

ANDRZEJ GRĘBECKI

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

RUCHY BŁONY I CYTOSZKIELETU W KOMÓRKACH AMEBOIDALNYCH

Wczesne teorie ruchu błony u ameb. Wczesne teorie ruchu błony u komórek tkankowych. Ruchy białek błonowych i receptorów (capping). Hipoteza autonomicznego przepływu lipidów. Krytyka koncepcji ogólnego przepływu błony lub lipidów. Holowanie białek błonowych przez cytoszkielet i bierny przepływ lipidów.

Związek białek błonowych z cytoszkieletem. Ruchy dośrodkowe podbłonowego cytoszkieletu u ameb. Teoria ogólnego „przepływu” korteksu kurczliwego. Odklejanie się cytoszkieletu od błony pod przednią krawędzią komórki. Problem udziału miozyny w ruchach cytoszkieletu w strefie czołowej. Repolimeryzacja sieci aktynowej w czole komórki. Regulacja dynamiki błony i cytoszkieletu w czołowej krawędzi komórki.

Ruchem ameboidalnym poruszają się zarówno liczne organizmy jednokomórkowe, ameby słodkowodne, morskie i pasożytnicze, jak i wiele komórek tkankowych, fibroblasty, komórki układu odpornościowego, komórki embrionalne oraz nowotworowe w stadium inwazyjnym. Komórki ameboidalne są zdolne do przemieszczania się pod warunkiem kontaktu ze stałym podłożem. W stanie zawiesiny są one zwykle zaokrąglone i zachowują się biernie. Po przyłączeniu do podłoża mniej lub bardziej się rozplaszczają oraz zyskują polaryzację ruchową, tzn. strukturalne i funkcjonalne wyróżnienie okolicy czołowej, która przyrasta, zmienia kształt i posuwa się do przodu, oraz tylnej, która jest obkurczana i wycofywana. Siłą napędową ruchu jest aktywność skurczowa aktomiozynowego cytoszkieletu.

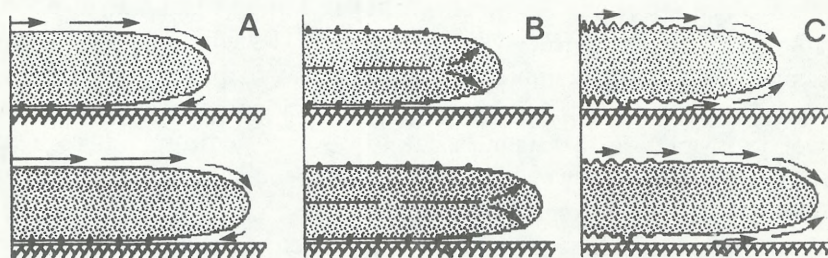
Komórki ameboidalne nie mają narządów ruchu o stałej strukturze i stałym położeniu. Zarówno same wypustki wytwarzane w ich przedniej części, zwane nibynóżkami, jak ich cytoszkielet, ulegają stopniowej dezintegracji w miarę wykonywania swych funkcji ruchowych. Muszą być one zatem zastępowane nowymi i są nieprzerwanie odbudowywane w strefie czołowej. Ów stan ciągłej morfologicznej i molekularnej płynności w komórce ameboidalnej powoduje, że komórka taka w trakcie lokomocji nie tylko przemieszcza się jako całość względem podłoża, lecz wszystkie elementy jej struktury także przesuwały się względem siebie. Przedmiotem niniejszego artykułu jest udział w ruchu ameboid-

dalnym przemieszczeń błony komórkowej oraz podścielającej ją cytoszkieletalnej warstwy kurczliwej.

WCZESNE TEORIE RUCHU BŁONY U AMEB

Podstawowe pytanie, skąd się biorą i w jaki sposób są transportowane rezerwy błony komórkowej niezbędne dla okrycia wciąż przyrastających i zmieniających kształt przednich części pełznającej komórki, postawili sobie — jako pierwsi — badacze ruchu ameb swobodnie żyjących.

Na początku przyjmowano jako pewnik pogląd, że błona jest strukturą raczej permanentną. Zatem poruszająca się ameba musiałaby ją w jakiś sposób przenosić na swojej powierzchni do przodu. Tłumaczyła to koncepcja przetaczania błony (z ang. *rollingu*) sformułowana blisko sto lat temu przez *Jenningsa* (1904), a potem nadal akceptowana przez najbardziej znane teorie ruchu amebowego (*Mast* 1926; *Allen* 1961). Obrazowo porównywano zachowanie się błony ameby do ruchu gąsienicy czołgu (rys. 1A). Oznaczałoby to, że błona jest nieruchoma po stronie brzusznej, gdzie przylega do podłoża, natomiast po stronie grzbietowej przesuwą się do przodu dwukrotnie prężej niż cała komórka. Potwierdzały to obserwacje zachowania się przyczepionych do błony cząstek karminu albo innych podobnych znaczników. Na górnej powierzchni poruszały się one do przodu, wyprzedzając zarówno struktury cytoplazmatyczne widoczne pod błoną, jak i elementy konturu zewnętrznego wędrującej komórki. Powiedzmy od razu, że były to obserwacje poprawne w odniesieniu do części znaczników i do środkowych okolic ciała ameby.



Rys. 1. Hipotetyczne sposoby przenoszenia błony ku przedniej krawędzi ameby według teorii przetaczania błony (A), jej stacjonarności (B) i rozfałdowywania (C). We wszystkich trzech przypadkach przemieszczenie błony pokazano w dwóch kolejnych stadiach ruchu postępowego czołowej strefy komórki

Rewolucyjnie odmienną teorię ogłosił *Goldacre* (1961). Zauważył on, że w roztworach barwników przyżyciowych, które wiążą się z glikoproteinami okrywającymi powierzchnię ameby, intensywne zabarwienie pojawia się w samym tyle komórki, natomiast świeżo wysuwane nowe nibynóżki wydają się

wolne od barwnika. W tyle zbierają się również niektóre znaczniki mechaniczne, np. włoski szklane, które ponadto pozostają nieruchome, gdy przylegają do bocznej powierzchni ameby. Pod wpływem tych obserwacji Goldacre sformułował teorię stacjonarności błony (rys. 1B). Zgodnie z nią błona na bocznej powierzchni pełzającej ameby pozostaje w ogóle nieruchoma, jest zaś nieprzerwanie dezintegrowana i pobierana do wnętrza w wycofywanym tyle komórki, przenoszona do przodu przez strumień płynącej cytoplazmy, a wreszcie wbudowywana ponownie w powierzchnię w strefie czołowej. Zatem transport materiału okrywającego przrastające przednie okolice ameby nie odbywałby się na powierzchni, ale przez cytoplazmę. Goldacre jest więc właściwym twórcą koncepcji obiegu błony pomiędzy powierzchnią komórki a jej wnętrzem, chociaż liczni współcześni badacze tego zjawiska u komórek tkankowych prawie nigdy się na niego nie powołują.

Teoria błony stacjonarnej początkowo pociągnęła wielu badaczy swym nowatorstwem i prostotą, od razu jednak zaczęła budzić wątpliwości innych. Logiczną jej konsekwencją jest konieczność całkowitego odnowienia błony na powierzchni, gdy wędrująca ameba pokona odległość równą swej własnej długości. Potrzebuje ona na to około 3 minut. Czy wymiana między powierzchniami a wewnętrznymi zasobami błony istotnie może być aż tak szybka? Wolpert i O'Neill (1962) w jednej z pierwszych na świecie prac wykonanych metodą immunofluorescencji wykazali, że okres połowicznego zaniku fluorescencji na powierzchni ameby wynosi około 5 h, wymiana jest więc o dwa rzędy wielkości powolniejsza, niż należałoby się spodziewać.

We wcześniejszych obserwacjach zachowania się różnych znaczników na powierzchni ameby (cząstek stałych i barwników) tkwił paradoks — znaczniki wędrują do przodu, a ostatecznie zbierają się w tyle komórki. Teoria przetaczania błony powołuje się na to pierwsze, a teoria stacjonarności na drugie. Wyjaśnieniem tej sprawy zajęliśmy się w naszej pracowni (Czarska i Grębecki 1966). Okazało się m.in., że różnice w zabarwieniu tylnej części ameby i nowych nibynózek nie powstają stopniowo w wyniku lokomocji, ale od razu — z powodu silnego pofałdowania powierzchni w tyle, a jej gładkości w przodzie. Cząstki stałe na powierzchni ameby istotnie przesuwały się do przodu w stosunku do podłoża i do powoli zmieniającego się bocznego konturu komórki, ale ich średnia prędkość nie przekracza prędkości przesuwu komórki jako całości. Dlatego nie mogą gromadzić się na przodzie. Ruch niektórych jest opóźniony (z przyczyn wówczas nam nie znanych) i te gromadzą się w tyle. W żadnym razie ich ruch na stronie grzbietowej nie jest dwukrotnie szybszy od ruchu komórki. Ruch cząstek ma natomiast charakter symetryczny — zachodzi również po stronie brzusznej. Ponadto w warunkach podwyższonej lepkości środowiska wokół ameby powstają symetryczne prądy cieczy, o rozkładzie i prędkości odpowiadającej przesuwaniu się całej komórki i wszystkich jej części.

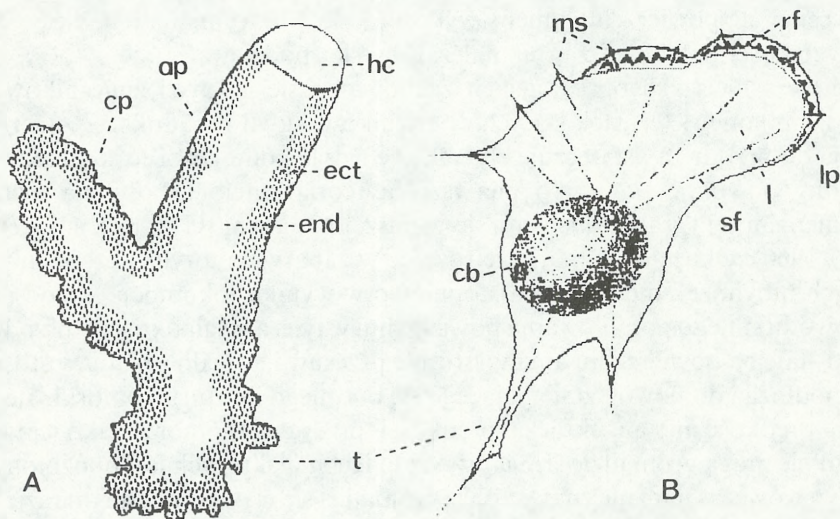
Ostatecznie więc paradoks został wyjaśniony, ale w sposób niezgodny ani z teorią przetaczania błony, ani z teorią stacjonarności. Zastąpiliśmy je teorią

fałdowania i rozfałdowywania, według której błona jest przenoszona do przodu na powierzchni ameby adekwatnie do zmian kształtu i położenia komórki, wskutek procesów nieprzerwanego fałdowania w rejonach obkurczanych i wycofywanych, wraz z równoczesnym rozfałdowywaniem w okolicach przyrastających i wysuwanych do przodu (rys. 1C).

Koncepcja ta została w krótkim czasie potwierdzona metodami filmowej analizy ruchu oraz analizy ukształtowania błony w mikroskopie elektronowym (Haberey i in. 1969, Stockem i in. 1969). Wolpert i Gingell (1968) połączyli ją zaś z koncepcją płynności błony. Dodajmy tu nawiasem, że idea płynności błony była wysunięta przez Wolperta o kilka lat wcześniej, zanim do jej sformułowania doszli ci, którzy ją potem upowszechnili.

WCZESNE TEORIE RUCHU BŁONY U KOMÓREK TKANKOWYCH

W ciągu następnych dwudziestu lat nikt więcej nie zajmował się zachowaniem się błony podczas ruchu ameb swobodnie żyjących. Natomiast od samego początku lat siedemdziesiątych podjęto tę kwestię u ruchliwych komórek tkankowych, zwłaszcza u fibroblastów. Fibroblast pod względem budowy i ruchu znacznie różni się od ameb (rys. 2). Nic więc dziwnego, że zachowanie się jego błony objaśniano, przynajmniej na początku, w sposób odmienny.



Rys. 2. Schematy istotnych dla lokomocji cech budowy ameby (A) i fibroblastu (B). U **ameby**: ect — żel ektoplazmatyczny, end — endoplazma płynąca do przodu, hc — hialinowy czepek czołowy, ap — rosnąca nibynóżka, cp — nibynóżka obkurczana, t — wycofywana część zwana ogonową. U **fibroblastu**: cb — wypukłe ciało komórkowe z jądrem, l — rozplaszczona lamella, lp — lamellipodium, rf — pofałdowania błony (ruffles), ms — mikrokolce (microspikes), sf — włókna naprężeniowe (stress fibers), t — wycofywane tylne okolice komórki. Dla jasności rysunku znacznie ograniczono liczbę rf, ms i sf

W czasie ruchu fibroblastu jego ciało komórkowe zawierające jądro wytwarza, zamiast płatowatych nibynózek, jak u ameb, bardzo silnie spłaszczoną wachlarzowatą wypustkę zwaną lamellą. Na przodzie lamella przechodzi w tzw. lamellipodium, mające zaledwie kilka mikrometrów długości i około jednej piątej mikrometra grubości. Fibroblast jest przytwierdzony do podłoża za pomocą przyczepów punktowych (focal contacts) tworzonych wzdłuż nasady lamellipodium. Samo lamellipodium jest więc strukturą swobodną, która przyrasta i zmienia kształt. Między innymi wytwarza ono pofałdowania zwane ruffles, które stopniowo jedno po drugim usuwają się z krawędzi czołowej i wędrują po powierzchni lamellipodium do tyłu, w kierunku lamelli. Na krawędzi przedniej są oczywiście wciąż zastępowane przez nowe fałdki. Zjawisko to jest uważane za jeden z głównych przejawów motorycznej aktywności fibroblastu.

Wyłania się zatem ta sama kwestia, co w przypadku ameb. Jakie jest źródło błony, która ma pokryć wypustki wytwarzane przez krawędź czołową? Czy rezerwy błony są przesuwane po powierzchni komórki w miarę jej ruchu, czy pochodzą z pęcherzyków błonowych przenoszonych przez jej wnętrze i wbudowywanych w skład powierzchni na przodzie?

Na początku dominowała druga hipoteza. Jest ona oczywiście pokrewna koncepcji błony stacjonarnej u ameb (Goldacre 1961). W odróżnieniu od niej sądzono jednak, że u fibroblastów wydajność wewnątrzkomórkowego obiegu błony przewyższa potrzeby wynikłe z ruchu komórki do przodu. Skoro tak, to błona na powierzchni powinna w trakcie lokomocji komórki przesuwac się jako całość do tyłu (a więc przeciwnie, niż to obserwowaliśmy u ameb). Jest to teoria ogólnego wstecznego przepływu błony, która w latach siedemdziesiątych była poglądem najbardziej rozpowszechnionym.

Zaznaczmy od razu, że dziś znamy ruchy wsteczne wielu struktur komórkowych, białek błonowych, zewnętrznych znaczników powierzchni komórkowej itp. Zwane są one również ruchami dośrodkowymi i uważane za zjawisko powszechne we wszystkich komórkach ruchliwych (Bray i White 1988, Heath i Holifield 1991). Występowanie ich nie jest jednak samo przez się dowodem, że błona jako całość przetacza się po powierzchni komórki do tyłu.

Historycznie pierwszym argumentem za ogólnym wstecznym przepływem całej błony powierzchniowej była obserwacja Marcusa (1962), że białko wirusa Newcastle wydostaje się na powierzchnię komórek HeLa wyłącznie w przodzie lamelli, po czym rozprzestrzenia się do tyłu.

Teorię ogólnego przepływu całej błony najbardziej rozpowszechniły badania ruchu fibroblastów przez Abercrombiego ze współpracownikami (1970, 1971, 1972). Zanalizował on wspomniany już tutaj wsteczny transport pofałdowań lamellipodiów, a także rozmaitych znaczników przywierających do powierzchni komórek, receptorów błonowych związanych z konkanawaliną, pod błoną zaś „serii nieokreślonych cieni wciąż uciekających jeden przed drugim do tyłu”. Ruchy te Abercrombie obserwował na grzbietowej stronie

lamellipodium i lamelli, a tłumaczył je właśnie jako skutek inkorporacji nadmiaru błony z wnętrza komórki do jej przedniej krawędzi. Sądził zaś, że po stronie brzusznej adhezja przeszkadza swobodnemu przepływowi błony do tyłu, natomiast umożliwia napędzanie lokomocji przez kurczliwy cytoszkielec.

Z tego okresu pochodzą także powszechnie cytowane badania *Harrisa* (1973, 1976), który pierwszy zauważył, że w nie przyczepionym do podłoża przodzie fibroblastu ruchy wsteczne są symetryczne, tzn. zachodzą również na brzusznej stronie lamellipodium. Sądził, że ten sam ogólny skurcz cytoszkieletu ciągnie komórkę do przodu, działając w miejscach jej adhezji do podłoża, a w okolicach swobodnych — ciągnie błonę do tyłu. W przypadku rosnącego neuronu postulowano (*Bray* 1970, 1973), że system aktomiozynowy napędza transport błonowych pęcherzyków wewnątrz aksonu do przodu, a ich włączenie na przodzie w skład powierzchni powoduje odpływ całej błony zewnętrznej do tyłu.

RUCHY BIAŁEK BŁONOWYCH I RECEPTORÓW (CAPPING)

Należy mocno podkreślić, że wszystkie wczesne teorie wstecznego przepływu błony jako całości dopatrywały się siły napędowej tego ruchu w kurczliwości cytoszkieletu. Co prawda w owym czasie o budowie i funkcjach systemu aktomiozynowego w ruchliwych komórkach niemięśniowych wiedzano jeszcze stosunkowo niewiele. Ponadto teorie te budowano zanim został ogłoszony tzw. mozaikowy model błony komórkowej *Singera* i *Nicholsona* (1972). Zgodnie z tym modelem dwuwarstwa lipidowa jest płynna w płaszczyźnie błony, zaś częściowo w niej pograżone cząsteczki białkowe mogą się poruszać w sposób od niej względnie niezależny. Wobec takiej budowy i reologicznych właściwości błony, wydaje się niemożliwe przyczepienie do niej elementów kurczliwych w taki sposób, aby mogły one poruszać nią jako całością.

Mniej więcej w tymże czasie zostało ponownie odkryte zjawisko cappingu. Było ono najpierw opisane (a termin „cap” użyty) u ameb przez *Ra*y (1951), ale stało się powszechnie znane znacznie później, gdy wykryto je u limfocytów (*Taylor* i in. 1971). Próby jego wytłumaczenia silnie się splótły z teoriami ruchu błony komórkowej. Białkowe lub związane z integralnymi białkami błonowymi receptory powierzchniowe mogą być krzyżowo wiązane („sieciowane”) przez różne ligandy, szczególnie przeciwciała i lektyny. Utworzone w ten sposób kompleksy (patches) rozpoczynają wsteczną lub dośrodkową wędrówkę po powierzchni komórki, aż zbiorą się w jeden konglomerat (tzw. cap). Stamtąd mogą być zrzućane do środowiska, albo pobierane do wnętrza komórki na drodze endocytozy.

Najwcześniejsze (*De Petris* i *Raff* 1973), a zarazem najpowszechniej przyjęte (*Bourguignon* i *Bourguignon* 1984) wytłumaczenie kierunkowego ruchu receptorów powierzchniowych w trakcie cappingu polega na ich holowaniu przez cytoszkielec. Istotnie, po paru latach zaczęły pojawiać się

pierwsze informacje o połączeniach podbłonowej warstwy aktynowej, tzw. korteksu kurczliwego, z receptorami powierzchniowymi za pośrednictwem białek wiążących aktynę, a mianowicie u fibroblastów (Ash i in. 1977; Bourguignon i Singer 1977; Toh i Hard 1977), komórek nabłonkowych (Albertini i Anderson 1977) i limfocytów (Braun i in. 1978; Flanagan i Koch 1978). Innych dowodów dostarczyły dość dawno temu badania cappingu w warunkach upośledzenia funkcji cytoszkieletu aktynowego. Już odkrywcy cappingu u limfocytów (Taylor i in. 1971) wykazali, że jest on hamowany przez cytochalazynę. Inni szybko to potwierdzili na szerszym materiale (Lor 1981). Ostatnio wyprodukowano u *Dictyostelium* (śluzowiec komórkowy mający amebowe stadium rozwoju) mutanta nie zawierającego klasycznej miozyny (De Lozanne i Spudich 1987); okazał się on niezdolny do cappingu (Pasternak i in. 1989).

A zatem ruchy na powierzchni byłyby istotnie spowodowane aktywnością skurczową cytoszkieletu, lecz przecież nie mógłby on ciągnąć wstecz całej błony. Ciągnąłby tylko „wyspy” białkowe, a otaczające je „morze” lipidów przepływałoby wokół nich w sposób niezależny, zapewne wymuszony przez zmiany kształtu i położenia frontu pełznającej komórki.

HIPOTEZA AUTONOMICZNEGO PRZEPŁYWU LIPIDÓW

Przyjęcie mozaikowego modelu błony spowodowało jednak także pojawienie się krańcowo odmiennej koncepcji jej zachowania się u komórek ruchliwych. Wysunął ją i podtrzymuje Bretscher (1976, 1982, 1984). Zastąpił on dawne teorie ogólnego wstecznego przepływu błony jako całości teorią wstecznego przepływu samej warstwy lipidowej. Postuluje następujący ciąg zjawisk: endocytoza receptorowa zachodzi w tylnych częściach komórki; lipidy przechodzą w skład pęcherzyków endosomalnych; w tej postaci są przenoszone ku frontowi komórki; zostają wbudowane na drodze egzocytozy w dwuwarstwę lipidową przedniej krawędzi zewnętrznej; powoduje to wsteczny przepływ lipidów na powierzchni spowrotem ku miejscom ich endocytozy. Zachowanie się białek jest natomiast bierne, zależne od wypadkowej trzech czynników: ich swobodnej dyfuzji w lipidach, unoszenia przez płynące lipidy, ewentualnego zakotwiczenia w strukturach podbłonowych. Motoryczna rola cytoszkieletu jest przez Bretschera całkowicie odrzucana. Autonomiczny przepływ lipidów służy mu również do logicznego, a bardzo prostego objaśnienia lokomocji i cappingu. Zatrzymanie lipidowej gąsienicy po stronie brzusznej, wskutek adhezji do podłoża, automatycznie spowoduje przesunięcie komórki do przodu. Gdy zaś chodzi o capping, białka receptorowe będą unoszone do tyłu przez płynące lipidy, jeśli ich współczynnik dyfuzji nie jest zbyt wysoki.

KRYTYKA KONCEPCJI OGÓLNEGO PRZEPŁYWU BŁONY LUB LIPIDÓW

W tej sytuacji rozpatrzmy argumenty, które były i są podnoszone przeciw teorii ogólnego przepływu błony, a później w szczególności przeciw teorii autonomicznego przepływu lipidów.

Zdania co do tego, czy wydajność wewnątrzkomórkowego obiegu błony może sprostać zapotrzebowaniu wynikłemu z lokomocji i zmian kształtu, są co najmniej podzielone. Według A b e r c r o m b i e g o (1980) u fibroblastów „można je uważać za adekwatne”, a w rosnącym neuronie jest to pewne (B r a y 1970, 1973). Natomiast u ameb wydajność takiego obiegu błony jest niewystarczająca (S t o c k e m 1972). Zapewne jest także niedostateczna u granulocytów.

Wspomnijmy, że materiał powierzchniowy po internalizacji nie zawsze wraca na powierzchnię wyłącznie w przodzie. Na przykład receptory konkanawaliny są ponownie wbudowywane w powierzchnię wzdłuż całej komórki (V a s i l i e v i in. 1976). Inny wczesny kontrargument podali E r i c k s o n i T r i n k a u s (1976). Wykazali oni, że powierzchnia fibroblastów rozplaszczonych i wędrujących wcale nie jest większa niż fibroblastów oderwanych od podłoża i zaokrąglonych, a to dlatego, że w tej drugiej sytuacji jest ona o wiele silniej sfalderowana. W sposób oczywisty przypomina się wcześniej omawiana teoria fałdowania i rozfałdowywania błony w ruchu ameb.

Najnowsze badania wskazały na trudność innego rodzaju. Zarówno w czołowej strefie fibroblastów (H e a t h 1981; F i s h e r i in. 1988), jak i ameb (G r ę b e c k i i K w i a t k o w s k a 1988; G r ę b e c k i 1990) pojawiają się odsuwające się spod błony warstwy sieci aktynowej, które tworzą filtr nie dopuszczający większych elementów strukturalnych, a w tej liczbie pęcherzyków błonowych do właściwej krawędzi czołowej. Sieć aktynowa w fibroblastach zatrzymuje już elementy o średnicy 24 nm (L u b y - P h e l p s i T a y l o r 1988). U makrofagów rozmiary oczek w sieci aktynowej określono na 100 nm (H a r t w i g i Y i n 1988; Y i n i H a r t w i g 1988).

Rozważmy teraz specyficzne konsekwencje teorii autonomicznego przepływu lipidów według B r e t s c h e r a. Jego objaśnienie lokomocji komórek, logicznie tak atrakcyjne, jest jednak fałszywe. Stwierdzono (G e i g e r i in. 1982), że w miejscach punktowej adhezji podlega unieruchomieniu około 50% białek błonowych, natomiast lipidy nadal poruszają się swobodnie. Oczywiście, bez unieruchomienia warstwy lipidowej w miejscu przyczepu do podłoża, pogląd że lipidy są odpowiedzialne za przesuw komórki do przodu musi upaść automatycznie.

Za teorią B r e t s c h e r a ma przemawiać m.in. to, że cappingowi mogą również podlegać glikolipidy, które przecież nie mają bezpośredniego połączenia z cytoszkieletem. Mogą one jednak być z nim połączone za pośrednictwem białek transmembranowych, co niedawno udowodniono u limfocytów (T u r n e r i S h o t t o n 1987).

Według koncepcji B r e t s c h e r a łączenie receptorów przez ligandy w większe kompleksy tylko dlatego wywołuje capping, że znacznie obniża ich współ-

czynnik dyfuzji, wobec czego zaczynają one ulegać przepływowi lipidów. Zatem capping powinien być niespecyficzny, niezależny od innych właściwości receptorów. W rzeczywistości capping jest względnie specyficzny. Tym samym argument okazuje się mało wartościowy, bo obosieczny. B r e t s c h e r powołuje się na przypadki niespecyficzności cappingu, a jego przeciwnicy na przejawy specyficzności tego zjawiska.

Bardzo ważny kontrargument wysuwają H e a t h i H o l i f i e l d (1991). Empirycznie mierzone współczynniki dyfuzji większości białek błonowych są zbyt niskie, by mogły się one przeciwstawić przepływowi lipidów z prędkością postulowaną przez B r e t s c h e r a . Receptory powierzchniowe powinny więc być unoszone do tyłu zawsze, bez konieczności ich sieciowania w większe kompleksy. W rzeczywistości zaś są one rozproszone równomiernie, dopóki odpowiednie ligandy nie indukują cappingu.

Wreszcie kontrargument bardzo bezpośredni. Badano rozmieszczenie na powierzchni fibroblastów dwóch integralnych białek błonowych: PGP i jednej z hemaglutynin, które mają prawie identyczne współczynniki dyfuzji. Mimo to, po dodaniu specyficznych przeciwciał jedno z nich (PGP) podlegało cappingowi, a drugie (hemaglutynina) pozostawało w rozproszeniu (H o l i f i e l d i i n . 1990). Możemy podsumować stwierdzeniem, że objaśnianie cappingu jako interakcji swobodnej dyfuzji białek w błonie z hipotetycznym wstecznym przepływem lipidów nie wytrzymuje krytyki doświadczalnej.

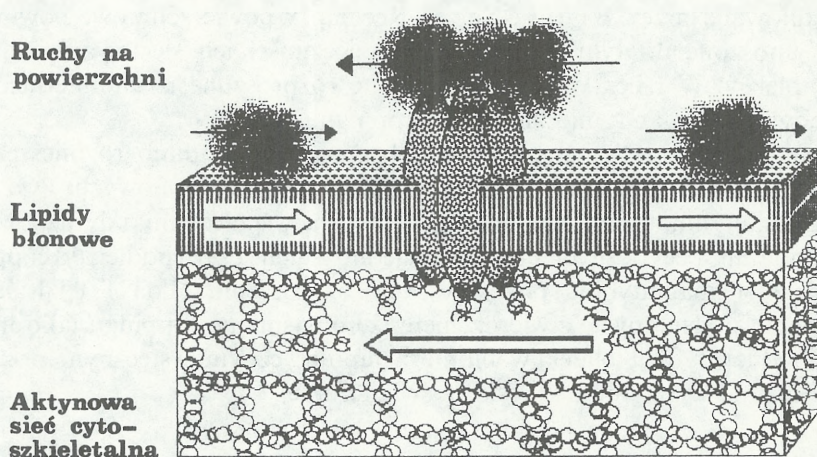
HOLOWANIE BIAŁEK BŁONOWYCH PRZEZ CYTOSZKIELET I BIERNY PRZEPŁYW LIPIDÓW

W przypadku ameb żyjących swobodnie już kilka lat wcześniej sformułowaliśmy wniosek, że nie autonomiczny przepływ lipidów, ale holowanie białek przez cytoszkielet jest przyczyną wstecznego ruchu znaczników związanych z receptorami powierzchniowymi (G r e b e c k i 1986, 1987a, 1988). Doszliśmy do tego za pomocą stosunkowo prostych metod, dzięki szczególnym zaletom ameb jako modelu do badania ruchów komórkowych.

Metodą kinematografii poklatkowej analizowano ruch na powierzchni *Amoeba proteus* i *Saccamoeba limax* cząstek lateksu, szkła i zawiesiny strąconego błękitu alcjanowego (barwnika specyficznego dla glikoprotein powierzchni komórkowej). Jednocześnie utrzymywano pod kontrolą ruchy ziarnistości ektoplazmatycznych po drugiej stronie błony. Dodajmy od razu, że ruchy tych ostatnich są wskaźnikiem zachowania się podbłonowej sieci aktynowej, która jak dowiedliśmy nieco wcześniej (G r e b e c k i 1984, 1985, 1987b), obkurcza się u tych ameb dośrodkowo ku miejscom adhezji do podłoża (a więc w przedniej części komórki przesuwają się wstecznie).

Wykazano współlistnienie na powierzchni ameb dwóch zupełnie różnych ruchów badanych cząstek (Rys. 3). Cząstki związane adhezyjnie przemieszczają się zgodnie z ruchami ziarnistości ektoplazmatycznych po przeciwległej stronie

błony; odległości między nimi pozostają niezmiennie. Są więc one przenoszone dośrodkowo, ruchem wstecznym w przodzie komórki, a postępowym w jej tylnej części. Natomiast cząstki luźno przylegające do powierzchni, a nawet pozostające w zawieszinie w jej bezpośrednim sąsiedztwie, płyną nieprzerwanie do przodu wzdłuż całej komórki. Przepływ ich jest zupełnie nie skoordynowany z zachowaniem się ektoplazmy z drugiej strony błony, ogólnie zaś zależny od zmian położenia i kształtu czoła pełzającej ameby.



Rys. 3. Objaśnienie dwukierunkowego ruchu materiałów przylegających z zewnątrz do powierzchni ameby: ich wsteczny transport (na lewo) wraz z białkami błonowymi holowanymi w tym kierunku przez cytoskielet, albo unoszenie ku przodowi komórki (na prawo) wraz z przepływem lipidów. Dla czytelności schematu pominięto złożony charakter połączenia integralnych białek błonowych zarówno z siecią aktynową, jak z materiałami pozakomórkowymi na powierzchni

Ruchy obu tych rodzajów współwystępują w tym samym czasie na tym samym bardzo niewielkim obszarze powierzchni komórki. Na przykład, cząstki transportowane do tyłu oraz płynące do przodu często mijają się w odległości około $1\ \mu\text{m}$. Ponadto, ta sama cząstka może zmienić charakter ruchu przechodząc z jednej kategorii do drugiej.

Można skonstatować ogólnie, że ruch cząstek związanych z powierzchnią ameby adhezyjnie ma taki sam charakter, jak ruch receptorów powiązanych ligandami w trakcie cappingu u komórek tkankowych (De Petris i Raff 1973), natomiast ruch cząstek luźno przylegających dokładnie odpowiada przepływowi zawieszin wokół komórki, który wykryliśmy dawniej w związku z rozfałdowywaniem się powierzchni pełzającej ameby (Czarska i Grębecki 1966). Pierwszy typ ruchu trzeba więc interpretować jako wynik holowania receptorów powierzchniowych przez cytoskielet, czyli odzwierciedlenie czynnego zachowania się podbłonowego systemu kurczliwego, drugi zaś jako przejaw

biernego przepływu lipidów błonowych do przodu wymuszonego przez przesunięcia i rozbudowę przedniej krawędzi migrującej komórki.

Wnioski te, które wysunęliśmy kilka lat temu badając stosunkowo prostymi metodami ameby, znajdują obecnie potwierdzenie w wyniku zastosowania najnowocześniejszych technik badawczych do komórek tkankowych. Na przykład grupa *Sheetz* analizowała, korzystając z aparatury wideo o rozdzielczości sięgającej nanometrów, ruchy cząstek złota o średnicy 40 nm, pokrytych konkanawaliną, na powierzchni makrofagów i keratocytów ryb (*Sheetz* i in. 1989; *Kucik* i in. 1989, 1990). W granicach tego samego bardzo niewielkiego obszaru niektóre cząstki wykazywały przypadkową dyfuzję, a inne ruch kierunkowy zarówno postępowy, jak wsteczny; ponadto ta sama cząstka mogła w trakcie obserwacji przechodzić od jednego typu ruchu do innego. Zdaniem autorów ruch jednych cząstek jest przejawem cappingu, a inne biernie dryfują zgodnie z ruchem całej komórki. Zgodność tych rezultatów i ich interpretacji z prawidłowościami zaobserwowanymi wcześniej u ameb jest więc stuprocentowa.

Cząstki koloidalnego złota pokrywano także poly-L-lizynami o różnej długości łańcucha (4 kD i 240 kD), po czym badano ich ruch na powierzchni fibroblastów (*De Brabander* i in. 1991). Pierwsze wykazywały tylko ruchy Browna i dyfuzję, a drugie podlegały transportowi wstecznemu (hamowanemu przez cytochalazynę). Pierwsze więc odzwierciedlały bierne zachowanie się lipidów w błonie, a drugie ruchy podbłonowego cytoszkieletu.

Wreszcie, nasze obserwacje wskazujące, że u ameb lipidy błony nie płyną do tyłu, lecz przesuwają się do przodu ruchem wymuszonym przez przyrost czołowej strefy komórki, znalazły ostatnio bezpośrednie potwierdzenie na granulocytach (*Lee* i in. 1990). Po włączeniu fluorescencyjnego analogu lipidowego do błony granulocytu wygaszono za pomocą wiązki laserowej świecenie małego prostokątnego obszaru na jego powierzchni. W ciągu 5 sekund zanim powróciła fluorescencja obszar ten przesuwał się do przodu z taką samą prędkością, jak czołowa krawędź komórki.

Wszystkie badania ruchów na powierzchni komórek ameboidalnych, zarówno swobodnie żyjących jak tkankowych, dowodzą więc zgodnie, że ich siłą napędową są ruchy podbłonowego cytoszkieletu, a nie hipotetyczny wsteczny przepływ lipidów. Dodajmy, że po zignorowaniu motorycznej roli cytoszkieletu brakłoby siły napędowej także dla wewnątrzkomórkowego ramienia obiegu lipidów, przede wszystkim dla ich transportu przez cytoplazmę ku przodowi komórki, ale także dla ich endocytozy i egzocytozy. Dowody na motoryczne funkcje systemu aktomiozynowego w komórkach ameboidalnych są tak ważne i obfite, że podjęta ostatnio izolowana próba szukania źródła ich siły napędowej w potencjałach błonowych (*Dolow* 1987) zapewne nie ma szans powodzenia.

ZWIĄZEK BIAŁEK BŁONOWYCH Z CYTOSZKIELETEM

Do tej pory wielokroć, ale raczej dość ogólnikowo odwoływaliśmy się do odpowiedzialności cytoszkieletu za ruchy powierzchni komórki. Aby konkretniej uzasadnić i wyjaśnić tę jego funkcję, trzeba wykazać po pierwsze, że peryferyjna sieć aktynowa jest połączona z błoną, a ściślej mówiąc, z białkami błonowymi; po drugie, że sama wykonuje ruchy lateralne w płaszczyźnie błony; wreszcie po trzecie, należałoby przedstawić współczesne poglądy na molekularne mechanizmy tej funkcji cytoszkieletu.

Oczywiście, związek ruchów zachodzących na powierzchni komórki z ruchami cytoszkieletu wymaga mechanicznego połączenia białek błonowych z podbłonową siecią aktynową. Nie jest to połączenie bezpośrednie. Pośrednikami są niektóre spośród białek wiążących aktynę, te które mają ponadto inne specyficzne miejsca wiązania pozwalające im przyłączać się z drugiej strony do białek transmembranowych, albo wchodzić w skład złącz bardziej złożonych. Opisano już co najmniej dziesiątki takich białek (por. Tilney 1983; Schliwa 1986; Bershadsky i Vasiliev 1988; Mangel 1988). Spośród ważniejszych i szeroko rozpowszechnionych w różnych komórkach wymienimy spektrynę i białka do niej podobne, jak fodryna, ankiryne, winkulinę, α -aktyninę.

Ameby swobodnie żyjące, które tak często okazywały się znakomitym obiektem eksperymentu fizjologicznego, są przeciwnie, bardzo trudnym materiałem dla prac biochemicznych, a nawet immunocytochemicznych. Z tego powodu dopiero w ostatnim czasie zaczęły się pojawiać pierwsze informacje o białkach wiążących ich aktynę z błoną komórkową. Znamy już jednak pontikulinę, która pełni tę rolę w amebowym stadium śluzowca *Dictyostelium* (Wuestehube i Luna 1987). Stosunkowo nieźle jest poznana pod względem biochemicznym niewielka *Acanthamoeba*; u tej ameby znane są analogi spektryny (Pollard 1984; Kwiatkowska i Sobota 1990). U *Amoeba proteus*, która jest najczęściej używana jako obiekt w fizjologii ruchu, znaleziono α -aktyninę i winkulinę. Stosując metody immunofluorescencyjne, Brix i in. (1990) stwierdzili obecność bardzo cienkiej warstwy α -aktyniny pomiędzy błoną a warstwą aktynową, winkulina zaś skupiała się w miejscach przyczepu ameby do podłoża.

Nie ma więc żadnych wątpliwości, ani w przypadku komórek tkankowych, ani ameb swobodnie żyjących, co do samego istnienia i natury połączeń warstwy aktynowej z błoną komórkową. O ich funkcjonalnym znaczeniu zaświadczyło zastosowanie do komórek będących w toku cappingu metody podwójnej immunofluorescencji lub technik pokrewnych. Równocześnie stosowano z jednej strony oznakowane ligandy wiążące receptory powierzchniowe, a z drugiej oznakowane przeciwciała specyficzne dla poszczególnych białek cytoszkieletu. Przede wszystkim ujawniono tym sposobem, że aktyna (Gabbiani i in. 1977; Tohi i Hard 1977) albo aktyna i miozyna (Bourguignon i Singer 1977) skupiają się pod kompleksami powiązanych receptorów oraz przesuwały się wraz z nimi w trakcie cappingu (Heath 1983b). Inni wykazali

skupianie się w tych samych miejscach białek wiążących aktynę oraz uczestniczących w jej połączeniach z białkami błonowymi (np. α -aktyniny, spektryny, fodryny, ankiryry). Te transmembranowe połączenia między receptorami powierzchniowymi a cytoszkieletem są na tyle trwałe, że nie zrywają się po ekstrakcji lipidowej frakcji błony z użyciem detergentów. Mało tego, nawet wtedy mogą zachować zdolność działania. Mianowicie, według Bershadskiego i Vasileva (1988) limfocyty poddane ekstrakcji saponiną mogą nadal dokonywać cappingu konkanawaliny po podaniu ATP. W doświadczeniu tym capping powierzchniowych kompleksów białkowych zostaje zatem wykonany przez sam „wypreparowany” cytoszkielet.

RUCHY DOŚRODKOWE PODBŁONOWEGO CYTOSZKIELETU U AMEB

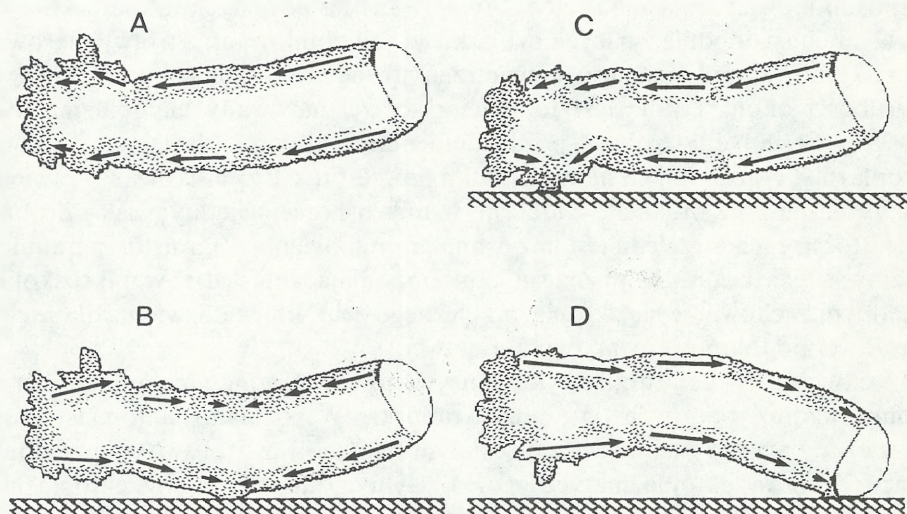
Przejdźmy z kolei do drugiego z uprzednio postawionych pytań: czy peryferyjny cytoszkielet komórek ameboidalnych sam przesuwają się pod błoną w sposób mogący objaśnić ruchy obserwowane na powierzchni komórki.

U ameb swobodnie żyjących cytoszkielet jest zbudowany z trójwymiarowej sieci aktynowej podścielającej wewnętrzną stronę błony komórkowej warstwą o grubości około 1 μm . Jest to przejrzysty żel nazywany hialoplazmą, nie zawierający innych struktur poza filamentami aktyny. Następną warstwą ektoplazmy, o grubości co najmniej kilku μm , jest także żelifikowana, zawiera jednak liczne inne organelle widoczne w mikroskopie świetlnym jako drobne ziarnistości; z tego względu jest nazywana granuloplazmą. Ziarnistości granuloplazmy są więc naturalnymi znacznikami pozwalającymi śledzić w mikroskopie świetlnym zachowanie się ektoplazmatycznego żelu, który odzwierciedla ruchy kurczliwej podbłonowej warstwy aktynowej.

W dawniejszej literaturze zwykle opisywano ektoplazmę ameby jako nieruchomą wzdłuż bocznych krawędzi komórki. Wyróżniano natomiast dwa niezależne zjawiska ruchowe w zamkniętym tylnym oraz w otwartym przednim końcu cylindra ektoplazmatycznego. W tylnym końcu ameby ektoplazma porusza się do przodu w związku z wycofywaniem się strefy ogonowej. Na samym przodzie natomiast może ona ruchem wstecznym odsuwać się od krawędzi czołowej, pod którą jest nieprzerwanie odtwarzana na drodze żelifikacji endoplazmy (tzn. polimeryzacji aktyny). Zjawisko to nazwano ruchem fontannowym, bo istotnie napływająca środkiem endoplazma, a wokół niej powracająca ektoplazma, razem tworzą przestrzenną pętlę w kształcie fontanny.

Tradycyjny pogląd, że peryferyjna warstwa kurczliwa pozostaje nieruchoma wzdłuż prawie całej komórki sprawdzaliśmy za pomocą filmowej analizy zachowania się granuloplazmy u dwóch gatunków i kilku form morfologicznych ameb swobodnie żyjących (Grębecki 1984, 1985, 1987b). Ameby te były badane w warunkach różnego kontaktu z podłożem oraz — całkowitego braku przyczepu.

Ameba oczywiście nie może posuwać się wzdłuż podłoża, jeśli jest pozbawiona kontaktu z nim. Wewnątrz unieruchomionej w ten sposób komórki cytoszkieletalny motor jednak nadal pracuje, chociaż „na jałowym biegu”. Endoplazma jak zwykle środkiem płynie do przodu, wobec czego żelifikowana ektoplazma wycofuje się jako całość, wzdłuż boków ameby aż do samego jej tyłu, a nie tylko w strefie czołowej (rys. 4A). Analiza rozkładu prędkości tego wstecznego ruchu pod błoną ameby dowiodła, że cała peryferyjna warstwa kurczliwa funkcjonuje równomiernie — nie ma odcinków biernie wleczonych, lecz wszystkie w trakcie wycofywania same się skracają. A więc, wbrew dawniejszym opisom, cały podbłonowy cytoszkielet ameby jest kurczliwy i zdolny do skoordynowanego przesuwu wstecznego, właśnie takiego, jaki może powodować wsteczne ruchy występujące po drugiej stronie błony, na powierzchni komórki.



Rys. 4. Przesuwanie się całego żelu ektoplazmatycznego do tyłu komórki u ameby zawieszonej w środowisku bez kontaktu z podłożem (A), oraz jego dośrodkowe obkurczanie się ku miejscom adhezji u ameby przyczepionej do podłoża po środku swej brzusznej powierzchni (B), w strefie ogonowej (C) albo w strefie czołowej (D). Długości strzałek pokazują, że szybkość przesuwu przyrasta w miarę oddalania się od miejsca przyczepu

Obraz ten ulega tylko wtórnym modyfikacjom, gdy ameba pozostaje w warunkach naturalnych i pełźnie do przodu. Zwykle jest ona wówczas przyczepiona do podłoża gdzieś w środkowo-przedniej okolicy ciała. Wtedy cała peryferyjna warstwa cytoplazmy obkurcza się dośrodkowo, od obu swobodnych biegunów komórki ku strefie przyczepu (rys. 4B). Analiza prędkości wskazuje ponownie, że jest to ruch związany z równomiernym skurczem wzdłuż całej

komórki, choć kierunki przesuwu materiału są przeciwne w jej przedniej i tylnej części. Zatem od dawna niezależnie opisywane wycofywanie strefy ogonowej i ruch fontannowy w strefie czołowej wcale nie są dwoma różnymi zjawiskami; są to tylko lokalne przejawy tego samego wspólnego procesu — nieprzerwanego dośrodkowego obkurczania się całego cytoszkieletu. U normalnie pełzającej ameby wsteczny ruch cytoszkieletu obserwuje się więc w nie przytwierdzonym do podłoża przednim odcinku komórki, dokładnie tam gdzie również rozmaite znaczniki powierzchni komórkowej są transportowane do tyłu.

W trakcie lokomocji ameby zdarza się, że chwilowo przylega ona do podłoża tylko przednim, albo tylko tylnym końcem swej strony brzusznej. Oczywiście w takich przypadkach cytoszkielet przesuwa się jako całość albo wyłącznie do przodu, albo wyłącznie do tyłu (rys. 4C, D). We wszystkich sytuacjach przesuw podbłonowej warstwy kurczliwej jest całkowicie zgodny z ruchami na powierzchni tych znaczników, które przylegają do niej adhezyjnie.

Opisane tu zjawiska posłużyły do opracowania modelu i komputerowej symulacji dynamiki cytoszkieletu u ameb (D e m b o 1989).

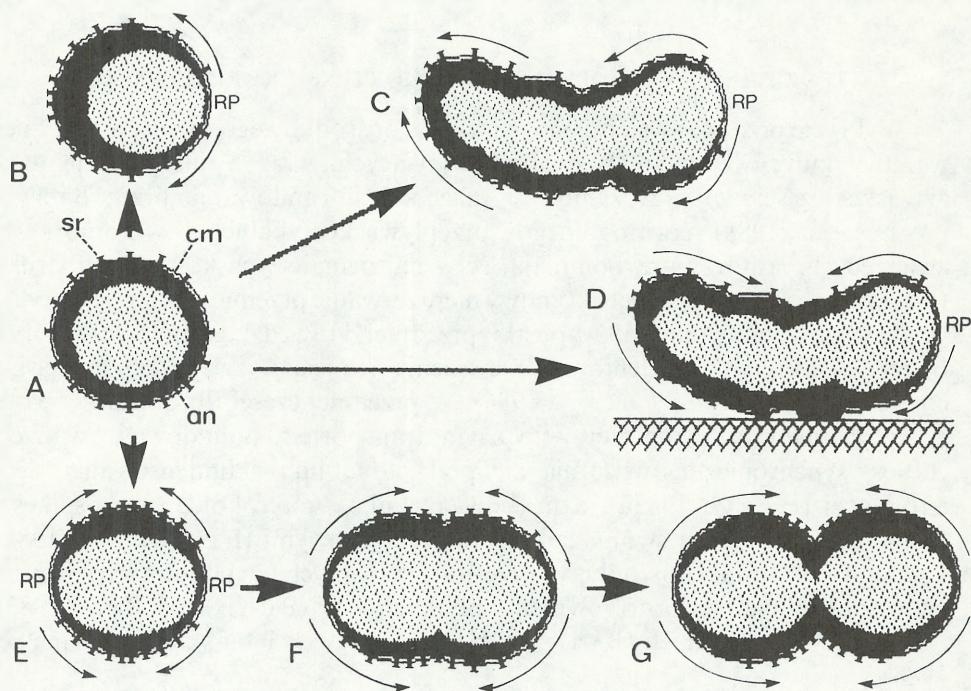
TEORIA OGÓLNEGO „PRZEPŁYWU” KORTEKSU KURCZLIWEGO

Wykrycie przez nas wstecznego, czy ściślej dośrodkowego ruchu peryferyjnej warstwy kurczliwej u ameb swobodnie żyjących, wraz z interpretacją tego zjawiska, częściowo przyczyniły się także do sformułowania przez B r a y a i W h i t e ' a (1988) teorii ogólnego „przepływu korykalnego” w komórkach zwierzęcych. Autorzy przypominają, że w najrozmaitszych komórkach struktury zawierające cytoszkielet aktynowy nieprzerwanie przemieszczają się do tyłu.

Tak się zachowują np. wypustki przedniej krawędzi granulocytów oraz bogate w aktynę pierścieniowe przewężenia ich ciała, zwane po angielsku constriction rings (por. L a c k i e 1986). W przedniej części fibroblastów, wraz z opisywanym już wcześniej wstecznym transportem pofałdowań zwanych ruffles, synchronicznie wycofują się pod błoną łuki skondensowanej sieci aktynowej (H e a t h 1983a), a na powierzchni — mikrokolce (microspikes), zwane też, z uwagi na swój skład, żebrami aktynowymi (F i s h e r i in. 1988; I z z a r d 1988). Stały dośrodkowy przesuw tych samych lub podobnych struktur cytoszkieletalnych wykryto również w płytkach krwi (B e h n k e i B r a y 1988) i w rosnących neuronach (B r a y i C h a p m a n 1985; F o r s c h e r i S m i t h 1988).

Zgodnie z koncepcją ogólnego przepływu korykalnego aktywność skurczowa podbłonowej sieci aktynowej nie jest równomierna. W jednych okolicach bywa ona wzmożona, a gdzieś indziej zachodzi lokalna relaksacja. Od tego zależy rozkład ruchów warstwy korykalnej pod powierzchnią komórki. Przesuwa się ona zawsze od ośrodków relaksacji ku okolicom silniej się kurczącym. Jest to w istocie ta sama zasada, którą wcześniej stosowaliśmy do ameb, tłumacząc wycofywanie się ich peryferyjnej warstwy kurczliwej ze zrelaksowanej strefy przedniej.

Teoria B r a y a i W h i t e ' a oczywiście odwołuje się do połączeń pomiędzy białkami cytoszkieletu a białkami integralnymi błony i receptorami powierzchniowymi (rys. 5A). Zatem, jeżeli gdzieś w korteksie komórki zachodzi miejscowa relaksacja, warstwa aktynowa musi płynąć do przeciwnego bieguna i holować za sobą receptory powierzchniowe; w sytuacji takiej komórka może nie być jeszcze ani przytwierdzona do podłoża, ani spolaryzowana morfologicznie, będzie jednak wykonywać capping (rys. 5B). W komórce zaś z rozwiniętą polaryzacją ruchową, ale bez kontaktu z podłożem, peryferyjny cytoszkielet musi „na jałowym biegu” wycofywać się aż do tylnego krańca komórki (rys. 5C). Po przytwierdzeniu do podłoża wsteczny ruch warstwy kurczliwej spowoduje automatycznie przesuwanie komórki do przodu, a sam rozłoży się wokół strefy adhezji (rys. 5D). Przypomnijmy, że te dwie ostatnie sytuacje przewidziane w teorii B r a y a i W h i t e ' a były już wcześniej zarejestrowane w rzeczywistości u ameb (por. rys 4).



Rys. 5. Schemat ogólnego przepływu kortykalnego według B r a y a i W h i t e ' a (zmodyfikowany). Komórka nie spolaryzowana (A), dokonująca cappingu (B), spolaryzowana ruchowo, lecz nie przytwierdzona do podłoża (C), poruszająca się po podłożu (D) oraz w trakcie podziału (E-G). W kompleksie kortykalnym zaznaczono błonę (cm), receptory powierzchniowe (sr), sieć aktynową (an); nie są zachowane rzeczywiste proporcje rozmiarów tych elementów. RP — biegun zrelaksowany, strzałki oznaczają spodziewane kierunki przesuwania się kortykalnej warstwy kurczliwej.

Szczegółowe objaśnienia w tekście

Według Braya i White'a wsteczny przepływ uformowanego cytoszkieletu pod błoną wędrującej komórki musi być zawsze skompensowany przepływem przez cytoplazmę zdepolimeryzowanego materiału kurczliwego ku przodowi. Teoria przepływu kortykalnego odwołuje się więc do istnienia prądu cytoplazmatycznego od dawna doskonale poznanego u ameb, lecz wciąż dyskusyjnego u komórek tkankowych.

Teorią ogólnego przepływu kortykalnego autorzy starają się objaśnić nawet zachowanie się peryferyjnej warstwy kurczliwej w trakcie podziału komórkowego, czyli cytokinezy. Wychodzą z założenia, że powstają wówczas dwa bieguny relaksacji (rys. 5E). Pogląd taki nie jest powszechny, ale był już wysuwany w przeszłości (Wolpert 1960) i współcześnie (Devore i in. 1989; Fukui i Inoué 1991). Znajduje on m.in. oparcie w badaniach Hiramoto (1963) świadczących, że w jajach jeżowca przed bruzdkowaniem naprężenie warstwy kortykalnej najpierw ogólnie rośnie, a potem raptownie spada w miejscach dwóch przyszłych biegunów. Wobec tego kortykalna sieć aktynowa powinna przesuwać się od obu biegunów w kierunku równika (rys. 5F) i utworzyć tam, pod bruzdą podziałową pierścień materiału kurczliwego (rys. 5G). Takie pierścienie kurczliwe i ich aktynowy charakter znane są od dawna. Wiadomo też, że w ich skład wchodzi również miozyna (Yumura i Fukui 1985; Schroeder 1987; Schroeder i Otto 1988; Fukui i Inoué 1991). Zgodnie z przewidywaniami przesuwały się cytoszkielet holuje w kierunku równika kompleksy receptorów powierzchniowych. Na przykład dzielące się makrofagi potraktowane konkanawaliną wykonują capping do bruzdy podziałowej (Koppell i in. 1982). To samo obserwuje się w innych komórkach i przy użyciu innych ligandów.

Zatem według teorii ogólnego przepływu kortykalnego aktomiozyny cytoszkielet nie rozwija się wskutek polimeryzacji białek kurczliwych na miejscu pod bruzdą podziałową, ale w postaci już uformowanej nasuwa się od strony obu biegunów. Komputerowa symulacja takiego mechanizmu (White i Borisy 1983) wykazała dużą zgodność z rzeczywistym przebiegiem cytokinezy. Jest to koncepcja niewątpliwie pociągająca dla badaczy ruchów amebowych, bo zakłada odtwarzanie się cytoszkieletu na drodze polimeryzacji w zrelaksowanych okolicach dzielącej się komórki (tak jak w czole pełzającej ameby), a nie odwrotnie.

ODKLEJANIE SIĘ CYTOSZKIELETU OD BŁONY POD PRZEDNIĄ KRAWĘDZIĄ KOMÓRKI

Na czym polega relaksacja czoła ameby w toku lokomocji i jakie jest jej funkcjonalne znaczenie? O samym jej istnieniu świadczą eksperymenty fizjologiczne. Lokalne anestetyki przykładane mikropipetką do bocznej powierzchni ameby wywołują powstawanie w tych miejscach nowych stref czołowych, a przykładane do części przedniej intensyfikują przyrost i ruch szczytów już

istniejących tam nibynózek (Goldacre 1952; Korohoda 1972, 1977; Kalisz i Korohoda 1976). W ten sam sposób działa miejscowe zacienianie szczytów nibynózek, natomiast drażnienie wąską wiązką światła odwrotnie, prowadzi do ich zatrzymania, obkurczania i wycofywania; takie same bodźce świetlne przykładane do bocznych i tylnych okolic ameby wywierają przeciwne skutki — bodziec skurczowy przyspiesza, a rozkurczowy zwalnia ruch całej komórki (Grębecki 1980, 1981). Zatem ogólnie cała warstwa peryferyjna zachowuje się jakby była w stanie skurczu, z wyjątkiem czoła będącego w stanie relaksacji.

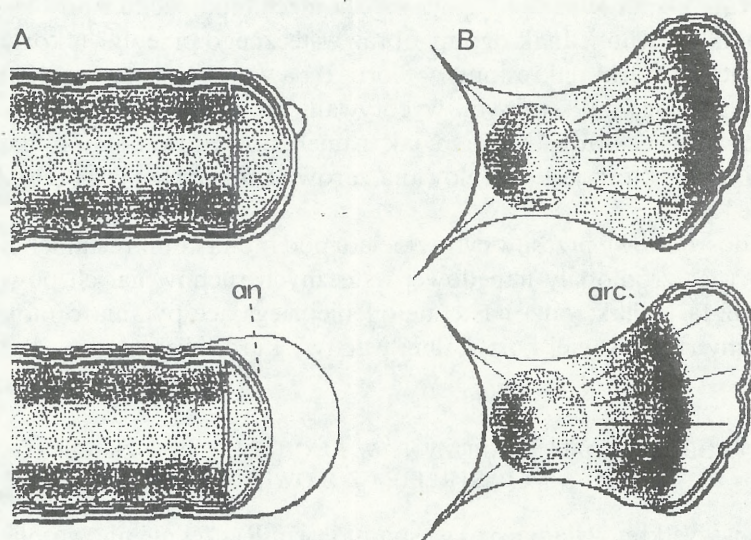
Z drugiej strony jednak, opisywaliśmy już tutaj intensywny ruch wsteczny cytoszkieletu właśnie w czołowej strefie ameby, zwanej z tego powodu strefą fontannową, a także pod przednią krawędzią ameboidalnych komórek tkankowych. Nie może więc tam zachodzić relaksacja samego systemu aktomiozynowego, bo wówczas ustałyby ruchy cytoszkieletu. Jest natomiast coś, co powoduje nieefektywność tych ruchów z punktu widzenia lokomocji komórki. Układ pozostaje biochemicznie funkcjonalny, ale staje się mechanicznie niesprawny.

Już ponad dziesięć lat temu wykazano w mikroskopie elektronowym, że pod samą przednią krawędzią wędrującej ameby peryferyjna sieć aktynowa nie przylega bezpośrednio do błony, lecz jest od niej znacznie odsunięta (Grębecka i Hrebenda 1979; Wehland i in. 1979; Stockem i in. 1982). Powstała wolna przestrzeń zajmuje przejrzysta cytoplazma (tz. czepek hialinowy), z której wszystkie większe elementy strukturalne zostały odfiltrowane przez sieć aktynową. Wiadomo zaś przecież, że warstwa kurczliwa nie przytwierdzona do błony nie może przekazać siły napędowej, choćby się sama poruszała.

Wspomnijmy przy okazji, że funkcjonalna relaksacja czoła ameby spowodowana lokalnym zerwaniem kontaktu między błoną a cytoszkieletem leży u podstawy współczesnej koncepcji ruchu amebowego, zwanej teorią ogólnej kurczliwości kortykalnej (Grębecki 1981, 1982, 1987c; Grębecka 1988; Stockem i Kłopocka 1988). Peryferyjny skurcz całej sieci aktynowej przyczepionej do błony podnosi ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz komórki, z wyjątkiem strefy czołowej, gdzie cytoszkielet jest od błony oderwany. Ciśnienie w przodzie jest więc niższe, co powoduje przepływ cytoplazmy w tym kierunku. Strefy czołowe, w których związek błony z cytoszkieletem jest zerwany (lub odbudowywany), pełnią więc rolę zaworów, których otwieranie i przamykanie reguluje kierunek i intensywność przepływu wewnątrzkomórkowego, a tym samym steruje ruchem całej ameby.

W ostatnich latach, m.in. dzięki zastosowaniu najnowszych technik wideo-mikroskopii i komputerowego wzmacniania kontrastu, udało się zaobserwować u żywych ameb o błonie zdestabilizowanej szokiem cieplnym (Grębecki i Kwiatkowska 1988; Kłopocka i in. 1988), a także w trakcie normalnego ruchu i endocytozy (Grębecki 1990, 1991), jak dochodzi do zrywania i odtwarzania kontaktu cytoszkieletu z błoną. Oba te procesy nieprzerwanie zachodzą w przodzie ameby i mają charakter cykliczny. Mniej

więcej co 2 s odrywa się warstwa sieci aktynowej, powodując uwypuklenie krawędzi czołowej i jej raptowne przesunięcie do przodu. Oderwana warstwa cytoszkieletu wędruje w tym czasie do tyłu z prędkością kilku μm na sekundę. Pod błoną zaś następuje repolimeryzacja sieci aktynowej, już wcześniej pokazana metodami immunofluorescencyjnymi (G a w l i t t a i in. 1980b; S t o c k e m i in. 1983), która prowadzi do jej odbudowy, następnego odklejenia i następnego „kroku” do przodu (rys. 6A). Bodźce dodatnie przyspieszają postępowy ruch czoła ameby, bo wzmagają odrywanie się warstw cytoszkieletu od błony. Ujemne natomiast hamują to zjawisko, wobec czego sieć aktynowa, wciąż przesuując się wstecz, ciągnie za sobą błonę krawędzi przedniej i powoduje wycofanie się dawnego czoła.



Rys. 6. Schematy ilustrujące fazy odrywania się podbłonowej sieci aktynowej (an) i jej wycofywania się w strefie czołowej ameby (A) oraz dwa stadia wstecznego ruchu tzw. łuków aktynowych w lamelli fibroblastów (B)

Konieczność rozerwania związku warstwy aktynowej z błoną w przedniej krawędzi komórki wynika również z komputerowej symulacji dynamiki cytoszkieletu u ameb przeprowadzonej przez D e m b o (1989).

Także w przypadku makrofagów odklejenie się błony od cytoszkieletu wskutek rozrywania filamentów jest uważane za warunek wysuwania pseudopodiów (H a r t w i g i Y i n 1988). Podobne znaczenie funkcjonalne zapewne ma brak fodryny, jednego z białek wiążących aktynę z błoną, obserwowany pod przednią krawędzią pobudzonych komórek nabłonkowych tarczycy (G a b r i o n i in. 1990).

Zjawisko bardzo podobne do odsuwania się kolejnych warstw kurczliwych od przedniej krawędzi czoła ameby było już wcześniej opisane u fibroblastów

(Heath 1981, 1983a; Soranno i Bell 1982). Jest ono widoczne w lamelli (rys. 6B). Pod jej powierzchnią grzbietową seryjnie przesuwa się ku tyłowi koncentryczne łuki skondensowanej sieci aktynowej. Ruch ich jest skoordynowany z wycofywaniem receptorów powiązanych ligandami (Heath 1983b) oraz innych struktur powierzchniowych i cytoplazmatycznych (Fisher i in. 1988). Przesuw łuków aktynowych w lamelli fibroblastów jest kilkadziesiąt razy wolniejszy ($0,1-0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) niż w strefie czołowej ameb, podobnie jednak różnią się między sobą prędkości lokomocji tych komórek. Na razie nie wiemy, czy warstwa kurczliwa w fibroblastach odkleja się od samej ich przedniej krawędzi, bo do tej pory wędrówkę łuków aktynowych obserwowano jedynie na terenie lamelli, a nie w lamellipodium. W związku z tym o wiele jest trudniej zinterpretować znaczenie tego zjawiska dla mechaniki ruchu fibroblastów, niż dla ameb. Na pewno jednak ogólny obraz wstecznego przepływu korykalnego wzdłuż całej komórki nakreślony w teorii Braya i White'a (1988) warto uzupełnić nieciągłym, seryjnym wycofywaniem kolejnych warstw sieci aktynowej ze strefy czołowej. Może to, jak u ameb, powodować stan funkcjonalnej relaksacji czoła, która jest postulowana zarówno przez nas, jak przez Braya i White'a.

Stały dośrodkowy przesuw cytoszkieletu pod błoną komórek ameboidalnych tłumaczy więc źródło siły napędowej wstecznych ruchów na ich powierzchni. Odpowiedź ta jednak rodzi następne, głębiej sięgające pytania o molekularne mechanizmy ruchu samej korykalnej warstwy kurczliwej.

PROBLEM UDZIAŁU MIOZYNY W RUCHACH CYTOSZKIELETU W STREFIE CZOŁOWEJ

Przed wszystkim wyłania się kwestia motoru. Raczej nie ma wątpliwości, że dośrodkowy przepływ korykalnego cytoszkieletu jest wynikiem interakcji aktyny z miozyną. Ale rozmieszczenie w komórkach miozyny II tzn. „konwencjonalnej” miozyny dwugłównkowej analogicznej do miozyny mięśniowej, nie jest zgodne z topografią obserwowanych ruchów. Wsteczny przesuw aktynowego cytoszkieletu zaczyna się bowiem już od przedniej krawędzi komórki, gdzie z reguły nie znajduje się miozyny II, ani w postaci grubych filamentów widocznych w mikroskopie elektronowym, ani metodami immunofluorescencyjnymi.

W fibroblastach miozyna II jest obecna w tyle komórki, wzdłuż bocznych peryferii oraz w lamelli, ale nie w lamellipodium (Heath 1983a). U ameb swobodnie żyjących grube filamenty miozynowe są skoncentrowane w obkurczających się i wycofywanych okolicach ciała, a nieobecne w strefie czołowej (Stockem i in. 1982), co ostatnio potwierdziły badania immunocytochemiczne (Brix i in. 1990). Zgodnie z tym, w warstwach aktynowych szeregowo odklejających się spod przedniej krawędzi ameby brakuje miozyny II, a pojawia

się ona dopiero po ich wycofaniu w głąb komórki (Kłopotcka i in. 1988). Również w amebowym stadium *Dictyostelium* miozyna II została wykryta immunologicznie tylko w tylnych okolicach komórki (Yumura i in. 1984; Fukui i Yumura 1986). W toku podziału *Dictyostelium* miozyna II jest rozmieszczona równikowo w pierścieniu kurczliwym, natomiast po stronie obu biegunów, tzn. na terenie przyszłych czoł komórek potomnych, jest nieobecna (Fukui i Inoué 1991).

W związku z tym ostatnio często przypisuje się napęd intensywnych ruchów cytoszkieletu w przedniej strefie komórek ameboidalnych innej miozynie, obecnej tylko w komórkach niemięśniowych, miozynie I. Prawie dwadzieścia lat temu Pollard i Korn (1973) wykryli ją u swobodnie żyjącej *Acanthamoeba*, zidentyfikowano ją także u *Dictyostelium*, obecnie zaś uważa się ją za rozpowszechnioną również w komórkach tkankowych. Miozyna I nie tworzy filamentów oraz jest jednogłówkowa. Ma więc tylko jedno miejsce wiązania z aktyną wrażliwe na ATP i zdolne do przesuwania się wzdłuż filamentu aktynowego. Występują w niej natomiast jedno albo dwa inne miejsca wiązania — na ATP niewrażliwe, ale zdolne do statycznego zakotwiczenia cząsteczki bezpośrednio do błony do innego filamentu aktynowego. Dzięki temu miozyna I wywołuje w odpowiednich warunkach przesuwanie się jednego filamentu aktynowego względem drugiego, albo względem błony, w eksperymentach *in vitro* (Adams i Pollard 1989).

Pewne fakty świadczą o roli pełnionej przez nią *in vivo*. Wspominany już tutaj mutant *Dictyostelium* pozbawiony miozyny II (De Lozanne i Spudis 1987) jest jednak zdolny do lokomocji i fagocytozy, a zawiera on miozynę I. U genetycznie normalnych komórek *Dictyostelium*, u których miozyna II jest skoncentrowana z tyłu, miozynę I wykryto przy krawędzi przedniej (Fukui i in. 1989). Przypuszcza się, że także w komórkach tkankowych, np. w strefie czołowej rosnącego neuronu albo w lamellipodiach fibroblastów miozyna I może zastępować nieobecną tam „konwencjonalną” miozynę II (Smith 1988; Adams i Pollard 1989; Heath i Holifield 1991). Rozwiązywałoby to zagadkową kwestię motoru napędzającego intensywny wsteczny transport warstwy aktynowej spod przedniej krawędzi komórek ameboidalnych.

Istnieją co prawda hipotezy proponujące alternatywne rozwiązania. Na przykład Heath (1983a) dopuszczał możliwość ciągnięcia sieci aktynowej w lamellipodium przez skurcz zachodzący poza nim, na obszarze lamelli gdzie już występuje miozyna II. Ale w taki razie cała warstwa korykalna w strefie czołowej powinna być włączona z jednakową prędkością, jak jeden bierny blok. U ameb taki mechanizm został wykluczony. Pomiar prędkości przesuwu cytoszkieletu wzdłuż całej komórki (Grecki 1984, 1987a) wskazały, że sieć aktynowa pod krawędzią przednią wycofuje się aktywnie, bo po drodze sama się kurczy.

REPOLIMERYZACJA SIECI AKTYNOWEJ W CZOLE KOMÓRKI

Istnieje jeszcze inne objaśnienie wstecznego ruchu aktyny w przodzie komórki. Jest ono oparte na sposobie polimeryzacji filamentów aktynowych przylegających do błony. Filamenty ułożone prostopadle do błony zawsze są do niej zwrócone jednym ze swych końców, zwanym po angielsku *barbed end*. Jest tak m.in. u *Acanthamoeba* (Pollard i Korn 1973) i w lamellipodiach fibroblastów (Sma11 1981). Ten właśnie skierowany do błony koniec filamentu jest zarazem odpowiedzialny za jego wydłużanie się wskutek przyłączania nowych monomerów aktyny. Filament rośnie więc, jak paznokiec — od nasady. A zatem wszystkie cząsteczki wchodzące wcześniej w jego skład muszą odsuwać się od błony w miarę wbudowywania nowych monomerów. Czy zjawisko to (po angielsku zwane *treadmilling*) może posłużyć zamiast skurczu do wytłumaczenia wstecznego ruchu warstwy aktynowej w lamellipodiach fibroblastów i w strefie czołowej ameb?

Próbowano kwestię tę rozstrzygnąć doświadczalnie. Wang (1985) wstrzykiwał do migrujących fibroblastów fluorescencyjnie oznaczoną aktynę monomeryczną, a gdy rozpoczęło się jej wbudowywanie w cytoszkielecie przedniej krawędzi komórki, wygaszał wiązką laserową świecenie na małym jej obszarze. Obszar ten rzeczywiście odsuwał się do tyłu z prędkością $0,013 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. W ten sposób samo występowanie zjawiska *treadmilling* zostało u fibroblastów potwierdzone *in vivo*. Z drugiej strony okazało się ono jednak około dziesięć razy zbyt powolne dla objaśnienia wycofywania się warstwy aktynowej w strefie czołowej ($0,1\text{--}0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u fibroblastów).

Dodatkowy kłopot sprawia to, że filamenty aktynowe mogą być przytwierdzone do błony nie końcami, lecz bocznie. Spotyka się to zarówno u ameb (Stockem i in. 1982) i *Dictyostelium* (Bennet i Condeelis 1984; Goodloe-Holland i Luna 1984), jak i w niektórych komórkach tkankowych (Tilney 1983). Obecnie uważa się oba te sposoby połączenia filamentów aktynowych z błoną za współistniejące.

Alternatywne tłumaczenia odsuwania się warstwy aktynowej od przedniej krawędzi komórki są więc wątpliwe. Zdecydowana większość badaczy przychyliła się do jego objaśniania mechanizmem miozynowym (Fisheri Smith 1988; Smith 1988; Mitchison i Kirschner 1988; Adams i Pollard 1989; Heath i Holifield 1991; Theriot i Mitchison 1991).

Chociaż repolimeryzacja aktyny pod przednią krawędzią komórki sama raczej nie stanowi siły napędowej wstecznego ruchu cytoszkieletu w tej strefie, to jednak oczywiście musi być z nim skoordynowana. Sieć aktynowa winna być odbudowywana w tempie adekwatnym do jej wycofywania. W związku z tym częstotliwość odrywania się kolejnych warstw w szczytach nibynózek ameb (mniej więcej co 2 s — Grębecki 1990) może wydawać się bardzo wysoka. Również matematyczne modelowanie dynamiki cytoszkieletu ameby wskazuje na jego ogromną labilność — średni czas pozostawania w nim każdego elementu w stanie spolimeryzowanym powinien wynosić tylko około 12 s (Dembo 1989). Nie są to jednak wartości nieprawdopodobne w zestawieniu np. z reorganizacją

cytoszkieletu aktynowego u *Dictyostelium* dokonującą się pod wpływem bodźca chemotaktycznego w ciągu zaledwie 3 do 5 sekund (McRobbie i Newell 1983), albo około 10 s u granulocytów po indukcji fagocytozy (Shetterline i in. 1984). Heath i Holifield (1991) obliczają, że dla kompensacji wycofywania aktyny w fibroblastach z prędkością $0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ każdy filament pod przednią krawędzią powinien przyłączać 66 monomerów na sekundę. W mikrokosmkach nabłonka jelitowego stwierdzono przyłączanie około 70 monomerów na sekundę, co odpowiadałoby przyrostowi filamentu o $0,24 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Pollard i Mooseker 1981). Aktyna może więc repolimeryzować w tempie adekwatnym do jej wycofywania się z czoła komórki.

REGULACJA DYNAMIKI BŁONY I CYTOSZKIELETU W CZOŁOWEJ KRAWĘDZI KOMÓRKI

Rozszczepienie kompleksu błona—cytoszkielet w przedniej krawędzi komórki ameboidalnej najprawdopodobniej jest powodowane miejscowym wzrostem stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Można tego się domyślać już dlatego, że aktynowy żel cytoplazmatyczny ameb swobodnie żyjących — zarówno *in vitro*, jak i na miejscu w komórce — ulega upłynnieniu, jeżeli stężenie wolnego wapnia osiąga wartości mikromolarne (Taylor i in. 1973; Taylor 1977). Iniekcja do wnętrza ameby aequoryny, naturalnego luminoforu świecącego w obecności wolnych jonów wapnia pokazała, że podczas ruchu komórki stężenie wapnia wzrasta rytmicznie w strefie czołowej co 1–4 s (Taylor i in. 1980). Nadmiar wolnych jonów wapnia pojawia się więc w tym samym rytmie, co odrywanie kolejnych warstw aktynowych spod błony. Bardzo silnie to przemawia za przypuszczeniem, że właśnie wapń wyzwała procesy prowadzące najpierw do rozszczepienia kompleksu cytoszkielet—błona w czołe ameby, a w konsekwencji — do przesunięcia warstwy aktynowej w głąb cytoplazmy, a przedniej krawędzi komórki do przodu.

U amebowych form *Dictyostelium* reakcja na pozytywny bodziec chemiczny i tworzenie nowych nibynózek są związane z podniesieniem poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego (Wick i in. 1978; Malchow i in. 1982; Fukui i Yumura 1986). Podobnie jest u poruszających się komórek tkankowych. Wzrost stężenia wolnego wapnia przy przedniej krawędzi komórek nabłonkowych aktywizuje ich lamellipodia (Strohmeier i Bereiter-Hahn 1984; Mittali Bereiter-Hahn 1985). Wolne jony wapnia pojawiają się w nadmiarze w strefach czołowych granulocytów podczas fagocytozy (Sawyer i in. 1985) i w toku ich reakcji na bodźce chemiczne (Truett i in. 1988), a także u fibroblastów drażnionych prądem elektrycznym (Onuma i Hui 1988).

Wapń pełni w tych reakcjach raczej tylko rolę sygnału. Samo zaś rozluźnianie lub rozrywanie warstwy kortykalnej we frontach komórek ruchliwych zapewne zależy od białek regulujących polimeryzację aktyny albo zwartość sieci aktynowej. Tak np. cytochalazyna B, która blokuje dalszą polimeryzację aktyny na

końcach filamentów przylegających do błony, powoduje gwałtowne wycofywanie się warstwy kurczliwej spod krawędzi stożków wzrostu neuronów (Forscher i Smith 1988). Taki sam efekt wywołuje cytochalazyna u ameb (Grębecka, dane niepubl.). DNAaza I, która wiąże się z aktyną monomeryczną uniemożliwiając tym samym jej repolimeryzację, powoduje u ameb w miejscu iniekcji rozszczepienie kompleksu błona — cytoszkielet i wytworzenie tam nowego czoła lokomocji (Wehland i in. 1979.). Innym białkiem blokującym monomery aktyny jest profilina, szeroko rozpowszechniona w różnych komórkach tkankowych (Carlsson i in. 1977). Występuje ona również u ameb i śluzowców (Reichstein i Korn 1979; Ozaki i Hatanō 1984; Sonobe i in. 1986) i może uczestniczyć w regulacji dynamiki ich cytoszkieletu w strefach czołowych.

Na największą uwagę zasługują te białka związane z aktyną, które mogą rozrywać filamenty aktynowe, a spośród nich przede wszystkim żelsolina i białka z nią blisko spokrewnione. Dla swego działania wymagają one właśnie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia do poziomu kilku mikromoli. Zdaniem Hartwiga i Yin (1988) żelsolina jest obok profiliny głównym regulatorem dynamiki aktynowego cytoszkieletu u makrofagów. Pod wpływem dodatniego bodźca zewnętrznego w cytoplazmie makrofaga zostają uwolnione jony wapniowe. W ich obecności żelsolina wiąże się do boków filamentów aktynowych i rozcina je na krótsze odcinki. W podrażnionej okolicy komórki następuje więc rozluźnienie sieci aktynowej, a wreszcie jej oderwanie od błony i wysunięcie nibynóżki.

Żelsolina jest obecna w znacznych ilościach w rozmaitych komórkach tkankowych. Białka do niej podobne, również rozcinające filamenty aktynowe w obecności nadmiaru jonów wapnia, są znane u śluzowców bezkomórkowych i komórkowych: fragmina u *Physarum* (Hasegawa i in. 1980; Hinssen 1981) i seweryna u *Dictyostelium* (Brown i in. 1982). Na razie nie wiadomo, czy występują one także w cytoplazmie ameb swobodnie żyjących. Ale fragmina ze śluzowca wstrzyknięta pod powierzchnię ameby powoduje lokalne odsunięcie warstwy kurczliwej od błony i powstanie nowego czoła lokomocji (Gawlińska i in. 1980a). Wolno więc przypuszczać, że być może u ameb też jest obecne jakieś białko lub białka z grupy żelsoliny, które rozrywając strukturę sieci aktynowej pod przednią krawędzią komórki umożliwiają wsteczny ruch całego cytoszkieletu wraz ze związanymi z nim strukturami powierzchniowymi.

PODSUMOWANIE

Współczesne informacje o zachowaniu się aparatu kurczliwego ameb swobodnie żyjących i ameboidalnych komórek tkankowych pozwalają sądzić, że ich peryferyjny cytoszkielet znajduje się w stanie skurczu powodującego jego ciągle i równomierne przesuwanie się pod błoną od krawędzi przedniej ku tyłowi komórki, albo ku miejscom jej przyczepu do podłoża. Za motor tego ruchu

najpowszechniej uważa się interakcję aktyny z miozyną II lub I. Pod samą krawędzią przednią kolejne warstwy aktynowe cyklicznie odrywają się od błony, a następne są rekonstruowane na drodze polimeryzacji aktyny. Oba te zjawiska są regulowane przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, zapewne za sprawą białek organizujących i dezorganizujących sieć aktynową.

Filamenty aktynowe tworzące podbłonowy cytoszkielet są, za pośrednictwem innych białek, połączone z wieloma białkami integralnymi błony. Kompleksy białek błonowych są więc holowane przez cytoszkielet i powtarzają wiernie jego przesuw, wsteczny lub dośrodkowy. Wskutek tego związane z nimi kompleksy receptorów powierzchniowych z ligandami cząsteczkowymi albo z cząstkami obcymi adherującymi do powierzchni również powtarzają ruchy cytoszkieletu zachodzące po przeciwległej stronie błony komórkowej. Są więc także transportowane wstecznie lub dośrodkowo (zjawisko cappingu). Cytoszkielet może w ten sposób transportować powiązaną z nim część białek błonowych, lecz nie całą błonę. Jej frakcja lipidowa zapewne płynie do przodu wzdłuż powierzchni komórki ruchem wymuszonym przez translokację strefy czołowej (a częściowo jest unoszona do przodu przez cytoplazmę).

MEMBRANE AND CYTOSKELETAL MOVEMENTS IN AMOEBOID CELLS

Summary

Behaviour of the cortical layers of free-living amoebae and amoeboid tissue cells indicates a steady contraction state within the cytoskeletal network around the cell periphery. That results in a continuous and uniform cytoskeleton sliding beneath the plasma membrane from the frontal edge to the rear body end, or centripetally toward the cell-to-substratum attachment sites. Generation of the force needed for this retrograde transport of cytoskeleton is most commonly attributed to the interaction of myosin II or I with actin network. Under the leading edge successive actin layers are rhythmically detached from the plasma membrane and retracted. The submembrane network is simultaneously reconstructed by actin polymerization. Both phenomena depend on the filament severing and cross-linking proteins operating under control of the cytoplasmic Ca concentration.

Actin filaments building the submembrane network in amoebae are, like in other cells, indirectly connected to some of the integral membrane proteins. Patches of membrane proteins are therefore hauled by the cytoskeleton and replicate its retrograde or centripetal movement. As a further consequence, the surface receptors carried by them and cross-linked by soluble ligands or adhering particles, also repeat movements of the cytoskeleton on the opposite side of cell membrane. Eventually, the contractile network withdraws them toward the cell's centre or rear pole (the phenomenon of capping). In that way the cytoskeleton may transport those membrane proteins which are connected to the actin network, but not the whole surface material. The membrane lipids move in amoebae independently forwards, along the cell surface (though a part of them are re-cycled through the cytoplasm). Lipids on the surface are probably forced to a forward flow by tensions created by the advancement of cell's leading edge.

LITERATURA

- Abercrombie M. — *The crawling movement of metazoan cells*. Proc. R. Soc. London 207: 129–147, 1980.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. I. Movements of the leading edge. Exp. Cell Res. 59: 393–398, 1970a.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. II. „Ruffling”. Exp. Cell Res. 60: 437–444, 1970b.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. Exp. Cell Res. 62: 389–398, 1970c.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. IV. Electron microscopy of the leading lamella. Exp. Cell Res. 67: 359–367, 1971.
- Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M. — *The locomotion of fibroblasts in culture*. V. Surface marking with concanavalin A. Exp. Cell Res. 73: 536–539, 1972.
- Adams R.J., Pollard T.D. — *Membrane-bound myosin-I provides new mechanisms in cell motility*. Cell Motil. Cytosk. 14: 178–182, 1989.
- Albertini D.F., Anderson E. — *Microtubule and microfilament rearrangements during capping of concanavalin A receptors on cultured ovarian granulosa cells*. J. Cell Biol. 73: 111–127, 1977.
- Allen R.D. — *A new theory of amoeboid movement and endoplasmic streaming*. Exp. Cell Res. (Suppl.) 8: 17–31, 1961.
- Ash J.F., Louvard D., Singer S.J. — *Antibody induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5584–5588, 1977.
- Behnke O., Bray D. — *Surface movements during the spreading of blood platelets*. Eur. J. Cell Biol. 46: 207–216, 1988.
- Bennet H., Condeelis J. — *Decoration with myosin subfragment-1 disrupts contacts between microfilaments and the membrane in isolated Dictyostelium cortices*. J. Cell Biol. 99: 1434–1440, 1984.
- Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. — *Cytoskeleton*. Plenum Press. New York, London, 1988.
- Bourguignon L.Y.W., Bourguignon G.J. — *Capping and the cytoskeleton*. Int. Rev. Cytol. 87: 195–224, 1984.
- Bourguignon L.Y.W., Singer S.J. — *Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by their specific ligands*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5031–5035, 1977.
- Braun J., Fujiwara k., Pollard T.D., Unanue E.R. — *Two distinct mechanisms for redistribution of lymphocyte surface macromolecules. I. Relationship to cytoplasmic myosin*. J. Cell Biol. 79: 409–418, 1978.
- Bray D. — *Surface movements during the growth of single explanted neurons*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 65: 905–910, 1970.
- Bray D. — *Model for membrane movements in the neuronal growth cone*. Nature 244: 93–96, 1973.
- Bray D., Chapman K. — *Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone*. J. Neurosci. 5: 3204–3213, 1985.
- Bray D., White J. G. — *Cortical flow in animal cells*. Science 239: 881–888, 1988.
- Bretscher M. S. — *Directed lipid flow in cell membranes*. Nature 260: 21–23, 1976.
- Bretscher M. S. — *Surface uptake by fibroblasts and its consequences*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46: 707–712, 1982.
- Bretscher M. S. — *Endocytosis: relation to capping and cell locomotion*. Science 224: 681–686, 1984.
- Brix K., Reinecke A., Stockem W. — *Dynamics of the cytoskeleton in Amoeba proteus. III. Influence of microinjected antibodies on the organization and function of the microfilament system*. Eur. J. Cell Biol. 51: 279–284, 1990.

- Brown S. S., Yamamoto K., Spudich J. A. — *A 40,000 dalton protein from Dictyostelium discoideum affects assembly properties of actin in a Ca-dependent manner*. J. Cell Biol. 93: 205–210, 1982.
- Carlsson L., Nystrom L. E., Sundquist I., Markey F., Lindberg U. — *Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in nonmuscle cells*. J. Mol. Biol. 115: 465–483, 1977.
- Czarska L., Grębecki A. — *Membrane folding and plasma-membrane ratio in the movement and shape transformation in Amoeba proteus*. Acta Protozool. 4: 201–239, 1966.
- De Brabander M., Nuydens R., Ishihara A., Holifield B., Jacobson K., Geerts H. — *Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with nanovid microscopy*. J. Cell Biol. 112: 111–124, 1991.
- De Lozanne A., Spudich J. A. — *Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination*. Science 236: 1086–1091, 1987.
- Dembo M. — *Mechanics and control of the cytoskeleton in Amoeba proteus*. Biophys. J. 55: 1053–1080, 1989.
- De Petris S., Raff M. C. — *Fluidity of the plasma membrane and its implications for cell movement*. Locomotion of tissue cells. Porter R., Fitzsimmons D. W. red., Ciba Found. Symp. 14: 27–40, 1973.
- Devore J. J., Conrad G. W., Rappaport R. — *A model for astral stimulation of cytokinesis in animal cells*. J. Cell Biol. 109: 2225–2232, 1989.
- Dołowy K. — *Membrane-potential-controlled lipid vesicle recycling and amoeboid locomotion*. J. Bioelectr. 6: 109–128, 1987.
- Erickson C. A., Trinkaus J. P. — *Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading*. Exp. Cell Res. 99: 375–384, 1976.
- Fisher G., Conrad P. A., DeBiasio R. L., Taylor D. L. — *Centripetal transport of cytoplasm, actin and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts*. Cell Motil. Cytosk. 11: 235–247, 1988.
- Flanagan J. Koch G. L. E. — *Cros-linked surface Ig attaches to actin*. Nature 273: 278–281, 1978.
- Forscher P., Smith S. J. — *Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone*. J. Cell. Biol. 107: 1505–1516, 1988.
- Fukui Y., Inoué S. — *Cell division in Dictyostelium with special emphasis on actomyosin organization in cytokinesis*. Cell Motil. Cytosk. 18: 41–54, 1991.
- Fukui Y., Lynch T. J., Brzeska H., Korn E. D. — *Myosin I is located at the leading edges of locomoting Dictyostelium amoebae*. Nature 341: 328–331, 1989.
- Fukui Y., Yumura S. — *Actomyosin dynamics in chemotactic amoeboid movement of Dictyostelium*. Cell Motil. Cytosk. 6: 662–673, 1986.
- Gabbiani G., Chaponnier C., Zumbe A., Vassalli P. — *Actin and tubulin co-cap with surface immunoglobulin in mouse B lymphocytes*. Nature 269: 697–698, 1977.
- Gabrion J. B., Barrière H., Nguyen Than Dao B., Chambard M., Mauchamp J., Regnouf F., Pradel L. A. — *Absence of fodrin (spectrin-like protein) under the pseudopod membrane in stimulated thyroid cells*. Eur. J. Cell Biol. 52: 282–290, 1990.
- Gawlitta W., Hinssen H., Stockem W. — *The influence of an actin-modulating protein (AM-protein) from Physarum polycephalum on the cell motility of Amoeba proteus*. Eur. J. Cell Biol. 23: 43–52, 1980a.
- Gawlitta W., Stockem W., Wehland J., Weber K. — *Organization and spatial arrangement of fluorescein-labeled native actin microinjected into normal locomoting and experimentally influenced Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 206: 181–191, 1980b.
- Geiger B., Avnur Z., Schlessinger J. — *Restricted mobility of membrane constituents in cell substrate focal contacts of chicken fibroblasts*. J. Cell Biol. 93: 495–500, 1982.
- Goldacre R. J. — *The action of general anaesthetics on amoebae and the mechanisms of the response to touch*. Symp. Soc. Exp. Biol. 6: 126–144, 1952.

- Goldacre R. J. — *The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback*. Exp. Cell Res. (Suppl.) 8: 1–16, 1961.
- Goodloe-Holland C. M., Luna E. J. — *A membrane cytoskeleton from Dictyostelium discoideum. III. Plasma membrane fragments bind predominantly to the sides of actin filaments*. J. Cell Biol. 99: 71–78, 1984.
- Grębecka L. — *Polarity of the motor functions in Amoeba proteus. I. Locomotory behaviour*. Acta Protozool. 27: 83–96, 1988.
- Grębecka L., Hrebenda B. — *Topography of cortical layer in Amoeba proteus as related to the dynamic morphology of moving cell*. Acta Protozool. 18: 493–502, 1979.
- Grębecki A. — *Behaviour of Amoeba proteus exposed to light-shade difference*. Protistologica 16: 103–116, 1980.
- Grębecki A. — *Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications*. Eur. J. Cell Biol. 24: 163–175, 1981.
- Grębecki A. — *Supramolecular aspects of amoeboid movement*. Progress in Protozoology. Proc. VI Int. Congr. Protozool. Acta Protozool. (special issue) 1: 117–130, 1982.
- Grębecki A. — *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites. I. Behaviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon*. Protoplasma 123: 116–134, 1984.
- Grębecki A. — *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites. II. Ectoplasmic and surface movements in polytactic and heterotactic amoebae*. Protoplasma 127: 31–45, 1985.
- Grębecki A. — *Two-directional pattern of movements on the cell surface of Amoeba proteus*. J. Cell Sci. 83: 23–35, 1986.
- Grębecki A. — *Velocity distribution of the anterograde and retrograde transport of extracellular particles by Amoeba proteus*. Protoplasma 141: 126–134, 1987a.
- Grębecki A. — *Locomotion of Saccamoeba limax*. Arch. Protistenkd. 134: 347–365, 1987b.
- Grębecki A. — *Mechanizmy ruchów amebowych*. Komórka — Jej budowa i ruch. 133–186. Ossolineum, 1987c.
- Grębecki A. — *Bidirectional transport of extracellular material by the cell surface of locomoting Saccamoeba limax*. Arch. Protistenkd. 136: 139–151, 1988.
- Grębecki A. — *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement*. Protoplasma 154: 98–111, 1990.
- Grębecki A. — *Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae*. Protoplasma 160: 144–158, 1991.
- Grębecki A., Kwiatkowska E. M. — *Dynamics of the membrane-cortex contacts demonstrated in vivo in Amoeba proteus pretreated by heat*. Eur. J. Protistol. 23: 262–272, 1988.
- Haberey M., Wohlfarth-Bottermann K. E., Stockem W. — *Pinocytose und Bewegung von Amöben. VI. Kinematographische Untersuchungen über das Bewegungsverhalten der Zelloberfläche von Amoeba proteus*. Cytophysiologie 1: 70–84, 1969.
- Harris A. K. — *Cell surface movements related to cell locomotion*. Locomotion of Tissue Cells. Porter R., Fitzsimmons D. W. red., Ciba Found. Symp. 14: 3–26, 1973.
- Harris A. K. — *Recycling of dissolved plasma membrane components as an explanation of the capping phenomenon*. Nature 263: 781–783, 1976.
- Hartwig J. H., Yin H. L. — *The organization and regulation of the macrophage actin skeleton*. Cell Motil. Cytosk. 10: 117–126, 1988.
- Hasegawa T., Takahashi S., Hayashi H., Hatano S. — *Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor of the formation of actin filaments*. Biochemistry 19: 2677–2683, 1980.
- Heath J. P. — *Arcs: curved microfilament bundles beneath the dorsal surface of the leading lamellae of moving chick embryo fibroblasts*. Cell. Biol. Int. Rep. 5: 975–980, 1981.
- Heath J. P. — *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface*. J. Cell. Sci. 60: 331–354, 1983a.

- Heath J. P. — *Direct evidence for microfilament-mediated capping of surface receptors on crawling fibroblasts.* Nature 302: 532–534, 1983b.
- Heath J. P., Holifield B. F. — *Cell locomotion: New research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow.* Cell Motil. Cytosk. 18: 245–257, 1991.
- Hinssen H. — *An actin-modulating protein from Physarum polycephalum. I. Isolation and purification.* Eur. J. Cell Biol. 23: 225–233, 1981a.
- Hinssen H. — *An actin-modulating protein from Physarum polycephalum. II. Ca-dependence and other properties.* Eur. J. Cell Biol. 23: 234–240, 1981b.
- Hiramoto Y. — *Mechanical properties of sea urchin eggs. II. Changes in mechanical properties from fertilization to cleavage.* Exp. Cell. Res. 32: 76–88, 1963.
- Holifield B. F., Ishihara A., Jacobson K. — *Comparative behavior of membrane protein-antibody complex on motile fibroblasts: Implications for a mechanism of capping.* J. Cell Biol. 111: 2499–2512, 1990.
- Izzard C. S. — *A precursor of the focal contact in cultured fibroblasts.* Cell Motil. Cytosk. 10: 137–142, 1988.
- Jennings H. S. — *Contributions to the study of the behavior of lower organisms. VI. The movements and reactions of Amoeba.* Carnegie Inst. Washington Publ. 16: 129–234, 1904.
- Kalisz B., Korohoda W. — *Experimental study on locomotion of Amoeba proteus. I. Movements in the nucleated and anucleated fragments of the amoebae after removal of the part of their cytoplasm.* Acta Protozool. 15: 345–361, 1976.
- Kłopotcka W., Stockem W., Grębecki A. — *Fine structure and distribution of contractile layers in Amoeba proteus preincubated at high temperature.* Protoplasma 147: 117–124, 1988.
- Koppel D. E., Oliver J. M., Berlin R. D. — *Surface functions during mitosis. III. Quantitative analysis of ligand-receptor movement into the cleavage furrow: diffusion versus flow.* J. Cell Biol. 93: 950–960, 1982.
- Korohoda W. — *Positive chemotactic reactions of Amoeba proteus to general anaesthetics.* Acta Protozool. 11: 333–336, 1972.
- Korohoda W. — *Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of Amoeba proteus and its bearing on the theories of amoeboid movement.* Cytophysiol. 14: 338–349, 1977.
- Kucik D. F., Elson E. L., Sheetz M. P. — *Forward transport of glycoproteins on leading lamellipodia in locomoting cells.* Nature 340: 315–317, 1989.
- Kucik D. F., Elson E. L., Sheetz M. P. — *Cell migration does not produce membrane flow.* J. Cell Biol. 111: 1617–1622, 1990.
- Kwiatkowska K., Sobota A. — *Alpha-spectrin immunoanalogue in Acanthamoeba cells.* Histochemistry 94: 87–93, 1990.
- Lackie J. M. — *Cell Movement and Cell Behaviour.* Allen and Unwin. Winchester, 1986.
- Lee J., Gustafsson M., Magnusson K. E., Jacobson K. — *The direction of membrane lipid flow in locomoting polymorphonuclear leukocytes.* Science 247: 1229–1233, 1990.
- Loor F. — *Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions.* Adv. Immunol. 30: 1–120, 1981.
- Luby-Phelps K., Taylor D. L. — *Subcellular compartmentalization by local differentiation of cytoplasmic organization.* Cell Motil. Cytosk. 10: 28–37, 1988.
- Malchow D., Böhme R., Gras U. — *On the role of calcium in chemotaxis and oscillations of Dictyostelium cells.* Biophys. Struct. Mech. 9: 131–136, 1982.
- Mangeat P. H. — *Interaction of biological membranes with the cytoskeletal framework of living cells.* Biol. Cell 64: 261–281, 1988.
- Marcus P. I. — *Dynamics of surface modification in myxovirus infected cells.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27: 351–365, 1962.
- Mast S. O. — *Structure, movement, locomotion and stimulation in Amoeba.* J. Morph. 42: 347–425, 1926.

- McRobbie S.J., Newell P.C. — *Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of Dictyostelium discoideum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 351–359, 1983.
- Mitchison T., Kirschner M. — *Cytoskeletal dynamics and nerve growth*. Neuron 1: 761–772, 1988.
- Mittal A.K., Bereiter-Hahn J. — *Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells. I. Role of calcium influx*. Cell Motil. 5: 123–136, 1985.
- Onuma E.K., Hui S.W. — *Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent*. J. Cell Biol. 106: 2067–2075, 1988.
- Ozaki K., Hatano S. — *Mechanism of regulation of actin polymerization by Physarum profilin*. J. Cell Biol. 98: 1919–1925, 1984.
- Pasternak C., Spudich J.A., Elson E.L. — *Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin*. Nature 341: 549–551, 1989.
- Pollard T.D. — *Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from Acanthamoeba that share antigenic determinants with vertebrate spectrins*. J. Cell Biol. 99: 1970–1980, 1984.
- Pollard T.D., Korn E.D. — *Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin*. J. Biol. Chem. 248: 4682–4690, 1973.
- Pollard T.D., Mooseker M.S. — *Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores*. J. Cell Biol. 88: 654–659, 1981.
- Ray D.L. — *Agglutination of bacteria: a feeding mechanism in the soil amoeba Hartmanella sp.* J. Exp. Zool. 118: 443–464, 1951.
- Reichstein E., Korn E.D. — *Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation*. J. Biol. Chem. 254: 6174–6179, 1979.
- Sawyer D.W., Sullivan J.A., Mandell G.L. — *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. Science 230: 663–666, 1985.
- Schliwa M. — *The Cytoskeleton. An Introductory Survey*. Springer-Verlag. Wien, New York, 1986.
- Schroeder T.E. — *Fourth cleavage of sea urchin blastomeres: Microtubule patterns and myosin localization in equal and unequal cell divisions*. Dev. Biol. 124: 9–22, 1987.
- Schroeder T.E., Otto J.J. — *Immunofluorescent analysis of actin and myosin in isolated contractile ring of sea urchin eggs*. Zool. Sci. 5: 713–725, 1988.
- Sheetz M.S., Turney S., Qian H., Elson E.L. — *Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not draw membrane glycoprotein movements*. Nature 340: 284–288, 1989.
- Shetterline P., Gallagher K., Rickard J.E., Richards R.C. — *Control of actin assembly in the cortical contractile network of neutrophil leukocytes during phagocytosis*. J. Submicrosc. Cytol. 16: 57–58, 1984.
- Singer S.J., Nicholson G.L. — *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science 175: 720–731, 1972.
- Small J.V. — *Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks*. J. Cell Biol. 90: 222–235, 1981.
- Smith S.J. — *Neuronal cytomechanics: the actin-based motility of growth cones*. Science 242: 708–715, 1988.
- Sonobe S., Takahashi S., Hatano S., Kuroda K. — *Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization*. J. Biol. Chem. 261: 14837–14843, 1986.
- Soranno T., Bell E. — *Cytoskeletal dynamics of spreading and translocating cells*. J. Cell Biol. 95: 127–136, 1982.
- Stockem W. — *Membrane turnover during locomotion of Amoeba proteus*. Acta Protozool. 11: 83–93, 1972.

- Stockem W., Hoffmann H.U., Gawlitta W. — *Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 221: 505–519, 1982.
- Stockem W., Hoffmann H.U., Gruber B. — *Dynamics of the cytoskeleton in Amoeba proteus. I. Redistribution of microinjected fluorescein-labeled actin during locomotion, immobilization and phagocytosis*. Cell Tiss. Res. 232: 79–96, 1983.
- Stockem W., Kłopotcka W. — *Ameboid movement and related phenomena*. Int. Rev. Cytol. 112: 137–183, 1988.
- Stockem W., Wohlfarth-Bottermann K.E., Haberey M. — *Pinocytose und Bewegung von Amöben. V. Konturveränderungen und Faltungsgrad der Zelloberfläche von Amoeba proteus*. Cytophysiologie 1: 37–57, 1969.
- Strohmeier R., Bereiter-Hahn J. — *Control of cell shape and locomotion by external calcium*. Exp. Cell Res. 154: 412–420, 1984.
- Taylor D.L. — *The contractile basis of amoeboid movement. IV. The viscoelasticity and contractility of Amoeba cytoplasm in vivo*. Exp. Cell Res. 105: 413–426, 1977.
- Taylor D.L., Blinks J.R., Reynolds G. — *The contractile basis of amoeboid movement. VIII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis, and capping*. J. Cell Biol. 86: 599–607, 1980.
- Taylor D.L., Condeelis J.S., Moore P.L., Allen R.D. — *The contractile basis of amoeboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm*. J. Cell Biol. 59: 378–394, 1973.
- Taylor R.B., Duffus W.P.H., Raff M.C., De Petris S. — *Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody*. Nature 233: 225–229, 1971.
- Theriot J.A., Mitchison T.J. — *Actin microfilament dynamics in locomoting cells*. Nature 352: 126–131, 1991.
- Tilney L.G. — *Interactions between actin filaments and membranes give spatial organization to cells*. Modern Cell Biol. 2: 163–199, 1983.
- Toh B.H., Hard G.C. — *Actin co-caps with concanavalin A receptors*. Nature 269: 225–229, 1977.
- Truett A.P., Verghese M.V., Dillon R.B., Snyderman R. — *Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1549–1553, 1988.
- Turner C.E., Shotton D.M. — *Isolation and initial biochemical characterization of caps of two major rat thymocyte glycoproteins: evidence for the involvement of a 205 K Con A binding protein and cytoskeletal components in capping*. Cell Motil. Cytosk. 8: 37–43, 1987.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M., Domnina L.V., Dorfman N.A., Pletyushkina O.Y. — *Active cell edge and movements of concanavalin A receptors of the surface of epithelial and fibroblastic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 4085–4089, 1976.
- Wang Y.L. — *Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role or treadmilling*. J. Cell Biol. 101: 597–602, 1985.
- Wehland J., Weber K., Gawlitta W., Stockem W. — *Effects of the actin-binding protein DNAase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 199: 353–372, 1979.
- White J.G., Borisy G.G. — *On the mechanisms of cytokinesis in animal cells*. J. Theor. Biol. 101: 289–316, 1983.
- Wick U., Malchow D., Gerisch G. — *Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of Dictyostelium discoideum*. Cell Biol. Int. Rep. 2: 71–79, 1978.
- Wolpert L. — *The mechanisms and mechanics of cleavage*. Int. Rev. Cytol. 10: 163–216, 1960.
- Wolpert L., Gingell D. — *Cell surface membrane and amoeboid movement*. Symp. Soc. Exp. Biol. 22: 169–198, 1968.

- Wolpert L., O'Neill C.H. — *Dynamics of the membrane of Amoeba proteus studied with labeled specific antibody*. Nature 196: 1261–1266, 1962.
- Wuestehube L.J., Luna E.J. — *F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulin, a 17-kD integral glycoprotein from Dictyostelium discoideum plasma membranes*. J. Cell Biol. 105: 1741–1751, 1987.
- Yin H. L., Hartwig J. H. — *The structure of the macrophage actin skeleton*. J. Cell Sci., Suppl. 9: 169–184, 1988.
- Yumura S., Fukui Y. — *Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in Dictyostelium*. Nature 314: 194–196, 1985.
- Yumura S., Mori H., Fukui Y. — *Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence*. J. Cell Biol. 99: 894–899, 1984.