

WANDA KŁOPOCKA

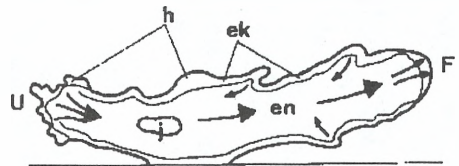
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ROLA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO WAPNIA W RUCHU AMEBOIDALNYM I W ZJAWISKACH Z NIM ZWIĄZANYCH

MECHANIZM I REGULACJA LOKOMOCJI

W świecie żywym występują różne rodzaje ruchu. Jednym z nich jest bardzo rozpowszechniony ruch ameboidalny. Poruszają się nim nie tylko organizmy jednokomórkowe, takie jak ameby, ale również zwierzęce komórki tkankowe. Pomiedzy tymi komórkami występują olbrzymie różnice biologiczne i morfologiczne. Jednak podczas migracji wszystkie wykazują polaryzację ruchową, to znaczy mają morfologicznie i funkcjonalnie zróżnicowany przedni i tylny rejon komórki, są przytwierdzone do podłoża, rozwijają przejściowe organy lokomotoryczne, zwane nibynóżkami (pseudopodia) i wytwarzają siłę motoryczną dzięki aktywności kurczliwej aktomiozynowego cytoszkieletu, zwanego korteksem. Tworzy on ciągłą warstwę podścielającą wewnętrzną powierzchnię błony komórkowej i ma strukturę trójwymiarowej sieci o konsystencji półsztywnego żelu, utworzonej z filamentów F-aktyny powiązanych przez białka sieciujące. W aktywniej sieci nierównomiernie są rozmieszczone krótkie, grube filamenty miozynowe oraz miozyna oligomeryczna, która również może reagować z F-aktyną. W czasie lokomocji w tylnej strefie komórki, a u ameb również w wycofywanych pseudopodiach, proces skurczu jest połączony z zolifikacją, to jest fragmentowaniem sieci (TAYLOR i współaut. 1979, TAYLOR i FECHHEIMER 1982). Materiał powstały w wyniku dezorganizacji aparatu kurczliwego, a więc: nisko oligomeryczna aktyna, G-aktyna, cząsteczki miozyny oraz białka regulujące, jest

przenoszony w postaci strumienia endoplazmatycznego do strefy frontальной, gdzie ulega ponownej żelifikacji (rys. 1) (GRĘBECKI 1986, STOCKEM i HOFFMANN 1986). Procesy degradacji i rekonstrukcji warstwy kurczliwej są więc rozdzielone pomiędzy dwa bieguny komórki. Aktywność kurczliwa warstwy kortykalnej pomiędzy nimi jest odpowiedzialna za generowanie siły motorycznej (GRĘBECKI 1981, 1982). Aby mogły powstać mechaniczne efekty działa-

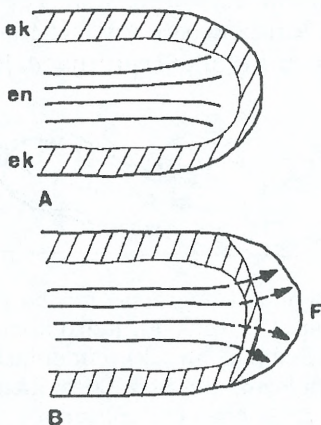


Rys. 1. Schemat migracji *Amoeba proteus*. Uroid (U), front (F), jądro komórkowe (j), ektoplazma (ek), endoplazma (en), hialoplazma (h). Strzałki wskazują kierunek przepływu endoplazmy.

nia takiej siły aktomiozynowa sieć musi być połączona z błoną plazmatyczną bezpośrednio bądź poprzez białka łączące. W komórkach poruszających się ruchem ameboidalnym połączenia aktyny z błoną są krótkotrwałe, równie szybko się tworzą, jak i rozpadają (BERSHADSKY i VASILIEV 1988). Dzięki swej dynamice umożliwiają zmiany kształtu komórki, wysuwanie i wycofywanie pseudopodiów.

Kurczenie się peryferyjnego cylindra stowarzyszone z jego stopniową zolifikacją to jeden z dwu najważniejszych aspektów ruchu ameboidalnego. Drugim jest rytmiczne odklejanie się warstwy mikrofilamentów od błony komórkowej, zachodzące w wierzchołkach wysuwanych nibynózek. Skurcz całej peryferyjnej sieci aktynowej przyczepionej do błony podnosi ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz komórki. W miejscach, w których cytoskielet jest oderwany od błony występuje lokalny spadek ciśnienia. W tym kierunku, zgodnie z prawami hydrodynamiki, płynie endoplazma i tam tworzy się nowy front. Rytmiczne odklejanie się zrekonstruowanej warstwy mikrofilamentów od błony w wierzchołkach wysuwanych pseudopodiów powoduje więc oscylacje gradientu ciśnienia hydrostatycznego w komórce. Odbudowa sieci aktynowej połączonej z błoną, a następnie jej skurcz prowadzi do zmniejszenia tego gradientu i zwolnienia lub zatrzymania przepływu endoplazmy oraz posuwania się krawędzi czołowej. Następne rozdzielenie kompleksu błona-cytoskielet wywołuje kolejny lokalny spadek ciśnienia i przywrócenie albo przyspieszenie przepływu endoplazmy oraz progresji strefy wiodącej (rys. 2) (GRĘBECKI 1990). U *Amoeba proteus* cykl ten powtarza się średnio co 2 sekundy (GRĘBECKI 1990, 1991, 1994). Rozdzielenie kompleksu błona-cytoskielet zachodzi również u *Dictyostelium discoideum* (SPUDICH 1989), a także w komórkach tkankowych: fibroblastach (HEATH 1983), keratynocytach (THERIOT i MITCHISON 1991) i makrofagach (HARTWIG i YIN 1988). Sugeruje się, że właśnie strefa frontalna kontroluje zarówno szybkość, jak i kierunek lokomocji (GRĘBECKI i współaut. 1981, GRĘBECKI 1987).

Ruch amebowy wymaga niezwykle precyzyjnej kontroli, zarówno transformacji zol-żel-zol, jak i cyklicznych zmian zachodzących w wierzchołkach wysuwanych nibynózek. Regulacja interakcji miozyny z aktyną, reologicznych właściwości cytoplazmy oraz zjawisk zachodzących w strefach frontalnych jest zależna od $[Ca^{2+}]_i$. Omówiony więc zostanie kolejno wpływ wapnia na funkcjo-

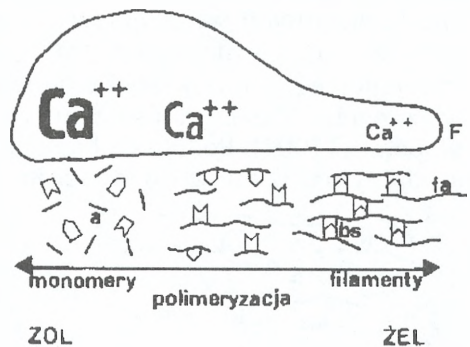


Rys. 2. Schemat funkcjonowania frontu amebowy. A — obkurczanie cylindra korykalnego połączonego z błoną; zatrzymanie przepływu endoplazmy. B — odklejenie warstwy kurczliwej od błony plazmatycznej; progresja strefy wiodącej. Ektoplazma (ek), endoplazma (en), front (F). Według A. GRĘBECKI 1990.

nowanie samego cytoszkieletu, a następnie rola jaką Ca^{2+} pełni w cyklicznych zjawiskach obserwowanych w strefach czołowych migrujących komórek.

W procesach żelifikacji biorą udział białka sieciujące F-aktynę. Żelifikacja natomiast jest konsekwencją dysocjacji tych białek i działania białek redukujących długość mikrofilamentów. Wykazano, że białka te przeprowadzają odwracalną transformację zol-żel w sposób zależny od stężenia w $[\text{Ca}^{2+}]_i$. W warunkach względnie wysokiego $[\text{Ca}^{2+}]_i$, to jest w uroidzie ameb działają białka rozluźniające strukturę żelu. Jedne z nich mogą ciąć mikrofilamenty, powodując rozpadanie się trójwymiarowej sieci na małe agregaty, inne wiążą się z jednym z końców filamentu aktywnego, zwanym po angielsku barbed-end czy monomerami aktywnymi determinując stopień polimeryzacji aktyny. Z komórek tkankowych wyizolowano bardzo wiele takich białek (SCHLIWA 1981, CRAIG i POLLARD 1982). U ameb zidentyfikowano dotychczas białka hamujące polimeryzację G-aktyny. Są to profilina i cytoplazmatyczna kinaza (REICHSTEIN i KORN 1979, MOCKRIN i KORN 1980, SONOBE i współaut. 1986). Jednocześnie, w warunkach wysokiego $[\text{Ca}^{2+}]_i$, które aktywuje kinazę i umożliwia fosforylację lekkiego łańcucha miozyny, formuje ona krótkie, grube filamente i wchodzi w interakcje z aktyną (CRAIG i współaut. 1983, TAYLOR 1986). Proces żelifikacji połączonej ze skurczem w tylnej strefie komórki jest stowarzyszony z przechodzeniem frakcji cytoszkieletalnej i białek regulujących do puli płynnej endoplazmy. W strefie frontalnej, gdzie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest niższe, zdepolimeryzowana aktyna, która dociera tu wraz ze strumieniem endoplazmy, ulega repolimeryzacji (KORN 1982). Jest to możliwe dzięki uwalnianiu białek hamujących polimeryzację. Jednocześnie białka sieciujące, które nie wymagają obecności jonów wapnia formują z mikrofilamentów ektoplazmatyczny żel (rys. 3). Grube filamente miozyny ulegają dysocjacji.

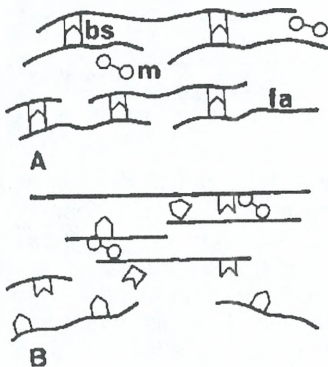
W komórkach mięśniowych, w przeciwieństwie do komórek mięśni, białka biorące udział w skurczu zmieniają miejsce w komórce. Podczas lokomocji stale przemieszczają się w strumieniu endoplazmy w kierunku frontu i wraz z warstwą korytkalną ku strefie uroidalnej (GRĘBECKI 1984, 1994). U *Dictyostelium discoideum* stwierdzono, że zmiana miejsca filamentów miozyny II w komórce jest kontrolowana przez poziom cytoplazmatycznego wapnia oraz wewnątrzkomórkowe pH. W migrującej amebie filamente te są skoncentrowane w tylnym rejonie komórki (YUMURA i współaut. 1984), gdzie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest stale podwyższone, a w czasie podziału znajduje się je w rejonie bruzdy (KITANISHI-YUMURA i FUKUI 1989, YUMURA i FUKUI 1985). Gromadzą się także w ograniczonych rejonach korteksu pod skupieniami receptorów powierzchniowych (CONDEELIS 1979). Ostatnio wykazano, że uwalnianie miozyny II z korteksu *Dictyostelium* do endoplazmy jest hamowane przez jony wapnia i kalmodulinę (YUMURA i KITANISHI-YUMURA



Rys. 3. Schemat zależności pomiędzy stężeniem Ca^{2+}_i w różnych strefach komórki a stopniem polimeryzacji aktyny i odwracalną transformacją zol — żel. Front (F), G — aktyna (a), F — aktyna (fa), białka sieciujące (bs). Według I. H. HARTWIG i H. L. YIN 1988.

1993). Podczas chemotaktycznej stymulacji cAMP, to jest w stadium agregacji komórek amebowych, wzrasta czasowo poziom cytoplazmatycznego wapnia (MALCHOW i współaut. 1987), a filamenty miozyny II przechodzą z endoplazmy do rejonu kortykalnego. LIU i NEWELL (1991) sugerują, że cGMP reguluje fosforylację miozyny, a tym samym jej asocjacje z cytoszkieletem poprzez regulację napływu Ca^{2+} do komórki. Wzrost stężenia Ca^{2+} zaczyna się w 6 sek. po rozpoczęciu stymulacji i maksimum osiąga po 30 sek. (BUMANN i współaut. 1984). Przemieszczenie miozyny II z endoplazmy do korteksu zachodzi po około 30 sek. od momentu zadziałania cAMP (NACHMIAS i współaut. 1989), co ściśle odpowiada maksimum wzrostu u $[\text{Ca}^{2+}]_i$. W tym samym czasie ma miejsce kurczenie i zaokrąglenie się komórek (FUTRELLE i współaut. 1982).

Pierwsze badania dotyczące roli wapnia w regulacji struktury cytoplazmy były prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych na modelach glicerynowych wielkich ameb, takich jak *Chaos carolinensis* czy *Amoeba proteus*, izolowanej cytoplazmie tych ameb (lit. zob. STOCKEM i KŁOPOCKA 1988), a także ekstrakcie z *Dictyostelium discoideum* (CONDEELIS i TAYLOR 1977). Wykazano, że dla reaktywacji modeli glicerynowych oraz indukcji strumienia endoplazmatycznego w izolowanej cytoplazmie jest niezbędne stężenie Ca^{2+} równe temu, które powoduje skurcz mięśni, to jest około 10^{-6}M (EBASHI i ENDO 1968). Manipulując stężeniem Ca^{2+} i MgATP można zmieniać stan izolowanej cytoplazmy lub ekstraktu komórkowego. Stężeniem progowym dla skurczu połączonego z dezorganizacją cytoszkieletu, a przy braku miozyny dla przejścia ze stanu żelu w zol, jest $7,0 \times 10^{-7}\text{M}$. Optimum żelifikacji jest osiągane przy stężeniu około $3,0 \times 10^{-8}\text{M}$ (rys. 4) (TAYLOR i współaut. 1973, TAYLOR i współaut. 1976, HELLEWELL i TAYLOR 1979, TAYLOR i CONDEELIS 1979, SONOBE i współaut. 1985). Przypuszcza się, że jednym z mechanizmów kontrolujących transformację zol — żel jest fosforylacja kompleksu profilina/G-aktyna, katalizowana przez kinazę przy wysokim $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i umożliwiająca tworzenie F-aktyny (SONOBE i współaut. 1986). Badania prowadzone na dużych amebach (*Chaos carolinensis* i *Amoeba proteus*) z użyciem fluorescencyjnych wskaźników Ca takich jak ekworyna, czy fura-2 wykazały przestrzenne zróżnicowanie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w migrujących komórkach i potwierdziły znaczenie tego jonu w ruchu ameboidalnym i niektórych zjawiskach z nim związanych (TAYLOR i współaut. 1980, KURODA i współaut. 1988, GOLLNICK i współaut. 1991). Podczas lokomocji komórek *Amoeba proteus* $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w rejonie uroidalnym utrzymuje się zawsze na poziomie około 10^{-7}M , podczas gdy w strefie



Rys. 4. Schemat pokazujący związek pomiędzy skurczem i żelifikacją żelu aktynowego: A — żel aktynowy; brak interakcji aktyny z miozyną, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ równe $3,0 \times 10^{-8}\text{M}$; B — żelifikacja żelu aktynowego, interakcja białek biorących udział w skurczu, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ równe $7,0 \times 10^{-7}\text{M}$. Filamenty aktynowe (fa), miozyna (m), białka sieciujące (bs). Według S. B. HELLEWELL i D. L. TAYLOR 1979.

frontalnej wynosi około 10^{-8} M. Ten stale utrzymujący się gradient wapniowy jest skorelowany z rozkładem przepływu strumienia cytoplazmy i kierunkiem lokomocji.

Uważa się, że źródłem Ca^{2+} kontrolującego funkcjonowanie warstwy kortalnej (COHEN i DE VRIES 1973, STOCKEM i KLEIN 1979) mogą być złogi wapniowe związane z błoną plazmatyczną. Wykryto je u *Amoeba proteus* (STOCKEM i KLEIN 1979), *Acanthamoeba castellanii* (SOBOTA 1985, SOBOTA i współaut. 1977, 1978), a także u *Dictyostelium discoideum* (DE CHASTELLIER i RYTER 1981, 1982). U *Dictyostelium* te lokalnie ograniczone miejsca wiązania Ca^{2+} są szczególnie liczne w rejonach komórki, w których błona podścielona jest siecią mikrofilamentów, a więc w filopodiach i kubkach fagocytarnych (DE CHASTELLIER i RYTER 1981). U *Amoeba proteus* są obecne w tylnym rejonie komórki, a więc tam gdzie poziom wolnego wapnia jest stale podwyższony. Sugeruje się, że magazyny te są formowane w rejonach ze zwiększoną przepuszczalnością błony komórkowej dla Ca^{2+} (STOCKEM i KLEIN 1979). Być może są one związane z domenami błony plazmatycznej, w których zbierają się kanały wapniowe. Badania elektrofizjologiczne wykazały ciągły napływ jonów Ca^{2+} w tylnej strefie komórki i ich usuwanie w rejonie przednim (KÜHTREIBER i JAFFE 1990, NUCCITELLI i współaut. 1977).

Oprócz utrzymującego się stale przestrzennego zróżnicowania stężenia wolnego wapnia, w migrujących komórkach obserwuje się również lokalne, spontaniczne zmiany poziomu tego jonu. Wykazano, że podczas ruchu dużych ameb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w ich strefach czołowych wzrasta rytmicznie co 1–4 sek. (TAYLOR i współaut. 1980). Ponieważ odrywanie się kolejnych warstw aktywnych spod błony powtarza się co około 2 sek., sugeruje się, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bezpośrednio pod błoną frontálną powoduje rozdzielenie kompleksu błona-cytoszkiet (GRĘBECKI 1994). Powstaje w ten sposób gradient ciśnienia hydrostatycznego, kontrolujący zarówno kierunek, jak i tempo lokomocji. Gdy stężenie wapnia spada jest możliwa reorganizacja cytoszkietu pod błoną frontu. Różnice ciśnienia zmniejszają się wówczas lub zanikają, endoplazma płynie wolniej lub zatrzymuje się, front przestaje się posuwać i może rozpocząć się jego wycofywanie (rys. 2). Na lokomocję ameb mogą mieć wpływ rozmaite bodźce zarówno fizyczne, jak i chemiczne. Za pomocą pozytywnych bodźców chemicznych (KOROHODA 1977) czy świetlnych (GRĘBECKI 1981), działających lokalnie na powierzchnię *Amoeba proteus* możliwe jest formowanie nowych frontów w dowolnym rejonie komórki. Czynniki te powodują bowiem destabilizację połączeń błona-cytoszkiet, poprzez wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ograniczony do strefy stymulacji i formowanie w tym miejscu nowego frontu. Powstanie nowego frontu z kolei reorientuje polaryzację ameby, a tym samym zmienia kierunek jej migracji (Grębecka 1988). Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obserwowano również pod wpływem chemotaktycznie pozytywnych bodźców przy krawędzi lamellipodiów komórek nabłonkowych (STROHMEIER i BEREITER-HAHN 1984, MITTAL i BEREITER-HAHN 1985) oraz w strefach czołowych granulocytów (Sewyer i współaut. 1985, TRUETT i współaut. 1988) i fibroblastów (ONUMA i HUI 1988). Pozytywny bodziec chemiczny powoduje wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia u amebowych form *Dictyostelium* (WICK i współaut. 1978, MALCHOW i współaut. 1982, FUKUI i YUMURA 1986). Sugeruje się, że kontrola ruchu u ameb bazuje właśnie na lokalnych zmianach $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i związanej z nimi cyklicznej dezintegracji połączeń błona-cytoszkiet (GRĘBECKI 1992).

WAPŃ JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK W REAKCJACH AMEB
NA BODŹCE ZEWNĘTRZNE

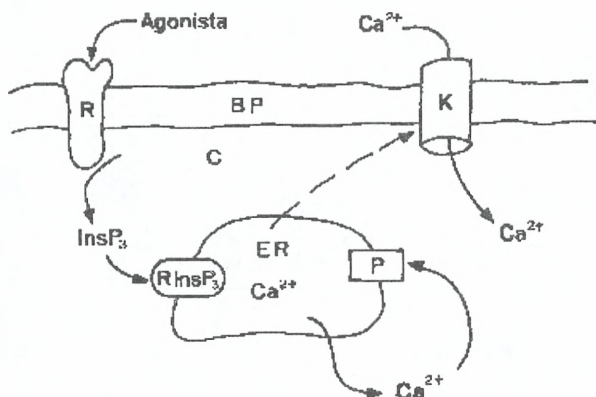
Nie tylko migracja ameb jest kontrolowana w sposób zależny od stężenia wolnego wapnia. Jest on zaangażowany w regulację wszystkich zjawisk związanych z aktywnością kurczliwą cytoszkieletu ameb, to jest endo- i egzocytozy, cytokinezy, transportu receptorów powierzchniowych, czy kontaktów międzykomórkowych. Wapń jest również wtórnym przekaźnikiem w reakcjach ameb wywoływanych przez rozmaite bodźce, zarówno czynniki chemotaktyczne, jak światło (UV), czy induktory pinocytotyczne. Dla tych komórek bowiem reakcją jest zwykle zmiana kierunku lub szybkości ruchu, zahamowanie lub podjęcie lokomocji, czy pinocytoza. Związane z Ca^{2+} reakcje na bodźce są badane od ponad stu lat. Wyniki dotyczące biochemicznej strony tych zjawisk pochodzą głównie z badań na komórkach tkankowych. Ameby pozostają przede wszystkim obiektem eksperymentów fizjologicznych.

Działanie bodźca powoduje zwykle przejściowy wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia. Jest on wynikiem uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów do cytoplazmy oraz napływu tego jonu do komórki przez kanały wapniowe w błonie plazmatycznej. Mobilizacja wapnia we wszystkich typach komórek jest związana z działaniem trisfosfoinozytolu (inozytolo (1,4,5)trisfosforan, w skrócie InsP_3) będącego produktem rozpadu fosfolipidów inozytolowych (według BARAŃSKA 1992, PUTNEY 1993). Ten wtórny przekaźnik informacji pojawia się w cytoplazmie w wyniku aktywacji określonej grupy receptorów powierzchniowych. Wzrostowi stężenia trisfosfoinozytolu towarzyszy zawsze wzrost poziomu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie ponieważ InsP_3 uwalnia wapń z cystern endoplazmatycznego retikulum (ER) poprzez wiązanie się do specyficznych receptorów w błonie tej organelli (według KWIATKOWSKA 1986, BERRIDGE i IRVINE 1989, PODDANA i BARAŃSKA 1991). Receptor InsP_3 jest jednocześnie kanałem wapniowym (FERRIS 1989, PODDANA i BARAŃSKA 1991). W wyniku konformacyjnych zmian, powodowanych przyłączeniem cząsteczki przekaźnika (GILL 1989), otwiera się i uwalnia Ca^{2+} do cytosolu (rys. 5).

Opróżnianie organelli magazynujących wapń jest sygnałem, który inicjuje napływ zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} do cytoplazmy. W komórkach pobudliwych wapń napływa zarówno przez kanały napięciowo-zależne, jak i receptorowe; w komórkach niepobudliwych, które nie posiadają kanałów wapniowych, regulowanych przez zmiany potencjału błonowego — przez jonowe kanały receptorowe (TSIEN i TSIEN 1990).

Mechanizm kontrolowania przepuszczalności błony plazmatycznej dla jonów wapnia pozostaje nadal kontrowersyjny. Badania prowadzone na limfocytach (KHAN i współaut. 1992) i zakończeniach nerwowych komórek węchowych (RESTREPO i współaut. 1990, KALINOSKI i współaut. 1992) wykazały, że InsP_3 stymuluje napływ Ca^{2+} do komórki przez interakcję ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej. W 1990 roku PUTNEY sugerował istnienie dyfundującego przekaźnika, uwalnianego z opróżnionych magazynów wapniowych, który inicjowałby napływ Ca^{2+} do komórki. Taki przekaźnik wyizo-

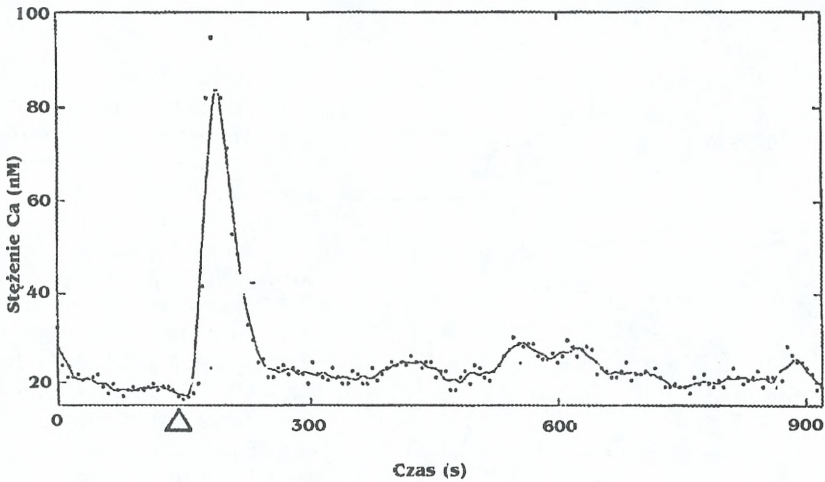
lowano ostatnio z limfocytów (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1993). Jest on uwalniany do cytoplazmy i w mniejszym stopniu do środowiska (rys. 5). Ponieważ powoduje napływ Ca^{2+} nie tylko do komórek, w których jest produkowany, ale również do nieaktywowanych makrofagów i fibroblastów, nazwano go Ca^{2+} -influx factor (CIF).



Rys. 5. Schemat mobilizacji Ca^{2+} w komórce spowodowany aktywacją receptora powierzchniowego (R). Działanie agonisty prowadzi do powstania InsP_3 . Łączy się on z receptorem — kanałem (R InsP_3) w błonie endoplazmatycznego retikulum (ER) i powoduje uwolnienie Ca^{2+} z cysterne ER do cytoplazmy (C). Opróżniony magazyn uwalnia przekaznik (CIF), który inicjuje napływ Ca^{2+} do komórki przez kanały wapniowe (K). Cytoplazmatyczny wapń jest ponownie transportowany do ER przez pompę wapniową (P). Błona plazmatyczna (BP). Według J. W. PUTNEY 1990.

U *Dictyostelium discoideum* stymulowanego cAMP $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wzrasta 2,6x (SARAN i współaut. 1994). Ze stymulacją cyklicznym AMP jest związane przechodzenie komórek ze stanu wegetatywnego do stanu agregacji, wapń jest więc zaangażowany prawdopodobnie zarówno w adhezję, jak i lokomocję małych ameb, konieczną dla uformowania pseudoplazmodium. Ponieważ opisane doświadczenia prowadzono w środowisku pozbawionym Ca^{2+} , wzrost poziomu tego jonu w cytoplazmie musiał odbywać się dzięki uwalnianiu go z magazynów wewnątrzkomórkowych (SARAN i współaut. 1994). Jednocześnie wykazano, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rozpoczyna się wcześniej niż napływ tego jonu do komórek. U *Amoeba proteus* gwałtowny, przejściowy wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} wywołują induktory pinocytotyczne, takie jak jony sodu (rys. 6) i potasu oraz czynniki powodujące powstawanie rozet: acetylcholina i chlorek choliny (KŁOPOCKA i POMORSKI w przygotowaniu). Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest zawsze skorelowany w czasie z zahamowaniem lokomocji, utratą adhezji i stopniowym zaokrągleniem się komórki (rys. 7). Zmiany te są spowodowane silnym kurczeniem się całej warstwy korykalnej. Ponieważ pinocytoza u wielkich ameb może zachodzić w środowisku bezwapniowym (JOHANSSON i JOSEFSSON 1978, STOCKEM i KLEIN 1988, KŁOPOCKA i Grębecka 1985), wydaje się, że podobnie jak u stymulowanego cAMP *Dictyostelium* i tutaj sygnał wapniowy jest wynikiem uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów. Sugeruje się, że spadek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ do poziomu sprzed stymulacji jest wynikiem ponownej sekwestracji wapnia. W wielu typach komórek niepobudliwych wykazano, że przejściowy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ może zachodzić niezależnie od napływu Ca^{2+} (ROONEY i współaut. 1990, LECHLEITER i współaut. 1991, MIYAZAKI 1991, DELISLE i WELSH 1992). Natomiast przy braku InsP_3 , sam napływ Ca^{2+} do cytoplazmy nie generuje

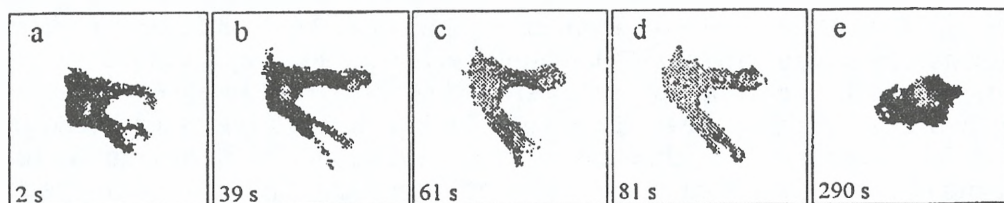
sygnału wapniowego (GIRARD i CLAPHAM 1993). Okazało się jednak, że wewnątrzkomórkowe sygnały wapniowe, które trwają dłużej niż kilka minut od momentu stymulacji zależą właśnie od napływu Ca^{2+} (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1993).



Rys. 6. Wykres zmian stężenia cytoplazmatycznego wapnia w komórce *Amoeba proteus* wywołanych 125mM NaCl. Grot strzałki pokazuje moment podania induktora.

Klasyczną reakcją komórek niepodobliwych na wiele bodźców jest czasowy, gwałtowny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, po którym przez czas jakiś utrzymuje się podwyższony nieco poziom cytoplazmatycznego wapnia. Reakcja jest więc dwufazowa — za pik są odpowiedzialne jony wapnia, uwalniane z magazynów wewnątrzkomórkowych, utrzymujące się plateau to wynik napływu Ca^{2+} do komórki (JACOB 1990a) spowodowany wzrostem przepuszczalności błony plazmatycznej dla tego jonu. Taki przebieg ma reakcja *Amoeba proteus* na induktory pinocytotyczne (Na^+ i K^+) (rys. 6). Utrzymujący się bardzo długo po indukcji podwyższony poziom wolnego wapnia w amebie jest prawdopodobnie odpowiedzialny za formowanie pinocytotycznych pseudopodiów. W niektórych komórkach efektem działania pewnych agonistów na receptory powierzchniowe jest lokalny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, falowo rozprzestrzeniający się w komórce. Uważa się, że lokalne zmiany poziomu wolnego Ca są ograniczone do obszarów cytoplazmy sąsiadujących z kanałami wapniowymi w błonie plazmatycznej i ER (JACOB 1990a, TSIEN i TSIEN 1990). Zjawisko falowego rozprzestrzeniania się sygnału wapniowego obserwowano po raz pierwszy w komórkach jajowych szkarłupni (JAFFE 1983). Występuje również w komórkach tkankowych (TSIEN i POENIE 1986, JACOB 1990b), a także u *Amoeba proteus* (KŁOPOCKA i POMORSKI w przygotowaniu) jako efekt działania jonów sodu (rys. 7) i chlorku cholinyl. Fale wapniowe mogą być poprzedzane przez lokalny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w jednym lub kilku miejscach inicjacji (ROONEY i Thomas 1993). Obecnie wiadomo, że rozprzestrzenianie się fal wapniowych nie jest wynikiem dyfuzji Ca^{2+} w cytoplazmie (współczynnik dyfuzji tego jonu jest zbyt niski). Ich przenoszenie jest raczej wynikiem dyfuzji InsP_3 (ALLBRITTON i MEYER 1993). Wydaje się, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem propagowania fal jest indukowane przez Ca^{2+} uwalnianie wapnia (WILLIAMS 1993, JAFFE 1993).

Wiele agonistów może w komórkach niepobudliwych, takich jak: hepatocyty (WOODS i współaut. 1986, 1987), komórki endotelialne (JACOB i współaut. 1988), makrofagi (KRUSKAL i MAXFIELD 1987), czy oocyty (CUTHBERSON i COBBOLD 1985, MIYAZAKI i współaut. 1987) indukować oscylacje wapniowe. Są one w tym przypadku konsekwencją zjawisk zachodzących w samej komórce, a nie jak w komórkach pobudliwych wynikiem periodycznych depolaryzacji błony plazmatycznej. Spontaniczne pulsacje wapniowe występują w strefach czołowych migrujących ameb (TAYLOR i współaut. 1980). Uważa się, że są one wynikiem cyklicznego uwalniania związanego z błoną wapnia.



Rys. 7. Ilustracje pokazujące zmiany w rozmieszczeniu cytoplazmatycznego Ca u *Amoeba proteus* po podaniu 125mM NaCl. Widoczne falowe rozprzestrzenianie się sygnału wapniowego (c i d). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ skorelowany w czasie ze zmianą kształtu komórki.

Mechanizmy związane z powrotem poziomu Ca do stanu sprzed zadziałania bodźca są automatycznie uruchamiane przez podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$. Obejmują one usuwanie Ca^{2+} przez błonę plazmatyczną na zewnątrz i zamykanie tego jonu w magazynach wewnątrzkomórkowych. Transport wapnia do wnętrza magazynów i na zewnątrz komórek jest regulowany przez zależną od jonów Mg ATP-azę (Ca^{2+} -Mg $^{2+}$ -ATPazę), zwaną pompą wapniową. U ameb wapń jest akumulowany w gładkim ER przy $[Ca^{2+}]_e$ równym 10^{-6} M (REINOLD i STOCKEM 1972) oraz w magazynach zlokalizowanych na cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej.

Odebranie sygnału wapniowego i uruchomienie procesów odpowiedzialnych za reakcję komórki jest funkcją wiążących wapń białek regulujących. Wykryto około 200 rodzajów takich białek (HEIZMANN 1991). Podzielono je na grupy w zależności od struktury i funkcjonowania (KUŹNICKI i KORDOWSKA 1992). Wszystkie one wiążą Ca^{2+} w granicach stężeń fizjologicznych i inicjują różnorodne reakcje komórek. Czytelników zainteresowanych działaniem tych białek odsyłam do książki A. TRETYNA (1994).

Reakcje komórek, których podstawą jest skurcz, są związane zawsze z aktywnością aktyny i miozyny. Znane są dwa mechanizmy, za pośrednictwem których Ca^{2+} reguluje interakcję tych białek. W mięśniach szkieletowych i komórkach mięśnia serca Ca^{2+} inicjuje skurcz przez wiązanie się do białka regulującego — tropomiozyny C, znosząc hamujący wpływ kompleksu troponina-tropomiozyna na interakcję aktyny z miozyną (GREASER i GERGELY 1971). W komórkach mięśni gładkich i komórkach niemięśniowych regulacja ta jest związana z odwracalną fosforylacją lekkiego łańcucha miozyny (SZENT-GYORGYI i współaut. 1973), katalizowaną przez specyficzne enzymy: kinazę i fosfatazę lekkiego łańcucha (ADELSTEIN i CONTI 1976). Niezależnie od mechanizmu regu-

lacji, interakcja aktyny z miozyna jest inicjowana przez $[Ca^{2+}]_i$ w granicach od 10^{-7} do $10^{-6}M$ w obecności MgATP (ADELSTEIN i współaut. 1977).

Od około 25 lat są identyfikowane i badane białka, które pośredniczą w zależnej od Ca^{2+} regulacji interakcji aktyny z miozyna. Grupę takich białek, bardzo podobnych w strukturze i funkcjonowaniu, określa się wspólną nazwą kalmoduliny (CaM). Kalmodulina jest najpowszechniej występującym białkiem wiążącym wapń. Zidentyfikowano ją w wielu zwierzęcych komórkach tkankowych i komórkach roślinnych (według TRETYN 1994). Od lat prowadzi się badania nad specyfiką działania tego białka w komórkach różnych gatunków pierwotniaków. Są wśród nich zarówno wiciowce, orzęski, jak i zarodkowe (KUŹNICKI 1986). Obecność CaM stwierdzono również u śluzowca *Physarum polycephalum* (KUŹNICKI i współaut. 1977, 1979). Kompleks kalmodulina-wapń (CaM.Ca) aktywuje w sposób zależny od Ca^{2+} , bezpośrednio albo pośrednio wiele enzymatycznych białek. Moduluje więc różnorodne funkcje komórkowe: skurcz mięśni gładkich, ruchy wici i rzęsek, endocytozę, egzocytozę i kariokinezę; odgrywa też ważną rolę w migracji komórek poruszających się ruchem ameboidalnym (patrz u HINRICHSEN 1993). Kalmodulina jest włączona w zależną od Ca^{2+} regulację ruchliwości polimorfonuklearnych neutrofilii (MARKS i współaut. 1991, CHATIŁA i współaut. 1989) i fibroblastów (HAHN i współaut. 1992). Jest białkowym pośrednikiem włączonym w regulację interakcji aktyny z miozyna u *Amoeba proteus* (KUŹNICKI i współaut. 1977, 1979) i *Acanthamoeba castellanii* (BRZESKA i współaut. 1992) co sugeruje, że ma wpływ na zjawiska ruchowe w tych komórkach. U *Dictyostelium discoideum* wykazano jednak ostatnio, że obniżenie poziomu CaM powoduje zaburzenia w cytokinezie, ale nie hamuje lokomocji (LIU i współaut. 1992). Może to oznaczać, że w tych komórkach kalmodulina nie jest bezpośrednio włączona w procesy związane z migracją. Z drugiej strony jednak wiadomo, że w komórkach *Dictyostelium*, podobnie jak w zwierzęcych komórkach tkankowych, znajdują się liczne białka, które wchodzi w interakcję z CaM (MARUTA i współaut. 1983, BENNETT i CONDEELIS 1988, FUKUI i współaut. 1989, STULL 1988). Obecnie uważa się, że CaM.Ca reguluje aktywność każdej komórki eukariotycznej. Sugeruje się również, że najwcześniejszą funkcją kalmoduliny w ewolucji *Eukaryota* była regulacja ruchliwości (MEANS i współaut. 1982). Ta z kolei jest, jak wiadomo, integrującym komponentem wielu zjawisk biologicznych od rozwoju do onkogenezy.

THE ROLE OF INTRACELLULAR CALCIUM IN AMEBOID MOVEMENT AND RELATED PHENOMENA

Summary

It is generally accepted that calcium is an essential factor in complicated movement phenomena in amoebae, and that it controls sol-gel-sol transformations and triggers contraction. The internal concentration of Ca^{2+} above $10^{-7}M$ induces contraction and transformation of ectoplasmic gel into endoplasmic sol at the uroid and in retracting pseudopodia. In the frontal aera where $[Ca^{2+}]_i$ is below $10^{-8}M$ the reconstruction of the rigid gel occurs. The intracellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients always correspond to the direction of cytoplasmic streaming and to the characteristic pattern of amoeboid movement. In large amoebae, calcium ions are involved in controlling the reversible equilibrium between G- and F-actin via profilin and cytoplasmic kinase.

External application of different stimuli abolishes the intracellular Ca^{2+} gradients existing previously and, in consequence, influences the motor behaviour of amoeba. The stimulation usually

leads to a transient increase in cytoplasmic calcium level which triggers different responses of amoebae.

Elevation of $[Ca^{2+}]_i$ automatically actuates the mechanisms that pump Ca^{2+} out of the cytosol, either out of the cell across the plasma membrane or into intracellular stores. In giant amoebae two Ca^{2+} stores have been described: internal plasma membrane-attached binding sites and elements of the smooth endoplasmic reticulum.

LITERATURA

- ADELSTEIN R. S., CHACKO S., STYLIANOS P., SCORDILIS P., BARYŁKO B., CONTI M. A., TROTTER J. A., 1977. *The role of Ca^{2+} and myosin phosphorylation in regulating actomyosin in smooth muscle and non-muscle cells.* [W:] *Calcium-binding Proteins and Calcium Function.* WASSERMAN R. H., CORRADINO R. A., CARAFOLI E., KRETSINGER R. H., MACLENNAN D. H., SIEGEL F. L. (red.). North-Holland-New York, New York-Amsterdam-Oxford, 251-261.
- ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., 1976. *The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase.* [W:] *Cell Motility.* GOLDMAN R., POLLARD T., ROSENBAUM J. (red.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor-N. Y., 725-738.
- ALLBRITTON N. L., MEYER T., 1993. *Localized calcium spikes and propagating calcium waves.* *Cell Calcium* 14, 691-697.
- BARAŃSKA J., 1992. *Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce.* Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa.
- 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. Cytoskeleton* 11, 303-317.
- BERRIDGE M.J., IRVINE R.F., 1989. *Inositol phosphates and cell signalling.* *Nature* 341, 197-204.
- BERSHADSKY A. D., VASILIEV J. M., 1988. *Cytoskeleton.* Plenum Press., New York-London.
- BRZESKA H., KULESZA-LIPKA D., KORN E., 1992. *Inhibition of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase by Ca^{2+} -calmodulin.* *J. Biol. Chem.* 267, 23870-23875.
- BUMANN J., WURSTER B., MALCHOW D., 1984. *Attractant-induced changes and oscillations of the extracellular Ca^{2+} concentration in suspensions of differentiating Dictyostelium cells.* *J. Cell Biol.* 98, 173-178.
- CHATILA T., GEHA R., ARNAOUT M., 1989. *Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules.* *J. Cell Biol.* 109, 3435-3444.
- COHEN I., DE VRIES A., 1973. *Platelet contractile regulation in an isometric system.* *Nature* 246, 36-37.
- 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.
- CONDEELIS J. S., TAYLOR D. L., 1977. *The contractile basis of ameboid movement. V. The control of solation, gelation, and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum.* *J. Cell Biol.* 74, 901-927.
- CRAIG S. W., POLLARD T. D., 1982. *Actin binding proteins.* *Trends Biochem. Sci.* 7, 88-92.
- CRAIG R., SMITH R., KENDRICK-JONES J., 1983. *Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules.* *Nature (London)* 302, 436-439.
- CUTHBERSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1985. *Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} .* *Nature* 316, 541-542.
- DE CHASTELLIER C., RYTER A., 1981. *Calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Dictyostelium discoideum and their possible relation with contractile proteins.* *Biol. Cell* 40, 103-113.
- DE CHASTELLIER C., RYTER A., 1982. *Calcium deposits at the plasma membrane of Dictyostelium discoideum during phagocytosis and cell motility.* *Biol. Cell* 43, 121-128.
- DE LISLE S., WELSH M. J., 1992. *Inositol trisphosphate is required for the propagation of calcium waves in Xenopus oocytes.* *J. Biol. Chem.* 267, 7963-7966.
- EBASHI S., ENDO M., 1968. *Calcium ion and muscle contraction.* *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18, 123-183.
- FERRIS D. C., HUGANIR R. L., SUPATTAPONE S., SNYDER S. H., 1989. *Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles.* *Nature* 342, 87-89.
- FUKUI Y., LYNCH T., BRZESKA H., KORN E., 1989. *Myosin I is located at the leading edges of locomoting Dictyostelium amoebae.* *Nature* 341, 328-331.
- FUKUI Y., YUMURA S., 1986. *Actomyosin dynamics in chemotactic amoeboid movement of Dictyostelium.* *Cell Motil. Cytosk.* 6, 662-673.

- FUTRELLE R. P., TRAUT J., MCKEE W. G., 1982. *Cell behavior in Dictyostelium discoideum: Preaggregation response to localized cyclic AMP pulses.* J. Cell Biol. 92, 807-821.
- GILL D. L., 1989. *Receptor kinships revealed.* Nature 342, 16-18.
- GIRARD S., CLAPHAM D., 1993. *Acceleration of intracellular calcium waves in Xenopus oocytes by calcium influx.* Science 260, 229-232.
- GOLLNICK F., MEYER R., STOCKEM W., 1991. *Visualization and measurement of calcium transients in Amoeba proteus by fura-2 fluorescence.* Eur. J. Cell Biol. 55, 262-271.
- GREASER M. L., GERGELY J., 1971. *Reconstitution of troponin activity from three protein components.* J. Biol. Chem. 246, 4226-4233.
- GRĘBECKA L., 1988. *Polarity of the motor functions in Amoeba proteus. I. Locomotory behaviour.* Acta Protozool. 27, 83-96.
- GRĘBECKI A., 1981. *Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications.* Eur. J. Cell Biol. 24, 163-175.
- GRĘBECKI A., 1982. *Supramolecular aspects of amoeboid movement. Progress in Protozoology. Proceedings of the VI International Congress on Protozoology, part 1, 117-130.*
- GRĘBECKI A., 1984. *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.
- GRĘBECKI A., 1986. *Relationship between cytoskeleton and motility.* Insect Sci. Applic. 7, 379-386.
- GRĘBECKI A., 1986. *Organizacja przestrzenna mechanizmów napędowych i sterujących w ruchu amebowym.* Postępy Biologii Komórki 13, 175-194.
- GRĘBECKI A., 1987. *Mechanizmy ruchów amebowych.* [W:] Komórka — jej budowa i ruch. KUŹNICKI L. (red.), Wszechnica Polskiej Akademii Nauk (Ossolineum), Wrocław-Warszawa, 133-186.
- GRĘBECKI A., 1990. *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement.* Protoplasma 154, 98-111.
- GRĘBECKI A., 1991. *Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae.* Protoplasma 160, 144-158.
- GRĘBECKI A., 1992. *Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych.* Kosmos, 41, 7-38.
- GRĘBECKI A., 1994. *Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae.* Int. Rev. Cytol. 148, 37-80.
- GRĘBECKI A., GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., 1981. *Testing steering functions of the frontal zone in the locomotion of Amoeba proteus.* Cell Biol. Int. Rep. 5, 595-599.
- HAHN K., DEBIASIO R., TAYLOR D. L., 1992. *Patterns of elevated free calcium and calmodulin in living cells.* Nature 359, 736-738.
- HARTWIG J. H., YIN H. L., 1988. *The organization and regulation of the macrophage actin skeleton.* Cell Motil. Cytosk. 10, 117-126.
- HEATH J. P., 1983. *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shape microfilament bundles beneath the dorsal cell surface.* J. Cell Sci. 60, 331-354.
- HEIZMANN C. W., 1991. *Calcium-binding proteins of the EF-hand-type and of the annexin family: a survey.* [W:] Novel Calcium-Binding Proteins. HEIZMANN C. W. (red.), Springer-Verlag, Berlin, 39-49.
- HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., 1979. *The contractile basis of amoeboid movement.* J. Cell Biol. 83, 633-648.
- HINRICHSEN R. D., 1993. *Calcium and calmodulin in the control of cellular behavior and motility.* Biochem. Biophys. Acta 1155, 277-293.
- JACOB R., 1990a. *Calcium oscillations in electrically non-excitabile cells.* Biochem. Biophys. Acta 1052, 427-438.
- JACOB R., 1990b. *Imaging cytoplasmic free calcium in histamine stimulated endothelial cells and in fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils.* Cell Calcium 11, 241-249.
- JACOB R., MERRITT J. E., HALLAM T. J., RINK T. J., 1988. *Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells.* Nature 335, 40-45.
- JAFFE L. F., 1983. *Source of calcium in egg activation: A review and hypothesis.* Dev. Biol. 99, 265-276.
- JAFFE L. F., 1993. *Classes and mechanisms of calcium waves.* Cell Calcium 14, 736-745.
- JOHANSSON P., JOSEFSSON J.-O., 1978. *Evidence for a dual effect of intracellular Ca⁺⁺ on pinocytosis.* Acta Physiol. Scand. 102, 71A-72A.
- KALINOSKI D. L., ALDINGER S. B., BOYLE A. G. i współaut., 1992. *Characterization of a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in isolated olfactory cilia.* Biochem. J. 281, 449-456.
- KHAN A. A., STEINER J. P., KLEIN M. G., SCHNEIDER M. F., SNYDER S. H., 1992. *IP₃ receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor.* Science 257, 815-818.

- KITANISHI-YUMURA T., FUKUI Y., 1989. Actomyosin organization during cytokinesis: reversible translocation and differential redistribution in *Dictyostelium*. Cell Motil. Cytoskel. 12, 78-89.
- KŁOPOCKA W., GRĘBECKA L., 1985. Effects of bivalent cations on the initiation of Na-induced pinocytosis in *Amoeba proteus*. Protoplasma 126, 207-214.
- KŁOPOCKA W. T., POMORSKI P., 1995. Cytoplasmic calcium transients in *Amoeba proteus* during induction of pinocytotic and non-pinocytotic rosettes. Eur. J. Cell Biol.
- KORN E. D., 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiol. Rev. 62, 672-736.
- KOROHODA W., 1977. Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of *Amoeba proteus* and its bearing on the theories of amoeboid movement. Cytobiologie 14, 338-349.
- KRUSKAL B. A., MAXFIELD F. R., 1987. Cytosolic free calcium increases before and oscillates during frustrated phagocytosis in macrophages. J. Cell Biol. 105, 2685-2693.
- KÜHTREIBER M., JAFFE L. F., 1990. Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. J. Cell Biol. 110, 1565-1573.
- KURODA K., YOSHIMOTO Y., HIRAMOTO Y., 1988. Temporal and spatial localization of Ca^{2+} in moving *Amoeba proteus* visualized with aequorin. Protoplasma 144, 64-67.
- KUŹNICKI L., 1986. Calmodulin regulated processes in protistan motility. Acta Protozool. 25, 295-304.
- KUŹNICKI J., KORDOWSKA J., 1992. Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych. Kosmos 41, 105-121.
- KUŹNICKI J., KUŹNICKI L., DRABIKOWSKI W., 1977. Ca^{2+} -regulation of motility and troponin C-like proteins in Protozoa and Myxomycete. Proceedings of the 6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, 29-30 September, 67-68.
- KUŹNICKI J., KUŹNICKI L., DRABIKOWSKI W., 1979. Ca^{2+} -binding modulator protein in Protozoa and Myxomycete. Cell Biol. Int. Rep. 3, 17-23.
- KWIATKOWSKA J., 1986. Fosfolipidy inozytowe w przetwarzaniu informacji w komórkach. Post. Biochem. 32, 329-334.
- LECHLEITER J., GIRARD S., PERALTA E., CLAPHAM D., 1991. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. Science 252, 123-126.
- LIU G., NEWELL P. C., 1991. Evidence that cyclic GMP may regulate the association of myosin II heavy chain with the cytoskeleton by inhibiting its phosphorylation. J. Cell Sci. 98, 483-490.
- LIU T., WILLIAMS J., CLARKE M., 1992. Inducible expression of calmodulin antisense RNA in *Dictyostelium* cells inhibits the completion of cytokinesis. Mol. Biol. Cell 3, 1403-1413.
- MALCHOW D., BOHME R., GRAS U., 1982. On the role of calcium in chemotaxis and oscillations of *Dictyostelium* cells. Biophys. Struct. Mech. 9, 131-136.
- MALCHOW D., NANJUNDIAH V., WURSTER B., ECKSTEIN F., GERISH G., 1987. Cyclic AMP-induced pH changes in *Dictyostelium discoideum* and their control by calcium. Biochim. Biophys. Acta 538, 473-480.
- MARSH P., HENDEY B., MAXFIELD F., 1991. Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. J. Cell Biol. 112, 149-158.
- MARUTA H., BALTES W., DIETER P., MARME D., GERISCH G., 1983. Myosin heavy chain kinase inactivated by Ca^{2+} /calmodulin from aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*. EMBO J. 2, 535-542.
- MEANS A. R., TASH J. S., CHAFOULEAS J. G., 1982. Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. Physiol. Rev. 62, 1-39.
- MITTAL A. K., BEREITER-HAHN J., 1985. Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells. Cell Motil. 5, 123-136.
- MIYAZAKI S., 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. Cell Calcium 12, 205-216.
- MIYAZAKI S.-I., HASHIMOTO N., YOSHIMOTO Y., KISHIMOTO T., IGUSA Y., HIRAMOTO Y., 1987. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. Dev. Biol. 118, 259-267.
- MOCKRIN S. C., KORN E. D., 1980. *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-Triphosphate. Biochemistry 19, 5359-5362.
- NACHMIAS V. T., FUKUI Y., SPUDICH J. A., 1989. Chemoattractant-elicited translocation of myosin in motile *Dictyostelium*. Cell Motil. Cytoskel. 13, 158-169.
- NUCCITELLI R., POO M.-M., JAFFE L. F., 1977. Relations between amoeboid movement and membrane-controlled electrical currents. J. Gen. Physiol. 69, 743-763.
- ONUMA E. K., HUI S. W., 1988. Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. J. Cell Biol. 106, 2067-2075.
- PODDANA H., BARAŃSKA J., 1991. Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach. Post. Biochem. 37, 2-5.

- POLLARD T. D., KORN T. D., 1973. *Acanthamoeba myosin*. J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.
- PUTNEY J. W. (Jr), 1990. *Capacitative calcium entry revisited*. Cell Calcium 11, 611-624.
- PUTNEY J. W. (Jr.), 1993. *Excitement about calcium signaling in inexcitable cells*. Science 262, 676-678.
- RANDRIAMAMPITA C., TSIEN R. Y., 1993. *Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx*. Nature 364, 809-814.
- REICHSTEIN E., KORN E. D., 1979. *Acanthamoeba profilin: protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation*. J. Biol. Chem. 254, 6174-6179.
- REINOLD M., STOCKEM W., 1972. *Darstellung eines ATP-sensitiven Membransystems mit Ca²⁺-transportierender Funktion bei Amöben*. Cytophologie 6, 182-194.
- RESTREPO D., MIYAMOTO T., BRYANT B.P., TEETER J. H., 1990. *Odor stimulus tigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel cat fish*. Science 249, 1166-1168.
- ROONEY T. A., SASS E., THOMAS A. P., 1990. *Agonist-induced cytosolic calcium oscillations originate from a specific locus in single hepatocytes*. J. Biol. Chem. 265, 10792-10796.
- ROONEY T. A., THOMAS A. P., 1993. *Intracellular calcium waves generated by Ins(1,4,5)P3-dependent mechanisms*. Cell Calcium 14, 674-690.
- SARAN S., NAKAO H., TASAKA M., IIDA H., TSUJI F.I., NANJUNDIAH V., TAKEUCHI I., 1994. *Intracellular free calcium level and its response to cAMP stimulation in developing Dictyostelium cells transformed with jellyfish apoequorin cDNA*. FEBS Letters 337, 43-47.
- SCHLIWA M., 1981. *Proteins associated with cytoplasmic actin*. Cell 25, 587-590.
- SEWYER D. W., SULLIVAN J. A., MANDELL G. L., 1985. *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. Science 230, 663-666.
- SOBOTA A., 1985. *Subplasmalemmal calcium-binding microregions in Acanthamoeba*. J. Cell Sci. 79, 217-235.
- SOBOTA A., HREBENDA B., PRZEŁĘCKA A., 1977. *Formation of calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Acanthamoeba castellanii*. Cytophologie 15, 259-268.
- SOBOTA A., PRZEŁĘCKA A., JANOSSY A. G. S., 1978. *X-ray microanalysis of calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Acanthamoeba castellanii*. Cytophologie 17, 464-469.
- SONOBE S., HATANO S., KURODA K., 1985. *Cytoplasmic movement in a glycerinated model of Amoeba proteus*. [W:] *Cell motility: Mechanism and Regulation*. ISHIKAWA H., HATANO S., SATO H. (red.). University of Tokyo Press, Tokyo, 271-282.
- SONOBE S., TAKAHASHI S., HATANO S., KURODA K., 1986. *Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization*. J. Biol. Chem. 261, 14837-14843.
- SPUDICH J. A., 1989. *In pursuit of myosin function*. Cell Regln. 1, 1-11.
- STOCKEM W., HOFFMANN H. U., 1986. *Microfilament organization and function in Amoeba proteus*. Acta Protozool. 25, 245-254.
- STOCKEM W., KLEIN H-P., 1979. *Pinocytosis and locomotion in amoebae. XV. Demonstration of Ca⁺⁺-binding sites during induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Protoplasma 100, 33-43.
- STOCKEM W., KLEIN H. P., 1988. *Pinocytosis and Locomotion of Amoebae XVII. Influence of different cations on induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Europ. J. Protisol. 23, 317-326.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. *Ameboid movement and related phenomena*. Int. Rev. Cyt. 112, 137-183.
- STROHMEIER R., BEREITER-HAHN J., 1984. *Control of cell shape and locomotion by external calcium*. Exp. Cell Res. 154, 412-420.
- STULL J., 1988. *Myosin light chain kinase and caldesmon: biochemical properties and roles in skeletal and smooth muscle*. [W:] *Calmodulin*. COHEN P, KLEE C. (red.). Elsevier, New York, 91-122.
- SZENT-GYORGYI A. G., SZENTKIRALEY E. M., KENDRICK-JONES J., 1973. *The light chains of scallop myosin as regulatory subunits*. J. Mol. Biol. 74, 179-203.
- TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G., 1980. *Contractile basis of ameboid movement. VIII. Aequorin luminescence during ameboid movement, endocytosis, and capping*. J. Cell Biol. 86, 599-607.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., 1979. *Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells*. Int. Rev. Cytol. 56, 57-144.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., MOORE P. L., ALLEN R. D., 1973. *The contractile basis of ameboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm*. J. Cell Biol. 59, 378-394.
- TAYLOR D. L., FECHHEIMER M., 1982. *Cytoplasmic structure and contractility: the solation-contraction coupling hypothesis*. Ohil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 185-197.
- TAYLOR D. L., HELLEWELL S. B., VIRGIN H. W., HEIPLE J., 1979. *The solation-contraction coupling hypothesis of cell movement*. [W:] *Cell Motility: Molecules and Organization*. HATANO S., ISHIKAWA H., SATO H., (red.). University of Tokyo Press, Tokyo, 363-367.

- TAYLOR D. L., MOORE P. L., CONDEELIS J. S., ALLEN R. D., 1976. *The mechanochemical basis of amoeboid movement. I. Ionic requirements for maintaining viscoelasticity and contractility of amoeba cytoplasm.* Exp. Cell Res. 101, 127–133.
- TAYLOR E. W., 1986. *Cell motility.* J. Cell Sci. Suppl. 4, 89–102.
- THERIOT J. A., METCHISON T. J., 1991. *Actin microfilament dynamics in locomoting cells.* Nature 352, 126–131.
- TRETYN A., 1994. *Wapń w komórkach eukariotycznych występowanie, transport i komórkowy mechanizm działania.* SKUPIŃSKA M. (red). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- TRUETT A. P., VERGHESE M. V., DILLON R. B., SNYDERMAN R., 1988. *Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1549–1553.
- TSIEN R. W., TSIEN R. Y., 1990. *Calcium channels, stores, and oscillations.* Annu. Rev. Cell Biol. 6, 715–760.
- TSIEN R. Y., POENIE M., 1986. *Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling.* Trends Biochem. Sci. 11, 450–455.
- WICK U., MALCHOW D., GERISCH G., 1978. *Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of Dictyostelium discoideum.* Cell Biol. Int. Rep. 2, 71–79.
- WILLIAMS D. A., 1993. *Mechanisms of calcium release and propagation in cardiac cells. Do studies with confocal microscopy add to our understanding?* Cell Calcium 14, 724–735.
- WOODS N. M., CUTHBERSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1987. *Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes.* Cell Calcium 8, 79–100.
- WOODS N. M., CUTHBERSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1986. *Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes.* Nature 319, 600–602.
- YUMURA S., FUKUI Y., 1985. *Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in Dictyostelium.* Nature 314, 194–196.
- YUMURA S., KITANISHI-YUMURA T., 1993. *A mechanism for the intracellular localization of myosin II filaments in the Dictyostelium amoeba.* J. Cell Sci. 105, 233–242.
- YUMURA S., MORI H., FUKUI Y., 1984. *Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence.* J. Cell Biol. 99, 894–899.