

WANDA KŁOPOCKA

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN*

*Zakład Biologii Komórki*

*Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

## ROLA CYTOSZKIELETU W ENDOCYTOZIE W KOMÓRKACH TKANKOWYCH I PINOCYTOZIE U AMEB

Wymiana substancji pomiędzy komórką a środowiskiem jest jednym z warunków prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów. Małe cząsteczki przenikają przez błonę komórkową drogą transportu biernego w kierunku zgodnym z gradientem elektrochemicznym oraz transportu aktywnego, wymagającego dopływu energii metabolicznej. Natomiast przeprowadzanie przez błonę takich związków, jak białka, polinukleotydy czy wielocukry jest możliwe dzięki endocytozie i egzocytozie — zjawiskom polegającym na tworzeniu pęcherzyków, w których makrocząsteczki są odpowiednio wprowadzane do komórki albo z niej usuwane. Endo- i egzocytoza występują we wszystkich organizmach eukariotycznych. Tą drogą przeprowadzają różne substancje przez błonę plazmatyczną zarówno komórki swobodnie żyjące, jak i tkankowe z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów. U ameb endocytozę, w czasie której wchłaniane są cząstki mniejsze niż 1mm, określa się terminem pinocytozy (ALLISON i DAVIES 1974).

Egzocytoza umożliwia usuwanie z komórki zbędnych produktów metabolizmu i wydzielanie określonych substancji. Jest więc związana z procesem wydalania i sekrecji. Endocytoza, odwrotnie, umożliwia pobieranie pokarmu i płynów zewnątrzkomórkowych, czynników wzrostu oraz hormonów. Obydwa zjawiska — endo- i egzocytoza — są zaangażowane w transport makrocząsteczek przez komórki a także w kontrolę składu białek błony komórkowej. Internalizowane drogą endocytozy białka mogą bądź powracać nietknięte na powierzchnię komórki, bądź podlegać degradacji w lizosomach.

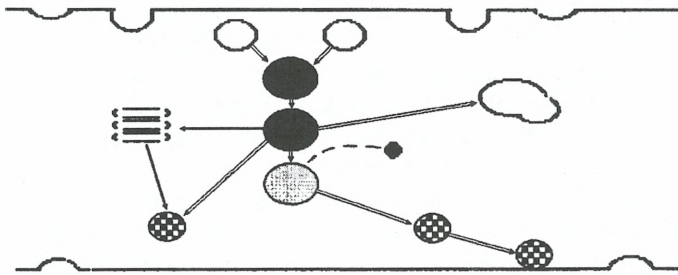
Wbudowywanie w powierzchnię komórki elementów błony jest możliwe także dzięki egzocytozie (rys. 1). W komórkach spolaryzowanych niektóre substancje mogą być przeprowadzane w pęcherzykach endocytotycznych z jednego bieguna komórki na przeciwny. W proces ten, zwany transcytozą (MOSTOV i SIMISTER 1985), są włączone zarówno endo-, jak i egzocytoza. Transcytoza występuje między innymi w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych.

---

Skróty użyte w tekście: LDL — lipoproteiny o niskiej gęstości; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; MDCK — nabłonkowe komórki nerki; PMA — octan mirystylowo-forbolowy; M6P — mannozo- 6-fosforan; GTP — guanozynotrifosforan; ATP — adenozynotrifosforan.

Ze względu na sposób indukcji i mechanizm działania induktorów wyróżnia się endocytozę adsorpcyjną (receptorową) oraz endocytozę fazy płynnej. Morfologicznie endocytoza rozpoczyna się tworzeniem niewielkiego zagłębienia w błonie. Następnymi etapami zjawiska jest dalsza inwaginacja i utworzenie pęcherzyka endocytotycznego w wyniku fuzji przylegających do siebie zewnętrznych powierzchni błony komórkowej u wlotu zagłębienia. Po zamknięciu pęcherzyk odrywa się od powierzchni i przemieszcza w głąb komórki, gdzie w wyniku fuzji z innymi pęcherzykami tworzy tak zwane wczesne endosomy (rys. 1), we wczesnych endosomatozach w przypadku endocytozy receptorowej zwykle następuje oddzielenie indukującego liganda od receptora, który powraca wówczas nietknięty na powierzchnię komórki (SMYTHE i WARREN 1991, STAHL i SCHWARTZ 1986). Niektóre receptory, na przykład LDL, mogą w czasie swego istnienia wprowadzić do komórki do 300 cząsteczek liganda (BROWN i współaut. 1983, WILEMAN i współaut. 1984). Inne, jak receptor insuliny czy Fc, są degradowane po przekazaniu do endosomów tylko jednej lub kilku cząsteczek (MELLMAN i PLUTNER 1984). Endosomy wczesne tworzą w drodze fuzji endosomy późne. Ich zawartość może być usunięta na zewnątrz — u ameb bezpośrednio (STOCKEM i CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU 1993), w komórkach tkankowych za pośrednictwem aparatu Golgiego (rys. 1). Jeśli pobrane substancje mają ulec rozkładowi, są przeprowadzane do lizosomów (rys. 1) — głównego miejsca rozkładu białek w komórce.

## ENDOCYTOZA



## EGZOCYTOZA

### objaśnienia:



Rys. 1. Schemat ilustrujący wędrowkę (strzałki podwójne) pobieranych drogą endocytozy substancji w komórkach tkankowych i u ameb.

Strzałki pojedyncze pokazują etapy przemian, jakim podlega zawartość pęcherzyków endocytotycznych tylko w komórkach tkankowych (wg GRUENBERG i HOWELL 1989 oraz SMYTHE i WARREN 1991).

Zawartość endosomów może też być przekazana do magazynów wewnątrzkomórkowych.

### ENDOCYTOZA FAZY PŁYNNEJ

Ten rodzaj endocytozy jest indukowany przez czynniki znajdujące się stale w środowisku i jest bezpośrednio zależny od ich stężenia. Podczas endocytozy płynnej środowisko otaczające komórki jest pochłaniane w sposób ciągły i nie-selektywny. Endocytoza fazy płynnej występuje zarówno w komórkach swobodnie żyjących, jak też w różnych typach komórek tkankowych, takich jak mięśnie, komórki nerwowe, czy makrofagi. U *Amoeba proteus* proces ten jest znany pod nazwą permanentnej pinocytozy (WOHLFARTH-BOTTERMANN i STOCKEM 1966, KOMNICK i współaut. 1973, STOCKEM 1977), zachodzi bowiem stale w tylnych strefach migrujących komórek. Uważa się, że zjawisko to jest związane z ciągłą wymianą błony między powierzchnią ameby a jej wnętrzem. Endocytozę fazy płynnej określa się często mianem mikropinocytozy ze względu na rozmiary tworzących się pęcherzyków. U ameb ich średnica nie przekracza 5  $\mu\text{m}$ , a w komórkach tkankowych 0,2  $\mu\text{m}$ . Wyniki wielu doświadczeń wskazują, że w procesie formowania i transportu mikroendocytotycznych pęcherzyków mogą być zaangażowane filamenty aktynowe. Stwierdzono, że aktywność mikropinocytozy w komórkach tkankowych wzrasta podczas fałdowania powierzchniowego (RIDLEY 1994). Powstające w wyniku aktywacji komórki pofałdowania błony, których tworzenie jest zależne od polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny (COOPER 1991, STOSSEL 1993) mogą tworzyć mikropinosomy (BAR-SAGI i FERAMISCO 1986, KELLER 1990, WARN i współaut. 1993). Cytochalazyna D hamuje lub stymuluje zarówno endocytozę fazy płynnej, jak też fałdowanie powierzchni zależnie od rodzaju komórki, czynnika indukującego oraz warunków, w których zjawiska te zachodzą. W komórkach MDCK (GOTTLIEB i współaut. 1993) oraz w komórkach nerki jednej z małp afrykańskich (SANDVIG i VAN DEURS 1990) cytochalazyna D selektywnie hamuje endocytozę fazy płynnej indukowaną przez rycynę i żółcień lucyferową. KELLER i NIGGLI (1995) wykazali natomiast, że w ludzkich obojętno-chłonnych granulocytach, stymulowanych PMA cytochalazyna D znosi fałdowanie powierzchniowe, hamuje ruchliwość lecz wpływa stymulująco na mikropinocytozę indukowaną przez PMA. W zjawisko to nie są jednak zaangażowane mikrotubule. Zgodnie bowiem z wynikami tej samej pracy stymulacja endocytozy fazy płynnej cytochalazyną D nie jest hamowana przez kolchicynę.

### ENDOCYTOZA RECEPTOROWA W KOMÓRKACH TKANKOWYCH

Induktorami endocytozy receptorowej są wielowartościowe cząsteczki zwane ligandami (ALBERTS i współaut. 1983). Mechanizm indukcji tego typu endocytozy polega na selektywnym wiązaniu się cząsteczki liganda z receptorem powierzchniowym. Wystąpienie zjawiska jest więc zależne zarówno od stężenia cząsteczek indukujących w środowisku, jak też ich powinowactwa do receptorów. U makrofagów obserwowano również endocytozę receptorową niespecyficzną.

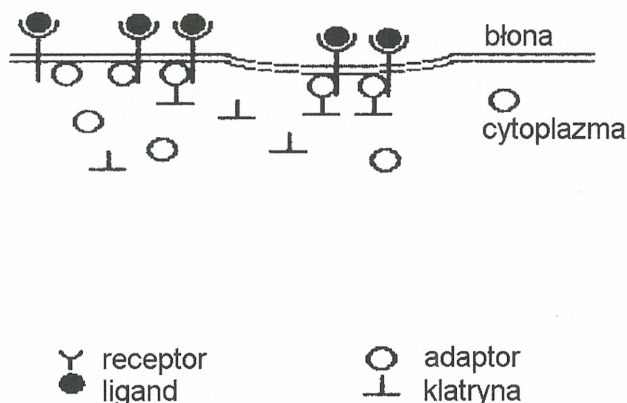
Jest ona indukowana przez wiązanie anionowych makromolekuł do kationowych receptorów, a więc przez zmianę ładunku na powierzchni komórki (ONO i SENO 1986).

Różne rodzaje substancji są wprowadzane do wnętrza (internalizowane): odżywcze (transferyna, cholesterol), czynniki wzrostowe (np. naskórkowy czynnik wzrostu — EGF), hormony (m.in. insulina), wirusy grypy a także różnego rodzaju toksyny (FALLON i SCHWARTZ 1985, SMYTHE i WARREN 1991). W pobieranie tych substancji drogą endocytozy jest zaangażowanych wiele klas receptorów. Receptory te posiadają zewnętrzną domenę hydrofilową wiążącą ligand, krótki hydrofobowy odcinek błonowy i zakończenie cytoplazmatyczne, odpowiedzialne za przekazanie sygnału (FALLON i SCHWARTZ 1985). Wiele receptorów po przyłączeniu liganda gromadzi się w wyspecjalizowanych rejonach błony plazmatycznej, podścielonych płaszczem klatrynowym, zwanych „coated pits” (CP) i dopiero wtedy ulega internalizacji (ROTH i PORTER 1964, ANDERSON i współaut. 1977). Tworzenie CP jest procesem wieloetapowym (rys. 2), który obejmuje:

1) Wiązanie się kompleksów białek zwanych adaptorami do błony plazmatycznej (VIGERS i współaut. 1986). Wykazano, że łączą się one z cytoplazmatycznym zakończeniem receptorów, między innymi receptorów LDL i M6P (PEARSE 1988, GLICKMAN i współaut. 1989), czy EGF (SORKIN i CARPENTER 1993) i umożliwiają klatrynie organizację na cytoplazmatycznej powierzchni błony (ZAREMBA i KEEN 1983, GALLUSSER i KIRCHHAUSEN 1993).

2) Hydrolizę GTP za pomocą dynaminy (za ROBINSON 1994).

3) Organizację klatryny, będącej głównym białkowym składnikiem płaszcza (PEARSE 1975, 1976). Zewnętrzne bodźce mogą wpływać na aktywność endocytocytyczną poprzez modyfikację białek płaszcza.



Rys. 2. Diagram przedstawiający niektóre etapy tworzenia CP.

Wiązanie się białek adaptorowych z cytoplazmatycznymi domenami receptorów umożliwia zarówno organizację klatryny na cytoplazmatycznej powierzchni błony, jak też włączanie kompleksów ligand-receptor do CP (wg ROBINSON 1994).

Jak już wspomniano, cytoplazmatyczne odcinki receptorów dla induktorów endocytozy są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów. Wiadomo, że przyłą-



czenie liganda, na przykład transferyny (SCHNEIDER i współaut. 1982), insuliny (KASUGA i współaut. 1982) czy EGF (CARPENTER i współaut. 1979) do receptora inicjuje autofosforylację cytoplazmatycznej domeny tego białka, która wydaje się być odpowiedzialna za segregację, przemieszczanie oraz internalizację kompleksu ligand-receptor (JING i współaut. 1990, SMYTHE i WARREN 1991). Są receptory, na przykład cholesterolowe, które mogą gromadzić się w CP jeszcze przed przyłączeniem liganda (PASTAN i WILLINGHAM 1981). Są i takie, które mogą być internalizowane również bez liganda i następnie podlegać recyrkulacji (STAHL i SCHWARTZ 1986). Analiza domen cytoplazmatycznych receptorów o znanej sekwencji aminokwasów wykazała brak jakiegokolwiek homologii pomiędzy nimi z wyjątkiem obecności tyrozyny. Zastąpienie tego aminokwasu przez cysteinę znacznie hamuje gromadzenie się kompleksu ligand-receptor w „coated pits” (SMYTHE i WARREN 1991). Sygnał przekazywany przez cytoplazmatyczną końcówkę receptora jest prawdopodobnie rozpoznawany przez wspomniane już białka adaptorowe. Obecnie uważa się, że selektywne pobieranie makrocząsteczek, to jest włączanie się kompleksu ligand-receptor do CP, jest możliwe dzięki specyficznemu współoddziaływaniu adaptorów z domeną cytoplazmatyczną białka receptorowego (PEARSE 1988). Segregacja receptorów, w której CP działają jak molekularne filtry (BRETSCHER i współaut. 1980), umożliwia komórce pobranie dużej ilości specyficznego liganda, zapobiegając jednocześnie internalizacji innych białek niezaangażowanych w tym procesie. Pobieranie substancji poprzez CP jest więc mechanizmem selektywnym i kondensującym. Wysokie powinowactwo liganda do receptora pozwala na wprowadzenie do wnętrza komórki cząsteczek występujących w środowisku w niskim stężeniu.

Wiele doświadczeń wskazuje, że proces gromadzenia się receptorów w CP nie wymaga udziału białek cytoszkieletalnych. Ilość CP na powierzchni apikalnej komórek MDCK wzrasta w obecności cytochalazyny D (GOTTLIEB i współaut. 1993). Natomiast połączenie receptorów wirusa HIV (CD4) z cytoszkieletem uniemożliwia ich ruch do CP (za SMYTHE i WARREN 1991). Stwierdzono jednak, z drugiej strony, bezpośrednią asocjację receptora EGF z F-aktyną oraz gromadzenie się filamentów aktynowych pod skupiskami tego receptora (SALISBURY i współaut. 1980). Według VAN DEURS i współpracowników (1989) receptory lub kompleksy ligand-receptor mogą tworzyć agregaty dzięki aktywności połączonych z nimi białek cytoszkieletalnych. Mogą również gromadzić się w CP poruszając się swobodnie w płaszczyźnie błony. Uważa się, że w większości komórek tkankowych białka cytoszkieletalne nie biorą udziału także w drugim etapie endocytozy receptorowej, to jest w procesie formowania opłaszczonych pęcherzyków. W inwaginację CP jest zaangażowana natomiast klatryna, która, jak już wspomniano, pokrywa wyspecjalizowane fragmenty błony plazmatycznej, tworząc na ich cytoplazmatycznej powierzchni rodzaj kratownicy. Wpuklanie się opłaszczonych odcinków błony zachodzi w wyniku niezależnej od ATP konwersji tworzących kratownicę układów sześciokątnych do pięciokątnych (SMYTHE i współaut. 1989). Energia wiązań ATP jest natomiast niezbędna dla oddzielenia pęcherzyka od błony (SCHMID i CARTER 1990). Klatryna jest uwalniana z powierzchni pęcherzyka natychmiast po jego odłączeniu od błony.

W wielu pracach wykazano jednak hamujący wpływ cytochalazyny D na pobieranie różnych substancji drogą endocytozy receptorowej (SALISBURY

i współaut. 1980, KAUFMAN i współaut. 1990). Na powierzchni apikalnej komórek MDCK oraz w komórkach drożdży internalizacja CP wymaga nienaruszonych filamentów aktynowych (GOTTLIEB i współaut. 1993, RIEZMAN 1993). Cytochalazyna D hamuje endocytozę transferyny po stronie apikalnej komórek MDCK nie wpływając jednocześnie na jej przebieg w części bazalnej. W tym rejonie komórki endocytoza zależna od klatryny zachodzi więc bez udziału filamentów aktynowych. Działanie cytochalazyny D prowadzi jednak do zwiększenia ilości CP na powierzchni apikalnej nabłonkowych komórek nerki. Nie hamuje więc ona gromadzenia się receptorów w CP, lecz jedynie ich zagłębianie (inwaginację) i formowanie pęcherzyków endocytotycznych (GOTTLIEB i współaut. 1993). Cytochalazyna D blokuje również infekcję wirusem grypy, internalizowanym, podobnie jak transferyna, drogą CP ale tylko wtedy, gdy atakuje on apikalną powierzchnię komórek. Gdy, przez usunięcie  $Ca^{2+}$  ze środowiska, zostanie zahamowane formowanie połączeń szczelinowych w nabłonku i wirus działa również na powierzchnie boczne i bazalne komórek, cytochalazyna D nie przeciwdziała infekcji. Również w komórkach drożdży, w których badano udział dwu składników cytoszkieletu:  $\beta$ -tubuliny i aktyny w endocytozie zależnej od klatryny (NOVICK i BOTSTEIN 1985) stwierdzono, że procesy polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny, jak też tworzenie wiązek F-aktyny są niezbędne dla inwaginacji CP i wciągania do cytoplazmy pęcherzyków klatrynowych. Już w 1980 roku pokazano agregację filamentów aktynowych i ich połączenie z CP w komórkach B limfoblastoidalnych (SALISBURY i współaut. 1980).

Endocytoza może zależeć zarówno od klatryny, jak i od filamentów aktynowych. RIEZMAN (1993) zauważył, że dotyczy to tych powierzchni komórek, które (podobnie jak pierwsze komórki eukariotyczne) są wystawione na działanie środowiska o wielu zmiennych parametrach. W takich warunkach, zgodnie z sugestią Riezman'a, endocytoza może wymagać zaangażowania zarówno klatryny, jak i filamentów aktynowych, aby proces internalizacji mógł przeciwstawić się sile generowanej przez turgor komórki. W czasie ewolucji zwierzęce komórki tkankowe wytworzyły kontrolowane, ochronne środowisko, w którym aktyna stała się zbędna w endocytozie pośredniczonej przez CP.

Nie wszystkie jednak substancje są internalizowane poprzez CP. Ligandy o małym ciężarze cząsteczkowym są pobierane w nieopłaszczonych pęcherzykach endocytotycznych, zwanych kaweolami (ANDERSON i współaut. 1992, ROTHBERG i współaut. 1992). Liczne doświadczenia pokazały, że w internalizacji pęcherzyków formowanych poza CP biorą udział filamenty aktynowe. Elementy cyto-szkieletu, z którymi są połączone integralne białka błonowe mogą nie tylko kontrolować lokalizację czy ruchliwość tych białek (LUNA 1991), ale również uczestniczyć w ich internalizacji. W sposób niezależny od klatryny lecz zależny od filamentów aktynowych są internalizowane również desmosomy w komórkach nabłonkowych. Na domenach błony zasocjowanych z desmosomami nigdy nie wykryto klatryny. Proces ten, podobnie jak endocytoza fazy płynnej, jest selektywnie hamowany przez cytochalazynę D. Natomiast ani zablokowanie internalizacji transferyny (pobieranej drogą CP), ani depolimeryzacja mikrotubul nie mają wpływu na endocytozę desmosomów (HOLM i współaut. 1993).

## PINOCYTOZA U AMEB

Ameby pobierają płyny i substancje stałe przy udziale filamentów aktywnych. Zastosowanie w badaniach mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej oraz komputerowych technik wzmacniania obrazu wykazało, że system połączonych z błoną plazmatyczną mikrofilamentów jest u ameb odpowiedzialny za generowanie siły motorycznej, koniecznej zarówno dla endo-, jak i egzocytozy (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU i współaut. 1989, GRĘBECKI 1991, KLEIN i STOCKEM 1979, STOCKEM i współaut. 1983, STOCKEM i HOFFMANN 1986, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988). Zaangażowana w zjawiskach endocytotycznych aktywna bierze udział zarówno w ruchu białek błonowych, jak też ich internalizacji.

U *Amoeba proteus*, będącej klasycznym modelem w badaniach nad endocytozą, występuje w zależności od warunków zewnętrznych pinocytoza fazy płynnej (mikropinocytoza) oraz pinocytoza indukowana (makropinocytoza) (ALBERTS i współaut. 1983, ALLISON i DAVIES 1974).

Mikropinocytoza jest zjawiskiem fizjologicznym, zachodzącym podczas lokomocji w rejonie uroidalnym komórki i morfologicznie jest podobna do endocytozy w komórkach tkankowych. Następstwem inwaginacji błony w przypadku tego zjawiska jest bowiem tworzenie kanałów i pęcherzyków mikropinocytotycznych. Wydaje się, że w tworzeniu tych struktur bierze udział zarówno błona, jak też podbłonowa warstwa kurczliwa. Połączone z mikrofilamentami agregaty białek błonowych są internalizowane prawdopodobnie dzięki lokalnemu skurczowi warstwy korykalnej, powodującemu inwaginację błony i formowanie pęcherzyków (GRĘBECKA i KŁOPOCKA 1987). Rola aparatu kurczliwego w mikropinocytozie musi być ograniczona do działań lokalnych, ponieważ zjawisko zachodzi podczas migracji ameby. Przeciwnie, pinocytozie indukowanej towarzyszy zawsze całkowite zaburzenie lokomocji oraz obkurczanie się komórki, co wskazuje, że w tym zjawisku zaangażowany jest cały korteks ameby (GRĘBECKA 1988, KŁOPOCKA i POMORSKI w druku).

Makropinocytoza jest wywoływana przez pojawienie się w środowisku określonego stężenia czynnika indukującego. Istnieje pogląd, że jest mechanizmem obronnym, umożliwiającym komórce przeżycie mimo zmian zachodzących na powierzchni błony plazmatycznej dzięki szybkiej internalizacji zmienionych jej obszarów. *Amoeba proteus* pobiera jednorazowo do 50% błony podczas trwającej około 30 min pinocytozy (CHAPMAN-ANDRESEN 1962).

Ze względu na rodzaj induktora i mechanizm indukcji wyróżnia się u ameb dwa typy pinocytozy indukowanej: selektywną i nieselektywną. Makropinocytoza selektywna jest indukowana wielkocząsteczkowymi związkami organicznymi, takimi jak białka, aminokwasy, czy barwniki, które wiążą się trwale ze specyficznymi receptorami błonowymi. Ten typ pinocytozy można porównać z oczyszczaniem powierzchni u makrofagów i limfocytów podczas reakcji immunologicznej, tym bardziej, że kompleks antygen-przeciwciało odbywa taką samą drogę w tych komórkach, jak zawartość endosomów u ameb (STOCKEM i CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU 1993). Makropinocytoza nieselektywna nie angażuje specyficznych miejsc wiązania i jest wywoływana wzrostem stężenia jednowartościowych ka-



tionów, takich jak  $\text{Na}^+$  czy  $\text{K}^+$  (CHAPMAN-ANDRESEN 1958) oraz chelatorami jonów dwuwartościowych: EGTA i EDTA (KŁOPOCKA i GREBECKA 1985).

Podczas makropinocytozy u *Amoeba proteus* tworzenie kanałów i pęcherzyków endocytotycznych jest zawsze związane z powstawaniem specjalnych nibynóżek pinocytotycznych. Tworzą się one przez wypuklenie obszarów powierzchni, otaczających bezpośrednio miejsce inwaginacji. Nibynóżki pinocytotyczne posiadają zwykle jeden kanał o długości do 50  $\mu\text{m}$  i szerokości kilku  $\mu\text{m}$ , którego dno stanowi pierwotnie zainicjowane zagłębienie błony. Wydłużanie się pinocytotycznego pseudopodium zawsze jest połączone z wydłużaniem kanału, a jego wycofywanie ze skracaniem kanału. W czasie pinocytozy u *Amoeba proteus* obserwuje się wielokrotne wyciąganie i skracanie nibynóżek pinocytotycznych skorelowane z kierunkiem przepływu strumienia cytoplazmy (KLEIN i STOCKEM 1979).

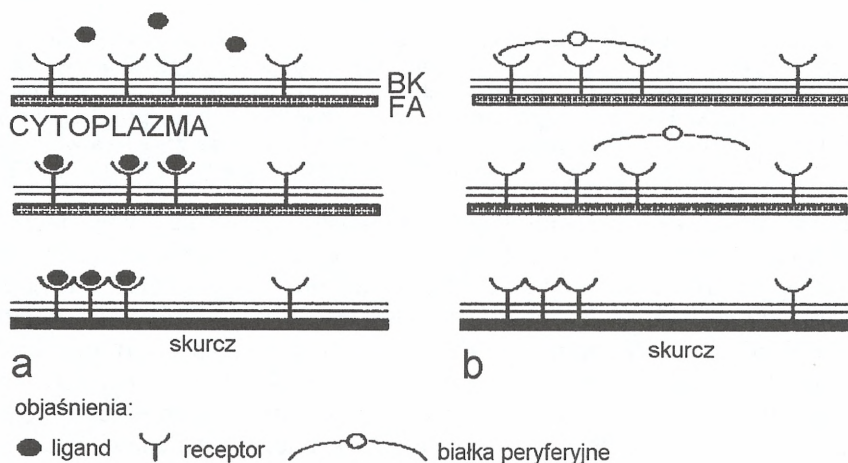
Tworzenie pierwszych kanałów jest zawsze poprzedzone utratą polaryzacji i aktywności lokomotorycznej ameby, a w niektórych przypadkach również zmianą kształtu komórki. Przebieg i morfologia pinocytozy są zależne bowiem od rodzaju induktora (GREBECKA i KŁOPOCKA 1986). Pierwsze kanały mogą powstawać po zahamowaniu migracji najpierw w strefie uroidalnej, a następnie na powierzchni dawnych frontów komórki o nie zmienionym jeszcze kształcie ( $\text{NaCl}$ ), albo mogą być formowane w dowolnym miejscu zaokrąglonej już ameby ( $\text{KCl}$ ). O usytuowaniu kanałów i nibynóżek pinocytotycznych decydują prawdopodobnie lokalne zmiany zachodzące w powierzchniowych warstwach ameby, to jest w błonie komórkowej oraz podbłonowej warstwie białek biorących udział w skurczu (GREBECKA 1988, GREBECKA i KŁOPOCKA 1987). Natomiast zahamowanie aktywności lokomotorycznej i zmiany kształtu komórki są związane zawsze z ogólnym skurczem całej podbłonowej sieci kurczliwej (GREBECKA 1988, GREBECKA i KŁOPOCKA 1987, KŁOPOCKA i POMORSKI w druku, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988).

Za aktywację systemu aktomiozynowego i inicjację zjawiska jest odpowiedzialny wewnątrzkomórkowy wapń (ALLISON 1973, GAWLITTA i współaut. 1980, JOHANSSON i JOSEFSSON 1978, JOSEFSSON 1975, JOSEFSSON i współaut. 1975, KŁOPOCKA i POMORSKI w druku, KUKULIS i współaut. 1986, PRUSCH 1986, PRUSCH i HANNAFIN 1979, STOCKEM i KLEIN 1979, STOCKEM i KLEIN 1988, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988, TAYLOR i współaut. 1980). Induktory pinocytotyczne wywołują u *Amoeba proteus* gwałtowny, przejściowy wzrost poziomu cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$ , który jest zawsze skorelowany w czasie z zahamowaniem lokomocji, utratą adhezji i stopniowym zaokrągleniem się komórki (KŁOPOCKA i POMORSKI w druku). Zwiększenie  $[\text{Ca}^{2+}]$  w komórce prowadzi do skurczu korteksu, który powoduje zarówno zmiany kształtu ameby, jak też może uczestniczyć w tworzeniu agregatów białek błonowych i w zagłębieniu błony.

Podobnie jak w komórkach tkankowych również u ameb mechanizm indukcji pinocytozy polega prawdopodobnie na skupianiu się integralnych białek błonowych. W przypadku makropinocytozy selektywnej czynnikami sieciującymi receptory są ligandy, analogicznie jak w komórkach tkankowych. W tym procesie mogą lecz nie muszą brać udziału filamenty aktynowe. Niezależnie jednak od ich zaangażowania w tworzeniu skupisk białek błonowych znajdują się one zawsze pod tymi skupieniami (rys. 3a) i niewątpliwie są odpowiedzialne za formowanie kanałów i pęcherzyków pinocytotycznych (GREBECKA i KŁOPOCKA 1987, STOCKEM



i KŁOPOCKA 1988). Czynniki indukujące makropinocytozę nieselektywną nie sieciują receptorów. Jednak zarówno wzrost siły jonowej środowiska, jak też chelatory mogą powodować usuwanie białek peryferyjnych z powierzchni błony i tym samym zwiększać swobodę ruchu białek integralnych (SINGER i NICOLSON 1972). W tych warunkach łatwiej przemieszczają się one w obrębie błony zarówno w sposób dyfuzyjny, jak i kontrolowany przez mikrofilamenty i mogą tworzyć agregaty (rys. 3b) analogiczne do tych, które powstają w wyniku działania ligandów (GRĘBECKA i KŁOPOCKA 1987). Potwierdzeniem znaczenia ruchliwości białek błonowych dla indukcji pinocytocy jest fakt, że czynniki ograniczające tę ruchliwość — stabilizatory błonowe, takie jak  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  (JOSEFSSON 1975, KŁOPOCKA i GRĘBECKA 1985, LIGETI i FONYÓ 1977), czy niska temperatura (ALLISON i DAVIES 1974, CHAPMAN-ANDRESEN 1962) hamują pinocytozę. Przemieszczanie się białek w błonie komórkowej przy współdziałaniu ligandów i/ albo podbłonowych mikrofilamentów wydate się warunkiem koniecznym wystąpienia pinocytocy.



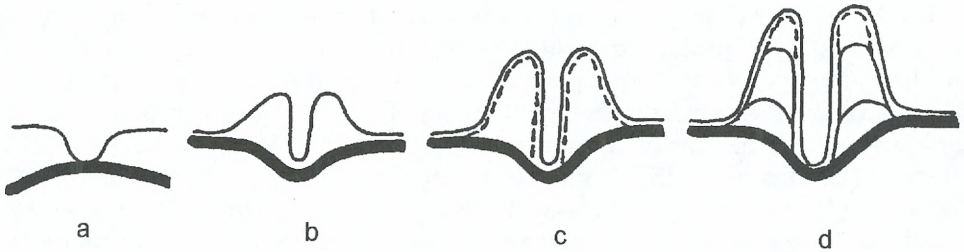
Rys. 3. Schemat zmian wywołanych przez różne induktory pinocytocy w błonie komórkowej i podbłonowej sieci mikrofilamentów.

a — działanie induktora sieciującego receptory (pinocytocy selektywna). b — zmiany powodowane przez chelatory lub jednowartościowe kationy (pinocytocy nieselektywna). Wynikiem działania każdej z grup induktorów jest przemieszczanie się białek w błonie i tworzenie ich skupień oraz skurczenie podbłonowej warstwy kurczliwej. BK — błona komórkowa. FA — filamenty aktynowe (wg GRĘBECKA i KŁOPOCKA 1987).

Mechanizm formowania kanałów i nibynózek pinocytocytycznych badano stosując metody mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej podczas pinocytocy indukowanej w komórkach normalnych (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU i współaut. 1989, STOCKEM i współaut. 1983) oraz w termicznie tworzonych modelach ameb, zwanych hialosferami stosując metodę komputerowego wzmacniania obrazu (GRĘBECKI 1991). Hialosfery wykazują dużą aktywność endocytocytyczną formując wpuklenia, kanały, makro- i mikrosomy również spontanicznie.

Na podstawie tych badań wykazano, że w tworzeniu struktur endocytocytycznych u ameb biorą udział dwie składowe: ciągnąca, która bazuje na interakcji podbłonowych białek kurczliwych z powierzchnią komórki i ciśnieniowa, zwią-

zana z cykliczną degradacją połączeń pomiędzy błoną i podbłonową siecią aktywną (GRĘBECKI 1991). Ta pierwsza umożliwia zagłębianie się i wydłużanie kanału, wynikiem drugiej jest ekspansja powierzchni i tworzenie oraz wzrost nibynóżki pinocytotycznej. Jak pokazano na rysunku 4, korykalna sieć kurczą-



Rys. 4. Rola warstwy kurczliwej w rozwoju pinocytotycznej nibynóżki u *Amoeba proteus*.

a — „odklejanie” kurczącej się sieci mikrofilamentów od błony, z zachowaniem połączenia w miejscu stanowiącym dno przyszłego kanału umożliwia inwaginację błony; b — uwypuklenie się powierzchni wokół otworu kanału; c — zrekonstruowana sieć mikrofilamentów na cytoplazmatycznej powierzchni błony kanału i nibynóżki (linia przerywana); d — luki aktywne (linia ciągła) powstające w wyniku powtarzającego się rytmicznie odrywania sieci kurczliwej od błony są wycofywane w kierunku podstawy nibynóżki (wg CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU i współaut. 1989 oraz GRĘBECKI 1991).

liwa jest trwale połączona z błoną w miejscu zainicjowania inwaginacji, które stanowi dno przyszłego kanału, a następnie w rejonie centralnym pinocytotycznego pseudopodium. Natomiast sieć aktywna z obszaru wokół kanału periodycznie traci łączność z błoną plazmatyczną i jest wycofywana do wnętrza komórki. Kurcząca się sieć mikrofilamentów umożliwia tworzenie wpukleń oraz wydłużanie kanałów. Prawdopodobnie jest również odpowiedzialna za transport pęcherzyków pinocytotycznych, które podobnie jak ściany kanałów są opłaszczone filamentami aktynowymi. Sugeruje się, że obszar kontaktu między korteksem i błoną plazmatyczną może determinować średnicę kanałów i pęcherzyków pinocytotycznych (KLEIN i współaut. 1988). Jednocześnie wycofywanie „odklejonej” od błony sieci korykalnej powoduje napływ hialoplazmy pod błonę komórkową, uwypuklenie się powierzchni wokół otworu kanału i powstawanie pinocytotycznego pseudopodium. Zjawisko to powtarza się cyklicznie ponieważ warstwa mikrofilamentów jest stale rekonstruowana na cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej z mono- i oligomerów aktynowych, dopływających tu wraz ze strumieniem hialoplazmy (GRĘBECKI 1990, GRĘBECKI i KWIATKOWSKA 1988, KLEIN i STOCKEM 1979, KŁOPOCKA i współaut. 1988). Takie rytmiczne odrywanie się sieci korykalnej od błony plazmatycznej zachodzi również w wierzchołkach wysuwanych nibynóżek lokomotorycznych (GRĘBECKI 1990). Jest więc zjawiskiem wspólnym dla lokomocji i endocytozy. W pierwszym przypadku umożliwia ekspansję powierzchni i przemieszczanie się komórki, w drugim wzrost nibynóżki pinocytotycznej i wydłużanie się kanału. Podczas lokomocji i pinocytozy powstają zatem struktury analogiczne, których wysuwanie i wycofywanie zachodzi z udziałem F-aktyny. Ponadto mechanizm wydłużania obu typów nibynóżek jest identyczny i opiera się na cyklicznych zmianach stanu cytoszkieletu i interakcjach pomiędzy błoną i podbłonową siecią mikrofilamen-

tów. Pinocytozę indukowaną u ameb można więc rozpatrywać nie tylko jako sposób internalizacji błony plazmatycznej i związanych z nią substancji oraz pobieranie płynów, ale również jako pewną formę ruchliwości komórki wymuszoną przez induktor (GRĘBECKA 1988). Przejawami tej ruchliwości są zmiany kształtu ameby, charakterystyczne oscylacje endoplazmy oraz powstawanie wyspecjalizowanych pseudopodiów pinocytotycznych. Taka aktywność ruchowa prowadzi do utworzenia tak zwanej rozety pinocytotycznej (CHAPMAN-ANDRESEN 1962, HOLTER 1965), w której stale, aż do wygaśnięcia zjawiska, wysuwane są nowe i wycofywane stare nibynóżki.

## THE ROLE OF CYTOSKELETON IN ENDOCYTOSIS

### Summary

Endocytosis occurs in virtually all eukaryotic cells except in mature erythrocytes. Depending on the kind of inducer and the mechanism of induction, the fluid phase (in *Amoeba proteus* known as permanent pinocytosis) and receptor-mediated endocytosis (called in amoeba induced pinocytosis), are distinguished. These two processes are used by cells for the uptake from their environment of small molecules and macromolecules, respectively. The fluid phase endocytosis enables cells to absorb extracellular fluid in a constant and unselective way. Due to receptor-mediated endocytosis cells are capable of selective internalization of molecules *via* specialised regions of plasma membrane, termed "coated pits". The main component of the cytoplasmic coat is clathrin which assembles onto plasma membrane, interacting with a family of proteins called adaptors. The coated pits act as molecular filters. Ligand/receptor complexes are selected and clustered into the coated regions, and this prevents plasma membrane proteins from being internalized in the endocytotic flow.

In many tissue and free living cells actin plays a direct role in the internalization step of receptor-mediated and fluid phase endocytosis. In some tissue cells the formation of coated endocytotic vesicles requires both clathrin and actin cytoskeleton. On the other hand, *Amoebae* internalize fluid and solutes in a clathrin-independent manner. In *Amoeba proteus*, one of the classic subject for studies on endocytosis, the microfilament system is responsible for generation of the motive force necessary to promote all steps of permanent and induced pinocytosis.

### LITERATURA

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York- London, 1146.
- ALLISON A. C., 1973. *The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis*. [W:] *Locomotion of Tissue Cells*. PORTER R., FITZSIMONS D. W. (red. ). Ciba Foundation Symp. (new series) 14, Elsevier, Amsterdam- London- New York, 109-148.
- ALLISON A. C., DAVIES P., 1974. *Mechanism of endocytosis and exocytosis*. Symp. of the Soc. for Exp. Biol. 28, Cambridge University Press, 419-446.
- ANDERSON R. G. W., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., 1977. *Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts*. Cell 10, 351-364.
- ANDERSON R. G. W., KAMEN B. A., ROTHBERG K. G., LACEY S. W., 1992. *Potocytosis: segregation and transport of small molecules by Caveolae*. Science (Wash. DC) 255, 410-411.
- BAR-SAGI D., FERAMISCO J. R., 1986. *Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins*. Science 233, 1061-1068.
- BRETSCHER M. S., THOMPSON J. N., PEARSE B. M. F., 1980. *Coated pits act as molecular filters*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 77, 4156-4159.
- BROWN M. S., ANDERSON R. G. W., GOLDSTEIN J. L., 1983. *Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins*. Cell 32, 663-667.
- CARPENTER G., KING L. JR., COHEN S., 1979. *Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor*. J. Biol. Chem. 254, 4884-4891.



- CHAPMAN-ANDRESEN C., 1958. *Pinocytosis of inorganic salts by Amoeba proteus (Chaos diffluens)*. Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg 31, 77-92.
- CHAPMAN-ANDRESEN C., 1962. *Studies on pinocytosis in amoebae*. Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg 33, 73-263.
- CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M., BRIX K., STOCKEM W., 1989. *Induced pinocytosis and cytoskeletal organization in Amoeba proteus - a combined fluorescence and electron microscopic study*. Eur. J. Protistol. 24, 336-345.
- COOPER J. A., 1991. *The role of actin polymerization in cell motility*. Annu. Rev. Physiol. 53, 585-605.
- FALLON R. J., SCHWARTZ A. L., 1985. *Receptor-mediated endocytosis and targeted drug delivery*. Hepatology 5, 899-901.
- GALLUSSER A., KIRCHHAUSEN T., 1993. *The b1 and b2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components*. Embo J. 12, 5237-5244.
- GAWLITTA W., STOCKEM W., WEHLAND J., WEBER K., 1980. *Pinocytosis and locomotion in amoebae. XV. Visualization of Ca<sup>2+</sup>-dynamics by chlorotetracycline (CTC) fluorescence during induced pinocytosis in living Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 213, 9-20.
- GLICKMAN J. N., CONIBEAR E., PEARSE B. M. F., 1989. *Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor*. Embo J. 8, 104-1047.
- GOTTLIEB T. A., IVANOV I. E., ADESNIK M., SABATINI D. D., 1993. *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not basolateral surface of polarized epithelial cells*. J. Cell Biol. 120, 695-710.
- GRĘBECKA L., 1988. *Polarity of motor function in Amoeba proteus II. Non-locomotory movements*. Acta Protozool. 27, 177-204.
- GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., 1986. *Morphological differences of pinocytosis in Amoeba proteus related to the nature of pinocytotic inducer*. Protistologica 22, 265-270.
- GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., 1987. *Pinocytoza i jej związki ze zjawiskami ruchowymi*. [W:] Komórka — jej Budowa i Ruch. KUŹNICKI L. (red.). Ossolineum, Wrocław, 187-212.
- GRĘBECKI A., 1990. *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normal locomoting amoebae demonstrated by video-enhancement in vivo*. 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., KWIATKOWSKA E. M., 1988. *Dynamics of membrane-cortex contacts demonstrated in vivo in Amoeba proteus pretreated by heat*. Eur. J. Protistol. 23, 262-272.
- GRUENBERG J., HOWELL K. E., 1989. *Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays*. Annu. Rev. Cell Biol. 5, 453-481.
- HOLM P. K., HANSEN S. H., SANDVIG K., VAN DEURS B., 1993. *Endocytosis of desmosomal plaques depends on intact actin filaments and leads to a nondegradative compartment*. Eur. J. Cell Biol. 62, 362-371.
- HOLTER H., 1965. *Physiologie der Pinozytose bei Amöben*. [W:] Sekretion und Exkretion. WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E. (red.). Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 119-146.
- JING S., SPENCER T., MILLER K., HOPKINS C., TROWBRIDGE I. S., 1990. *Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization*. J. Cell Biol. 110, 283-294.
- JOHANSSON P., JOSEFSSON J. -O., 1978. *Evidence for a dual effect of intracellular Ca<sup>2+</sup> on pinocytosis*. Acta Physiol. Scand. 102, 71A-72A.
- JOSEFSSON J. -O., 1975. *Studies on the mechanism of induction of pinocytosis in Amoeba proteus*. Acta Physiol. Scand. 97 (Suppl. 423), 1-65.
- JOSEFSSON J. O., HOLMER N. G., HANSSON S. E., 1975. *Membrane potential and conductance during pinocytosis induced in Amoeba proteus with alkali metal ions*. Acta Physiol. Scand. 94, 278-288.
- KASUGA M., KARLSSON F. A., KAHN C. R., 1982. *Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-Dalton subunit of its own receptor*. Science (Wash. DC) 215, 185-187.
- KAUFMAN S. S., BLAIN P. L., PARK J. H. Y., TUMA D. J., 1990. *Role of microfilaments in asialoglycoprotein processing in adult and developing liver*. Am. J. Physiol. 259 (Gastrointest. Liver Physiol. 22), G639-G645.
- KELLER H. U., 1990. *Diacylglycerol and PMA are particularly effective stimulators of fluid-phase pinocytosis in human neutrophils*. J. Cell Physiol. 145, 465-471.
- KELLER H. U., NIGGLI V., 1995. *Effects of cytochalasin D on shape and fluid pinocytosis in human neutrophils as related to cytoskeletal changes (actin,  $\alpha$ -actinin and microtubules)*. Eur. J. Cell Biol. 66, 157-164.

- KLEIN H. P., KOSTER B., STOCKEM W., 1988. *Pinocytosis and locomotion of amoebae. XVIII. Different morphodynamic forms of endocytosis and microfilament organization in Amoeba proteus*. Protoplasma (Suppl. 2), 76–87.
- KLEIN H. P., STOCKEM W., 1979. *Pinocytosis and locomotion of amoebae. XII. Dynamics and motive force generation during induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Cell Tiss. Res. 197, 263–279.
- KŁOPOCKA W., GREBECKA L., 1985. *Effects of bivalent cations on the initiation of Na-induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Protoplasma 126, 207–214.
- KŁOPOCKA W., POMORSKI P., *Cytoplasmic calcium transients in Amoeba proteus during induction of pinocytotic and non-pinocytotic rosettes*. Acta Protozool. (w druku).
- KŁOPOCKA W., STOCKEM W., GREBECKI A., 1988. *Fine structure and distribution of contractile layers in Amoeba proteus preincubated at high temperature*. Protoplasma 147, 117–124.
- KOMNICK H., STOCKEM W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., 1973. *Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and amoeboid movement*. Int. Rev. Cyt. 34, 169–249.
- KUKULIS J., ACKERMANN G., STOCKEM W., 1986. *Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIV. Demonstration of two different receptor sites on the cell surface of Amoeba proteus*. Protoplasma 131, 233–243.
- LIGETI E., FONYÓ A., 1977. *Competitive inhibition of valinomycin-induced  $K^+$  transport by  $Mg^{2+}$  ions in liver mitochondria*. Febs Lett. 79, 33–36.
- LUNA E. J., 1991. *Molecular links between the cytoskeleton and membranes*. Curr. Opin. Cell Biol. 3, 120–126.
- MELLMAN I. S., PLUTNER H., 1984. *Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes*. J. Cell Biol. 98, 1170–1177.
- MOSTOV K. E., SIMISTER N. E., 1985. *Transcytosis*. Cell 43, 389–390.
- NOVICK P., BOTSTEIN D., 1985. *Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants*. Cell 40, 405–415.
- ONO T., SENO S., 1986. *Endocytosis of cationic and anionic non colloid particles by rat macrophages*. Acta Histochem. Cytochem. 19, 105–118.
- PASTAN J. H., WILLINGHAM M. C., 1981. *Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells*. Ann. Rev. Physiol. 43, 239–250.
- PEARSE B. M. F., 1975. *Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization*. J. Mol. Biol. 97, 93–98.
- PEARSE B. M. F., 1976. *Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 73, 1255–1259.
- PEARSE B. M. F., 1988. *Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits*. Embo J. 7, 3331–3336.
- PRUSCH R. D., 1986. *Calcium and initial surface binding phase of pinocytosis in Amoeba proteus*. Am. J. Physiol. 251, C153–C158.
- PRUSCH R. D., HANNAFIN J., 1979. *Sucrose uptake by pinocytosis in Amoeba proteus and influence of external calcium*. J. Gen. Physiol. 74, 523–535.
- RIDLEY A. J., 1994. *Membrane ruffling and signal transduction*. BioEssays 16, 321–327.
- RIEZMAN H., 1993. *Yeast endocytosis*. Trends Cell Biol. 3, 273–277.
- ROBINSON M. S., 1994. *The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis*. Curr. Op. Cell Biol. 6, 538–544.
- ROTH T. F., PORTER K. R., 1964. *Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes aegypti*. L. J. Cell Biol. 20, 313–332.
- ROTHBERG K. G., HEUSER J. E., DONZELL W. C., YING Y-S., GLENNEY J. R., ANDERSON R. G. W., 1992. *Caveolin, a protein component of Caveolae membrane coats*. Cell 68, 673–682.
- SALISBURY J., CONDEELI J., SATIR P., 1980. *Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells*. J. Cell Biol. 87, 132–141.
- SANDVIG K., VAN DEURS B., 1990. *Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis*. J. Biol. Chem. 265, 6382–6388.
- SCHMID S. L., CARTER L. L., 1990. *ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells*. J. Cell Biol. 111, 2307–2318.
- SCHNEIDER C., SUTHERLAND R., NEWMAN R., GREAVES M., 1982. *Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9*. J. Biol. Chem. 257, 8516–8522.
- SINGER S. J., NICOLSON G. L., 1972. *The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes*. Science 175, 720–731.

- SMYTHE E., PYPAERT M., LUCOCQ J., WARREN G., 1989. *Formation of coated vesicles from coated pits in broken A431 cells.* J. Cell Biol. 198, 843–853.
- SMYTHE E., WARREN G., 1991. *The mechanism of receptor-mediated endocytosis.* Eur. J. Biochem. 202, 689–699.
- SORKIN A., CARPENTER G., 1993. *Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins.* Science 261, 612–615.
- STAHL P., SCHWARTZ A. L., 1986. *Receptor-mediated endocytosis.* J. Clin. Invest. 77, 657–662.
- STOCKEM W., 1977. *Endocytosis.* [W:] *Mammalian Cell Membranes* 5. JAMIESON G. A., ROBINSON D. M. (red. ), 151–195.
- STOCKEM W., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M., 1993. *Food uptake and digestion in amoebae.* Advances in Cell and Molecular of Membranes 2B, 371–407.
- 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  $Ca^{2+}$ -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. Protistol. 23, 317–326.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. *Ameboid movement and related phenomena.* Int. Rev. Cyt. 112, 137–183.
- STOCKEM W., NAIB-MAJANI W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., OSBORN M., WEBER K., 1983. *Pinocytosis and locomotion of amoebae. XIX Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in A. proteus.* Eur. J. Cell Biol. 29, 171–178.
- STOSSEL T. P., 1993. *On the crawling of mammalian cells.* Science 260, 1086–1094.
- TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G., 1980. *Contractile basis of ameboid movement. VII. Aequorin luminescence during ameboid movement, endocytosis and capping.* J. Cell Biol. 86, 599–607.
- WARN R., BROWN D., DOWRICK P., PRESCOTT A., WARN A., 1993. *Cytoskeletal changes associated with cell motility.* [W:] *Cell Behaviour: Adhesion and Motility*, SEB Symposium 47. JONES G., WIGLEY C., WARN R. (red. ). The Company of Biologists Ltd., Cambridge, 325–338.
- WILEMAN T., BOSHANS R. L., SCHLESINGER P., STAHL P., 1984. *Monensin inhibits recycling of macrophage mannose-glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes.* Biochem. J. 220, 665–675.
- WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., STOCKEM W., 1966. *Pinocytose und Bewegung von Amöben II. Permanente und Induzierte Pinocytose bei Amoeba proteus.* Z. Zellforsch. 73, 444–474.
- VAN DEURS B., PETERSEN O. W., OLSNES S., SANDVIG K., 1989. *The ways of endocytosis.* Int. Rev. Cytol. 117, 131–175.
- VIGERS G. P. A., CROWTHER R. A., PEARSE B. M. F., 1986. *Location of the 100kd-50kd accessory proteins in clathrin coats.* Embo J. 5, 2079–2085.
- ZAREMBA S., KEEN J. H., 1983. *Assembly polypeptides from coated vesicles mediated reassembly of unique clathrin coats.* J. Cell Biol. 97, 1339–1347.