

KATARZYNA KWIATKOWSKA I ANDRZEJ SOBOTA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

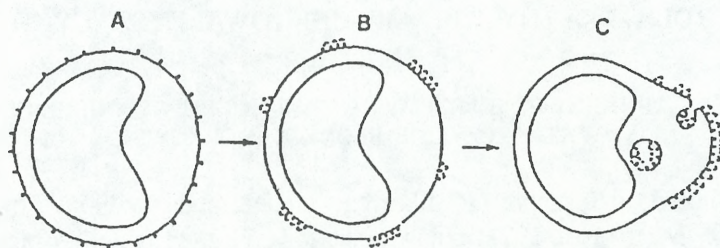
CAPPING RECEPTORÓW POWIERZCHNIOWYCH KOMÓRKI ROLA AKTYNY I BIAŁEK JEJ TOWARZYSZĄCYCH

„CAPPING” — INDUKOWANE PRZEMIESZCZANIE I GRUPOWANIE RECEPTORÓW
W PŁASZCZYZNIE BŁONY KOMÓRKOWEJ

Wkrótce po ogłoszeniu mozaikowego modelu budowy błony komórkowej (Singer i Nicolson 1972) pojawiła się idea, że ruch białek w płaszczyźnie błony jest kontrolowany przez związane z nimi białka cytoszkieletu. W 1976 roku Edelman zaproponował, że interakcja receptorów błonowych z cytoszkieletem odgrywa kluczową rolę w takich zjawiskach jak adhezja, ruch i podział komórek. W tym czasie uznawano powszechnie, że przejawem takiej interakcji jest tak zwany „capping” receptorów. Z uwagi na brak odpowiedniego terminu polskiego, „capping” określamy najczęściej opisowo jako proces indukowanego przemieszczania i grupowania receptorów w płaszczyźnie błony komórkowej. Zjawisko to stało się powszechnie znane, gdy Taylor i współautorzy (1971) opisali je u limfocytów. Wkrótce obserwacje ultrastrukturalne de Petrisa i Raffa (1972, 1973) potwierdziły ich dane. W pracach tych wykazano, że immunoglobuliny (Ig) limfocytów mysich, rozmieszczone pierwotnie równomiernie na powierzchni komórki, po przyłączeniu swoistych przeciwciał anti-Ig ulegały przemieszczeniom w płaszczyźnie błony. Kompleksy Ig/anti-Ig formowały początkowo niewielkie skupienia — patches (ang.) czyli „łatki”, a następnie były zbierane na jednym biegunie komórki tworząc „czapeczkę”, po angielsku — cap. Zebrane kompleksy Ig/anti-Ig były pobierane do wnętrza komórki — rysunek 1.

Okazało się, że podobnym przemieszczeniom ulegają także inne białka błonowe limfocytów poddane działaniu swoistych przeciwciał (Taylor i współaut. 1971, Kourilsky i współaut. 1972, Loor i współaut. 1972, Unanue i współaut. 1972). Powszechność zjawiska potwierdziły obserwacje limfocytów, w których wywoływano redystrybucję błonowych receptorów lektyn — konkanawaliny A (Con A), fitohemaglutyniny i lektyny z kielków pszenicy (Sällström i Alm 1972, Unanue i współaut. 1972, Loor 1974). Później, proces przemieszczania i grupowania receptorów powierzchniowych, analogiczny do poznanego

w limfocytach, opisano także dla fibroblastów i komórek nabłonkowych (Vasiliev i współaut. 1976, Albertini i Anderson 1977) a nawet dla tak odległych filogenetycznie komórek, jakimi są ameby (Taylor i współaut. 1980a, b, Bailey i Bowers 1981). W komórkach nabłonkowych i fibroblastach usieciowane receptory są usuwane z powierzchni lamelli i zatrzymywane w okolicy okołojądrowej, położonej w tylnej części komórek migrujących lub w środkowej części komórek przywierających do podłoża (tworzących lamellę kurkularną). Lamella — to wyspecjalizowana, wiodąca część tych komórek, związana z ich aktywnością lokomotoryczną.



Rys. 1. Schemat przebiegu procesu indukowanego przemieszczania i grupowania receptorów powierzchniowych — „capping”. Receptory rozmieszczone równomiernie na powierzchni komórki (A), po usieciowaniu przez wielowartościowe ligandy tworzą niewielkie skupienia — „patches” (B), a następnie gromadzone są na jednym biegunie komórki — „cap” i internalizowane (C). Rysunek według de Petrisa i Raffa 1972, zmodyfikowany.

Wyjaśnić w tym miejscu należy, iż często, opisując zjawisko „cappingu” terminu receptor używa się w bardzo szerokim znaczeniu. Receptorami w tym ujęciu są dowolne składniki błony, to jest białka lub lipidy wiążące określony ligand — przeciwciała, lektyny, polikationy. W takim też znaczeniu terminu „receptor” używać będziemy w tym artykule.

Charakteryzując bliżej proces przemieszczania i grupowania receptorów w płaszczyźnie błony komórkowej, czyli „capping”, podkreślić należy, że:

1. Jest on indukowany jedynie przez przyłączenie ligandów wielowartościowych, to jest polikationów, przeciwciał (2 miejsca wiązania antygeny) lub lektyn, na przykład Con A (4 miejsca wiązania reszt cukrowych, Taylor i współaut. 1971, Gunther i współaut. 1973, Loor 1974, King i Preston 1977, Butman i współaut. 1980). Na tej podstawie przypuszcza się, że wielowartościowe ligandy wiążą krzyżowo receptory (sieciują je), co w efekcie prowadzi do formowania agregatów receptorów w błonie, to znaczy „łatek” (rys. 1B). Proces ten może zachodzić w temperaturze 4°C. Przypomina on precypitację antygeny przez przeciwciało *in vitro* i zapoczątkowuje dalsze przegrupowania receptorów w błonie komórki (Taylor i współaut. 1971, Loor i współaut. 1972).

2. Zbieranie receptorów na jednym biegunie komórki (rys. 1C) zachodzi jedynie w temperaturze powyżej 10°C. Tylko ta faza zjawiska wymaga aktywności

metabolicznej komórki i jest hamowana przez NaN_3 i dwunitrofenol (Taylor i współaut. 1971, Loor i współaut. 1972, Bourguignon i Singer 1977).

3. Przemieszczenia takie są hamowane, przynajmniej częściowo (do 70%), przez cytochalazynę B, czynnik dezintegrujący filamenty aktynowe (Taylor i współaut. 1971, Loor 1974, Poste i współaut. 1975, de Petris 1975). „Capping” receptorów wydaje się więc angażować system kurczliwy w podbłonowej warstwie cytoplazmy (Taylor i współaut. 1971, de Petris i Raff 1972, 1973).

Dane wskazujące na udział aktyny i miozyny w opisywanym zjawisku są coraz liczniejsze. Początkowo opierały się one na obserwacjach cytochemicznych:

a) stwierdzanym już wcześniej hamującym działaniu cytochalazyny B;

b) akumulowaniu filamentów aktynowych pod błoną komórki w miejscu gromadzenia kompleksów receptory/ligandy (Bourguignon i Singer 1977, Albertini i Anderson 1977, Ash i współaut. 1977, Gabbiani i współaut. 1977, Toh i Hard 1977, Bourguignon i Rozek 1980, Taylor i współaut. 1980a). Z takimi skupieniami receptorów i F-aktyny współwystępowały także skupienia miozyny (Ash i Singer 1976, Bourguignon i Singer 1977, Schreiner i współaut. 1977, Bourguignon G. J. 1980).

W efekcie tych licznych obserwacji wykształcił się pogląd, że aktyna i miozyna towarzyszą każdemu, usieciowanemu receptorowi błony w trakcie jego przemieszczania i grupowania w płaszczyźnie błony (Bourguignon i Singer 1977, Bourguignon i współaut. 1978b).

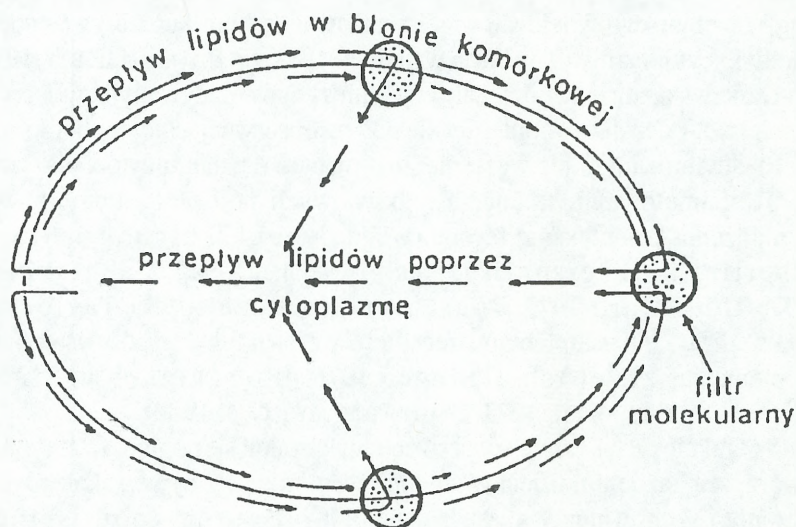
Przyznaje układowi akto-miozynowemu rolę motoru w indukowanych przemieszczeniach receptorów, wskazywano także na modulujący wpływ mikrotubul na to zjawisko (Yahara i Edelman 1973, Poste i współaut. 1975, de Petris 1975, Bourguignon i Bourguignon 1984).

Molekularny mechanizm leżący u podstaw ruchu usieciowanych receptorów w błonie pozostaje jednak nadal przedmiotem dyskusji.

CZY MOŻNA WYKLUCZYĆ UDZIAŁ CYTOSZKIELETU W INDUKOWANYCH PRZEMIESZCZENIACH RECEPTORÓW?

W roku 1976 Bretscher sformułował kontrowersyjną koncepcję „cappingu”, której istotę stanowiło odrzucenie, postulowanej dotąd powszechnie, motorycznej roli cytoszkieletu w ruchu receptorów powierzchniowych. Bretscher zakładał, że przemieszczenia usieciowanych receptorów są efektem kierunkowego (wstecznego) przepływu lipidów błony komórkowej. Ruch lipidów w błonie napędzany byłby ich cykliczną endocytozą i resorbcją z cytoplazmy. Według Bretschera, lipidy są internalizowane nieustająco z całej powierzchni błony komórkowej w postaci pęcherzyków okrytych klatryną. Następnie, przeniesione wraz ze strumieniem cytoplazmy, lipidy są wbudowywane z powrotem w błonę, tyle że w jednym, określonym rejonie komórki. Właśnie ta różnica w lokalizacji miejsc endocytozy i resorpcji lipidów byłaby wystarczającym czynnikiem wymu-

szającym ich kierunkowy przepływ w całej błonie komórki — przepływ od miejsc wbudowywania w błonę do miejsc internalizacji (rys. 2). Pęcherzyki okryte klatryną funkcjonowałyby dodatkowo jako „filtry molekularne” uniemożliwiając jednoczesną internalizację białek błony (Bretscher i współaut. 1980). Wyjątek



Rys. 2. Schemat obiegu lipidów w komórce wg Bretschera (1976). Lipidy są pobierane do wnętrza komórki z całej jej powierzchni a po przeniesieniu przez cytoplazmę, wbudowywane z powrotem w błonę w jednym rejonie komórki.

stanowiłyby tu określone receptory fizjologicznych ligandów. Pozostałe białka dyfundowałyby swobodnie w warstwie lipidowej błony opierając się prądowi przepływających lipidów. Wyliczony teoretycznie dla fibroblastów współczynnik dyfuzji lateralnej takich białek musiałby wynosić około 10^{-8} cm²/sek. (Bretscher 1984). Jednakże agregacja białek, wywołana przyłączeniem wielowartościowych ligandów, powodowałaby spadek współczynnika dyfuzji powstającego kompleksu (do ok. 10^{-10} cm²/sek.). Takie agregaty byłyby więc unoszone wraz z prądem lipidów. W konsekwencji zbierałyby się one na jednym biegunie komórki tworząc „cap”.

Teoria przepływu lipidów, potem została rozwinięta w ogólniejszą koncepcję ruchu komórek i wsparta dowodami doświadczalnymi Bretschera (Bretscher 1983, 1989a, Bretscher i Thomson 1983). Z dużą prostotą tłumaczy ona przede wszystkim niezwykle uniwersalność zjawiska „cappingu”. Wyjaśnia także przemieszczenia tych usieciowanych cząsteczek w błonie, które nie posiadają domeny cytoplazmatycznej, zdolnej do wiązania białek cytoszkieletu, jak na przykład antygen Thy-1, zmutowany antygen H-2 a nawet glikolipidy (w tym egzogenne) (Revesz i Greaves 1975, Stern i Bretscher 1979, Wolf i współaut. 1980, Murre i współaut. 1984, Spiegel i współaut. 1984).

Teorii przepływu lipidów Bretschera przeczy jednak szereg innych obserwacji:

a) Fluorescencyjny analog lipidów wbudowano w błonę komórkową granulocyту, a następnie punktowo wygaszano jego fluorescencję; wyciemnione pasemko, odzwierciedlając ruch lipidów w błonie, poruszało się wraz z całą komórką do przodu nie zmieniając swego położenia względem jej czoła. Nie wykryto natomiast wstecznego ruchu lipidów (Lee i współaut. 1990).

b) Dwa integralne białka błony fibroblastów, to jest glikoproteina 80 kDa (Pgp-1) i wbudowana w błonę hemaglutynina wirusowa, mają po związaniu swoistych przeciwciał ten sam współczynnik dyfuzji, około 3×10^{-10} cm²/sek. Jednakże, tylko kompleksy Pgp-1/przeciwciała ulegają przemieszczaniu i są zbierane w okolicy okołojądrowej fibroblastu — „capping”. Analogiczny kompleks hemaglutyniny pozostaje w tym czasie rozmieszczony równomiernie w błonie komórki (Holifield i współaut. 1990).

c) Cząstki złota koloidalnego o średnicy 40 nm, pokryte Con A, po związaniu z błoną makrofaga lub keratynocytów, wykazują dwa rodzaje ruchów: ukierunkowany (wsteczny) i przypadkowy (dyfuzyjny). Przemieszczenia te obrazują ruch glikoprotein, głównych receptorów Con A w błonie badanych komórek. Charakter ruchu dyfuzyjnego cząstek złota wykluczał istnienie hipotetycznego przepływu lipidów w błonie. Istotne jest także, że ta sama cząstka zmieniała wielokrotnie rodzaj wykonywanego ruchu. Takie zachowanie glikoprotein w błonie trudno wytłumaczyć, jeżeli przyjmie się, że jest ono kontrolowane jedynie przepływem lipidów (Sheetz i współaut. 1988, Kucik i współaut. 1990). Analogiczne dane otrzymano obserwując ruch cząstek na powierzchni ameb (Grębecki 1986, 1988).

d) Współczynnik dyfuzji lateralnej białek w błonie, wyznaczony eksperymentalnie, wynosi około 10^{-9} – 10^{-10} cm²/sek. Jest on zbyt niski by białka mogły oprzeć się hipotetycznemu przepływowi lipidów (Jacobson i współaut. 1987).

Początkowo, podjęta przez Bretschera próba wyjaśnienia mechanizmu „cappingu” została zaakceptowana przez niektórych badaczy (Schreiner i Unanue 1977, Braun i współaut. 1978a, b). Sam autor nadal broni swojej koncepcji wskazując na możliwości artefaktów i błędy w interpretacji przytoczonych wyników doświadczeń (Bretscher 1988, 1989b, 1991). Bez odpowiedzi pozostawia jednak pytanie: jak, ignorując udział aktyny i miozyny, wytłumaczyć współwystępowanie obu tych białek z usieciowanymi receptorami w trakcie ich przegrupowywania w płaszczyźnie błony?

SYSTEM AKTO-MIOZYNOWY SPRAWCĄ PRZEMIESZCZEŃ USIECIEWANYCH RECEPTORÓW

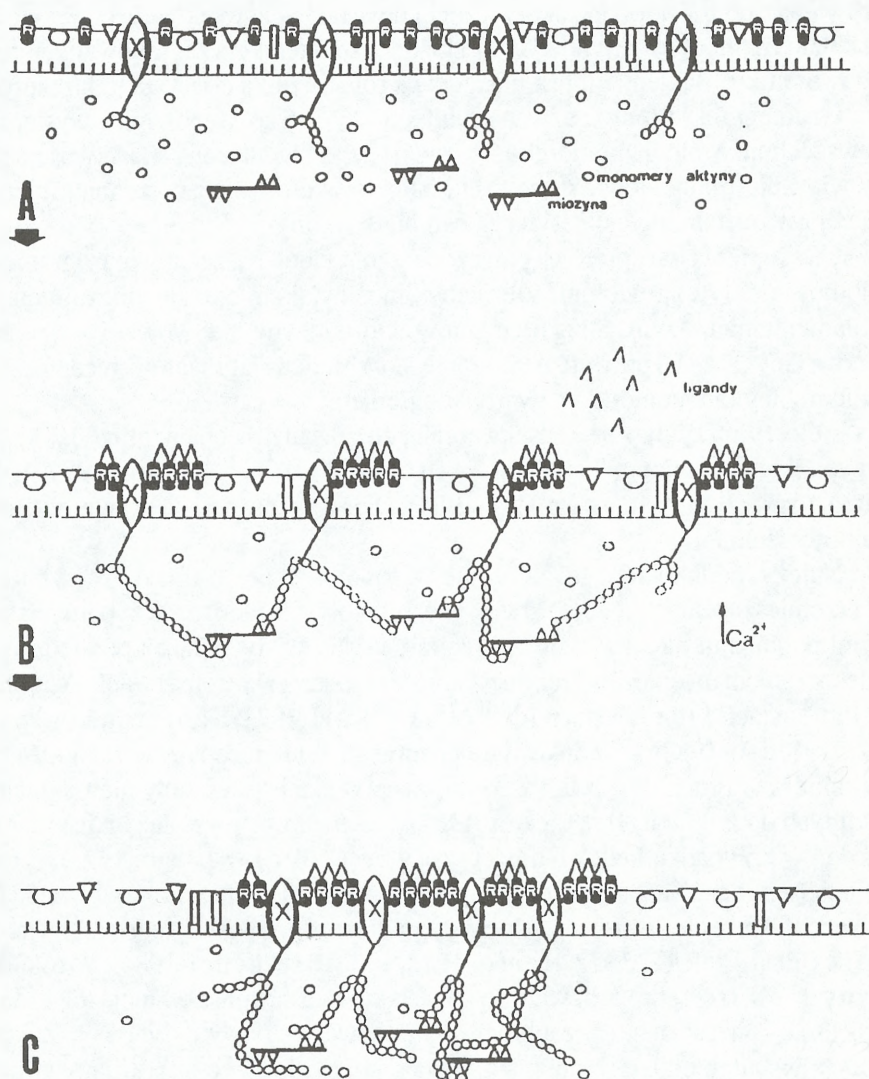
Klasyczna koncepcja przyznawała aktynie i miozynie motoryczną rolę w procesie przemieszczania usieciowanych receptorów w płaszczyźnie błony. Cytowane wcześniej obserwacje morfologiczne i immunocytochemiczne popiera-

ły takie założenie pośrednio (rozdz. *Capping — indukowane przemieszczanie i grupowanie receptorów w płaszczyźnie błony komórkowej*). Wkrótce liczne nowe dane wykazały, że fosforylacja łańcuchów lekkich miozyny, katalizowana przez kinazę zależną od $\text{CaM}/\text{Ca}^{+2}$, prawdopodobnie aktywuje system kurczliwy limfocytu w trakcie „cappingu” (Bourguignon i Bourguignon L. Y. W. 1981, Bourguignon i współaut. 1981, 1982, Bourguignon i Kerrick 1983, Kerrick i Bourguignon 1984). Obecnie dysponujemy jeszcze jednym istotnym dowodem: redystrybucja kompleksów receptory/Con A nie zachodzi w dwóch, otrzymanych drogą inżynierii genetycznej, mutantach śluzowca *Dictyostelium discoideum*; jeden z nich nie posiadał miozyny II w ogóle, w drugim cząsteczki miozyny II pozbawione były części ogonowej. Miozyna II (klasyczna), zdolna do budowania grubych filamentów odgrywa więc kluczową rolę w „cappingu” receptorów (De Lozanne i Spudich 1987, Pasternak i współaut. 1989, Fukui i współaut. 1990). Otwarty dotąd pozostaje problem ewentualnego współdziału miozyny I (miozyny niekonwencjonalnej) w tym procesie. W jaki sposób system kurczliwy komórki włącza się w ruch receptorów powierzchniowych?

Polemizując z teorią autonomicznego przepływu lipidów Harris (1976) zaproponował, że kurczliwe struktury cytoplazmy (aktyna i miozyna) napędzają wsteczny ruch całej błony, wszystkich jej białek i lipidów. Wycofywana błona ulegałaby dezintegracji. W tym czasie wszystkie jej składniki (a nie tylko lipidy!) byłyby pobierane do wnętrza komórki a następnie resorbowane z cytoplazmy na przeciwnym biegunie komórki. Usieciowane receptory powierzchniowe uczestniczyłyby w ogólnym, wstecznym ruchu błony, opierałyby się jednak internalizacji; ostatecznie byłyby one akumulowane w obrębie „czapeczki”. Koncepcja „cappingu” Harris’a została zakwestionowana wraz z całą teorią przepływu błony komórkowej (Middleton 1979). W sposób bezpośredni przeczą jej, przytoczone już wcześniej, obserwacje Holifielda i współautorów (1990). Stwierdzenie, że pewne składniki błony pozostają rozproszone na powierzchni komórki w trakcie przemieszczania i grupowania innych wyklucza bowiem możliwość ruchu wstecznego całej błony.

Uwzględnienie mozaikowego modelu budowy błony komórkowej miało podstawowe znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu ruchu receptorów powierzchniowych. Takim właśnie nowatorskim ujęciem wyróżniała się hipoteza de Petrisa i Raffa, sformułowana już w latach 1972/1973. Jej autorzy zakładali, że kierunkowe przemieszczenia receptorów w płaszczyźnie błony komórkowej są związane z trwającym nadal „przeciwprądem” pozostałych elementów błony. Przyjęto przy tym, że ruch usieciowanych receptorów jest napędzany aktywnie przez zasocjowaną z nimi aktynę i miozynę. W efekcie tego procesu pozostałe elementy błony są przesuwane biernie w kierunku przeciwnym (de Petris i Raff 1973, de Petris 1978). W takim ujęciu teoria „przeciwprądu” jest zbieżna z inną teorią, zaproponowaną przez Bourguignon i Singera w 1977 roku.

Bourguignon i Singer przedstawili klarowną i precyzyjną koncepcję mechanizmu „cappingu”. Proponowany przez nich przebieg omawianego procesu przedstawia rysunek 3.



Rys. 3. Molekularny mechanizm "cappingu" wg Bourguignona i Singera (1977). (A) Elementy błony komórkowej rozmieszczone równomiernie w płaszczyźnie błony; (B) Receptory -R-, usieciowane przez wielowartościowe ligandy, zbierają się w agregaty (patches) i asocjują z białkiem X; wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{+2} ; (C) Zebranie kompleksów ligandy/receptory/białko X na jednym biegunie komórki -cap- w drodze oddziaływań akto-miozynowych.

A-B: przyłączenie wielowartościowych ligandów prowadzi do spontanicznego przegrupowania ich receptorów w błonie komórki; w efekcie powstają drobne agregaty kompleksów receptory/ligandy, czyli „łatki — patches”.

B: wstępna agregacja receptorów jest punktem zwrotnym całego procesu. Prowadzi ono bowiem do zakotwiczenia powstałych agregatów w podbłonowym układzie filamentów aktynowych. Założono, że interakcja zagregowanych receptorów z mikrofilamentami jest pośrednia a rolę łącznika odgrywa tu hipotetyczne białko integralne błony, nazwane białkiem X. Białko X powinno występować powszechnie w błonie komórek *Eukaryota* a jego nieodłączną właściwością byłoby wiązanie filamentów aktynowych, bądź to w drodze bezpośredniej interakcji bądź przy udziale innego peryferyjnego białka błony.

C: skupienia receptorów, połączone z białkiem X, zachowują ograniczoną zdolność do dyfuzji w błonie. Te ruchy umożliwiają interakcję mikrofilamentów z filamentami miozyny. Ślizg filamentów akto-miozyny, aktywowany w obecności jonów Ca^{+2} i ATP, prowadzi następnie do zbierania agregatów receptorów na jednym biegunie komórki w zwarty konglomerat — „cap”.

Autorzy utrzymywali konsekwentnie, że opisany mechanizm rządzi każdym przypadkiem „cappingu” receptorów (Bourguignon i Singer 1977, Bourguignon i Bourguignon G. J. 1984). Dzisiaj koncepcja ta przyjmowana jest najpowszechniej.

Należy podkreślić, że założenie o motorycznej roli aktyny i miozyny w przemieszczeniach receptorów powierzchniowych zgadza się w pełni z aktualnymi poglądami na zjawisko ruchu komórek. Na ścisły związek pomiędzy przemieszczaniem receptorów i migracją komórki wskazywały obserwacje „cappingu” w limfocytach i fibroblastach (de Petris i Raff 1972, Schreiner i współaut. 1977, Heath 1983b). Indukowane przemieszczenia receptorów zachodzą tylko w komórkach ruchliwych lub w komórkach w stanie zawiesiny ale potencjalnie zdolnych do migracji (Bretscher 1984). Nie udało się wywołać takich przemieszczeń w przypadku białek błony erytrocytów (Loor i współaut. 1972). Z uwagi na te obserwacje, każda hipoteza tłumacząca mechanizm przegrupowywania usieciowanych receptorów była w istocie fragmentem ogólniejszej teorii ruchu komórki (de Petris i Raff 1972, Harris 1973, 1976, Bretscher 1984). W roku 1988 Bray i White zaproponowali, że oba te zjawiska są konsekwencją tego samego procesu — wstecznego przepływu podbłonowej warstwy aktynowej. Zakładali oni, że wskutek oddziaływania z miozyną, kortykalna sieć mikrofilamentów jest utrzymywana w stanie skurczu. Miejscowa relaksacja warstwy kurczliwej wokół krawędzi czołowej komórki wywołuje jej przesuw w kierunku przeciwnym. Od wpływ F-aktyny z czoła komórki jest skorelowany z jej stałą repolimeryzacją, która zachodzi pod błoną wokół wiodącej krawędzi komórki. Opisany kortykalny przepływ aktyny byłby immanentną cechą komórek aktywnych ruchowo, zachowuje się on także w komórkach zawiesiny. Receptory powierzchniowe komórek po usieciowaniu asocjują z podbłonową F-aktyną i włączają się w już istniejący

wsteczny ruch tych mikrofilamentów. Takie założenie tłumaczy sprzeczne doniesienia na temat stopnia polimeryzacji F-aktyny w trakcie „cappingu” receptorów (Laub i współaut. 1981, Jackman i Burridge 1989). Koncepcja Braya i Whita jest wsparta licznymi danymi doświadczalnymi. Wsteczny ruch podbłonowej F-aktyny obserwowano na przykład w obrębie lamelli fibroblastów i stożka wzrostu rosnących neuronów (Heath 1983a, Forscher i Smith 1988, Fisher i współaut. 1988). Analogiczny, kierunkowy przepływ mikrofilamentów wykryto także w korteksie *Amoeba proteus* (Grębecki 1984, 1985). W przypadku fibroblastów stwierdzono wyraźną zależność między ich aktywnością lokomotoryczną, wstecznym ruchem korykalnej F-aktyny po grzbietowej stronie lamelli i przemieszczeniami usieciovanych receptorów po jej powierzchni (Heath 1983b).

Heath i Holifield (1991) oraz Grębecki (1992, 1993) wszechstronnie zanalizowali rolę przepływu korykalnej aktyny w lokomocji komórek. Postuluje się, że ten sam mechanizm napędza też ruch cząstek stałych, które wiążą się adhezyjnie do powierzchni migrujących komórek. Podobnie jak kompleksy usieciovanych receptorów w trakcie „cappingu”, cząstki takie zostają zakotwiczone w korykalnym systemie akto-miozynowym, który transportuje je następnie po powierzchni błony. Wyraźna korelacja między prędkością przesuwu związanych cząstek i podbłonowych struktur aktynowych jest argumentem potwierdzającym to założenie (Grębecki 1986, 1987, Fisher i współaut. 1988). Wspomnijmy przy okazji, że wsteczny ruch bakterii po powierzchni ameb (rodzaj *Hartmannella*) i ich akumulacja w obrębie uroidu komórki był w istocie pierwszym poznany przykładem „cappingu”. Zjawisko to zostało opisane przez Ray już w 1951 roku.

Zwróćmy uwagę, że Bray i White, Bourguignon i Singer, a wcześniej także de Petris, Raff i wielu innych wraz z motoryczną rolą aktyny i miozyny w „cappingu” akceptowali założenie dodatkowe: przyłączenie wielowartościowych ligandów indukuje „transmembranowe” połączenie receptorów powierzchniowych z tymi białkami (de Petris i Raff 1972, 1973, Poste i współaut. 1975, Vasiliev i współaut. 1976, Bourguignon i Singer 1977; Bray i White 1988).

ZWIĄZEK KOMPLEKSÓW RECEPTORY-LIGANDY Z KORTYKALNĄ AKTYNĄ I MIOZYNĄ

Istnienie takiego transmembranowego połączenia sugerowały w sposób pośredni obserwacje immunocytochemiczne: I — równoległe gromadzenie aktyny i miozyny było zauważalne już na etapie formowania drobnych skupień usieciovanych receptorów — „patches” (Ash i Singer 1976, Ash i współaut. 1977, Bourguignon i Singer 1977, Bourguignon i współaut. 1978b); II — jak wspomniano, przemieszczenia receptorów powierzchniowych w komórkach fibroblastów skorelowane są ściśle z wędrówką podbłonowej aktyny, kondensowanej i wycofywanej cyklicznie z czoła lamelli w formie „łuków” (Heath 1983b).

Stwierdzono ponadto, że równolegle ze wspomnianymi łukami aktynowymi są wycofywane z powierzchni lamelli także cząstki złota koloidalnego pokryte uprzecznie przeciwciałami swoistymi wobec glikoproteiny 80 kDa (Pgp-1) lub poli-L-lizyną 240 kDa (de Brabander i współaut. 1991). Dodajmy, że połączenia takich cząstek z mikrofilamentami utrzymywało się nawet po ekstrakcji większości białek i lipidów fibroblastu przy użyciu detergentu. Przeciwnie, te same cząstki złota pokryte poli-L-lizyną o krótkich łańcuchach (4 kDa) nie wiązały się z cytoskieletem fibroblastu i wykonywały jedynie ruchy Browna na powierzchni jego lamelli. Na podstawie tych obserwacji wnioskowano, że ligandy, które efektywnie sieciują receptory w błonie komórki indukują połączenie tych receptorów z filamentami aktynowymi. Następnie, filamenty te uczestniczą aktywnie w przegrupowywaniu usieciowanych receptorów (de Brabander i współaut. 1991).

Tezę o powstającym transmembranowym połączeniu usieciowanych receptorów powierzchniowych z kortykalną akto-miozyną poparły w sposób bezpośredni wyniki badań biochemicznych. Dane te opierały się na analizie składu frakcji cytoszkieletalnej komórek, izolowanej przy użyciu niejonowych detergentów. Badania te przeprowadzono na limfocytach, neutrofilach i śluzowcu *Dictyostelium discoideum*. Wykazano jednoznacznie, że po związaniu wielowartościowych ligandów receptory łączą się z cytoszkieletem, w tym z mikrofilamentami, każdej z badanych komórek (Flanagan i Koch 1978, Sheterline i Hopkins 1981, Braun i współaut. 1982). Mikrofilamenty asocjują następnie z miozyną a interakcja receptory-aktyna-miozyna trwa w trakcie całej wędrówki receptorów (Flanagan i Koch 1978, Condeelis 1979).

W uzupełnieniu dodajmy, że przytoczone dane biochemiczne i cytochemiczne podważają alternatywną koncepcję „cappingu” zaproponowaną przez Hewitta (1979) a rozwiniętą przez Olivera i Berlina (1982). Autorzy ci zakładali, że kortykalny system filamentów akto-miozyny podlega cyklicznym skurczom, które wprawiają błonę komórki w ruch falowy. Kompleksy receptory/ligandy dryfowałyby wraz z takimi falami błony w kierunku formującego się samorzutnie skupienia podbłonowej aktyny i miozyny; zauważmy — grupowanie receptorów byłoby tu zjawiskiem wtórnym wobec przemieszczeń aktyny i miozyny, a ich połączenie z receptorami nie byłoby konieczne. Wydaje się, że teoria tak zwanego „surfingu” może tłumaczyć szczególnie przypadki przemieszczeń usieciowanych receptorów w błonie (Albertini i współaut. 1977), jednakże jej założenia trudno generalizować.

W świetle przytoczonych danych pytać więc należy nie o to czy, ale jak kompleksy receptory/ligandy wiążą się z podbłonowym układem mikrofilamentów i miozyn? Możliwość interakcji bezpośredniej jest trudna do przyjęcia; cytoplazmatyczne domeny poszczególnych receptorów nie mają budowy konserwatywnej (Holifield i współaut. 1990) a poza tym, jak już wspomniano, indukowanym przemieszczeniom podlegają także cząsteczki takiej domeny pozbawione (np. lipidy). Powszechnie akceptuje się więc koncepcję wiązania pośredniczonego

przez dodatkowe białko integralne błony, a więc hipotetyczne białko X według teorii Bourguignona i Singera (1977).

Próby identyfikacji białka X a także mechanizmy jego interakcji z cytoszkieletem komórki stanowiły w ostatnich latach przedmiot wielu dociekań. Zakładano, że białko X powinno towarzyszyć dowolnemu receptorowi błony w trakcie jego indukowanej wędrówki. W oparciu o to założenie wykazywano, że funkcję takiego łącznika mogą spełniać niektóre glikoproteiny (gp) błony na przykład gp205 kDa w limfocytach T szczura (Turner i Shotton 1987) i gp180 kDa w limfocytach T myszy (Bourguignon i współaut. 1985). Dowodzono także, że poszukiwane białko może być źródłem jonów Ca^{+2} , uruchamiających proces „cappingu” (Klausner i współaut. 1980). Późniejsze obserwacje przemawiają przeciw istnieniu jednego, uniwersalnego białka X. Liczba poznanych białek integralnych błony, zdolnych do interakcji z filamentami aktynowymi cytoszkieletu ciągle się powiększa (Niggli i Burger 1987, Luna i Hitt 1992). Sugeruje się też, że proces „cappingu”, chociaż indukowany przez nieswoiste ligandy, zachodzi w oparciu o strukturalne i funkcjonalne powiązania wykorzystywane w komórce w trakcie jej fizjologicznej aktywacji (Majercik i Bourguignon 1988, Bourguignon i współaut. 1990, Graziadei i współaut. 1990). Można zatem przypuszczać, że rolę łączników pomiędzy receptorami powierzchniowymi i podbłonowym układem akto-miozynowym w trakcie „cappingu” spełniają różnorodne białka integralne błony. Proponowane mechanizmy powiązania tych białek z aktyną są efektem badań nad organizacją podbłonowego cytoszkieletu komórek.

UDZIAŁ BIAŁEK WIĄŻĄCYCH AKTYNĘ W PRZEMIESZCZENIACH RECEPTORÓW POWIERZCHNIOWYCH

Zidentyfikowano już szereg białek zdolnych do wiązania filamentów aktynowych z integralnymi białkami błony komórkowej (Carraway i Carraway 1989). Do najlepiej poznanych należą składniki cytoszkieletu erytrocytarnego (prace przeglądowe Goodmana i Shiffera 1983, Bennetta 1990). Systematycznie badane są także białka podbłonowego kompleksu, formowanego w miejscach silnej adhezji komórek do podłoża (ang. focal contacts). Talina-winkulina- α -aktylina to prawdopodobny łańcuch powiązań białkowych wiodący tu od transmembranowych receptorów -integryn- do mikrofilamentów. Sugerowana jest także możliwość bezpośredniej interakcji α -aktyliny z integrzynami (Burridge i współaut. 1988, 1990). α -Aktylina charakteryzowana jest jednak najpełniej jako białko sieciujące filamente aktynowe (Stossel i współaut. 1985). Badania nad udziałem tego białka w „cappingu” receptorów nie dały dotąd jednoznacznej odpowiedzi. α -Aktyninę wykryto w obrębie skupień różnorodnych receptorów powierzchniowych limfocytów i fibroblastów (Geiger i Singer 1979). Przyznano jednak później, że przeciwciiała, użyte w tych badaniach, mogły być niespecyficzne (Burn i współaut. 1988). α -Aktylina towarzyszyła też konglomeratom

receptorów Con A w *Dictyostelium*, jednakże w mutancie pozbawionym tego białka proces „cappingu” przebiega w sposób niezakłócony (Carboni i Condeelis 1985, Schleicher i współaut. 1988). Negatywne wyniki przyniosły także badania nad indukowanym przemieszczaniem i grupowaniem integrzyn limfocytarnych — proces ten nie wywoływał zmian w lokalizacji α -aktyniny. Także winkulina nie ulegała w tym czasie redystrybucji. Natomiast udział taliny w „cappingu” integrzyn był przypuszczalnie regulowany metabolicznie, to znaczy wymagał ufosforylowania białka przy udziale kinazy C (Burn i współaut. 1988). Wątpliwe zatem, by talina odgrywała kluczową rolę w przemieszczaniach tych receptorów.

Znacznie liczniejsze dane doświadczalne popierają koncepcję, według której mechanizm wiązania receptorów powierzchniowych z mikrofilamentami w procesie „cappingu” jest analogiczny do poznanego w erytrocytach ssaczyc (Levine i Willard 1983, Nelson i współaut. 1983, Bourguignon i Bourguignon G. J. 1984). W erytrocytach białka integralne błony łączą się z F-aktyną przy udziale kilku białek pośredniczących, wśród których kluczową rolę odgrywa spektryna.

Spektryna erytrocytarna jest heterodimerem składającym się z podjednostek: alfa o masie cząsteczkowej 240 kDa i beta — 220 kDa (Marchesi 1974, Shotton i współaut. 1979). Para dimerów spektryny asocjuje w tetramer zdolny do sieciowania mikrofilamentów (Brenner i Korn 1979, Tyler i współaut. 1979, 1980). Interakcja spektryny z aktyną jest wzmacniana wielokrotnie w obecności białka 4.1, które wiąże następnie uformowaną siateczkę spektrynowo-aktynową z glikoforynami, integralnymi sialoglikoproteinami błony erytrocytu (Anderson i Lovrien 1984, Anderson i Marchesi 1985, Tanaka i współaut. 1991). Niezależnie, spektryna wiąże się — przez ankiryne — z białkiem pasma 3, główną glikoproteiną tej błony (Bennett i Stenbuck 1979, 1980).

W komórkach nieerytrocytarnych występują białka pokrewne spektrynie (Godman i współaut. 1981, Levine i Willard 1981, Glenney i współaut. 1982, Repasky i współaut. 1982). Białka te były opisywane początkowo pod różnymi nazwami (np. fodryna); w tym artykule określamy je jednak ogólnie jako spektryny. Immunologiczny i funkcjonalny analog spektryny zidentyfikowano między innymi w limfocytach (Nelson i współaut. 1983). Badania prowadzone na nowotworowych komórkach limfoidalnych typu T wykazały, że spektryna tworzy tu stabilny kompleks z integralną glikoproteiną błony o masie cząsteczkowej 180 kDa (antygen T-200) (Bourguignon i współaut. 1985). *In vivo* i *in vitro* kompleks gp180/spektryna wiąże filamenty aktynowe (Suchard i Bourguignon 1987). Szereg obserwacji wskazuje na udział wspomnianego kompleksu w procesie „cappingu”:

a) Sama glikoproteina 180 kDa podlega indukowanej redystrybucji czyli „cappingowi” a spektryna towarzyszy jej w trakcie tych przemieszczeń; bioche-

micznie scharakteryzowane połączenie obu tych białek funkcjonuje więc także *in vivo* (Bourguignon i Bourguignon G. J. 1984, Bourguignon i współaut. 1985).

b) Obserwacje immunocytochemiczne dowodzą, że spektryna współwystępuje z wieloma receptorami powierzchniowymi limfocytów w trakcie ich przegrupowywania, na przykład z antygenem H-2, Thy-1, receptorami Con A (Levine i Willard 1983, Nelson i współaut. 1983, Bourguignon i Bourguignon G. J. 1984). Analogiczne dane otrzymano wcześniej dla gp180 kDa (Bourguignon i współaut. 1978a).

c) Ilość białek: gp180 kDa, spektryny i aktyny, obecnych we frakcji cytoszkieletalnej zwizanej z błoną limfocyta wzrasta proporcjonalnie w trakcie „cappingu” szeregu receptorów powierzchniowych komórki (Bourguignon i współaut. 1985).

Kompleks gp180/spektryna może więc funkcjonować jako poszukiwany łącznik pomiędzy usieciowanymi receptorami powierzchniowymi a korykalną aktyną limfocytów w trakcie „cappingu” (Bourguignon i współaut. 1985, Suchard i Bourguignon 1987).

W limfocytach występują także odpowiedniki ankiry i białka 4.1. Skupienia ankiry wykryto pod błoną w rejonach akumulacji usieciowanych receptorów powierzchniowych tych komórek (Bourguignon i Bourguignon G. J. 1984, Bourguignon i współaut. 1986b, Kalomiris i Bourguignon 1988). Limfocytarna ankira i białko 4.1 są związane z dwiema glikoproteinami błony komórkowej, tworząc kompleksy analogiczne do opisanego dla spektryny. *In vitro* oba te kompleksy wiążą efektywnie spektrynę i aktynę. Mogą więc one współdziałać z kompleksem gp180/spektryna lub samą spektryną w trakcie „cappingu” (Bourguignon i współaut. 1986a, b, Kalomiris i Bourguignon 1988).

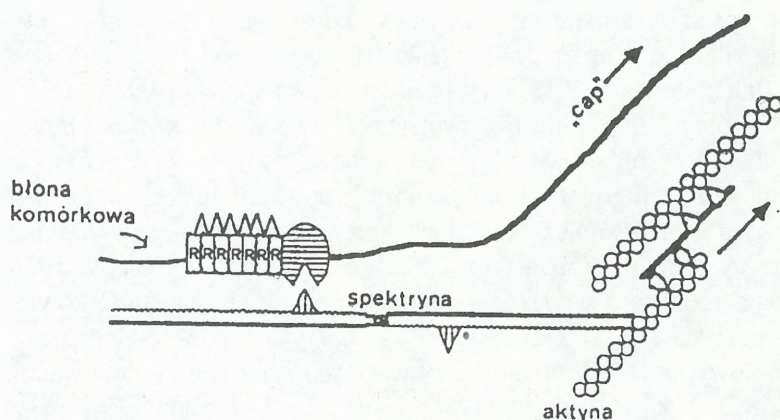
Wniosek o istotnej roli spektryny w redystrybucji receptorów powierzchniowych znalazł potwierdzenie w badaniach prowadzonych na komórkach epidermalnych linii hodowlanej A431 (Kwiatkowska i współaut. 1991a, b, Khrebtukova i współaut. 1991). Stosując swoiste przeciwciała indukowano w nich przemieszczenia receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Stwierdzono, że w komórkach migrujących po podłożu grupowanie usieciowanych receptorów EGF było skorelowane z akumulacją korykalnych filamentów aktynowych oraz spektryny, winkuliny, aneksyny 1 i 2. Potencjalnie, każde z tych czterech białek może pośredniczyć w wiązaniu mikrofilamentów z błoną komórkową. Aneksyna 1 (kalpaktyna 2, p35) i aneksyna 2 (kalpaktyna 1, p36), oddziałują z F-aktyną i anionowymi fosfolipidami błony w sposób zależny od jonów wapnia (Gerke i Weber 1984, Glenney 1986, Glenney i współaut. 1987). Jednakże, w komórkach A431 przeprowadzonych do zawiesiny „capping” receptorów EGF zachodził bez udziału winkuliny i aneksyn. Jedynie spektryna (obok filamentów aktynowych) towarzyszyła usieciowanym receptorom w trakcie ich grupowania. Zatem, tylko aktyna i spektryna mogły aktywnie współuczestniczyć w ruchu tych

receptorów. Redystrybucja winkuliny i aneksyny 1, obserwowana w komórkach przyczepionych do podłoża, wydaje się być efektem biernego transportu tych białek, spowodowanego ich asocjacją z F-aktyną.

Wzrastająca liczba danych wskazuje, że białka z rodziny spektryn występują także w komórkach pierwotniaczych (Pollard 1984, Schneider i współaut. 1988, Choi i Jeon 1989, Kwiatkowska i Sobota 1992). Immunoanalog spektryny, zidentyfikowany w *Acanthamoeba castellanii*, towarzyszył receptorom Con A w trakcie całego procesu ich przemieszczania aż po akumulację w obrębie uroidu ameby (Kwiatkowska i Sobota 1990, Kwiatkowska dane nie publ.). Zjawisko takie obserwowano zarówno w amebach migrujących po podłożu, jak i pozostających w zawieszynie. Także w śluzowcu *Dictyostelium discoideum*, analog spektryny gromadził się pod błoną w miejscu formowanych konglomeratów receptorów Con A (Bennett i Condeelis 1988).

Współwystępowanie spektryny z grupowanymi receptorami powierzchniowymi, wykryte w tak odległych filogenetycznie komórkach, jak komórki pierwotniaków i kręgowców, potwierdza raz jeszcze hipotezę o istnieniu jednego mechanizmu rządzącego procesem przemieszczania tych receptorów. Spektryna może tu pośredniczyć w wiązaniu receptorów, usieciovanych w płaszczyźnie błony, z podbłonowym układem akto-miozynowym. W ten sposób zakotwiczone receptory byłyby następnie przesuwane w kierunku „czapeczki” — rysunek 4. Dodatkowo, spektryna może też sieciować mikrofilamenty położone dośrodkowo od miejsc nagromadzenia receptorów w błonie komórki.

Proponowany model „cappingu” wymaga dalszych badań. Wiadomo jednak, że dynamiczna asocjacja analogów spektryny z białkami błony i kortykalną



Rys. 4. Proponowany mechanizm interakcji receptorów powierzchniowych z systemem akto-miozynowym w trakcie „cappingu”: spektryna pośredniczy w wiązaniu usieciovanych receptorów (R) z podbłonowymi filamentami aktynowymi. Według Willarda i współautorów (1987).

F-aktyna jest elementem wielu różnorodnych procesów. Należy do nich, obok „cappingu”, między innymi rozwój strukturalnej i funkcjonalnej polaryzacji komórek nabłonkowych, zmiany kształtu trombocytów, sekrecja katecholamin (Fox i współaut. 1987, Aunis i Bader 1988, Nelson i Hammerton 1989). W *Amoeba proteus* precypitacja spektryny, wywołana iniekcją swoistych przeciwciał do komórki, hamuje lokomocję, fagocytozę i wywołuje zmiany jej kształtu (Choi i Jeon 1992). Przeprowadzenie podobnych badań w odniesieniu do „cappingu” receptorów pozwoliłoby na sprecyzowanie funkcji spektryny (i białek z nią związanych) w ruchu receptorów powierzchniowych komórki.

PODSUMOWANIE

Receptory powierzchniowe komórki, usieciowane przez wielowartościowe ligandy (przeciwciała, lektyny), ulegają kierunkowym przemieszczeniom w płaszczyźnie błony komórkowej. Początkowo, kompleksy receptory/ligandy formują samorzutnie niewielkie skupienia („łatki”, ang. patches) a następnie zbierane są na jednym biegunie komórki tworząc tak zwaną czapeczkę (ang. cap). Tylko drugi etap „cappingu” wymaga aktywności metabolicznej komórki.

Wysunięto kilka hipotez próbujących wyjaśnić molekularny mechanizm ruchu usieciowanych receptorów powierzchniowych komórki. Obecnie, powszechnie jest akceptowana koncepcja, według której przemieszczenia receptorów są kontrolowane przez białka cytoszkieletu. Liczne dane biochemiczne i cytochemiczne wykazują, że drobne skupienia receptorów („łatki”) zostają połączone z filamentami aktynowymi korteksu komórki. Interakcja filamentów aktynowych i miozynowych sprawia następnie, że związane z nimi receptory są przesuwane w kierunku „czapeczki”. Uważa się także, że kierunkowy i zależny od miozyny przepływ kortykalnych filamentów aktynowych leży u podstaw zjawiska lokomocji komórek. Zgodnie z tym założeniem usieciowane receptory zostają włączone w już istniejący, wsteczny ruch kortykalnej aktyny i naśladują jej przemieszczenia w obrębie błony. W ten sam sposób są transportowane cząstki stałe, które wiążą się adhezyjnie z powierzchnią migrującej komórki.

Rosnąca liczba danych wskazuje, że białka z rodziny spektryn są aktywnie zaangażowane w procesie „cappingu”. Białka te występują powszechnie w komórkach *Eukaryota*, wiążą filamenty aktynowe i połączone są z różnorodnymi białkami integralnymi błony komórkowej. Spektryny towarzyszą usieciowanym receptorom powierzchniowym w czasie ich przemieszczania i grupowania; zjawisko takie obserwowano w tak odległych filogenetycznie komórkach, jak komórki pierwotniacze i ludzkie. Białka z rodziny spektryn mogą zatem pośredniczyć we wiązaniu receptorów, usieciowanych w płaszczyźnie błony, z podbłonowymi filamentami aktynowymi w trakcie „cappingu”.

CAPPING OF CELL SURFACE RECEPTORS. THE ROLE OF ACTIN AND ACTIN-BINDING PROTEINS

Summary

Capping is a process of directed redistribution of cell surface receptors in the plane of plasma membrane. It is induced by cross-linking of the receptors by polyvalent ligands (e.g. antibodies, lectins). Initially, the receptors gather spontaneously into small aggregates — patches. Later, they are gradually collected on one pole of the cell to form a large, single assembly — the cap. Only the second stage of the capping process requires metabolic activity of the cell.

Several contradictory hypotheses have been advanced to explain the molecular mechanism of capping. The concept that receptor movement is controlled by the cytoskeleton is now most commonly accepted. Many biochemical and cytochemical data indicate that receptor patches become linked to cortical actin filaments. Subsequently, patches are shifted toward the region of cap formation by a sliding motion of the cortical actin and myosin filaments. It has been recently proposed that directed (rearward) and myosin-dependent flow of cortical actin is also involved in cell locomotion. According to this assumption, receptor patches join actin flux and follow it within the membrane. Solid particles which adhere to the surface of moving cells are transported in the same manner.

The growing amount of evidence demonstrates that spectrin-related proteins are actively engaged in the mechanism of capping. They accompany redistribution of surface receptors in a wide variety of cells, from human to protozoan ones. Spectrin analogues belong to actin- and membrane-binding proteins. Therefore, they may participate in the linkage of surface receptors to cortical actin filaments, which is required for cap formation.

LITERATURA

- Albertini D. F., Anderson E., 1977. *Microtubule and microfilament rearrangements during capping of concanavalin A receptors on cultured ovarian granulosa cells*. J. Cell Biol. 73: 111–127.
- Albertini D. F., Berlin R. D., Oliver J. M., 1977. *The mechanism of concanavalin A cap formation in leucocytes*. J. Cell Sci. 26: 57–75.
- Anderson R. A., Lovrien R. E., 1984. *Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton*. Nature 307: 655–658.
- Anderson R. A., Marchesi V. T., 1985. *Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide*. Nature 318: 295–298.
- Ash J. F., Singer S. J., 1976. *Concanavalin-A-induced transmembrane linkage of concanavalin A surface receptors to intracellular myosin-containing filaments*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 4575–4579.
- Ash J. F., Louvard D., Singer S. J., 1977. *Antibody induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5584–5588.
- Aunis D., Bader M.-F., 1988. *The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells*. J. Exp. Biol. 139: 253–266.
- Bailey C. F., Bowers B., 1981. *Localization of lipophosphoglycan in membranes of Acanthamoeba by using specific antibodies*. Mol. Cell Biol. 1: 358–369.
- Bennett H., Condeelis J., 1988. *Isolation of an immunoreactive analogue of brain fodrin that is associated with the cell cortex of Dictyostelium amoebae*. Cell Motil. Cytoskel. 11: 303–317.

- Bennett V., 1990. *Spectrin-based membrane skeleton: A multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm*. *Physiol. Rev.* 70: 1029–1065.
- Bennett V., Stenbuck P. J., 1979. *The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes*. *Nature* 280: 468–473.
- Bennett V., Stenbuck P. J., 1980. *Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membranes*. *J. Biol. Chem.* 255: 6424–6432.
- Bourguignon L. Y. W., 1980. *Simultaneous localization of intracellular myosin and surface concanavalin A receptor clustres using immunoelectron microscopy*. *Cell Biol. Int. Rep.* 4: 541–547.
- Bourguignon G. J., Bourguignon L. Y. W., 1981. *Isolation and initial characterization of a lymphocyte cap struture*. *Biochim. Biophys. Acta* 646: 109–118.
- Bourguignon L. Y. W., Bourguignon G. J., 1984. *Capping and the cytoskeleton*. *Int. Rev. Cytol.* 87: 195–224.
- Bourguignon L. Y. W., Kerrick W. G. L., 1983. *Receptor capping in mouse T-lymphoma cells: A Ca^{+2} and calmodulin-stimulated ATP-dependent process*. *J. Membr. Biol.* 75: 65–72.
- Bourguignon L. Y. W., Rozek R. J., 1980. *Capping of concanavalin A receptors and their association with microfilaments in monolayer grown human fibroblastoid cells*. *Cell Tissue Res.* 205: 77–84.
- Bourguignon L. Y. W., Singer S. J. 1977. *Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by their specific ligands*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5031–5035.
- Bourguignon L. Y. W., Hymans R., Trowbridge I., Singer S. J., 1978a. *Participation of histocompatibility antigens in capping of molecularly independent cell surface components by their specific antibodies*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2406–2410.
- Bourguignon L. Y. W., Tokuyasu K. T., Singer S. J., 1978b. *The capping of lymphocytes and other cells, studied by an improved method for immunofluorescence staining of frozen sections*. *J. Cell. Physiol.* 95: 239–258.
- Bourguignon L. Y. W., Nagpal M. L., Hsing Y. C., 1981. *Phosphorylation of myosin light chain during capping of mouse T-lymphoma cells*. *J. Cell Biol.* 91: 889–894.
- Bourguignon L. Y. W., Nagpal M. L., Balazovich K., Guerriero V., Means A. R., 1982. *Association of myosin light chain kinase with lymphocyte membrane-cytoskeleton complex*. *J. Cell Biol.* 95: 793–797.
- Bourguignon L. Y. W., Suchard S. J., Nagpal M. L., Glenney J. R., Jr., 1985. *A T-lymphoma transmembrane glycoprotein (gp 180) is linked to the cytoskeletal protein fodrin*. *J. Cell Biol.* 101: 477–487.
- Bourguignon L. Y. W., Suchard S. J., Kalomiris E. L., 1986a. *Lymphoma Thy-1 glycoprotein is linked to the cytoskeleton via a 4.1-like protein*. *J. Cell Biol.* 103: 2529–2540.
- Bourguignon L. Y. W., Walker G., Suchard S. J., Balazovich K., 1986b. *A lymphoma plasma membrane-associated protein with ankyrin-like properties*. *J. Cell Biol.* 102: 2115–2124.
- Bourguignon L. Y. W., Walker G., Huang H. S., 1990. *Interactions between a lymphoma membrane-associated guanosine 5'-triphosphate-binding protein and the cytoskeleton during receptor patching and capping*. *J. Immunol.* 144: 2242–2252.
- Braun J., Fujiwara K., Pollard T. D., Unanue E. R., 1978a. *Two distinct mechanisms for redistribution of lymphocyte surface molecules. I. Relationship to cytoplasmic myosin*. *J. Cell Biol.* 79: 409–418.
- Braun J., Fujiwara K., Pollard T. D., Unanue E. R., 1978b. *Two distinct mechanism for redistribution of lymphocyte surface molecules. II. Contrasting effects of local anesthetics and a calcium ionophore*. *J. Cell Biol.* 79: 419–426.
- Braun J., Hochman P. S., Unanue E. R., 1982. *Ligand-induced association of surface immunoglobulin with the detergent-insoluble cytoskeletal matrix of the B lymphocyte*. *J. Immunol.* 128: 1198–1204.
- Bray D., White J. G., 1988. *Cortical flow in animal cells*. *Science* 239: 883–888.

- Brenner S. L., Korn E. D., 1979. *Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer cross-link F-actin*. J. Biol. Chem. 254: 8620–8627.
- Bretscher M. S., 1976. *Direct lipid flow in cell membranes*. Nature 260: 21–23.
- Bretscher M. S., 1983. *Distribution of receptors for transferrin and low density lipoprotein on the surface of giant HeLa cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 454–458.
- Bretscher M. S., 1984. *Endocytosis: Relation to capping and cell locomotion*. Science 224: 681–686.
- Bretscher M. S., 1988. *Fibroblast on the move*. J. Cell Biol. 106: 235–237.
- Bretscher M. S., 1989a. *Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor on CHO cells*. EMBO J. 8: 1341–1348.
- Bretscher M. S., 1989b. *Particle migration on cells*. Nature 341: 491–492.
- Bretscher M. S., 1991. *Lipid flow in locomoting cells*. Science 251: 317–318.
- Bretscher M. S., Thomson J. N., 1983. *Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells*. EMBO J. 2: 599–603.
- Bretscher M. S., Thomson J. N., Pearse B. M., 1980. *Coated pits act as molecular filters*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4156–4159.
- Burn P., Kupfer A., Singer S. J., 1988. *Dynamic membrane-cytoskeletal interactions: Specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 497–501.
- Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C., 1988. *Focal adhesion: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton*. Ann. Rev. Cell Biol. 4: 487–525.
- Burridge K., Nuckolls G., Otey C., Pavalko F., Simon K., Turner C., 1990. *Actin-membrane interaction in focal adhesion*. Cell Differ. Dev. 32: 337–342.
- Butman R. T., Bourguignon G. J., Bourguignon L. Y. W., 1980. *Lymphocyte capping induced by polycationized ferritin*. J. Cell. Physiol. 105: 7–15.
- Carboni J. M., Condeelis J. S., 1985. *Ligand-induced changes in the location of actin, myosin, 95K (α -actin), and 120K protein in amoebae of Dictyostelium discoideum*. J. Cell Biol. 100: 1884–1893.
- Carraway K. L., Carraway C. A. C., 1989. *Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells*. Biochim. Biophys. Acta 988: 147–171.
- Choi E. Y., Jeon K. W., 1989. *A spectrin-like protein present on membranes of Amoeba proteus as studied with monoclonal antibodies*. Exp. Cell Res. 185: 154–165.
- Choi E. Y., Jeon K. W., 1992. *Role of spectrin in Amoeba proteus, as studied by microinjection of anti-spectrin monoclonal antibodies*. Exp. Cell Res. 199: 174–178.
- Condeelis J., 1979. *Isolation of concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin*. J. Cell Biol. 80: 751–758.
- DeBrabander M., Nuydens R., Ishihara A., Holifield B., Jacobson K., Geerts H., 1991. *Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with Nanovoid Microscopy*. J. Cell Biol. 112: 111–124.
- De Lozanne A., Spudich J. A., 1987. *Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination*. Science 236: 1086–1091.
- De Petris S., 1975. *Concanavalin A receptors, immunoglobulins and antigen of the lymphocyte surface*. J. Cell Biol. 65: 123–146.
- De Petris S., 1978. *Nonuniform distribution of concanavalin-A receptors and surface antigens on uropod-forming thymocytes*. J. Cell Biol. 79: 235–251.
- De Petris S., Raff M. C., 1972. *Distribution of immunoglobulin on the surface of mouse lymphoid cells as determined by immunoferritin electron microscopy. Antibody-induced temperature-dependent redistribution and its implications for membrane structure*. Eur. J. Immunol. 2: 523–535.

- De Petris S., Raff M. C., 1973. *Fluidity of the plasma membrane and its implication for cell movement*. [W:] Porter R., Fitzsimmons D.W. (red.). *Locomotion of tissue cells*. Ciba Found. Symp. 14: 27-40.
- Edelman G. M., 1976. *Surface modulation in cell recognition and cell growth*. *Science* 192: 218-226.
- Fisher G. W., Conard P. A., DeBiasio R. L., Taylor D. L., 1988. *Centripetal transport of cytoplasm, actin, and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts*. *Cell Motil. Cytoskel.* 11: 235-247.
- Flanagan J., Koch L. E., 1978. *Cross-linked surface Ig attaches to actin*. *Nature* 273: 278-281.
- Forcher P., Smith S. 1988 *Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone*. *J. Cell Biol.* 107: 1505-1516.
- Fox J. E. B., Reynolds C. C., Morrow J. S., Philips D. R., 1987. *Spectrin is associated with membrane-bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the Ca^{++} -dependent protease during platelet activation*. *Blood* 69: 537-545.
- Fukui Y., DeLozanne A., Spudich J. A., 1990. *Structure and function of the cytoskeleton of a Dictyostelium myosin defective mutant*. *J. Cell Biol.* 110: 367-378.
- Gabbiani G., Chapponner C., Zumbé A., Vasalli P., 1977. *Actin and tubulin co-cap with surface immunoglobulins in mouse B lymphocytes*. *Nature* 269: 697-698.
- Geiger B., Singer S. J., 1979. *The participation of α -actinin in the capping of cell membrane components*. *Cell* 16: 213-222.
- Gerke V., Weber K., 1984. *Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin*. *EMBO J.* 3: 227-233.
- Glenney J., 1986. *Phospholipid-dependent Ca^{2+} binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (calpactin) and its 33-kDa core*. *J. Biol. Chem.* 261: 7247-7252.
- Glenney J. R., Jr., Glenney P., Weber K., 1982. *Erythroid spectrin, brain fodrin, and intestinal brush border proteins (TW-260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell type specific subunit*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4002-4005.
- Glenney J. R., Jr., Tack B., Powell M. A., 1987. *Calpactins: Two distinct Ca^{++} -regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta*. *J. Cell Biol.* 104: 503-511.
- Goodman S. R., Shiffer K., 1983. *The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal erythrocytes: A review*. *Am. J. Physiol.* 244: 121-141.
- Goodman S. R., Zagon I. S., Kulikowski R. R., 1981. *Identification of a spectrin-like protein in nonerythroid cells*. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 78: 7570-7574.
- Graziadei L., Riablow K., Bar-Sagi D., 1990. *Co-capping of ras proteins with surface immunoglobulins in B lymphocytes*. *Nature* 347: 396-400.
- Grębecki A., 1984. *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites. I. Behavior of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon*. *Protoplasma* 123: 116-134.
- Grębecki A., 1985. *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.
- Grębecki A., 1986. *Two-directional pattern of movements on the cell surface of Amoeba proteus*. *J. Cell Sci.* 83: 23-35.
- Grębecki A., 1987. *Velocity distribution of the anterograde and retrograde transport of extracellular particles by Amoeba proteus*. *Protoplasma* 141: 126-138.
- Grębecki A., 1988. *Bidirectional transport of extracellular material by the cell surface of locomoting Saccamoeba limax*. *Arch. Protist.* 136: 139-151.
- Grębecki A., 1992. *Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych*. *Kosmos* 1: 7-38.
- Grębecki A., 1993. *Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae*. *Int. Rev. Cytol.*, in press.

- Gunther G. R., Wang J. L., Yahara I., Cunningham B. A., Edelman G. M., 1973. *Concanavalin A derivatives with altered biological activities*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1012–1016.
- Harris A. K., 1973. *Cell surface movements related to cell locomotion*. [W:] Porter R., Fitzsimmons D. W. (red.). *Locomotion of tissue cells*. Ciba Found. Symp. 14: 3–19.
- Harris A. K., 1976. *Recycling of dissolved plasma membrane components as an explanation of the capping phenomenon*. Nature 263: 781–783.
- Heath J. P., 1983a. *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts*. J. Cell Sci. 60: 331–354.
- Heath J. P., 1983b. *Direct evidence for microfilament-mediated capping of surface receptors on crawling fibroblasts*. Nature 32: 532–534.
- Heath J. P., Holifield B. F., 1991. *Cell locomotion: New research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow*. Cell Motil. Cytoskel. 18: 245–257.
- Hewitt J. A., 1979. *Surf-riding model for cell capping*. J. Theor. Biol. 80: 115–127.
- Holifield B. F., Ishihara A., Jacobson K., 1990. *Comparative behavior of membrane protein-antibody complex on motile fibroblasts: Implications for a mechanism of capping*. J. Cell Biol. 11: 2499–2512.
- Jackman W. T., Burridge K., 1989. *Polymerization of additional actin is not required for capping of surface antigens in B-lymphocytes*. Cell Motil. Cytoskel. 12: 23–32.
- Jacobson K., Ishihara A., Inman R., 1987. *Lateral diffusion of proteins in membranes*. Ann. Rev. Physiol. 49: 163–175.
- Kalomiris E. L., Bourguignon L. Y. W., 1988. *Mouse T-lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin*. J. Cell Biol. 106: 319–327.
- Kerrick W. G. L., Bourguignon L. Y. W., 1984. *Regulation of receptor capping in mouse lymphoma T cells by Ca^{2+} -activated myosin light chain kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 165–169.
- Khrebtukova I. A., Kwiatkowska K., Gudkova D. A., Sorokin A. B., Pinaev G. P., 1991. *The role of microfilaments in the capping of epidermal growth factor receptor in A431 cells*. Exp. Cell Res. 194: 48–55.
- King C. A., Preston T. M., 1977. *Studies of anionic site on the cell surface of the amoeba Naegleria gruberi using cationized ferritin*. J. Cell Sci. 28: 133–149.
- Klausner R. D., Bhala D. K., Dragsten P., Hoover R. L., Karnovsky M. J., 1980. *Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acids*. J. Cell Biol. 77: 437–441.
- Kourilsky F. M., Silvestre D., Neauport-Santes C., Loosfelt V., Dausset J., 1972. *Antibody-induced redistribution of HL-A antigens at the cell surface*. Eur. J. Immunol. 2: 249–257.
- Kucik D. F., Elson E. L., Sheetz M. P., 1990. *Cell migration does not produce membrane flow*. J. Cell Biol. 11: 1617–1622.
- Kwiatkowska K., Sobota A., 1990. *Alpha-spectrin immunoanalog in Acanthamoeba cells*. Histochemistry 94: 87–93.
- Kwiatkowska K., Sobota A., 1992. *The 240 kDa immunoanalogue of vertebrate alpha-spectrin occurs in Paramecium cells*. Cell Motil. Cytoskel. 23: 111–121.
- Kwiatkowska K., Khrebtukova I. A., Gudkova D. A., Pinaev G. P., Sobota A., 1991a. *Actin-binding proteins involved in the capping of epidermal growth factor receptors in A431 cells*. Exp. Cell Res. 196: 255–263.
- Kwiatkowska K., Khrebtukova I. A., Sobota A., 1991b. *Participation of membrane skeleton proteins in aggregation of epidermal growth factor receptors in A431 cells*. Acta Biochim. Polon. 38: 201–210.
- Laub F., Kaplan M., Gitler C., 1981. *Actin polymerization accompanies Thy-1-capping on mouse thymocytes*. FEBS Lett. 124: 35–38.

- Lee J., Gustafsson M., Magnusson K. E., Jacobson K., 1990. *The direction of membrane lipid flow in locomoting polymorphonuclear leucocytes*. Science 247: 1229–1233.
- Levine J., Willard M., 1981. *Fodrin: Axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells*. J. Cell Biol. 90: 631–643.
- Levine J., Willard M., 1983. *Redistribution of fodrin (a component of the cortical cytoplasm) accompanying capping of cell surface molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 191–195.
- Loor F., 1974. *Binding and redistribution of lectins on lymphocyte membrane*. Eur. J. Immunol. 4: 210–220.
- Loor F., Forni L., Pernis B., 1972. *The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins*. Eur. J. Immunol. 2: 203–212.
- Luna E. J., Hitt A. L., 1992. *Cytoskeleton-plasma membrane interactions*. Science 258: 955–964.
- Majercik M. H., Bourguignon L. Y. W., 1988. *Insulin-induced myosin light-chain phosphorylation during receptor capping in IM-9 human B-lymphoblasts*. Biochem J. 252: 815–823.
- Marchesi V. T., 1974. *Spectrin: Present status of a putative cytoskeletal protein in the cell membrane*. J. Membr. Biol. 51: 101–131.
- Middleton C. A., 1979. *Cell-surface labelling reveals no evidence for membrane assembly and disassembly during fibroblast locomotion*. Nature, 282: 203–205.
- Murre C., Reiss C. S., Bernabeu C., Chen L. B., Burakoff S. J., Seidman J. C., 1984. *Construction, expression and recognition of an H-2 molecule lacking its carboxyl terminus*. Nature 307: 432–436.
- Niggli V., Burger M. M., 1987. *Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane*. J. Membr. Biol. 100: 97–121.
- Nelson W. J., Hammerton R. W., 1989. *A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺, K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: Implication for the biogenesis of epithelial cell polarity*. J. Cell Biol. 108: 893–902.
- Nelson W. J., Colaco C. A. L. S., Lazarides E., 1983. *Involvement of spectrin in cell-surface receptor capping in lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 1626–1630.
- Oliver J. M., Berlin R. D., 1982. *Mechanisms that regulate the structural and functional architecture of cell surface*. Int. Rev. Cytol. 74: 55–94.
- Pasternak C., Spudich J. A., Elson E. L., 1989. *Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin*. Nature 341: 549–551.
- Pollard T., 1984. *Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from Acanthamoeba that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins*. J. Cell Biol. 99: 1970–1980.
- Poste G., Papahadjopoulos D., Nicolson G. L., 1975. *Local anesthetics affect transmembrane cytoskeletal control of mobility and distribution of cell surface receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4430–4434.
- Ray D. L., 1951. *Agglutination of bacteria: A feeding method in the soil ameba Hartmanella sp.* J. Exp. Zool. 118: 443–466.
- Repasky E., Granger B., Lazarides E., 1982. *Widespread occurrence of avian spectrin in nonerythroid cells*. Cell 29: 821–833.
- Revesz T., Greaves M., 1975. *Ligand-induced redistribution of lymphocyte membrane ganglioside GM1*. Nature 257: 103–106.
- Sällström J. F., Alm G. V., 1972. *Binding of concanavalin A to the thymic and bursal chicken lymphoid cells*. Exp. Cell Res. 75: 63–78.
- Schleicher M., Wallraff E., Gerisch G., Isenberg G., 1988. *Construction and analysis of Dictyostelium mutants with defects in actin-binding proteins*. Protoplasma [Suppl.2]: 22–26.
- Schneider A., Lutz H. V., Marugg R., Gehr P., Seebeck T., 1988. *Spectrin-like proteins in the paraflagellar rod structure of Trypanosoma brucei*. J. Cell Sci. 90: 307–315.
- Schreiner G. F., Unanue E. R., 1977. *Capping and the lymphocyte: Models for membrane reorganization*. J. Immunol. 119: 1549–1551.

- Schreiner G. F., Fujiwara K., Pollard T. D., Unanue E. R., 1977. *Redistribution of myosin accompanying capping of surface Ig*. J. Exp. Med. 145: 1393–1398.
- Sheetz M. P., Turney S., Qian H., Elson E. L., 1988. *Nanometre level analysis demonstrated that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements*. Nature 340: 284–288.
- Sheterline P., Hopkins C. R., 1981. *Transmembrane linkage between surface glycoproteins and components of the cytoplasm in neutrophil leukocytes*. J. Cell Biol. 90: 743–754.
- Shotton D. M., Burke B. E., Branton D., 1979. *The molecular structure of human erythrocyte spectrin*. J. Mol. Biol. 131: 303–329.
- Singer S. J., Nicolson G. L., 1972. *The fluid mosaic model of the structure of cell membrane*. Science 175: 720–731.
- Spiegel S., Kassis S., Wilchek M., Fishman P. M., 1984. *Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes*. J. Cell Biol. 99: 1575–1581.
- Stern P. L., Bretscher M. S., 1979. *Capping of exogenous Forssmann glycolipid on cells*. J. Cell Biol. 82: 829–833.
- Stossel J. P., Chaponnier C., Ezzel R. M., Hartwig J. H., Janmey P. A., Kwiatkowski D. J., Lind S. E., Smith D. B., Southwick F. S., Yin H. L., Zaner K. S., 1985. *Nonmuscle actin-binding proteins*. Ann. Rev. Cell Biol. 1: 353–402.
- Suchard S. J., Bourguignon L. Y. W., 1987. *Further characterization of a fodrin-containing transmembrane complex from mouse T-lymphoma cells*. Biochim. Biophys. Acta 896: 35–46.
- Tanaka T., Kodawaki K., Lazarides E., Sobue K., 1991. *Ca²⁺-dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1*. J. Biol. Chem. 266: 1134–1140.
- Taylor D. L., Blinks J. R., Reynolds G., 1980b. *Contractile basis of ameboid movement. VIII. Aequorin luminescence during ameboid movement, endocytosis, and capping*. J. Cell Biol. 86: 599–607.
- Taylor D. L., Wang Y.-L., Heiple J. M., 1980a. *Contractile basis of ameboid movement. VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amebas*. J. Cell Biol. 86: 590–598.
- Taylor R. B., Duffus W. P. H., Raff M. C., de Petris S., 1971. *Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody*. Nature New Biol. 233: 225–229.
- Toh B. M., Hard G. C., 1977. *Actin co-caps with concanavalin A receptors*. Nature 269: 695–696.
- Turner C. E., Shotton D. M., 1987. *Isolation and initial biochemical characterisation 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. Cytoskel. 8: 37–43.
- Tyler J. M., Hargreaves W. R., Branton D., 1979. *Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 5192–5196.
- Tyler J. M., Reinhardt B. N., Branton D., 1980. *Associations of erythrocyte membrane proteins. Binding of purified bands 2.1 and 4.1 to spectrin*. J. Biol. Chem. 255: 7034–7039.
- Unanue E. R., Perkins W. D., Karnovsky E. R., 1972. *Ligand induced movement of lymphocyte membrane macromolecules I*. J. Exp. Med. 136: 885–906.
- Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. V., Dorfman N. A., Pletyushkina P., 1976. *Active cell edge and movements of concanavalin A receptors of the surface of epithelial and fibroblastic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 4085–4089.
- Willard M., Baitinger C., Cheney R., 1987. *Translocations of fodrin and its binding proteins*. Brain Res. Bull. 18: 817–824.
- Wolf D. E., Henkart D., Webb W. W., 1980. *Diffusion, patching and capping of stearylated dextran on 3T3 cell plasma membrane*. Biochemistry 19: 3893–3904.
- Yahara I., Edelman G. M., 1973. *The effects of concanavalin A on the mobility of lymphocyte surface receptors*. Exp. Cell Res. 81: 143–155.