tylakoidów. Zbliżonych danych na temat wpływu stężonych roztworów soli na inne błony (np. błony mitochondrialne lub plazmolemę) jest znacznie mniej. Jednakże fakt, że izolowane protoplasty i komórki roślinne, poddane działaniu roztworów hipertonicznych, wykazują uszkodzenia podobne do uszkodzeń mrozowych [6, 71, 73, 90, 92], sugeruje, że plazmolema może ulegać podobnym jak chloroplasty modyfikacjom spowodowanym oddziaływaniem toksycznych stężeń soli.

## SKUTKI DZIAŁANIA NISKIEJ TEMPERATURY

Niezależnie od skutków dehydratacji, wywołanych krystalizacją wody w apoplacie, uszkodzenia mrozowe mogą być spowodowane działaniem samej temperatury: zbyt niska temperatura może powodować zmiany we własnościach i funkcjonowaniu struktur komórkowych, niezależnie od modyfikacji spowodowanych dehydratacją mrozową (na schemacie punkty 1 i 2). Lipidowo-białkowa struktura błon sprawia, że zmiana własności błony pod wpływem niskiej temperatury może być spowodowana lub zapoczątkowana zmianą struktury każdego z tych składników. Prowadzone badania wskazują, że podobnie jak u roślin wrażliwych na chłód (tzn. u roślin wykazujących uszkodzenia w temperaturze  $> 0^{\circ}\text{C}$ ), również u roślin odpornych na chłód zachodzi termotropiczna zmiana fazy lipidów budujących błonę (płynno-krystaliczna struktura przechodzi w strukturę krystaliczną), albo też następuje rozdział (separacja) faz. W niektórych przypadkach temperatura przejścia fazowego, określona dla całych komórek lub dla lipidów wyekstrahowanych z tych komórek, odpowiada temperaturze powodującej uszkodzenia mrozowe [8, 61]. W innych pracach wykazano jednak, że przejście fazowe lipidów zapoczątkowywane jest działaniem temperatury znacznie wyższej od temperatury letalnej. Na przykład temperaturą letalną dla wielu drzew jest temperatura niższa niż  $-70^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy temperatura rozdziału faz, określona dla fosfolipidów wyekstrahowanych z tkanek tych drzew, mieści się w granicach od  $-30^{\circ}$  do  $-60^{\circ}\text{C}$  [14]. U zahartowanego rzepaku ozimego, krytyczną temperaturą, powodującą zabicie 50% komórek liścia, jest temperatura około  $-15^{\circ}\text{C}$ , rozdział zaś faz w błonach nienaruszonych liści lub w ekstraktach fosfolipidów uzyskanych z ich tkanek, zachodzi w temperaturze około  $0^{\circ}\text{C}$  [70]. U hartowanych i niehartowanych odmian żyta i pszenicy zachodzi odwrotne zjawisko: fosfolipidy wyekstrahowane z tkanek tych roślin wykazują rozdział faz w temperaturze o około  $20^{\circ}\text{C}$  niższej niż temperatura letalna [14]. Niezgodność między temperaturą krytyczną i temperaturą przejścia fazowego tłumaczy niektórym tym, że temperaturą krytyczną dla komórek może być przede wszystkim ta temperatura, w której zachodzi przejście fazowe jednej tylko błony lub nawet jakiejś jej domeny, a nie wszystkich błon i wszystkich fosfolipidów komórkowych. Wyniki badań Yoshidy [99, 100], przeprowadzonych na frakcji błon wzbogaconej w plazmolemę, wykazały, że temperatura przejścia fazowego tej błony odpowiada temperaturze 50% uszkodzenia mrozowego. Yoshida [100] uważa, że rozdział faz lub przejście fazowe plazmolemy predysponuje komórkę do reakcji na działanie innych czynników spowodowanych zamrażaniem, a więc również na dehy-



dratację. Yoshida [100] wykazał, że temperatura przejścia fazowego plazmolemy zależy w dużej mierze od zawartości w niej białek. Obecność białek sprawiała, iż przejście fazowe tej błony zachodziło w temperaturze około 10°C niższej niż temperatura przejścia fazowego liposomów lub błon potraktowanych pronazą. Sądzi więc, że białka błon stanowią istotny czynnik determinujący reakcję plazmolemy na niską temperaturę.

Pierwszorzędową rolę białek w reakcji błon na zamrażanie pozakomórkowe sugerują też prace Palty i jego współpracowników [54-59]. Prowadząc obserwacje, dotyczące morfologii oraz zdolności do plazmolizy i deplazmolizy komórek epidermy łusek cebuli oraz liści ziemniaka poddanych przemrażaniu, wykazali oni, że pierwszym objawem nienormalnego funkcjonowania błon był wyciek niektórych jonów (przede wszystkim potasu) i cukrów z przymrożonych komórek, przy czym zjawisko to zachodziło w komórkach, których plazmolema zachowała nadal swoje własności półprzepuszczalne w stosunku do wody. Na tej podstawie badacze dochodzą do wniosku, że pierwotnym miejscem uszkodzeń spowodowanych niską temperaturą są ATP-azy zlokalizowane w błonie, odpowiedzialne za transport jonów, przede wszystkim potasu (punkt 2 na schemacie). Zmiana stosunków jonowych w komórce (spadek zawartości jonów  $K^+$  pociąga za sobą uwalnianie  $Ca^{2+}$ ) prowadzi z kolei do degradacji błon i śmierci komórki. Propozycja ta spotkała się z ostrą krytyką ze strony Steponkusa [78], który zwraca uwagę, że prace Palty i współpracowników dotyczą początkowych i odwracalnych jeszcze skutków działania niskiej temperatury, natomiast nie wyjaśniają mechanizmu uszkodzeń nieodwracalnych, których przyczyną jest dehydratacja protoplastu. Cytochemiczne badania Jiana i innych [22] wskazują jednak, że w wyniku przemrażania niezahartowanych liści pszenicy faktycznie dochodzi do zahamowania aktywności ATP-az zlokalizowanych w plazmolemie, natomiast w komórkach zahartowanych aktywność tych enzymów jest wysoka, nawet w niskiej (+5°C) temperaturze środowiska.

Wydaje się, że zahamowanie aktywności ATP-az zaangażowanych w transport jonów jest jedną z bardzo wczesnych reakcji błon na niską temperaturę. Ponieważ u roślin wyższych pierwotnym aktywnym procesem transportowym jest elektrogeniczny transport protonów, można więc przypuszczać, że hamowanie pomp elektrogenicznych zlokalizowanych w plazmolemie i tonoplaście, powodujące depolaryzację błon, jest głównym elementem reakcji roślin na temperaturę niższą od 0°C i być może jest też przyczyną uszkodzeń spowodowanych niską, ale > 0°C temperaturą u roślin wrażliwych na chłód [74].

Zmiany własności błon w niskiej temperaturze i zaburzenia w gospo-

darce jonowej komórek, głównie zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , mogą również doprowadzić do aktywacji enzymów lipolitycznych związanych z błoną, przede wszystkim fosfolipazy D [69, 98]. Enzym ten, aktywny nawet w temperaturze  $-30^{\circ}\text{C}$ , powoduje degradację fosfatydylocholiny, czemu towarzyszy nagromadzenie się kwasu fosfatydowego w komórkach [98]. Kwas fosfatydowy, działając jako detergent, powoduje dalszą degradację błon. Badania Moreau'a i Isett [47] wykazały, że stymulowana przez  $\text{Ca}^{2+}$  aktywacja enzymów lipolitycznych w komórkach roślinnych może być pod kontrolą kalmoduliny.

W wyniku działania niskiej temperatury dochodzi również do aktywacji lipoksygenazy [23, 101]. Enzym ten, katalizujący utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, powoduje powstawanie hydroksynadtlenków lipidów, które mogą zapoczątkować łańcuch reakcji wolnorodnikowych w systemach biologicznych i doprowadzić do destrukcji błon i struktur białkowych. Rozpuszczalna, nie związana z błonami frakcja lipoksygenazy wykazuje znaczącą aktywność nawet w temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$  [7].

Wspólną cechą modyfikacji aktywności wymienionych tu enzymów jest to, że zależą one od gospodarki jonowej na terenie cytoplazmy, a przede wszystkim od zmian stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Być może słuszna jest hipoteza Minorsky'ego [45], która proponuje, iż w reakcji roślin na stres spowodowany niską temperaturą centralną rolę odgrywają reakcje zależne od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny. Wydaje się, że reakcje te mogą prowadzić do odwracalnych lub nieodwracalnych zmian własności błon, w zależności od natężenia stresu (tzn. od spadku temperatury i czasu jej działania), dodatkowych jego efektów (np. dehydratacji) i oczywiście uwarunkowań genetycznych i środowiskowych (adaptacji ewolucyjnej i osobniczej). Wyniki ostatnio prowadzonych badań wskazują, że wstępne naruszenie właściwości błon jest czynnikiem nieodzownym do zainicjowania procesów prowadzących do zwiększenia tolerancji komórek na zamrażanie, o ile zaistnieją sprzyjające warunki [67, 68]. Ten aspekt działania niskiej temperatury wymaga dokładnych badań.

Na zakończenie tego przeglądu udowodnionych doświadczalnie lub spodziewanych i postulowanych mechanizmów uszkodzeń mrozowych należy dodać, że dotyczą one zachowania się pojedynczej, modelowej komórki. Wrażliwość różnych komórek na zamrażanie może być oczywiście różna. Jest ona wypadkową uwarunkowań genetycznych (zmienności genetycznej), programu genetycznego aktualnie przez komórkę realizowanego (a więc jej stadium rozwojowego, specjalizacji i lokalizacji tkankowej), a także zmian spowodowanych oddziaływaniem środowiska na wzrost i rozwój całej rośliny (zmienności fenotypowej). Można więc przypusz-



czać, że główny mechanizm uszkodzeń spowodowanych zamrażaniem może być różny dla różnych komórek. Na przykład skurcz protoplastu i redukcja powierzchni błony komórkowej mogą mieć zasadnicze znaczenie dla zwakuolizowanych komórek parenchmatycznych kory lub liści, natomiast nie będą przyczyną uszkodzeń komórek merystematycznych. Termotropiczny rozdział faz lub zaburzenia w transporcie i zawartości jonów mogą mieć zasadnicze znaczenie dla metabolicznie aktywnych komórek liści lub korzeni, natomiast nie będą miały większego znaczenia dla komórek znajdujących się w stanie głębokiego spoczynku (np. dla komórek kory spoczynkowych gałęzi i pni). Mając więc na uwadze całą złożoność problemu uszkodzeń mrozowych, w badaniach ich mechanizmu należałoby zawsze brać pod uwagę rodzaj, etap rozwojowy i stan fizjologiczny tkanki będącej przedmiotem badań. W badaniach dotyczących odporności mrozowej całych roślin należy brać pod uwagę te tkanki, których funkcja i lokalizacja może decydować o przeżyciu całego osobnika.

## LITERATURA

- [1] ÅKERMAN A., Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen nebst Unter Suchungen über die Winterfestigkeit des Weizens, Lund, 1927.
- [2] BURKE M. J., GUSTA L. V., QUAMME H., WEISER C. J., LI P. H., Freezing and injury in plants, *Ann Rev. Plant Physiol.*, **27**: 507-528, 1976.
- [3] CHEN P. H., BURKE M. J., LI P. H., The frost hardiness of several *Solanum* species in relation to the freezing of water, melting point depression and tissue water content, *Bot. Gaz.*, **137**: 313-317, 1976.
- [4] DOWGERT M. F., STEPONKUS P. L., Effect of cold acclimation on intracellular ice formation in isolated protoplasts, *Plant Physiol.*, **72**: 978-988, 1983.
- [5] — Behaviour of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle, *Plant Physiol.*, **75**: 1152-1157, 1984.
- [6] EVANS R. Y., STEPONKUS P. L., Survival of isolated protoplasts in hypertonic solutions, *Plant Physiol.*, **67**: 122 (Suppl.), 1981.
- [7] FENNEMA O., SINGH J. C., Lipoyxygenase-catalyzed oxidation of linolenic acid at subfreezing temperatures, *Cryobiology*, **17**: 500-507, 1980.
- [8] FEY R. L., WORKMAN M., MARCELLOS H., BURKE M. J., Electron spin resonance of 2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) — labeled plant leaves, *Plant Physiol.*, **63**: 1220-1222, 1979.
- [9] GORDON-KAMM W. J., STEPONKUS P. L., The behaviour of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: Implications in freezing injury, *Protoplasma*, **123**: 83-94, 1984.
- [10] GORDON-KAMM W. J., STEPONKUS P. L. The influence of cold acclimation on the behaviour of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts, *Protoplasma*, **123**: 161-173, 1984.

- [11] GORDON-KAMM W. J., STEPONKUS P. L., Lamellar-to-hexagonal II phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6373-6377, 1984.
- [12] GORKE H., Über chemische Vorgänge beim Erfrieren der Pflanzen, *Landwirtsch. Vers. Stn.*, **65**: 149-160, 1906.
- [13] GUSTA L. V., BURKE M. J., KAPOOR A. C., Determination of unfrozen water in winter cereals at subfreezing temperatures, *Plant Physiol.*, **56**: 707-709, 1975.
- [14] HARVEY G. W., GUSTA L. V., FORK D. C., BERRY J. A., The relation between membrane lipid phase separation and frost tolerance of cereals and other cool climate species, *Plant Cell Environ.*, **5**: 241-244, 1982.
- [15] HARVEY R. B., Hardening process in plants and developments from frost injury, *J. Agric. Res.*, **15**: 83-112, 1918.
- [16] HEBER U., Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplasts, *Plant Physiol.*, **42**: 1343-1350, 1967.
- [17] HEBER U., SANTARIUS K. A., Loss of adenosine triphosphate synthesis caused by freezing and its relationship to frost hardiness problems, *Plant Physiol.*, **39**: 712-719, 1964.
- [18] — Cell death by cold and heat and resistance to extreme temperatures. Mechanisms of hardening and dehardening, [w] *Temperature and Life*, red. H. Precht, J. Christopheron, H. Hensel, W. Larcher, Berlin, Springer Verlag, 1973, 232-263.
- [19] ILJIN W. S., Über den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen, *Protoplasma*, **20**: 105-124, 1933.
- [20] ISHIKAWA M., SAKAI A., Characteristics of freezing avoidance in comparison with freezing tolerance: A demonstration of extraorgan freezing, [w] *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, 1982, 325-340.
- [21] JENSEN M., OETMEIER W., Effects of freezing on the structure of chloroplast membranes, *Cryobiology*, **21**: 465-473, 1984.
- [22] JIAN L.-C., SUN L.-H., DONG H.-Z., SUN D.-L., Changes in ATPase activity during freezing injury and cold hardening, [w] *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York 1982, 243-259.
- [23] KACPERSKA A., KUBACKA-ZEBALSKA M., Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC? *Physiol. Plant.*, **64**: 333-338, 1985.
- [24] KACPERSKA-PALACZ A., EGIERSZDORFF S., Effects of cold hardening and CCC treatment on hydration and frost and desiccation hardiness of plant tissues, *Bot. Gaz.*, **133**: 355-360, 1972.
- [25] LEVITT J., Frost, drought, and heat resistance, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **2**: 245-268, 1951.
- [26] — A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants, *J. Theoret. Biol.*, **3**: 355-391, 1962.
- [27] — Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York 1972, 697.
- [28] — Responses of Plants to Environmental Stresses, t. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses, Academic Press, New York, wyd. 2, 1980, 497.
- [29] LI P. H., SAKAI A. (wyd.), *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, Academic Press, New York, t. 1, 1978, 416.
- [30] — *ibidem*, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 694.



- [31] LIDFORSS B., Die wintergrüne Flora. Lunds Univers, Arsskr. Avd. 2, No. 13, 76, 1907.
- [32] LINEBERGER R. D., STEPONKUS P. L., Effects of freezing on the release and inactivation of chloroplast coupling factor 1, *Cryobiology*, **17**: 486-494, 1980.
- [33] LUZZATTI V. X-ray diffraction studies of lipid-water systems, [w] *Biological Membranes*, red. D. Chapman, Academic Press, New York 1968, 71-123.
- [34] LYONS J. M., GRAHAM D., Raison J. K. (wyd.), *Low Temperature Stress in Crop Plants*, Academic Press, New York, 1979, 569.
- [35] MAKSIMOW N. A., *Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren*, Berl. Dtsch. Bot. Ges., **30**: 52-65, 293-305, 504-516, 1912.
- [36] MAKSIMOW N. A., Internal factors of frost and drought resistance in plants, *Protoplasma*, **7**: 259-291, 1929.
- [37] MAZUR P., The role of cell membranes in the freezing of yeast and another single cells, *Ann. NY Acad. Sci.*, **125**: 658-676, 1965.
- [38] — Freezing injury in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**: 419-448, 1969.
- [39] — *Cryobiology: The freezing of biological systems*, *Science*, **168**: 939-949, 1970.
- [40] — The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology*, **14**: 251-272, 1977.
- [41] MERYMAN H. T., Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes, *Nature*, **218**: 333-336, 1968.
- [42] — Osmotic stress as a mechanism of freezing injury, *Cryobiology*, **8**: 489-500, 1971.
- [43] — Freezing injury and its prevention in living cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.*, **3**: 341-363, 1974.
- [44] MERYMAN H. T., WILLIAMS R. J., DOUGLAS M. St. J., Freezing injury from „solution effects” and its prevention by natural and artificial cryoprotection, *Cryobiology*, **14**: 287-302, 1977.
- [45] MINORSKY P. V., An heuristic hypothesis of chilling injury a role for calcium as the primary physiological transducer of injury, *Plant, Cell and Environment*, **8**: 75-94, 1985.
- [46] MOLISCH H., Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen, przedruk w j. ang. w 1982 w *Cryo-Letters*, **3**: 332-390, 1897.
- [47] MOREAU R. A., ISETT T. F., Autolysis of membrane lipids in potato leaf homogenates: effects of calmodulin and calmodulin inhibitors, *Plant Sci.*, **40**: 95-98, 1985.
- [48] MÜLLER-THURGAN H., Über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen, *Landwirtsch. Jahrb.*, **15**: 453-610, 1986.
- [49] MUSSEL H., STAPLES R. C., *Stress Physiology in Plants*, Wiley-Interscience, New York, 1979, 510.
- [50] NEWTON R., Colloidal properties of winter wheat plants in relation to frost resistance, *J. Agric. Sci.*, **14**: 178-191, 1924.
- [51] NIKI T., SAKAI A., Ultrastructural changes related to frost hardness in the cortical parenchyma cells from mulberry twigs, *Plant Cell Physiol.*, **22**: 171-183, 1981.
- [52] OLIEN C. R., Freezing stresses and survival, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **18**: 387-408, 1967.
- [53] OLIEN C. R., SMITH M. N., *Analysis and Improvement of Plant Cold Hardiness*, CRC-Boca Raton. 1981, 215.

- [54] PALTA J. P., JENSEN K. G., LI P. H., Cell membrane alterations following a slow freeze-thaw cycle: ion leakage, injury and recovery, [w] *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York 1982, 221-242.
- [55] PALTA J. P., LEVITT J., STADELMANN E. J., Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells, *Plant Physiol.*, **60**: 393-397, 1977 a.
- [56] — Freezing injury in onion bulb cells. II. Post-thawing injury or recovery, *Plant Physiol*: **60**: 396-401, 1977 b.
- [57] — Freezing tolerance of onion bulb cells and significance of freeze-induced tissue infiltration, *Cryobiology*, **14**: 614-619, 1977 c.
- [58] PALTA J. P., LI P. H., Cell membrane properties in relation to freezing injury, [w] *Plant Cold Cardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A Sakai, Academic Press, New York 1978, 93-115.
- [59] — Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory, *Physiol. Plant.*, **50**: 169-175, 1980.
- [60] PEARCE R. S., WILLISON J. H. M., A freeze-etch study of the effects of extracellular freezing on cellular membranes of wheat, *Planta*, **163**: 304-316, 1985.
- [61] RAJASHEKAR C., GUSTA L. V., BURKE M. J., Membrane structural transitions: Probable relation to frost-damage in hardy herbaceous species, [w] *Low Temperature Stress in Crop Plants*, red. J. M. Lyons, D. Graham i J. K. Raison, Academic Press, New York 1979, 255-274.
- [62] RASSMUSSEN D. H., MacKENZIE A. P., Effect of solute on the ice-solution interfacial free energy; calculation from measured homogenous nucleation temperatures, [w] *Water Structure at the Water-Polymer Interface*, red. H. H. G. Jellinek, Plenum, New York 1972, 126-145.
- [63] SAKAI A. Extraorgan freezing of primordial shoots of winter buds of conifer, [w] *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 199-209.
- [64] SANTARIUS K. A., Bauer J., Cryopreservation of spinach chloroplast membranes by low-molecular-weight carbohydrates. Evidence for cryoprotection by noncolligative-type mechanism, *Cryobiology*, **20**: 83-89, 1983.
- [65] SANTARIUS K. A., GIERSCH C., Cryopreservation of spinach chloroplast membranes by low-molecular-weight carbohydrates II. Discrimination between colligative and noncolligative protection, *Cryobiology*, **20**: 90-99, 1983.
- [66] — Factors contributing to inactivation of isolated thylakoid membranes during freezing in the presence of variable amounts of glucose and NaCl, *Biophys. J.*, **46**: 129-139, 1984.
- [67] SIKORSKA E., KACPERSKA-PALACZ A., Frost-induced phospholipid changes in cold acclimated and non-acclimated rape leaves, *Physiol. Plant.*, **48**: 201-206, 1980.
- [68] SIKORSKA E., KACPERSKA A., Freezing-induced membrane alterations: injury or adaptation? [w] *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 261-272.
- [69] — Modification of phospholipase D activity during frost hardening of winter rape plants, [w] *Biochemistry and Metabolism of Lipids*, red. J. F. G. Wintermans i P. J. C. Kuiper, Elsevier Biomedical Press, New York 1982, 415-418.



- [70] SIKORSKA E., ONDRIAS K., FARKAS T., Physical properties of membrane of cold-hardened and non-hardened winter rape plants, *Acta Biol. Acad. Sci. hung.*, **32**: 267-274, 1981.
- [71] SIMINOVITCH, D., Protoplasts survive freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  and osmotic dehydration in 5 molar salt solutions prepared from the bark of winter black locust trees, *Plant Physiol.*, **63**: 722-725, 1979.
- [72] SIMON E. W., Phospholipids and plant membrane permeability, *New Phytol.*, **73**: 377-420, 1974.
- [73] SINGH J., Isolation and freezing tolerance of mesophyll cells from cold-hardened and non-hardened winter rye, *Plant Physiol.*, **67**: 906-909, 1981.
- [74] SOBCZYK E. A., MARSZAŁEK A., KACPERSKA A., ATP involvement in plant tissue responses to low temperature, *Physiol. Plant.*, **63**: 399-405, 1985.
- [75] STEPONKUS P. L., Cold hardiness and freezing injury of agronomic crops, *Adv. Agron.*, **30**: 51-98, 1978.
- [76] — Effects of freezing and cold acclimation on membrane structure and function, [w] *Stress Physiology in Plants*, red. H. Hussel i R. C. Staples, Wiley-Interscience, New York 1979, 143-158.
- [77] — Responses to extreme temperatures. Cellular and subcellular basis, [w] *Encyclopedia of Plant Physiol*, Nowa Seria: Physiological Plant Ecology I, red. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond i H. Ziegler, Springer Verlag, Berlin, 1981, 12A: 371-402.
- [78] — Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **35**: 543-584, 1984.
- [79] STEPONKUS P. L., DOWGERT M. F., EVANS R. Y., GORDON-KAMM W. J., Freeze-induced dehydration: Effect on the plasma membrane of isolated protoplasts, [w] *Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 310-322.
- [80] Cryobiology of isolated protoplasts, [w] *Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 459-474.
- [81] STEPONKUS P. L., DOWGERT M. F., FERGUSON J. R., LEVIN R. L., Cryomicroscopy of isolated plant protoplasts, *Cryobiology*, **21**: 209-233, 1984.
- [82] STEPONKUS P. L., DOWGERT M. F., GORDON-KAMM W. J., Destabilization of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation, *Cryobiology*, **20**: 448-465, 1983.
- [83] STEPONKUS P. L., EVANS R. Y., SINGH J., Cryomicroscopy of isolated rye mesophyll cell, *Cryo-Letters*, **3**: 101-114, 1982.
- [84] STEPONKUS P. L., GARBER M. P., MYERS S. P., LINEBERGER R. D., Effects of cold acclimation and freezing on structure and function of chloroplast thylakoids, *Cryobiology*, **14**: 303-321, 1977.
- [85] STEPONKUS P. L., WIEST S. C., Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing, [w] *Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York 1978, 75-91.
- [86] — Freeze-thaw-induced lesions in the plasma membrane, [w] *Low Temperature Stress in Crop Plants*, red. J. H. Lyons, D. Graham i J. K. Raison, Academic Press, New York 1979, 231-254.
- [87] STEPONKUS P. L., WOLFE J., DOWGERT M. F., Stress induced contraction and expansion during a freeze-thaw cycle: A membrane perspective, [w] *Effects of Low Temperature on Biological Membranes*, red. G. J. Morris i A. Clarke, Academic Press, London 1981, 307-332.

- [88] STOUT D. G., Evaluation of freezing injury and freeze-thaw injury to membranes of Saskatoon serviceberry twigs by measuring HCN release, *Physiol. Plant.*, **57**: 573-578, 1983.
- [89] TAO D., LI P. H., CARTER J. V., Role of cell wall in freezing tolerance of cultured potato cells and their protoplasts, *Physiol. Plant.*, **58**: 527-532, 1983.
- [90] TOWILL L. E., MAZUR P., Osmotic shrinkage as a factor in freezing injury in plant tissue cultures, *Plant Physiol.*, **57**: 290-296, 1976.
- [91] VOLGER H., HEBER U., BERZBORN R. J., Loss of function of biomembranes and solubilization of membrane proteins during freezing, *Biochim. Biophys. Acta*, **511**: 455-469, 1978.
- [92] WIEST S. C., STEPONKUS P. L., Freeze-thaw injury to isolated spinach protoplasts and its simulation at above freezing temperatures, *Plant Physiol.*, **62**: 699-705, 1978.
- [93] WILLIAMS R. J., HOPE H. J., The relationship between cell injury and osmotic volume reduction III. Freezing injury and frost resistance in winter wheat, *Cryobiology*, **18**: 133-145, 1981.
- [94] WILLIAMS R. J., WILLEMOT C., HOPE H. J., The relationship between cell injury and osmotic volume reduction IV. The behaviour of hardy wheat membrane lipids in monolayer, *Cryobiology*, **18**: 146-154, 1981.
- [95] WOLFE J., STEPONKUS P. L., The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **643**: 663-668, 1981.
- [96] — Mechanical properties of the plasma membrane of isolated plant protoplasts, *Plant Physiol.*, **71**: 276-285, 1983.
- [97] — Tension in the plasma membrane during osmotic contraction, *Cryo-Letters*, **4**: 315-322, 1983.
- [98] YOSHIDA S., Phospholipid degradation and its control during freezing of plant cells, [w] *Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York 1978, 117-139.
- [99] — Fluorescence polarization studies on plasma membrane isolated from mulberry bark tissue, [w] *Cold Hardiness and Freezing Stress*, red. P. H. Li i A. Sakai, Academic Press, New York, t. 2, 1982, 273-284.
- [100] — Studies on freezing injury of plant cells. I. Relation between thermotropic properties of isolated plasma membrane vesicles and freezing injury, *Plant Physiol.*, **75**: 38-42, 1984.
- [101] ZHIROV V. K., MERZLYAK M. N., Cultivation of pea plants (*Pisum sativum* L.) at low temperature decrease lipid peroxidation induced by freezing-thawing, *Plant Science Letters*, **30**: 185-191, 1983.

Otrzymano: 18 czerwca 1986.

Przyjęto: 28 czerwca 1986.

Adres: Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa.



## NIEKTÓRE ASPEKTY ZAPŁODNIENIA OOCYTÓW SSAKÓW

## SOME ASPECTS OF MAMMALIAN OOCYTES FERTILIZATION

Anna NIEMIERKO, Aldona KOMAR

Pracownia Embriologii Doświadczalnej i Zakład Histologii i Embriologii,  
Akademia Medyczna, Warszawa

*Streszczenie.* W pracy dokonano przeglądu najnowszych badań dotyczących procesu zapłodnienia oocytów ssaków. Omówiono trzy zjawiska: bloku przeciwko polispermii, II podziału dojrzewania i rozwoju przedjądrzy. Opisano struktury uczestniczące w bloku przeciwko polispermii, ziarna korowe i osłonę przejrzystą oraz mechanizmy powstawania bloku, reakcje korową i osłony. Przedstawiono udział cytoszkieletu komórki jajowej w mechanizmie II podziału dojrzewania oraz wyniki badań dotyczących procesu przekształcania jądra plemnika w przedjądrze męskie.

*Summary.* This article is a review of topic knowledge about mammalian fertilization. Succeeding sections are considering three subjects: block to polyspermy, second meiotic division and pronuclear development. In the section regarding block to polyspermy participating elements have been described; the cortical granules and zona pellucida, and also the mechanisms of developing this block have been considered: cortical and zona reaction. In the next sections the participation of oocyte cytoskeleton in the second meiotic division and the process of transformation of the spermatozoon nucleus into male pronucleus is described.

## 1. WSTĘP

Fuzja błon oocyta i plemnika podczas zapłodnienia u ssaków zapoczątkowuje istotne zjawiska tego procesu, a są nimi: powstanie bloku przeciwko polispermii, dokończenie II podziału dojrzewania i wyrzucenie II ciała kierunkowego, oraz przekształcenie główki plemnika w przedjądrze

rze męskie. W ostatnich latach zjawiska te są intensywnie badane i dokładniej poznane, a ich wyniki będą tu przedstawione.

## 2. POWSTANIE BLOKU PRZECIWKO POLISPERMII

W oocytach ssaków blok przeciwko polispermii, dzięki któremu zapłodnienie jest monospermiczne, funkcjonuje na poziomie osłony przejrzystej (zona pellucida) i oolemy. Wyjątkiem są tu oocyty chomika mające tylko silny blok osłony przejrzystej i oocyty królika, gdzie funkcjonuje tylko blok oolemy [1].

W powstaniu bloku przeciwko polispermii na poziomie osłony uczestniczą dwie struktury: ziarna korowe i osłona przejrzysta. Ziarna korowe większości gatunków ssaków mają wymiary od 200 do 600  $\mu\text{m}$  i są otoczone błoną. Powstają w kompleksie Golgiego i ulegając pewnemu zróżnicowaniu wędrują pod powierzchnię oocytu [16]. Są wykrywalne już w oocytach otoczonych jedną warstwą komórek follikularnych. W owulowanym oocycie rozłożone są polarnie, gdyż obecne są tylko w obszarze pokrytym mikrokosmkami, który stanowi 80% powierzchni błony oocytu. Ziaren korowych nie stwierdza się pod powierzchnią gładką oocytu, czyli obszarze zajmowanym przez wrzeciono metafazy II [42, 43]. Ziarna te zawierają głównie enzymy podobne do trypsyny i peroksydazy, zwane owo-peroksydazami, co ustalono na podstawie badań histochemicznych i fizjologicznych [17, 59, 60]. W oocytach większości ssaków wyróżnia się dwie populacje ziaren różniących się gęstością elektronową, mniej liczną ziaren jasnych i dominującą liczebnie ziaren ciemnych [16, 43]. Ciemne ziarna korowe uwalniane są w reakcji korowej, odbywającej się po fuzji błon oocytu i plemnika. W wyniku reakcji korowej powstaje tzw. reakcja osłony, podczas której pod wpływem enzymów ziaren korowych dokonują się biochemiczne zmiany właściwości osłony. Zmienia ona swoje właściwości fizyczne i chemiczne i staje się nieprzepuszczalna dla dalszych plemników [20]. Liczba ziaren jasnych znacznie maleje po owulacji oocytu. Uwalnianie ziaren jasnych przed wniknięciem plemnika nosi nazwę przedwczesnej reakcji korowej. Zjawisko to nie wpływa na zmianę własności osłony. Sugerowany jest jego udział w niszczeniu wypustek komórek follikularnych. Wypustki tych komórek do owulacji mają ścisły kontakt z cytoplazmą komórki jajowej. Pozostaje nie wyjaśniona kwestia, czy ziarna ciemne i jasne przedstawiają różne stadia dojrzewania ziaren, czy ich występowanie związane jest z różną funkcją podczas dojrzewania oocytu i zapłodnienia. Spontaniczna, przedwczesna reakcja korowa w przedowulacyjnych oocytach jajnikowych, w której zachodzi egzocytaza ziaren ciemnych, stwierdzona została w oocytach niepłodnych ko-



biet [56]. Podobne zjawisko występuje u wsobnych myszy KE i jest defektem genetycznym, powodującym obniżenie płodności tego szczepu [25].

W egzocytozie ziaren korowych biorą udział podbłonowe filamenty aktynowe oocytu [16]. Zniszczenie tych filamentów przez cytochalazynę B, obecną podczas zapłodnienia, hamuje zarówno reakcję korową, jak i reakcję osłony [45]. Reakcja korowa przebiega, gdy wzrasta stężenie wolnych jonów  $Ca^{++}$  w cytoplazmie oocytu, co następuje po fuzji błony plemnika z oolemą. Mechanizm egzocytozy został dokładnie poznany w jajach jeżowców. Na podstawie tych badań odtworzono sekwencję zdarzeń od wnikięcia plemnika do powstania reakcji korowej. Zapładniający plemnik przez swój receptor na oolemie stymuluje G-proteiny — białka związane z nukleotydem guanylowym. Ten etap jest podobny do zdarzeń zachodzących podczas egzocytozy ziarenek komórek tucznych [13]. Aktywowane G-proteiny oddziałują na fosfolipazę C — enzym dokonujący hydrolizy dwufosforanu fosfatydyloinozytolu do trójfosforanu inozytolu. Ten ostatni związek mobilizuje jony  $Ca^{++}$  w komórce, przez co dochodzi do egzocytozy ziaren korowych [64].

Oslona przejrzysta jest syntetyzowana przez oocyt podczas oogenezy [5, 6]. Przeprowadzono jednak badania dokumentujące cytochemicznie udział komórek folikularnych przynajmniej w początkowym etapie tworzenia osłony [63]. O pochodzeniu osłony przejrzystej przesądza syntetyzowanie jej przez tzw. zagubione komórki płciowe w miejscach ektopowych. Są to komórki, które nie dotarły do somatycznego zawiązka gonady, a najczęściej stwierdza się ich obecność w nadnerczu. Komórki te, bez względu na płć genetyczną, przechodzą oogenezę i w czasie właściwym dla komórek żeńskich w jajniku zostają otoczone przez osłonę przejrzystą [72]. W mikroskopie skaningowym osłona przejrzysta ujawnia swoją fibryllarną strukturę i wygląda jak system nałożonych na siebie siatek [53]. Jest ona silnie porowata i przepuszczalna dla cząsteczek wirusów i immunoglobulin [16]. Biochemia osłony przejrzystej najpełniej została poznana u świni i u myszy. Osłona przejrzysta oocytu świni zbudowana jest z 11 frakcji glikoprotein [12]. Z osłony przejrzystej oocytu myszy wyodrębniono elektroforetycznie 3 klasy glikoprotein i oznaczono je symbolami ZP1, ZP2 i ZP3 [4, 5, 7]. Znana jest już w pewnym zakresie funkcja i zachowanie się tych frakcji podczas reakcji osłony oocytu myszy. Frakcja ZP1 stanowi 36% osłony przejrzystej i charakteryzuje się największymi cząsteczkami i dużą zawartością fukozy. Frakcja ZP2 stanowi 46% osłony. Enzymy ziaren korowych zmieniają ją w części peptydowej. Dzięki temu glikoproteina ta przestaje być substratem dla akrozyny, enzymu uczestniczącego w penetracji plemnika przez osłonę, a związanego z wewnętrzną błoną akrosomu plemnika. Zmiany w części peptydowej polegają na wytworzeniu wiązań między tyrozynami, a prze-

jawiają się jako stwardnienie osłony [59, 60]. Dzięki temu zjawisku wydłuża się czas proteolizy osłony oocyty po zapłodnieniu, co wykorzystywane jest w badaniach reakcji korowej [20]. Zmiana frakcji ZP2 jest procesem wolnym i odbywa się w ciągu 2-3 godz. po penetracji plemnika *in vivo* lub *in vitro* [45, 59, 60]. Utwardzona osłona przejrzysta chroni zarodek podczas rozwoju przedimplantacyjnego przed enzymami i makro-fagami jajowodu. Frakcja ZP3 stanowi 17% osłony i podczas reakcji osłony ulega zmianie w części cukrowej [7]. Frakcja ZP3 rozmieszczona jest na zewnętrznej powierzchni osłony. Frakcja ta jest nazwana receptorową; z nią bowiem związane są cząsteczki zawierające końcowe N-acetyloglukozaminy umożliwiające przyleganie plemników do osłony. Te receptorowe funkcje ulegają unieczynnieniu w ciągu 1 min od fuzji gamet. Powoduje to pierwsza fala uwalnianych ziaren korowych. Cały proces egzocytozy trwa 30 do 60 min po wniknięciu plemnika [14, 57]. Końcowa N-acetyloglukozamina jest ogólnym i niespecyficznym znacznikiem, gdyż pozwala na międzygatunkowe przyleganie plemników. Uważana jest stąd za część receptora lub jeden z wielu receptorów zapewniających zapłodnienie i wędrówkę plemników przez osłonę. Frakcja receptorowa osłony przejrzystej oocyty świni stanowi 11% białek osłony. Receptorem dla plemnika jest końcowa N-acetyloglukozalanina. Frakcja ta rozpuszczona i oznakowana  $^{125}\text{J}$  wiąże się zarówno z plemnikami swego gatunku, jak i plemnikami ludzkimi. Wskazuje to immunochemiczne podobieństwo receptorów lub części receptorów plemników ludzkich i świni. Z tej racji badania interakcji osłony przejrzystej i plemnika u tego gatunku na poziomie molekularnym wydają się bardzo interesujące. Jednocześnie cytowane badania dostarczyły informacji o lokalizacji receptora na błonie plemnika. N-acetyloglukozalanina wiązała się z wewnętrzną błoną akrosomu plemnika [12].

Reakcję korową i reakcję osłony można wywołać sztucznie niektórymi czynnikami powodującymi partenogenetyczną aktywację oocytów. Badania reakcji korowej po zastosowaniu różnych technik aktywacji dostarczyły informacji, że bodźce, takie jak działanie hialuronidazy i szok osmotyczny, nie wywołują egzocytozy ziaren korowych [16]. Szok elektryczny i działanie jonoforu A23187 wywołują niepełną reakcję [16, 71], natomiast pożywka pozbawiona jonów  $\text{Ca}^{++}$  [16] i etanol [18] wywołują pełną reakcję korową, jak czyni to plemnik. Wymienione badania przeprowadzone były głównie przy użyciu mikroskopu elektronowego. Najpełniej scharakteryzowano reakcję korową i osłony w oocytach aktywowanych termicznie [26-28]. W mikroskopie elektronowym w oocytach wykazano częściową egzocytozę ziaren korowych [28]. W badaniach fizjologicznych stwierdzono penetrację osłon przez plemniki [27], natomiast badaniami enzymatycznymi wykazano niecałkowite utwardzenie osłony [28].



W wyniku niepełnej egzocytozy ziaren korowych nie nastąpiła inaktywacja receptorów dla plemników i nie dokonała się pełna zmiana frakcji ZP2.

Blok na poziomie błony komórkowej oocyty myszy powstaje 40 min po wniknięciu plemnika do cytoplazmy, co zostało ustalone w doświadczeniach polegających na reinseminacji oocytów pozbawionych osłon przejrzystych [70]. Mechanizm powstawania bloku na poziomie błony cytoplazmatycznej oocyty pozostaje nadal nieznanym [23]. Wiadomo jednak, że nie ma on związku z reakcją korową. Uniemożliwienie egzocytozy ziaren korowych przez cytochalazynę B nie wywołuje polispermicznego zapłodnienia, chociaż powoduje zwiększoną penetrację plemników przez nieutwardzoną osłonę [46]. Stwierdzono również, że plemniki wnikają do cytoplazmy jaj, w których wywołano reakcję korową jonoforem A23187. Blok na poziomie błony powstaje w tych jajach dopiero po wniknięciu plemnika [3, 71].

### 3. II PODZIAŁ DOJRZEWANIA

Cytoszkielek komórki jajowej zbudowany jest z: tubuliny [67], aktyny [31, 36, 54],  $\alpha$ -aktyniny [31], cytokeratyny [30] i nieerytroidalnej spektryny [54]. W zjawisku II podziału dojrzwania zaangażowane są tubulina i aktyna. W oocycie przed zapłodnieniem, poza tubuliną budującą wrzeciono, stwierdzono tubulinę cytoplazmatyczną rozmieszczoną równomiernie w postaci pęczków krótkich mikrotubuli [67]. Po zapłodnieniu liczba ich wzrasta i grupują się w sąsiedztwie powstających przedjądrzy, tworząc zagęszczenia aktyny [58]. Działanie substancji wiążących się z tubuliną, takich jak kolcemid, nocodazol i griseofulwina podczas II podziału dojrzwania niszczy wrzeciono mejotyczne i uniemożliwia tworzenie nowych pęczków mikrotubuli. Jednocześnie substancje te uniemożliwiają przekształcenie główki plemnika w przedjądrze. Zniszczenie systemu mikrotubuli uniemożliwia jednocześnie migrację chromatyny męskiej i żeńskiej z obwodu jaja do środka [58]. Migrację przedjądrzy hamują również cytochalazyny B i D [36, 44]. Stąd można sądzić o funkcjonalnym związku obu elementów cytoszkieletu w zjawisku migracji.

Cytoszkielek aktynowy oocyty zaangażowany jest w zjawiska związane z polarnością oocyty wyrażoną podpowierzchniowym położeniem wrzeciona metafazy II i polarnym rozmieszczeniem ziaren korowych, mikrosomów błony komórkowej oraz receptorów konkanawaliny A na powierzchni oolemy. Dynamiczne zjawiska II podziału dojrzwania, jak ro-

tacja wrzeciona metafazy II, powstanie uwypuklenia cytoplazmatycznego na przyszłe ciało kierunkowe, migracja wrzeciona do tego uwypuklenia oraz odcięcie II ciała kierunkowego, odbywają się przez szybką przebudowę aktyny [34, 36]. Podbłonowa aktyna przez związek z receptorami konkanawaliny A wyznacza również właściwości powierzchni oocytu. Rozmieszczenie tych receptorów zmienia się podczas zapłodnienia, jak również pod wpływem cytochalazyny B [24, 36].

Przebieg II podziału dojrzewania decyduje o prawidłowej ploidii zygoty. Zaburzenia tego podziału można spowodować eksperymentalnie przez zapłodnienie w obecności różnych substancji. Obecność cytochalazyn B i D [36, 44, 46] oraz estru forbolu — PMA [47] podczas zapłodnienia oocytów myszy *in vitro* powoduje zahamowanie cytokinezy II podziału dojrzewania, bez hamowania przebiegu kariokinezy, co doprowadza do powstania triploidalnych zygot. Mimo jednakowego efektu cytologicznego, jakim jest triploidia digyniczna, mechanizm blokowania cytokinezy II podziału dojrzewania przez te dwie substancje jest prawdopodobnie różny. Działanie cytochalazyn B i D polega m. in. na wybiórczym działaniu na aktynę [15]. Cytochalazyny B i D dezintegrują aktynową warstwę kortykalną komórki jajowej i wpływają tym samym na rotację wrzeciona i powstanie cytoplazmatycznego uwypuklenia na ciało kierunkowe [36]. Mechanizm blokowania II podziału dojrzewania przez ester forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate = PMA) nie jest poznany. Substancja ta jest promotorem karcinogenezy. Jej receptorem jest enzym błony komórkowej — kinaza białkowa C [50]. W przeciwieństwie do szybko działającej cytochalazyny [44], ester forbolu nie hamuje zapoczątkowanej cytokinezy II podziału dojrzewania, ale blokuje ją skutecznie, jeśli 1-2 godz. działanie estru wyprzedza ten proces. Na odmienne działanie estru forbolu od substancji niszczących mikrotubule i mikrofilamenty aktynowe wskazują obserwacje, iż nie hamuje on funkcjonowania wrzeciona i rozdziału chromatyny oraz tworzenia i migracji przedjądrzy w triploidalnych oocytach [47]. Obserwacje sugerują, że ester forbolu upośledza proces podczepienia równika wrzeciona metafazy II do błony komórkowej, co jest istotnym zjawiskiem podczas odcinania II ciała kierunkowego [36]. Wydaje się, że ester forbolu zaburza ten proces pośrednio przez zmianę właściwości błony komórkowej oocytu lub/i zmieniając związki cytoszkieletu aktynowego z oolemą. Występująca w oocycie myszy nieerytroidalna spektryna i  $\alpha$ -aktynina prawdopodobnie tak jak w badanych komórkach somatycznych, wiąże cytoszkielet aktynowy z błoną komórkową [9]. Działanie estru forbolu jest być może działaniem na  $\alpha$ -aktyninę, gdyż jej reorganizację pod wpływem tego estru stwierdzono w komórkach linii BSC-1 [41].



## 4. PRZEKSZTAŁCANIE JĄDRA PLEMNIKA W PRZEDJĄDRZE MĘSKIE

Po wnikięciu plemnika do cytoplazmy komórki jajowej chromatyna główki plemnika rozpoczyna przekształcanie w przedjądrze męskie. W wieloetapowym procesie przekształcania możemy wyróżnić etap rozpadu błony jądrowej plemnika, rozpraszania chromatyny i tworzenia błony przedjądrza męskiego.

Rozpad błony jądrowej plemnika następuje bardzo szybko po jego penetracji do cytoplazmy oocytu [32] i polega na tworzeniu pęcherzyków w wyniku fuzji zewnętrznej i wewnętrznej błony jądra plemnika. Proces ten przebiega z udziałem czynnika cytoplazmatycznego powodującego fragmentację otoczki jądrowej. Jest to prawdopodobnie czynnik odgrywający bardziej uniwersalną rolę w regulacji fragmentacji otoczki jądrowej w komórce zarówno w procesie dojrzewania oocytu, jak i podczas mitozy [68]. W ostatnich badaniach, przeprowadzanych *in vitro* przy użyciu homogenatów komórkowych [8], wykazano, że polipeptydy, zwane laminami A, B i C, tworzące laminę jądrową, są zaangażowane w procesy rozpadu i tworzenia *de novo* otoczki jądrowej w komórce. Proces ten jest regulowany przez defosforylację i fosforylację lamin jądrowych [49].

Przekształcenie jądra plemnika w funkcjonalne przedjądrze męskie jest wynikiem interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych [61]. Główka plemnika jest jądrem interfazowym, w którym chromatyna jest bardzo zbita i aby mogła uczestniczyć w transkrypcji genomu, musi nastąpić zmiana stopnia jej upakowania. Odbywa się to prawdopodobnie dzięki obecności w jaju tzw. SDF-sperm chromatin decondensing factor, czyli czynnika specyficznego, powodującego dekondensację jądra plemnika. Czynniki cytoplazmatyczne, kontrolujące dekondensację chromatyny plemnika, są niezbędne, ale tylko we wstępnych stadiach i nie są identyczne z czynnikami kontrolującymi rozwój przedjądrza męskiego, tzw. SPDFs-sperm pronucleus development factors, lub PIA-pronucleus inducing activity [48]. Do tej pory nie wiadomo jak przebiegają mechanizmy kontrolujące przekształcenie zdekondensowanej chromatyny plemnika w przedjądrze męskie [73, 33]. Pewne jest natomiast, że do pełnej transformacji w przedjądrze męskie konieczna jest obecność materiału pochodzącego z jądra oocytu, co stwierdzono zapładniając połówki oocytów jajnikowych zawierające i niezawierające jądra [2]. Począwszy od momentu fragmentacji otoczki jądra oocytu, wraz z zaawansowaniem dojrzewania wzrasta zdolność cytoplazmy jaja do transformacji jądra plemnika [21]. Warunkiem koniecznym do omawianych przekształceń jest także aktywacja oocytu [62]. Inne jest zachowanie jądra plemnika w oocycie aktywowa-

nym, a inne w nieaktywowanym. Mikroiniekcje jądra plemnika do oocytu myszy nie powodują aktywacji i w związku z tym transformacji, natomiast u chomika uzyskano pełną transformację w przedjądrze [66]. W eksperymencie, w którym aktywacja pod wpływem bodźca partenogenetycznego wyprzedzała zapłodnienie, uzyskano bardziej zaawansowane stadia transformacji jądra plemnika, im krótszy był czas między aktywacją a zapłodnieniem. Utworzenie przedjądrza męskiego może nastąpić tylko w określonym i ściśle ograniczonym czasie po aktywacji. Powstające przedjądrze męskie nie rośnie, nie wyróżnicowują się z niego chromosomy i jest ono biernie przekazywane do jednego z blastomerów potomnych po I podziale bruzdkowania, w warunkach hodowli *in vitro* [27]. Główki plemników nie podlegały transformacji w przedjądrza męskie, jeżeli dokonywano zapłodnienia zygoty w stadium przedjądrzy [66]. Przypuszcza się, że czynnik wywołujący transformację chromatyny plemnika lub innego jądra interfazowego pojawia się lub staje się aktywny tylko w określonych okresach cyklu komórkowego, kiedy dochodzi do fragmentacji otoczki jądra i wyróżnicowują się chromosomy [66]. Czynnik odpowiedzialny za rozwój przedjądrza męskiego jest obecny w cytoplazmie w ograniczonej ilości. Wniosek taki wyciągnięto z obserwacji, że w przypadku zapłodnienia polispermicznego występują zarówno w pełni wykształcone przedjądrza męskie, jak i główki plemników będące w różnych stadiach transformacji [19, 69]. Czynnik ten jest niespecyficzny gatunkowo [65].

Rozpraszanie chromatyny jądra plemnika jest morfologicznym wyrazem zmiany składu białek jądrowych. Badania nad dekondensacją chromatyny dotyczą przemian, jakim podlegają białka związane z DNA plemnika. Proces dekondensacji jest procesem odwrótnym do zachodzącego podczas spermiogenezy [33]. Podczas spermiogenezy histony są zastępowane przez szczególną grupę białek zwanych zasadowymi białkami jądrowymi plemnika [37-40], przez co następuje kondensacja chromatyny i unieczynnienie DNA. Do włączenia w transkrypcję musi z kolei nastąpić zamiana białek plemnikowych na inne białka. Z bardzo wielu badań *in vitro* [10, 35, 38, 75, 76] wynika, że w tę przemianę zaangażowany jest proces redukcji wiązań dwusiarczkowych, co poprzedza rozpraszanie chromatyny [51]. Redukcja wiązań dwusiarczkowych prowadzi do destabilizacji chromatyny jądra plemnika, co przejawia się zmianą barwliwości jeszcze niezdekondensowanego jądra plemnika [29]. Za redukcję wiązań dwusiarczkowych są najprawdopodobniej odpowiedzialne substancje o niskim ciężarze cząsteczkowym, występujące w znacznej ilości w oocycie [55]. Inkubując plemniki *in vitro* z substancjami zawierającymi wolne grupy -SH uzyskano dekondensację chromatyny jąder plemników. Przypuszcza się w związku z tym, że proteoliza indukowana obecnością grup



-SH może być także zaangażowana w dekondensację chromatyny *in vivo* [11, 38, 74]. W procesie dekondensacji zaangażowana jest cytoplazmatyczna aktywność proteolityczna, gdyż po usunięciu proteinaz plemnikowych i mikroiniekcji takich plemników uzyskano dekondensację chromatyny i przekształcenie jądra plemnika w przedjądrze męskie [52].

Powstawanie otoczki przedjądrza męskiego opisano u wielu gatunków zwierząt [33] i jest ono podobne do powstawania otoczki jądrowej w komórkach mitotycznych i mejotycznych. Morfologicznie przejawia się to pojawieniem się pęcherzyków na granicy rozproszonej chromatyny, które łączą się tworząc cysterny, a te z kolei łącząc się tworzą otoczkę jądrową przedjądrza męskiego.

Przedstawione zagadnienia są bardzo interesujące poznawczo. Z niektórymi związane są przyszłe zastosowania praktyczne. Być może wiedza o molekularnej biologii receptorów gramet pozwoli na immunologiczną interwencję w zjawiska zapłodnienia w celach antykoncepcyjnych.

#### LITERATURA

- [1] AUSTIN C. R., *The mammalian egg*, C. C. Thomas, Springfield 1961.
- [2] BALAKIER H., TARKOWSKI A. K., The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse, *Exptl. Cell Res.*, **128**: 79-85, 1980.
- [3] BINOR Z., WOLF D. P., In-vitro maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of the zona pellucida, *J. Reprod. Fert.*, **56**: 309-314, 1979.
- [4] BLEIL J. D., BEALL C. F., WASSARMAN P. M., Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2, *Dev. Biol.*, **86**: 189-197, 1981.
- [5] BLEIL J. D., WASSARMAN P. M., Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida, *Dev. Biol.*, **76**: 185-202, 1980.
- [6] — Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1029-1033, 1980.
- [7] — Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm, *Cell*, **20**: 873-882, 1980.
- [8] BURKE B., GERACE L., A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis, *Cell*, **44**: 639-652, 1986.

- [9] BURRIDGE K., KELLY T., MANGEAT P., Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types, *J. Cell Biol.*, **95**: 478-486, 1982.
- [10] CALVIN H. I., BEDFORD J. M., Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **13**: 65-75, 1971.
- [11] CHANG T. S. K., ZIRKIN B. R., Proteolytic degradation of protamine during thiol induced nuclear decondensation in rabbit spermatozoa, *J. Exp. Zool.*, **204**: 283-289, 1978.
- [12] DIETL J., CZUPPON A., WEICHERT K., METTLER L., Identification of a sperm receptor-glycoprotein from the porcine zona pellucida, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**: 261-267, 1983.
- [13] FERNANDEZ J. M., NEHER E., GOMPERTS B. D., Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells, *Nature, Lond.*, **312**: 453-455, 1984.
- [14] FUKUDA Y., CHANG M. C., The time of cortical granule breakdown and sperm penetration in mouse and hamster eggs inseminated in vitro, *Biol. Reprod.*, **19**: 261-266, 1978.
- [15] GOODMAN G. C., MIRANDA A. F., Cellular contractility and the visible effects of cytochalasin, *Cytochalasins Biochemical and Cell Biological Aspects*, S. W. Tanenbaum, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1978.
- [16] GULYAS B. J., Cortical granules of mammalian eggs, *Int. Rev. Cytol.*, **63**: 357-389, 1980.
- [17] GULYAS B. J., SCHMELL E. D., Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. I. Electron microscopic localization, *Gamete Res.*, **3**: 267-277, 1980.
- [18] GULYAS B. J., YUAN L. C., Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol, *J. Exp. Zool.*, **233**: 269-276, 1985.
- [19] HUNTER R. H. F., Polyspermic fertilization in pigs during the luteal phase of estrus cycle, *J. Exp. Zool.*, **165**: 451-459, 1967.
- [20] INOUE M., WOLF D. P., Comparative solubility properties of rat and hamster zonae pellucidae, *Biol. Reprod.*, **12**: 535-540, 1975.
- [21] IWAMATSU T., CHANG M. C., Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation, *J. Reprod. Fert.*, **31**: 237-242, 1972.
- [22] JAFFE L. F., Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis, *Dev. Biol.*, **99**: 265-276, 1983.
- [23] JAFFE L. A., SHARP A. P., WOLF D. P., Absence of an electrical polyspermy block in the mouse, *Dev. Biol.*, **96**: 317-323, 1983.
- [24] JOHNSON M. H., EAGER D., MUGGLETON-HARRIS A., GRAVE H. M., Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membrane of mouse eggs, *Nature*, **257**: 321-322, 1975.
- [25] KALETA E., Influence of genetic factors on the fertilization of mouse ovum in vitro, *J. Reprod. Fert.*, **51**: 375-381, 1977.
- [26] KOMAR A., Parthenogenetic development of mouse eggs activated by heat-shock, *J. Reprod. Fert.*, **35**: 433-443, 1973.
- [27] — Fertilization of parthenogenetically activated mouse eggs, *Exp. Cell Res.*, **139**: 367, 1982.
- [28] KOMAR A., KUJAWA M., Cortical and zona reaction of heat-activated mouse eggs, *J. Reprod. Fert.*, **73**: 479-482, 1985.
- [29] KRZANOWSKA H., Toluidine blue staining reveals changes in chromatin



- stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova, *J. Reprod. Fert.*, **64**: 97-101, 1982.
- [30] LEHTONEN E., A monoclonal antibody against mouse oocyte cytoskeleton recognizing cytokeratin-type filaments, *J. Embryol. exp. Morphol.*, **90**: 197-209, 1985.
- [31] LEHTONEN E., BADLEY R. A., Localization of cytoskeletal proteins in pre-implantation mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morphol.*, **55**: 211-225, 1980.
- [32] LONGO F. J., Review fertilization: comparative ultrastructural review, *Biol. Reprod.*, **9**: 149-215, 1973.
- [33] — Regulation of pronuclear development, *Bioregulators of Reproduction*, 1981.
- [34] LONGO F. J., CHEN D. Y., Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus, *Dev. Biol.*, **107**: 382-394, 1985.
- [35] MAHI C., YANAGIMACHI R., Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro, *J. Reprod. Fert.*, **44**: 293-296, 1975.
- [36] MARO B., JOHNSON M. H., PICKERING S. J., FLACH G., Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg, *J. Embryol. exp. Morphol.*, **8**: 211-237, 1984.
- [37] MARUSHIGE Y., MARUSHIGE K., Transformation of sperm histone during fertilization and maturation of rat spermatozoa, *J. Biol. Chem.*, **250**: 39-45, 1975.
- [38] — Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization. An in vitro study, *Biochim. Biophys. Acta*, **519**: 1-22, 1978.
- [39] MAYER J. F., CHANG T. S. K., ZIRKIN B. R., Spermatogenesis in the mouse. Amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatid and spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **25**: 1041-1051, 1981.
- [40] MAYER J. F., ZIRKIN B. R., Spermatogenesis in the mouse. I. Autoradiographic study of nuclear incorporation, *J. Cell Biol.*, **81**: 403-410, 1979.
- [41] MEIGS J. B., WANG Y-L., Reorganization of alpha-actinin and vinculin induced by a phorbol ester in living cells, *J. Cell Biol.*, **102**: 1430-1438, 1986.
- [42] NICOSIA S. V., WOLF D. P., INOUE M., Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs, *Dev. Biol.*, **57**: 56-74, 1977.
- [43] NICOSIA S. V., WOLF D. P., MASTROIANI L., Surface topography of mouse egg. before and after insemination, *Gamete Res.*, **1**: 145-156, 1978.
- [44] NIEMIERKO A., Induction of triploidy in the mouse by cytochalasin B. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **34**: 279-289, 1975.
- [45] NIEMIERKO A., Properties of the zona pellucida of cytochalasin B-induced triploid mouse eggs, *J. Reprod. Fert.*, **73**: 313-316, 1985.
- [46] NIEMIERKO A., KOMAR A., Cytochalasin B-induced triploidy in mouse oocytes fertilized in vitro, *J. Reprod. Fert.*, **48**: 279-284, 1976.
- [47] — Action of phorbol myristate acetate (PMA) at fertilization of mouse oocytes in vitro, *J. Embryol. exp. Morphol.*, **89**: 171-177, 1985.
- [48] OHSUMI K., KATAGIRI C., YANAGIMACHI R., Development of pronuclei from human spermatozoa injected microsurgically into frog (*Xenopus*) eggs, *J. Exp. Zool.*, **237**: 319-325, 1986.
- [49] OTTAVIANO Y., GERACE L., Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis, *J. Biol. Chem.*, **260**: 624-632, 1985.
- [50] PARKER P. J., STABEL S., WHATERFIELD M. D., Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain-identity with the phorbol ester receptor, *The EMBO Journal*, **3**: 953-959, 1984.
- [51] PERREAULT S. D., WOLFF R. D., ZIRKIN B. R., The role of disulfide bond

- reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo, *Dev. Biol.*, **101**: 160-167, 1984.
- [52] PERREAULT S. D., ZIRKIN B. R., Sperm nuclear decondensation in mammals-role of sperm associated proteinase in vivo., *J. Exp. Zool.*, **224**: 253-257, 1982.
- [53] PHILLIPS D. M., SHALGI R., Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocytes, *J. Ultrastruct. Res.*, **72**: 1-12, 1980.
- [54] REIMA I., LEHTONEN E., Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse oocytes and preimplantation embryos, *Differentiation*, **30**: 68-75, 1985.
- [55] RODMAN T. C., PRUSLIN F. H., HOFFMAN H. P., ALFREY V. G., Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: a cytoimmunochemical study event in vivo, *J. Cell Biol.*, **90**: 351-361, 1981.
- [56] ROUSSEAU P., MEDA P., LECART C., HAUMONT S., FERIN J., Cortical granule release in human follicular oocytes, *Biol. Reprod.*, **16**, 104-111, 1977.
- [57] SATO K., Polyspermy-preventing mechanism in mouse eggs fertilized in vitro, *J. Exp. Zool.*, **210**: 353-359, 1979.
- [58] SCHATTEN G., SIMERLY C., SCHATTEN H., Microtubule configurations during fertilization, mitosis and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4152-4156, 1985.
- [59] SCHMELL E. D., GULYAS B. J., First demonstration of a mammalian ovoperoxidase and its role in hardening the zona of activated mouse eggs, *J. Cell Biol.*, **83**: 303a, 1979.
- [60] — Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs II Evidence for the enzymes role in hardening the zona pellucida, *Gamete Res.*, **3**: 279-290, 1980.
- [61] TARKOWSKI A. K., Nucleo-cytoplasmic interaction in oogenesis and early embryogenesis in the mouse, *Embryonic Development*, Alan R. Liss, New York, 1982.
- [62] TARKOWSKI A. K., BAŁAKIER H., Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between oocytes, blastomeres and somatic cells in the mouse, *J. Embryol. exp. Morphol.*, **55**: 319-1980.
- [63] TESORIERO J. V., Comparative cytochemistry of the developing ovarian follicles of the dog, rabbit, and mouse: origin of the zona pellucida, *Gamete Res.*, **10**: 301-318, 1984.
- [64] TURNER P. R., JAFFE L. A., FEIN A., Regulation of cortical vesicle exocytosis in Sea urchin eggs by inositol 1,4,5-triphosphate and GTP-binding protein, *J. Cell. Biol.*, **102**: 70-76, 1986.
- [65] UEHARA T., YANAGIMACHI R., Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei, *Biol. Reprod.*, **15**: 467-470, 1976.
- [66] USUI N., YANAGIMACHI R., Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development, *J. Ultrastruct. Res.*, **57**: 276-288, 1976.
- [67] WASSARMAN P. M., FUJIWARA K., Immunofluorescent anti-tubulin staining of spindle during meiotic maturation of mouse oocytes in vitro, *J. Cell Sci.*, **29**: 171-188, 1978.
- [68] WASSERMAN W. J., SMITH L. D., The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown, *J. Cell Biol.*, **78**: R15-R22, 1978.



- [69] WITKOWSKA A., Pronuclear development and the first cleavage division in polyspermic mouse eggs, *J. Reprod. Fert.*, **62**: 493-498, 1981.
- [70] WOLF D. P., The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs, *Dev. Biol.*, **64**: 1-10, 1978.
- [71] WOLF D. P., NICOSIA S. V., HAMADA M., Premature cortical granule loss does not prevent sperm penetration of mouse eggs, *Dev. Biol.*, **71**: 22-32, 1979.
- [72] ZAMBONI L., UPADHAY S., Germ cell differentiation in mouse adrenal glands, *J. Exp. Zool.*, **228**: 173-193, 1983.
- [73] YANAGIMACHI R., Mechanisms of fertilization in mammals, *Fertilization and Embryonic Development in vitro*, L. Mastroiani, J. D. Biggers, New York: Plenum Press, 1981.
- [74] ZIRKIN B. R., CHANG T. S. K., Involvement of endogenous proteolytic activity in thiol-induced release of DNA template restrictions in rabbit sperm nuclei, *Biol. Reprod.*, **17**: 131-137, 1977.
- [75] ZIRKIN B. R., CHANG T. S. K., HEAPS J., Involvement of an acrosin-like proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine, *J. Cell Biol.*, **85**: 116-121, 1980.
- [76] ZIRKIN B. R., SOUCEK D. A., CHANG T. S. K., PERREAULT S. D., In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation, *Game- te Res.*, **11**: 349-365, 1985.

*Otrzymano: 18 grudnia 1985.*

*Przyjęto: 9 lipca 1986.*

*Adres: Pracownia Embriologii Doświadczalnej i Zakład Histologii i Embriologii AM, ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa.*





## II EUROPEJSKI KONGRES BIOLOGII KOMÓRKI (6-11 lipca 1986 r., Budapeszt)

Szybki i wielokierunkowy rozwój badań z zakresu biologii komórki spowodował, że w European Cell Biology Organization (ECBO), a po jej reorganizacji w 1978 r., jako Federation of European Cell Biology Societies, narodziła się idea zwoływania co 4 lata kongresów europejskich. Postanowiono, że kongresy te będą organizowane przemiennie z kongresami światowymi, dzięki temu umożliwi się uczonym wymianę informacji na szerokim forum międzynarodowym w okresach 2-letnich.

I Europejski Kongres obradował w Paryżu w 1982 r. Dwa lata później (1984) odbył się Third International Congress of Cell Biology w Tokio. Wybór Budapesztu, jako miejsca zwołania II Europejskiego Kongresu, nie był przypadkowy. ECBO postanowiło powierzać organizację kongresów cytobiologom z Europy Zachodniej, a następnie z Europy Wschodniej.

Węgierscy biolodzy komórkowi wykazywali od lat dużą aktywność naukową i organizacyjną. W roku 1927 odbyło się w Budapeszcie, w ramach Kongresu Zoologicznego, pierwsze w historii spotkanie uczonych pracujących w dziedzinie cytologii eksperymentalnej. Tamże 12 lat później (1939) miał miejsce międzynarodowy zjazd dla upamiętnienia 100-letniej rocznicy odkrycia komórki.

II Europejski Kongres Biologii Komórki w Budapeszcie (6-11 VII 1986 r.) zgromadził blisko 1000 uczestników z 35 krajów. Zgodnie z tradycją, do stolicy Węgier przybyli również uczeni zamorscy z: Algieru, Australii, Chin, Indii, Iranu, Izraela, Kanady, Meksyku, Nowej Zelandii i Stanów Zjednoczonych.

Program naukowy obejmował 4 wykłady plenarne, 27 sympozjów, 2 spotkania robocze, sesję filmową oraz 2 sesje plakatowe, na których łącznie przedstawiono blisko 500 posterów. Ceremonia otwarcia i wykłady plenarne odbyły się na terenie Budapesztańskiego Centrum Zjazdowego (Budapest Convention Center), tamże miało też miejsce wieczorne spotkanie zapoznawcze. Poczynając od popołudnia 7 lipca, aż do zakończenia Kongresu o 13<sup>00</sup> 11 lipca 1986 r., obrady i prezentacje plakatowe odbywały się w Akademii Medycznej im. Semmelweisa (SOTE). Obrady sympozjalne toczyły się w 4 równoległych kierunkach. Integralną częścią Kongresu były wystawa aparatury, odczynników i wydawnictw, w której uczestniczyło 33 wystawców, a wśród nich renomowane firmy światowe (Baker, Balzers, Jeol, Leitz, LKB, Maximilian, Merck, Pharmacia, Philips, Opton, Reichert-Jung, Springer).

Cztery wykłady plenarne były poświęcone różnej tematyce: Garham Warren (Uniwersytet w Dundee) mówił na temat „Intracellular membrane traffic”; Werner W. Franke z Centrum Badania Nowotworów w Heidelbergu wygłosił wykład „Cytoskeletal and karyoskeletal proteins: cell — specific expression of multigene families”; Pietro de Camilli z Uniwersytetu w Mediolanie przedstawił wyniki, dotyczące „Target proteins for second messengers in the nervous system”; wresz-

cie wykład Pál Maliga z Auckland w Kalifornii nosił tytuł „Engineering of the cytoplasm in flowering plants”.

Podstawową formą obrad Kongresu były sympozja oraz sesje plakatowe. Załączona tabela podaje ich tytuły oraz porządek dzienny zgodnie z programem.

### Program

Data 1986 r.	Sympozja	Sesje plakatowe
7 VII	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Targeting and sorting of proteins in the cell</li> <li>2. Pathways to secretion</li> <li>3. Expression and evolution of cytoskeletal genes</li> <li>4. Cells in culture</li> </ol>	<p style="text-align: center;">I</p> Membrane structure, receptors, junctions, transport, excitability Endocytosis Protein processing, secretion, exocytosis
8 VII	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Genetic analysis of somatic cell variation</li> <li>6. Receptor--mediated endocytosis</li> <li>7. Dynamics of cytoskeletal elements</li> <li>8. Protein phosphorylation in cell regulation</li> <li>9. Transfer of genetic material</li> <li>10. Transcytosis</li> <li>11. The actin system</li> <li>12. Mechanism and regulation of cell activation in immune cells</li> </ol>	Targeting and sorting of proteins Protein phosphorylation Mitochondria, chloroplasts, peroxisomes Cytoskeleton Gametogenesis, fertilization, early development Differentiation: Cells of specific organ systems (neural, immune, blood, etc. cells). Unicellular organisms Enzymes Cells in culture
9 VII	<ol style="list-style-type: none"> <li>13. Gene structure and regulation</li> <li>14. Golgi apparatus and membrane biogenesis</li> <li>15. Membrane-cytoskeleton interaction</li> <li>16. Control of cell proliferation</li> <li>17. Cell polarity</li> <li>18. Contract sites and membrane fusion</li> </ol>	<p style="text-align: center;">II</p> Nucleus, chromatin, chromosomes, DNA, replication, repair, mitosis, meiosis, cell cycle Gene structure, regulation, transcription, postranscriptional events Plant cell genetics Growth factors, inhibitors, oncogenes Cell surface interactions, extracellular matrix Golgi apparatus and membrane biogenesis Contract sites and membrane fusion Membrane dynamics
10 VII	<ol style="list-style-type: none"> <li>19. Chromatin structure and chromosomes</li> <li>20. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions</li> <li>21. Water and inorganic elements in the living cell</li> <li>22. Plant cell genetics</li> <li>23. Regulation of cell volume and intracellular pH</li> <li>24. Intracellular protein degrada-</li> </ol>	



Data 1986 r.	Sympozja	Sesje plakatowe
	tion 25. Warzág memorial symposium: Cell aging	Cell polarity Lysosomes, protein catabolism, autophagy Cell aging Pathology of various cell sy- stems, toxic effects, virus-cell interaction New techniques Post-deadline posters
11 VII	26. Membrane dynamics and bio- logical information transfer Hybridocytochemistry (Work- shop) Advanced immunocytochemi- stry (Workshop) Film session IUBS joint Symposium: Envi- ronmentall cell biology	

Przebieg obrad w czterech równolegle odbywających się sympoziach spowodował, że byłem w stanie wysłuchać zaledwie około 25% wystąpień. Wymiana uwag z uczestnikami różnych sesji pozwala mi jednak na wygłoszenie ogólnych wniosków dotyczących Kongresu.

Złożoność komórki eukariotycznej okazała się większa od przewidywanej jeszcze z początkiem lat siedemdziesiątych. Ostatnie 10-lecie przyniosły też szybki postęp na polu technik badawczych: biochemicznych, immunocytochemicznych oraz inżynierii genetycznej (transfer fragmentu podłoża dziedzicznego z jednego genomu do drugiego). Czynniki te spowodowały rozwój wąskich specjalizacji. Większość badaczy interesuje się przede wszystkim określonymi ultrastrukturami, pojedynczymi białkami, czy sekwencjami nukleotydowymi. Kongres w Budapeszcie odzwierciedlał obraz współczesnego stanu badań. Nie oznacza to, że obrady pozbawione były tematyki ogólnej, czy też wolne były od kontrowersji w sprawach zasadniczych.

10 lipca odbyło się sympozjum „Water and inorganic elements in the living cell”. Pierwsze wystąpienie miał mieć Keith R. Porter, który w ostatniej chwili odwołał swój przyjazd. W zastępstwie przedstawiono tylko ogólne tezy jego wykładu „Structure and organization of the cytoplasmic matrix”. Na sympozjum wystąpił natomiast z wykładem Gilbert N. Ling. Jego wykład był ostrym atakiem skierowanym na hipotezy zakładające istnienie tzw. pomp jonowych w błonach. Większość uczestników sympozjum poparło to stonawisko, argumentując, że żadna komórka nie byłaby w stanie sprostać wymogom energetycznym, jakie były następstwem działania pomp. Na innych sympozjach rozwijano koncepcje oparte na założeniu istnienia aktywnej dystrybucji jonów między komórką a środowiskiem, całkowicie ignorując poglądy Linga i jego zwolenników.

Podczas sympozjum „Dynamics of cytoskeletal elements”, Karl R. Wohlfarth-Bottermann przedstawił wyniki badań, dotyczące zachowania się *in vivo* układów aktomiozynowych, uzyskanych z plazamodium śluzowca *Physarum polycephalum*.

Badania przeprowadzone na odbłonionych kroplach cytoplazmatycznych i kanałach śluzowca wykazały jednoznacznie, że wzrost poziomu jonów  $CA^{2+}$  jest czynnikiem uniemożliwiającym skurcz i podtrzymującym relaksację. Inhibicyjne działanie jonów wapnia sugeruje, że mechanizm skurczu niemięśniowych systemów aktomiozynowych może być różny od systemów mięśniowych. Na tym samym sympozjum G. Pollack przytoczył wiele argumentów podważających powszechnie uznaną teorię skurczu mięśni, według której zachodzi on w następstwie wzajemnego przesuwania się cienkich i grubych filamentów.

Organizatorzy Kongresu usłyszeli oficjalnie i w rozmowach prywatnych wiele słów uznania, a nawet zachwytu. W większości nie były to gesty grzecznościowe. II Europejski Kongres Biologii Komórki jako całość był imprezą udaną, o dobrej organizacji i cieplej atmosferze. Koledzy węgierscy nie ustrzegli się jednak od kilku wyraźnych potknięć. O jednej wspomniałem już tu. Wykłady plenarne powinny mieć bardziej ogólny i polemiczny charakter. Najistotniejszą luką Kongresu był jednak całkowity brak zorganizowanej dyskusji i podsumowań sesji posterowych. Z kolei wybór niektórych wystąpień sympozjalnych był mało uzasadniony — ich specjalistyczna treść nadawała się bardziej do prezentacji plakatowej, niż do przedstawienia ustnego. Wreszcie względy oszczędnościowe nie powinny dotyczyć „tradycyjnych” akcesorii zjazdowych, jak notatnik i długopis.

W II Europejskim Kongresie Biologii Komórki uczestniczyło liczne grono Polaków. Według mego szacunku do Budapesztu przyjechało 31 osób: 16 z placówek PAN i 15 z wyższych uczelni. Bardziej od liczb była pocieszająca struktura wiekowa — znaczny procent rodaków stanowili młodzi naukowcy między 30 a 40 rokiem życia. Udział Polaków w Kongresie był dobrze widoczny na sesjach plakatowych i sesji filmowej, ledwo dostrzegalny podczas obrad sympozjalnych.

Obradom naukowym II Europejskiego Kongresu Biologii Komórki towarzyszyły zebrania organizacyjne. 9 lipca odbyło się Zgromadzenie Ogólne ECBO, w którym udział wzięli z głosem stanowiącym członkowie Komitetu Wykonawczego (Executive Committee) oraz po jednym przedstawicielu z każdego towarzystwa (lub innej organizacji, będącej jego odpowiednikiem), wchodzącego w skład Federacji. Do 9 lipca 1986 r. do ECBO należało 14 organizacji. Podczas obrad Zgromadzenia Ogólnego w Budapeszcie ECBO powiększyło się o dalsze dwa towarzystwa. Do Federacji przyjęto organizacje zrzeszające biologów komórki z Hiszpanii i z Finlandii. Dokonano też wyboru niektórych członków Komitetu Wykonawczego. Przewodniczącym ECBO ponownie został Werner W. Franke (RFN). W związku z upływem kolejnej kadencji Kazimierza Ostrowskiego na stanowisku wiceprezydenta Federacji dokonano wyboru jego następcy. Został nim Węgier Pál Röhlich. Wysłunięto też propozycje, aby od 1988 r. funkcję skarbnika objął Francesco Clementi (Włochy). Jednym z punktów Zgromadzenia Ogólnego było sprawozdanie organizacyjne i finansowe Pála Röhlicha — sekretarza Kongresu w Budapeszcie.

Dotacje, wpłaty uczestników i firm mających punkty wystawowe wyniosły łącznie ponad 5 mln forintów. Suma ta nie wystarczyła na pokrycie wszystkich kosztów. Deficyt będzie jednak nieznaczny i prawdopodobnie wyniesie tylko kilkadziesiąt tysięcy forintów. Trudności finansowe i organizacyjne nie wszystkich przerażają. Towarzystwa trzech krajów — Hiszpanii, Włoch i Wielkiej Brytanii wystąpiły z propozycją zorganizowania w 1992 r. V Międzynarodowego Kongresu Biologii Komórki. Najbliższy kongres — Fourth International Congress of Cell Biology — odbędzie się 14-19 sierpnia 1988 r. w Montrealu.

Szczególne zainteresowanie organizacją V Kongresu są Hiszpanie, gdyż rok 1992 będzie obchodzony w tym kraju uroczystie w związku z pięćsetną rocznicą



odkrycia przez Kolumba Ameryki. Najbliższe posiedzenie ECBO odbędzie się w maju-czerwcu 1987 r. Dowiemy się wówczas, gdzie odbędzie się Third European Congress on Cell Biology w 1990 r. Prawdopodobnie będzie to Wielka Brytania bądź Włochy.

*Leszek Kuźnicki*

## KOMUNIKAT

Komitet Organizacyjny  
III Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki  
uprzejmie zawiadamia, że Konferencja odbędzie się  
w drugiej połowie czerwca 1988 r. w Łodzi. Prosimy  
o przesyłanie wstępnych zgłoszeń do 30 czerwca  
1987 r. pod adresem:

**Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin  
Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banach 12/16,  
90-237 Łódź.**



## Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

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

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

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

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

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

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

Foreign Trade Enterprise  
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

## TREŚĆ

E. MIKOŁAJCZYK, Reakcje fotofobowe wiciowców euglenoidalnych . . . . .	415
A. M. KORDOWIAK, Aparat Golgiego. I. Funkcje biologiczne. Strukturalna i funkcjonalna niejednorodność tej organeli. Rola w wewnątrzkomórkowym transporcie . . . . .	445
A. M. KORDOWIAK, Aparat Golgiego. II. Wpływ różnych substancji na strukturę i funkcję tej organeli. Zmiany aktywności biochemicznej oraz morfologii aparatu Golgiego w cukrzycy doświadczalnej . . . . .	463
A. KACPERSKA, Molekularne podstawy uszkodzeń mrozowych w komórkach roślinnych . . . . .	479
A. NIEMIERKO, A. KOMAR, Niektóre aspekty zapłodnienia oocytów ssaków . . . . .	497
II Europejski Kongres Biologii Komórki . . . . .	511