

ANNA WASIK Zakład Biologii Komórki Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa e-mail: annaw@nencki.gov.pl

PROCES SEKRECJI A TWORZENIE LORIK U ORZĘSKÓW Z PODRZĘDU TINTINNINA

TINTINNIDY I ICH LORIKI

Tintinnidy (Spirotrichea : Choreotrichia : Choreotrichida : Tintinnina) należą do grupy kosmopolitycznych, swobodnie pływających orzęsków, których protoplast otoczony jest organiczną otoczką zwaną loriką. Nie są one jedynymi orzęskami posiadającymi lorikę, aczkolwiek podkreślić należy, że wszystkie pozostałe są organizmami osiadłymi (SMALL i LYNN 1985).

Loriki, pod względem ich morfologii, podzielić można na dwie grupy: hialinowe, nie oblepione cząstkami oraz aglutynowane, posiadające na swej powierzchni obcy materiał organiczny i/lub mineralny. W obrębie tej drugiej grupy wydziela się dwie podgrupy: loriki całkowicie i częściowo aglutynowane (WASIK 1998, WASIK i współaut. 1996, 1997a). W przypadku lorik częściowo aglutynowanych proporcja między nagą szyjką i oblepionym kielichem może być bardzo różna (Ryc. 1). Zainteresownie tą grupą pierwotniaków i ich lorikami datuje się od końca 19-tego wieku, kiedy orzęski te zidentyfikowano w próbach planktonowych (ENTZ 1884, DADAY 1887). Wtedy też zaczęto tworzyć ich klasyfikację, która przez wiele lat oparta była wyłącznie na morfologii lorik (KOFOID i CAMPBELL 1929, MARSHAL 1969). Znacznie później okazało się, iż systematyka ta jest sztucznie rozbudowana i zawiera szereg błędów wynikających z faktu, że grupę tą charakteryzuje wyjątkowy polimorfizm (LAVAL-PEUTO i BROWNLEE 1986).

Na początku 20-tego wieku pojawiły się pytania szczegółowe: jak odbywa się podział i skąd biorą się loriki tintinnidów? Dość szybko znaleziono na nie odpowiedź. Okazało się, że po zakończeniu podziału naga przednia komórka popodziałowa (proter) dobudowuje sobie nową lorikę, a tylna komórka popodziałowa (opist)



Ryc. 1. Rodzaje lorik tintinnidów.

a — Parafavella denticulata (lorika hialinowa), b — Laackmaniella naviculaefera (lorika częściowo agglutynowana długa szyjka), c — Codonellopsis balechi (lorika częściowo agglutynowana — krótka szyjka), d — Tintinnopsis lobiancoi (lorika całkowicie agglutynowana). s — szyjka, k kielich.

pozostaje w starej (KOFOID i CAMPBELL 1929). Najdokładniej jednak proces podziału i tworzenia się nowej loriki opisała BIERNACKA (1952). Wiedziała ona już, że do utworzenia loriki niezbędny jest materiał budulcowy, który gromadzi się w czasie interfazy w dolnej części protoplastu. W początkowej fazie podziału w środkowej części komórki pojawia się zawiązek nowej gęby (Ryc. 2), a materiał lorikotwórczy jest transportowany pod wieniec "starych" membranelli oralnych, tak więc po zakończeniu podziału nagi proter jest przygotowany do konstruowania nowej loriki. Zgromadzony materiał lorikotwórczy, wydzielany jest z miejsca zlokalizowanego przy cytostomie i spływając wzdłuż rotującego protera buduje lorikę. Mimo upływu lat, przedstawiony przez BIERNACKĄ (1952) opis jest nadal obowiązujący, a toczące się w literaturze dyskusje nie wyjaśniły szeregu watpliwości dotyczących mechanizmów regulujących przebieg procesu oraz sposobów selekcjonowania przez orzęski cząstek umieszczanych na aglutynowanych lorikach (GOLD i MORALES 1976, Gold 1980, Laval-Peuto 1981, Wasik i współaut. 1996).

Dodać należy, że loriki tintinnidów zbudowane są wyłącznie z substancji organicznych, a



Ryc. 2. Podział (a) i tworzenie nowej loriki (b) – według BIERNACKIEJ (1952). g – zawiązek nowej gęby, m – materiał lorikotwórczy, mo – membranelle oralne.

ich podstawę konstrukcyjną stanowi kompleks białkowo-węglowodanowy (DOGIEL i współaut. 1962, GOLD i MORALES 1975, WASIK i współaut. 1997b)

WEWNĄTRZKOMÓRKOWY TRANSPORT

Dziś wiemy już, że to co dzieje się na zewnatrz nagiego protera jest odzwierciedleniem szeregu wewnątrzkomórkowych przemian, a lorika to efekt procesu sekrecyjnego. Aby utworzyć i utrzymać wewnętrzną organizację (a w przypadku tintinnidów również dobudować lorike), komórka musi zsyntetyzować i posortować niezbędne elementy składowe tak, aby umieścić je we właściwych miejscach docelowych (SCHEKMAN i ORCI 1996, MIRONOV i współaut. 1997). W przypadku komórek eukariotycznych wymaga to doskonale funkcjonującego wewnątrzkomórkowego systemu transportowego, który pozwala na przemieszczenie białek od rybosomów na szorstkiej siateczce śródplazmatycznej (reticulum endoplazmatyczne -ER), aż do ich miejsc przeznaczenia. Jako pierwszy, szlak sekrecyjny opisał PALADE (1975) (Schemat 1). Szlak ten rozpoczyna się od zsyntetyzowania, a kończy wyrzuceniem materiału z pęcherzyków transportowych do kolejnych struktur wewnątrz komórki lub poza jej obręb. PALADE zauważył ponadto, że pewne etapy procesu są stałe, inne zaś, w zależności od rodzaju komórek, mogą być omijane (np. w przypadku fibroblastów czy makrofagów: koncentracja i magazynowanie).

Prawidłowy, końcowy efekt procesu sekrecyjnego możliwy jest dzięki działaniu centralnego systemu błonowego (KLAUSNER 1989), w którym biosyntetycznemu szlakowi od ER przez system Golgiego (AG) do błony plazmatycznej, odpowiada droga endocytotyczna, przebiegają-



Schemat 1. Etapy szlaku sekrecyjnego według PALA-DE (1975).

ca w przeciwnym kierunku (Ryc. 3). Pozwala ona, między innymi, na odzyskiwanie błony, której elementy są przemieszczane od wczes-



Ryc. 3. Centralny system blonowy.

ERS — siateczka śródplazmatyczna szorstka, GS — granula sekrecyjna, L — lisosom, PE — późny endosom, TGS — siateczka trans-Golgi, WE — wczesny endosom.

nych, przez późne endosomy, aż do lizosomów. Oba szlaki, biosyntetyczny i endocytotyczny, są wzajemnie powiązane i krzyżują się ze sobą (KLAUSNER 1989). Pamiętać jednak mależy, że błony poszczególnych organelli komórkowych zawierają pewne, specyficzne tylko dla nich białka (ang. characteristic resident membrane proteins), określające ich niepowtarzalność i

BIAŁKA ODPOWIEDZIALNE ZA TRANSPORT PĘCHERZYKOWY

Przejście między kolejnymi etapami szlaku biosyntetycznego odbywa się dzięki transportowi pęcherzykowemu. Wewnątrzkomórkowy system regulacyjny określa zawartość pęcherzyka i jej miejsce docelowe. Działanie tego układu polega na odczytaniu sygnału selekcyjnego i adresu końcowego.

Zarówno transport pęcherzyków, jak i wydzielanie ich zawartości zależą od właściwego i specyficznego rozpoznania się błon, a następnie ich fuzji (LINIAL 1997). Istnieją dwie główne klasy białek — Rab i SNARE, oraz cały szereg białek regulacyjnych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg tych procesów.

Cytosolowe białka Rab kontrolują przebycie przez pęcherzyk drogi od donora do akceptora. Transport ten odbywa się wzdłuż mikrotubul lub włókien aktynowych (SIMONS i ZERIAL 1993, PFEFFER 1994, GOODSON i współaut. 1997, WAC-KER i współaut. 1997). Białka błonowe SNARE wyróżniające poszczególne elementy systemu wakuolarnego pod względem struktury i funkcji (SIMONS i ZERIAL 1993).

Pierwsze etapy wewnętrzkomórkowego systemu transportowego wiodace od ER do i przez system Golgiego są identyczne (PALADE 1975). Błony AG są miejscem syntezy mukopolisacharydów. To w cysternach AG do białek zsyntetyzowanych w ER szorstkim, dołączane są wielocukry. Tam również są otaczane błoną powstające w ER gładkim kuleczki tłuszczu. Z AG wywodzą się także nematocysty jamochłonów czy trichocysty Paramecium. Ich stadium przejściowym w szlaku sekrecyjnym są struktury określane jako "dense core vesicles" (HADDAD i TURKIEWITZ 1997, KLAUKE i PLATTNER 1998, VERBSKY i TURKIEWITZ 1998). W przeciwieństwie do pęcherzyków sekrecyjnych, których zawartość wydostaje się na zewnątrz po otrzymaniu informacji pochodzącej z wnętrza komórki, zawartość na przykład trichocyst wyrzucana jest w odpowiedzi na bodziec zewnątrzkomórkowy, a proces ten określany jest jako sekrecja regulowana (Haddad i Turkiewitz 1997, Mella i współaut. 1998).

Dalsze etapy wewnątrzkomórkowej drogi wiodącej od AG do błony plazmatycznej, różnią się w zależności od rodzaju komórek. W najbardziej zewnętrznej w stosunku do jądra części aparatu Golgiego, określanej jako siateczka trans-Golgi (ang. trans Golgi network —TGN) (Ryc.3), następuje selekcjonowanie materiału i rozpoczyna się jego droga do miejsca przeznaczenia.

są odpowiedzialne za kierunkowy transport pęczerzyków i ich fuzję z błoną akceptora.

BIAŁKA RAB

Klasa białek Rab została po raz pierwszy zidentyfikowana w komórkach drożdży w latach 80-tych. Były to Ypt 1p odpowiedzialne za transport między ER a aparatem Golgiego (GAL-LWITZ i współaut. 1983) oraz Sec 4p kontrolujące transport między aparatem Golgiego a błoną plazmatyczną (SALMINEN i NOVICK 1987). Obecnie znanych jest już 11 białek typu Rab w drożdżach i około 40 w komórkach ssaków (białka podstawowe oraz ich izoformy)(NOVICK i ZERIAL 1997). Ostatnie dwa zidentyfikowanł CHEN i współaut. (1996) w komórkach ludzkich melanocytów. Były to: Rab 22b analogiczne do psich Rab 22 i nowe, nigdzie dotąd nie stwierdzone, białko Rab 30. Badając funkcję białek Rab stwierdzono, że na każdym etapie transportu błonowego pojawia się inne, specyficzne białko z tej rodziny (SIMONS i ZERIAL 1993) (Ryc. 3 i 4). Wiele białek



Ryc. 4. Lokalizacja białek Rab w komórce eukariotycznej.



Ryc. 5. Udział białek SNARE w transporcie pęcherzykowym i fuzji błon.

Ulokowane w błonie pęcherzyka v-SNARE (V) łączą się z odpowiadającym mu t-SNARE (strzałka) w błonie plazmatycznej — według ROTHMANA 1994)

Rab jest wszechobecnych i można je znaleźć we wszystkich rodzajach komórek eukariotycznych. Należą do nich Rab 1a, Rab 1b i Rab 2 regulujace transport od ER do Golgi (TISDALE i współaut. 1992), Rab 8 zlokalizowane między TGN a błoną plazmatyczną (HUBER i współaut. 1993) oraz Rab 5 związane z błoną plazmatyczną, pęcherzykami opłaszczonymi klatryną i wczesnymi endosomami, a więc regulujące pierwsze etapy szlaku edocytotycznego (BUCCI i współaut. 1992). Pewne białka należace do rodziny Rab wykazują jednak wyraźną specyficzność i związane są jedynie z określonymi rodzajami komórek. Należy do nich Rab 17 lokalizowane wyłącznie w komórkach epitelialnych przy powierzchni basolateralnej oraz przy strukturach związanych z końcowymi etapami endocytozy (LÜTCKE i współaut. 1993). Podobnie specyficzne wydają się białka Rab 15 i Rab 23 zlokalizowane w neuronach mózgu (ELFERINK i współaut. 1992, Olkkonen i współaut. 1993) oraz Rab 22b i Rab 30 - w ludzkich melanocytach (CHEN i współaut. 1996).

BIAŁKA SNARE

Rodzine białek SNARE można podzielić na dwie podgrupy. Do jednej należą znajdujące się w błonie pecherzyków v-SNARE, drugie, to znajdujące się w błonie akceptora t-SNARE. Zasadę ich wzajemnego oddziaływania, określaną jako hipoteza SNARE przedstawił ROTHMAN (1994) (Ryc. 5). Oparta jest ona na założeniu, że kotwiczenie pecherzyka transportowego do błony docelowej może się odbyć jedynie w wyniku specyficznego kontaktu białek v-i t- (Ryc. 5). Pęcherzyk rozpoczynając swą drogę od donora (np. ER, trans Golgi) posiada na swej powierzchni v-SNARE, które odnajdują pokrewne t-SNARE na błonie akceptora (cis-Golgi, błona plazmatyczna). Efektem końcowym tego procesu jest zlewanie się obu błon, z tym że w zależności od lokalizacji akceptora zawartość pęcherzyka łączy się z zawartością akceptora pośredniego lub też jest wyrzucana na zewnątrz, poza obręb komórki (BENNETT 1995, LOWE i współaut. 1997).

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku odwrotnego, endocytotycznego szlaku, gdzie pęcherzyki endocytotyczne powstające w wyniku wpukalania się błony plazmatycznej mają na swej powierzchni wyłącznie v-SNARE, mimo iż w błonie znajdują się obydwie klasy białek. Po pokonaniu drogi w kierunku endosomu napotykają one na jego powierzchni odpowiadające im t-SNARE (Ryc. 5).

CYKL BŁONOWY MIĘDZY DONOREM I AKCEPTOREM

Należy pamiętać, że poza dwiema wymienionymi rodzinami białek w przemieszczaniu się błon od donora, ich kotwiczeniu i zlewaniu się z błonami akceptora, bierze udział szereg białek pomocniczych, nie tylko regulujących, ale wręcz niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesu cyklicznego transportu (SIMONS i ZE-RIAL 1993, PFEFFER 1994, NOVICK i ZERIAL 1997).

Białka Rab pełniące kluczową rolę w procesie przemieszczania błon, bezpośrednio po zsyntetyzowaniu są nieaktywne (PFEFFER 1994); aby przejść w formę aktywną muszą one być trwale izoprenylowane przez kowalencyjne przyłączenie dwóch 20-węglowych reszt geranylgeranylu do reszt cysteinowych na karboksylowym końcu ich łańcucha (MAGEE i NEW-MAN 1992). Proces ten jest niezbędny, gdyż tylko w formie aktywnej cytosolowe białka Rab mogą brać udział w transporcie pęcherzykowym. Prenylacja jest katalizowana przez Rab-geranylgeranyl transferazę, która jednak wchodzi w kontakt z białkami Rab dopiero wtedy, gdy do ich nieaktywnej formy zostanie przyłączona kolejna klasa białek regulujących, określana jako REP (Rab escort proteins — białka towarzyszące Rab). Pamiętać więc należy, iż białka Rab biorące udział w kolejnych etapach transportu pęcherzykowego występują wyłącznie w aktywnej, prenylowanej formie.

Opisując cykl błonowy (Ryc. 6) rozpocznijmy od momentu, gdy po fuzji pęcherzyka transportowego z błoną akceptora, przyłączony jest do niej kompleks Rab-GTP. Aby kontynuować cykl przemian białko musi przejść do cytosolu. Zdolność do odłączenia uaktywnionego Rab od błony akceptora i ponownego przeniesienia go do donora ma cytosolowe białko pomocnicze GDI (ang. guanine nucleotid dissociation inhibitor). Może ono jednak wejść w kontakt wyłącznie z kompleksem Rab-GDP, a więc konieczne jest włączenie się kolejnego czynnika pomocniczego GAP (ang. Rab specific GTP-ase activating proteins), który pozwoli na przejście GTP do GDP.

Zdolność GDI do odłączania Rab-GDP od błony akceptora i istnienie cytosolowej puli Rab-GDI świadczy, że to właśnie ten czynnik umożliwia cyrkulację białek Rab. GDI określany jest także, jako czynnik pozwalający na przyłączenie odzyskanego Rab do błony donora.

Po doprowadzeniu kompleksu w okolicę błony donora, GDI nie jest już dłużej potrzebny, ulega więc odłączeniu w wyniku działania GDF (ang. GDI displacement factor) i jako wolny GDI powraca pod błonę akceptora, aby brać udział w kolejnych cyklach. Rab-GDP jest natomiast włączany do błony donora, a jednocześnie podlega kolejnej przemianie w Rab-GTP. Jest ona



Ryc. 6. Cykl błonowy według PFEFFERA (1994).

GAP — białko aktywujące GTP-azę, GDI inhibitor dysocjacji nukleotydu guaninowego, GDF — czynnik odłączający GDI, GEF czynnik wymiany nukleotydu guaninowego, V w błonie pęcherzyka — v-SNARE, strzałka w błonie akceptora — t-SNARE. możliwa dzięki działaniu następnego czynnika regulacyjnego GEF (ang. guanine nucleotid exchange factor). Należy więc pamiętać, że przyłączenie Rab do błony donora możliwe jest dzięki zgodnemu współdziałaniu GDF i GEF.

Ponowne przejście Rab-GDP w Rab-GTP jest niezbędne, gdyż jedynie w takiej formie kompleks ten może być włączony do błony nowopo-

REGULACJA I KIERUNKOWANIE PROCESU ZLEWANIA SIĘ BŁON

Białka Rab-GTP regulują proces zlewania się błon jedynie pośrednio, katalizując połączenia v- i t-SNARE w odpowiednim czasie i miejscu. Rzeczywistym czynnikiem umożliwiającym kotwiczenie v-do t-, a następnie zlanie się błon jest kompleks NSF (ang. N-ethylmaleimide-sensitive factor) z α SNAP (ang. α -soluble NSF attachment protein). Należy pamiętać, iż termin SNARE (SNAP receptor) pierwotnie opisywał jedynie grupę białek przyłączających αSNAP (Söllner i współaut. 1993). Obecnie przez SNA-RE określana jest znacznie szersza klasa białek kierunkujących ruchem pęcherzyków, posiadających ściśle określoną strukturę i topologię (HAY i SCHELLER 1997). Działanie tych białek pozwala na zlewanie się błon w szlaku sekrecyjnym w ściśle określonych miejscach.

Rola kompleksu NSF/αSNAP w regulacji działania białek SNARE jest stale dyskutowana. Sugeruje się, że może on wchodzić w interakcję z synaptycznym kompleksem kotwiczącym — 7S i tworzyć wraz z nim dużą jednostkę — 20S, a hydroliza ATP przez NSF prowadzi do rozpadu połączeń między komponentami SNARE (białka v- i t-). Wyniki badań dotyczących roli NSF różnią się między sobą wskazując jego udział przed (KAISER i SCHEKMAN 1990) lub po (ORCI i współaut. 1989) kotwiczeniu pęcherzyków.

Współcześnie istnieją więc dwie teorie dotyczące udziału kompleksu NSF/αSNAP w kotwiczeniu pęcherzyków i zlewaniu się błon (Ryc. 7)(HAY i SCHELLER 1997). Pierwsza z nich sugeruje, że aktywność tego kompleksu pojawia się po połączeniu się v- i t-SNARE w wyniku wcześniejszej interakcji z Rab. Hydroliza ATP do ADP w wyniku działania NSF prowadzi do dysocjacji elementów SNARE i fuzji błon (Ryc. 7a).

Druga teoria mówi o udziale kompleksu NSF/ α SNAP w stworzeniu warunków do połączenia się v- i t-. Zakłada ona, że zależne od ATPi NSF przekształcenia mają miejsce zanim komplementarne v- i t- się połączą. Hydroliza ATP jest tym razem niezbędna do zakotwiczenia się elementów SNARE. Dopiero wtedy do akcji włączają się białka Rab umożliwiając fuzję błon wstającego pęcherzyka transportowego oraz wejść w interakcję ze znajdującymi się w niej błonowymi białkami v-SNARE. Pęcherzyk transportowy z Rab-GTP i v-SNARE przenoszony jest w kierunku błony akceptora i w ten sposób jeden cykl zostaje zamknięty, a kolejny może się rozpocząć.

(Ryc. 7b). Należy podkreślić iż, w tym przypadku v- i t- są nadal połączone, a więc nie może nastąpić powrót v-SNARE do błony donora i powtórzenie się cyklu w transporcie błonowym. Dysocjacja obu elementów następuje dopiero po kolejnym włączeniu się kompleksu NSF/ α S-NAP i hydrolizie ATP.



Ryc. 7. Model działania kompleksu NSF/ α SNAP po fuzji pęrzechyka z błoną (a) oraz przed fuzją (b) według HAYA i SCHELLERA (1997); czarna elipsa jednostka 20S powstała w wyniku interakcji synaptycznego kompleksu kotwiczącego i NSF/ α SNAP.

POWSTAWANIE PĘCHERZYKA TRANSPORTOWEGO

Białka sekrecyjne przenoszone są między poszczególnymi etapami szlaku sekrecyjnego w pęcherzykach transportowych, podlegając jednocześnie szeregowi przemian w wyniku działania glikozytransferaz, glikozydaz, czy proteaz (KUEHN i SCHEKMAN 1997). Powstawanie pęcherzyka transportowego jest więc ściśle związane ze zgromadzeniem odpowiedniej zawartości, obecnościa w błonie Rab-GTP, ale przede wszystkim (Pelham 1995, Salama i Schekman 1995) z udziałem kautomerów (kompleks cytosolowych białek opłaszczających). Stanowią one inną grupę niż, zaangażowane w prawidłowe funkcjonowanie szlaku endocytotycznego, opłaszczające klatryny (PEARSE i ROBINSON 1990, SCHEKMAN i ORCI 1996). Stwierdzono, że te struktury okrywające umożliwiają, przy udziale GTP i ATP, tworzenie pęcherzyków transportowych w przedziale między ER a aparatem Golgiego oraz w obrębie aparatu Golgiego. Mimo, iż wcześniej zdawano sobie sprawę z ich istnienia (BALCH i współaut. 1984), to dopiero w 1994r zgodnie z sugestią BARLOWEA i współaut. nadano im nazwy - COPI i COPII. Obecnie przyjmuje się (URBE i współaut. 1997), że COPI odpowiadają za transport w obrębie systemu Golgiego oraz za transport wsteczny od aparatu Golgiego do ER, podczas gdy COPII regulują ruch "do przodu" — od ER do aparatu Golgiego.

Proces tworzenia pęcherzyka wymaga spełnienia określonych warunków. W błonie donora musi nastąpić aktywacja czynnika GEF i lokalna koncentracja Rab (patrz Ryc. 6). Rozpoczyna go: 1) informacja z wnętrza ER o nagromadzeniu ładunku gotowego do transportu oraz 2) przejście białek opłaszczających (ang. coat proteins) z puli cytosolowej w określone miejsce na błonie donora. Polimeryzacja warstwy opłaszczającej na błonie donora odbywa się przez łączenie kautomerów, przy udziale czynnika błonowego GEF i przejścia GDP w GTP. Poszczególne elementy jednostkowe są dostarczane w okolicę błony, gdzie następuje ich przyłącznie do ostatniego elementu polimeru, a tym samym wydłużenie go. Narastanie warstwy opłaszczającej prowadzi do wytworzenia siły motorycznej niezbędnej do wygięcia błony i utworzenia pęcherzyka transportowego (URBE i współaut. 1997).

Odrębne zagadnienie stanowi proces wypełnianie pęcherzyków transportowych zawartością. Istnieje kilka modeli ilustrujących to zjawisko na etapie tworzenia się pęcherzyków na powierzchni siateczki śródplazmatycznej (Ku-EHN i SCHEKMAN 1997). Pierwszy to przepływ pecherzykowy (ang. bulk flow), kiedy zawartość nie podlega selekcji ani koncentracji w opłaszczonych COPII pęcherzykach transportowych. Kolejny to taki, gdy koncentracja zawartości i v-SNARE następuje w uprzywilejowanym rejonie, w wyniku obecności na błonie siateczki śródplazmatycznej specyficznej grupy białek (ang. gating proteins), które ściśle wyznaczają miejsce powstania pęcherzyka. Trzeci wariant określany, jako kierunkowe tworzenie pęcherzyka ma miejsce, gdy elementy błony, białka v-SNARE i przyszła zawartość pęcherzyka oddziaływują z COPII. Powstanie kompleksu tych elementów prowadzi do utworzenia w tym właśnie, uprzywilejowanym miejscu pęcherzyka transportowego.

Myślę, że przedstawione powyżej informacje pozwolą spojrzeć na loriki tintinnidów z punktu widzenia powszechnego u Eukariota procesu sekrecyjnego. Lorki to struktury organiczne, zbudowane głównie z białek, powstawające w wyniku skomplikowanych, wewnątrzkomórkowych przemian. Sekrecja materiału lorikotwórczego prowadzi do powstania osłonki protoplastu, o interesującym i różnorodnym pokroju zewnętrznym, a jednocześnie o precyzyjnej, tworzącej formę plastra miodu mikroarchitekturze wewnętrznej ścian (WASIK i współaut. 1996, 1997).

SECRETION AND ITS ROLE IN TINTINNID LORICAE FORMATION

Summary

Formation of extracellular structures such as tintinnid's loricae is the result of the secretion process. Its correct progress requires synchronization of the intracellular transporting system, which enables to target proteins from rough endoplasmic reticulum (ER) to their destination. This is feasible due to the central vacuolar system in which two pathways act simultaneously, the biosynthetic pathway from ER to plasma membrane and the opposite — the endocytotic one. The movement from one to the next step in the biosynthetic pathway is realized in the form of vesicle transport. This transport depends on the recognition and fusion of specific membranes. These processes are regulated by two main families of proteins, Rab and SNARE and by additional regulated proteins. interaction of proteins which the regulate progress of secretion leads in consequence to formation of, e.g. such distinct and precise structures as tintinnid loricae. The activities of the main and associate regulatory proteins are described. The course of the membrane cycle with transfer of transport vesicles between donor and acceptor, as well as membrane fusion, is also presented.

LITERATURA

- BALCH W. E., DUNPHY W. G., BRAELL W. A., ROTHMANN J. E., 1984. Reconstitution of the transport protein between succesive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. Cell 39, 405–416.
- BARLOWE C., ORCI L., YEUNH T., HOSOBUCHI M., HAMAMOTO S., SALAMA N., REXACH M. F., RAVAZZOLA M., AMHERDT M., SCHEKMAN R., 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteinc that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Cell 77, 895–907.
- BENNETT M. K., 1995. SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. Curr. Opi. Cell Biol. 7, 581–586.
- BIERNACKA I., 1952. Studia nad rozrodem niektórych gatunków rodzaju Tintinnopsis Stein. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. C 6, 211–247.
- BUCCI C., PARTON R.G., MATHER I. H., STUNNENBERG H., SIMONS K., HOFLACK B., ZERIAL M., 1992. The small GTPase rab 5 functions as a reulatory factorin the early endocytic pathway. Cell 70, 715–728.
- CHEN D., GUO J., MIKI T., TACHIBANA M., GAHL W.A., 1996. Molecular cloning of two novel rab genes from human melanocytes. Gene 174, 129–134.
- DADAY E.von, 1887. Monographie der Familie der Tintinnoden. Mitt. Zool. Sta. Neapel 7, 473–591.
- DOGIEL W. A., POLJANSKY J. I., CHAISSIN E .M., 1962. General Protozoology. Russian Acad. Sci. Press, Moscow, Leningrad, str. 592 (po rosyjsku).
- ELFERINK L. A., ANZAL K., SCHELLER R. H., 1992. Rab 15, a noval low molecular weight GTP-binding protein specifically expressed in rat brain. J. Biol. Chem. 267, 5768– 5775.
- ENTZ G., 1884. Über Infusorien des Golfes von Neapel. Mitt. Zool. Sta. Neapel 5, 289–444.
- GALLWITZ D., DONATH C., SANDER C., 1983. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. Nature 306, 704–707.
- GOLD K., 1980. SEM studies on the lorica of various Tintinnina. Scann. Electron. Microsc. 3, 537–542.
- GOLD K., MORALES E. A., 1975. Tintinnina of the New York Bight: lorica of Parafavella gigantea, P. parumdentata and Ptychocylis obtusa. Trans. Amer. Misrosc. Soc. 94, 142–145.
- GOLD K., MORALES E. A., 1976. Studies on the size, shapes, and the development of the lorica of agglutinated Tintinnida. Biol. Bull. 150, 377–392.
- GOODSON H. V., VALETTI C., KREIS T. E., 1997. Motors and membrane traffic. Curr. Opi. Cell Biol. 9, 18–28.
- HADDAD A., TURKEWITZ A. P., 1997. Analysis of exocytosis mutants indicates close coupling between regulated secretion and transcription activation in Tetrahymana. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 10675–10680.
- HAY J.C., SCHELLER R. H., 1997. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. Curr. Opi. Cell Biol. 9, 505–512.
- HUBER L. A., PIMPLIKAR S., PARTON R. G., VIRTTA H., ZERIAL M., SIMONS K., 1993. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. J. Cell Biol. 123, 34–45.
- KAISER C. A., SCHEKMAN R. W., 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. Cell 61, 723–733.
- KLAUKE N., PLATTNER H., 1998. Caffeine-induced Ca²⁺ transients and exocytosis in Paramecium cells. A correlated Ca²⁺ imaging and quenched-flow/freeze fracture analysis. J. Membr. Biol. 158, 197–208.

- KLAUSNER R. D., 1989. Sorting and traffic in the central vacuolar system. Cell 57, 703–708.
- KOFOID C. A., CAMPBELL A.S., 1929. A Conspectus of the Marine and Fresh-water Ciliata Belonging to the Suborder Tintinnoinea, with Descriptions of the New Species Principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific 1904–1905. University of California Press, Berkeley, California.
- KUEHN M. J., SCHEKMAN R., 1995. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. Curr. Opi. Cell Biol. 9, 477–483.
- LAVAL-PEUTU M., 1981. Construction of the lorica in Ciliata Tintinnina. In vivo study of Favella ehrenbergii: variability of the phenotypes during the cycle, biology, statistics, biometry. Protistologica 17, 249–272.
- LAVAL-PEUTO M., BROWNLEE D. C., 1986. Identification and systematics of the Tintinnina (Ciliophora): evaluation and suggestions for improvement. Ann. Inst. Oceanogr, Paris 62, 69–84.
- Lowe S. L., PETER F., SUBRAMANIAN V. N., WONG S. H., HONG W., 1997. A SNARE involved in protein transport through the Golgi apparatus. Nature 389, 881–884.
- LÜTCKE A., JANSSON S., PARTON R. G., CHAVRIER P., VALENCIA A., HUBER L. A., LEHTONEN E., ZERIAL M., 1993. Rab 17, a noval small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. J. Cell Biol. 121, 553–564.
- LINIAL M., 1997. SNARE proteins why so many, why so few? J. Neurochem. 69, 1781–1792.
- MAGEET., NEWMAN C., 1992. The role of lipid anchors for small G proteins in membrane trafficking. Trends Cell Biol. 9, 318–323.
- MARSHAL S. M., 1969. Order: Tintinnida. [W:] Protozoa. Conseil International pour L'Exploration de la Mer. FRASHER J. K., HANSEN V. Kr. (red.) ,Charlotenlund Slot, Denmark, 117–127.
- MELIA S. M., COLE E. S., TURKEWITZ A. P., 1998. Mutational analysisof regulated exocytosis in Tetrahymena. J. Cell Sci. 111, 131–140.
- MIRONOV A. A., WEIDMAN P., LUINI A., 1997. Variations on the intracellular transport theme: muturing cisternae and trafficing tubules. J. Cell Biol. 3, 481–484.
- NOVICK P., ZERIAL M., 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. Curr. Opi. Cell Biol. 9, 496–504.
- OLKKONEN V. M., DUPREE P., KILLISCH I., ZERIAL M., SIMONS K., 1993. Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the Rab subfamily. J. Cell Sci. 106, 1249–1261.
- ORCI L., MALHOTRA V., AMHERDT M., SERAFINI T., ROTHMAN J. E., 1989. Dissection of single round of vesicular transport: squential intermadiates for intercisternal movement in thr Golgi stack. Cell 56, 357–368.
- PALADE G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein sunyhesis. Science 189, 347–358.
- PEARSE B. M. F., ROBINSON M. S., 1990. Clathrin, adaptors and sorting. Ann. Rev. Cell Biol. 6, 151–171.
- PELHAM H. R. B., 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Curr. Opi. Cell Biol. 7, 530–535.
- PFEFFER S. R., 1994. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. Curr. Opi. Cell Biol. 6, 522–526.
- ROTHMAN J. E., 1994. Mechanism of intracellular protein transport. Nature 372, 55–63.

- SALAMA N. R., SCHEKMAN R. W., 1995. The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. Curr. Opi. Cell Biol. 7, 536–543.
- SALMINEN A., NOVICK P. J., 1987. A ras-like proteins is required for a post-Golgi event in yeast secretion. Cell 49, 527– 538.
- SIMONS K., ZERIAL M., 1993. Rab proteins and the road maps for intracellular transport. Neuron 11, 789–799.
- SCHEKMAN R., ORCI L., 1996. Coat proteins and vesicle budding. Science 271, 1526–1533.
- SMALL E. B., LYNN D. H., 1985. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. [W:] An Illustrated Guide to the Protozoa. LEE J. J., HUTNER S. H., BOVEE E. C. (red.), Society of Protozoologist, 393–575.
- SÖLLNER T., WHITEHEART S. W., BRUNNER M., ERDIUMENT-BROM-AGE H., GEROMANOS S., TEMPST P., ROTHMAN J. E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362, 318–324.
- TISDALE E. J., BOURNE J.R., KHOSRAVI-FAR R., DER C. J., BALCH W. E., 1992. GTP-binding mutants of Rab1 and Rab 2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. J. Cell Biol. 119, 749-761.

- URBE S., TOOZE S. A., BARR F. A., 1997. Formation of secretory vesicles in the biosynthetic pathway. Bioch. Bioph. Acta 1358, 6-22.
- VERBSKY J.W., TURKIEWITZ A. P., 1998. Proteolytic processing and Ca²⁺- binding activity of dense-core vesicle polypeptides in Tetrahymena. Mol. Biol. Cell 9, 497–511.
- WACKER I., KAETHER C., KRÖMER A., MIGALA A., ALMERS W., GERDES H-H., 1997. Microtubule dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFOtagged secretory protein. J. Cell Sci. 110, 1453–1463.
- WASIK A., 1998. Antarctic tintinnids: their ecology, morphology, ultrastructure and polymorphism. Acta Protozool. 37, 5–15.
- WASIK A., MIKOŁAJCZYK E., LIGOWSKI R., 1996. Agglutinated loricae of some Baltic and Antarctic Tintinnina species (Ciliophora). J. Plankt. Res. 18, 1931–1940.
- WASIK A., MIKOŁAJCZYK E., GOLEBIOWSKA M., 1997a. Morphology and microstructure of selected Tintinnina loricae. Acta Protozool. 36, 31–38.
- WASIK A., MIKOŁAJCZYK E., GOŁĘBIOWSKA M., SIKORA J., 1997b. X-ray analysis and cytochemical staining of some tintinnid loricae. Acta Protozool. 36, 153–155.