

ANDRZEJ GREBECKI

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: grebecki@nencki.gov.pl

SPORY O MECHANIZM RUCHU AMEB

WPROWADZENIE

Ruchem ameboidalnym przemieszczają się, poza amebami zaliczanymi do pierwotniaków, także rozmaite komórki zwierzęce, zwłaszcza komórki embrionalne, komórki układu obronnego oraz wiele komórek nowotworowych. Podstawowe jego prawidłowości przez wiele dziesiątków lat łatwiej było wykrywać u ameb swobodnie żyjących, niż u komórek tkankowych. Stąd zainteresowanie mechanizmem ich ruchu.

W artykule tym chcę przedstawić nie tylko współczesny pogląd na to, w jaki sposób poruszają się swobodnie żyjące ameby słodkowodne. Drugim moim zamierzeniem jest wskazać przy tej okazji na niektóre, być może nie dla każdego oczywiste, prawidłowości procesu poznania i zrozumienia funkcji komórek i organizmów żywych. Po pierwsze, dzieje trwających już ponad półtora wieku kontrowersji wokół mechanizmu ruchu ameb uczą, że walka sprzecznych teorii zwykle nie kończy się ostatecznym zwycięstwem jednej z nich, jak tego oczekują jej uczestnicy, ani nawet kompromisem pomiędzy nimi. Najczęściej prowadzi ona do narodzin całkiem innej, nowej koncepcji zdolnej objaśnić pozornie sprzeczne argumenty nagromadzone w toku sporu. Prawda nie leży więc po żadnej ze stron ani, tym bardziej, po środku. Leży ona przeważnie obok, a nawet w innej płaszczyźnie, by zaś dostrzec coś w innej płaszczyźnie trzeba innego punktu widzenia. Po drugie, historia badania i objaśniania ruchu amebowego jest szczególnie dobrym przykładem tego, że w biologii ekperymentalnej nie zawsze sprawdza się z pozoru logiczna droga od poznania materialnego podłoża jakiegoś zjawiska do badania jego przebiegu, dynamiki i znaczenia. Nader często nasza wiedza o interesującej nas funkcji komórki lub organizmu jest wcześniejsza i rozleglejsza, niż

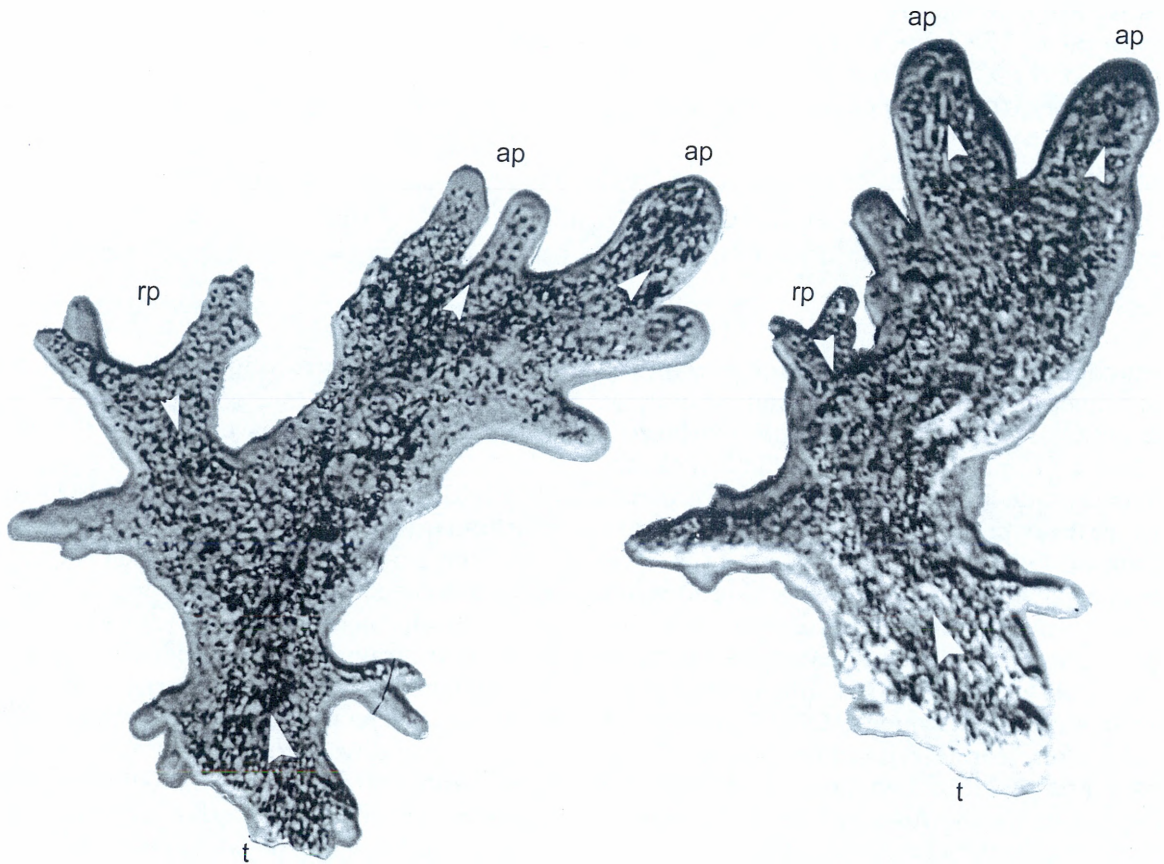
znajomość struktur odpowiedzialnych za tę funkcję.

Gdy przed czterdziestu laty po raz pierwszy zdradziłem memu ówczesnemu szefowi i Mistrzowi Janowi Dembowskiemu swoją chęć porzucenia pracy na orzęskach, aby zająć się amebami, ten znakomity badacz reakcji ruchowych orzęsków przestrzegł mnie słowami: „Niech Pan się za to nie bierze... To jest zbyt proste, żeby się dało zrozumieć”. To paradoksalne stwierdzenie miało głębokie uzasadnienie. Mechanizm ruchu orzęsków jest łatwiej zrozumieć, bo rzęski są dobrze widoczne nawet w klasycznym mikroskopie optycznym, ich struktura wewnętrzna jest nietrudna do zbadania w mikroskopie elektronowym, a co najważniejsze, są to stałe narządy ruchu wykonujące swą czynność wielokrotnie, a właściwie permanentnie i rytmicznie. Badacz orzęsków interpretujący mechanizm ich ruchu i reagowania na bodźce znajduje więc w znajomości struktury aparatu ruchowego oparcie pewne.

Oparcia takiego długo brakowało badaczowi ruchu ameb, a pod niektórymi względami nie jest ono zupełnie pewne do dzisiaj. Jednym z powodów jest to, że aparat ruchowy ameb jest znacznie delikatniejszą strukturą i uwidocznienie go wymagało bardziej wyrafinowanych metod. Największą trudność sprawia jednak to, że powszechną cechą ameb (a raczej wszystkich komórek ameboidalnych włącznie z tkankowymi) jest brak narządów ruchu o stałej budowie i stałym położeniu w komórce. Wykonanie każdej funkcji ruchowej prowadzi bowiem w rezultacie do dezintegracji tej struktury, która ją wykonała. Zarówno same wypustki wytwarzane w przedniej części ameby, zwane nibynóżkami, jak żelifikowana podbłonowa warstwa cytopla-

zmy wzdłuż obrzeża komórki (ektoplazma) oraz zawarty w niej kurczliwy cytoszkieleł ulegają stopniowej dezintegracji w miarę pełnienia swych funkcji. Muszą być one zatem zastępowane nowymi i są nieprzerwanie odbudowywa-

ne w strefie czołowej. Mamy więc do czynienia ze stanem ciągłej morfologicznej, ultrastrukturalnej i molekularnej płynności w komórce pełzającej ameby (Ryc. 1 i 2).



Ryc. 1. Zmienność postaci *Amoeba proteus* w trakcie ruchu.

Dwie fotografie tej samej ameby wykonane w odstępie około 30 sek. W tym czasie komórka posuwała się do przodu skracając zarazem w lewo. Oznaczono wysuwające się nibynóżki przednie (ap), nibynóżki cofające się i obkurczane (rp) oraz tył ameby (t).

CZY SIŁĄ NAPĘDOWĄ RUCHU AMEB JEST SKURCZ?

Sprzeczności między teoriami ruchu ameb zaczęły się pojawiać w XIX w. i w początkach XX w. Już pierwsza z nich (DUJARDIN 1835) głosiła, że siłą napędową tego ruchu jest skurcz podobny do skurczu mięśni. Zgadza się dzisiaj co do słuszności samej istoty tego poglądu, chociaż był to wówczas pomysł wykraczający daleko poza znajomość faktów. Dujardin przypisywał aktywność skurczową ogólnie cytoplazmie ameby (którą zresztą przez analogię z mięśniami nazywał sarkodą), bo bardzo mało

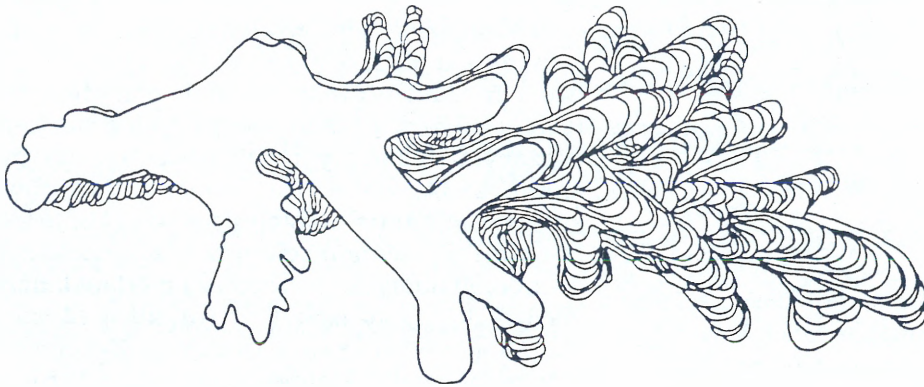
wówczas wiedziano o prawidłowościach ruchu ameb, o strukturze i funkcjach ich cytoplazmy, a nic o mechanizmie skurczu. Pole dla odmiennych interpretacji długo więc pozostawało otwarte. Przez kilkadziesiąt lat powstawały zatem teorie objaśniające ruch ameb działaniem innych sił, jak różnice napięcia powierzchniowego, siły elektrostatyczne, pęcznienie i odwadnianie (synereza) żelu wewnątrz komórki.

Ten pierwszy etap sporów o ruch amebowy mógł się zakończyć wówczas, gdy poznano pod-

stawowe zróżnicowanie cytoplazmy ameby na dwie warstwy, zewnętrzną ektoplazmę rozlokowaną pod błoną komórki i endoplazmę wypełniającą jej wnętrze. Ektoplazma ma galaretowatą konsystencję żelu i przy pobieżnej obserwacji wydaje się nieruchoma, endoplazma zaś jest ciekła (w stanie solu) i płynie nieprzerwanym strumieniem od tyłu do przodu komórki. Ta różnica w konsystencji i zachowaniu się peryferyjnej i osiowej warstwy cytoplazmy stała się podstawą nowej skurczowej teorii ruchu ameb (MAST 1926). Według Masta żel ektoplazmatyczny tworzy kurczliwy cylinder zamknięty

wiedząc nic o ultrastrukturze ich aparatu kurczliwego, a tym bardziej o molekularnym mechanizmie skurczu. Tak więc znowu poprawne objaśnienie funkcji wyprzedziło poznanie jej materialnego podłoża.

Jego poznawanie rozpoczęło się na przełomie lat 50. i 60. dzięki rozwojowi mikroskopii elektronowej oraz udoskonalaniu technik utrwalania i obróbki preparatów. Po wykryciu ultrastruktury mięśni prążkowanych przez Huxleya (HUXLEY i HANSON 1954) zaczęły pojawiać się w Stanach Zjednoczonych, w Anglii, w Niemczech, w Polsce i w Japonii doniesienia o



Ryc. 2. Zastępowanie kolejnych przednich nibynózek nowymi i rozbieżność ich kierunków w stosunku do osi ruchu komórki jako całości.

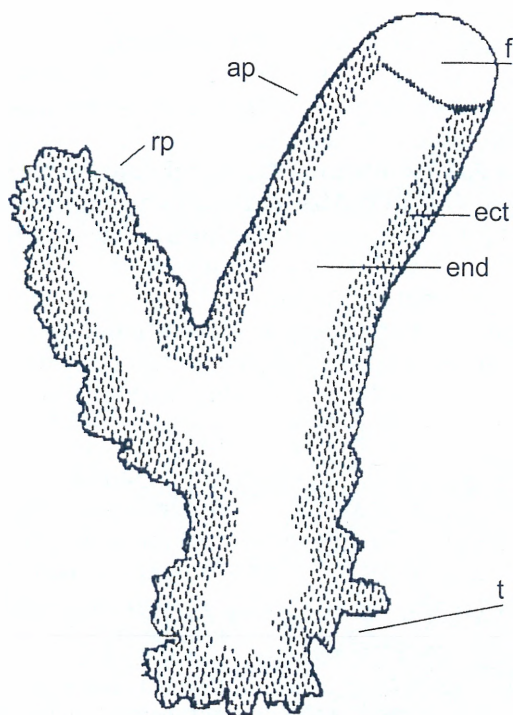
Rysunek wykonany z filmu metodą dorysowywania co 2,5 sek. nowej przedniej krawędzi każdej wysuwanej nibynóżki, w łącznym czasie 148 sek. (wg KŁOPOCKIEJ i GRĘBEC-KIEGO 1980).

z tyłu, a otwarty w przodzie ameby (Ryc. 3). Jego nieprzerwany skurcz powoduje wzrost ciśnienia hydrostatycznego we wnętrzu komórki i tłoczy zawartą w nim płynną endoplazmę w kierunku otwartego przedniego końca podobnie jak, słowami autora, „wyciska się pastę z tuby”. W trakcie skurczu peryferyjnego cylindra zachodzi solifikacja żelu, czyli wytwarzanie nowej endoplazmy, natomiast w przednim końcu ameby żelifikacja solu, czyli napływającej tam endoplazmy, co prowadzi do tworzenia nowych odcinków cylindra ektoplazmatycznego.

Teoria Masta była kanonem zadowalającym badaczy co najmniej przez następne 35 lat, a poglądy przypisujące ruch amebowy siłom innym niż skurcz stały się raczej kuriozalną rzadkością. Daleko już jednak teoria ta odbiegła od ogólnikowości pierwotnej idei Dujardin. Opisała, aczkolwiek tylko na poziomie ogólnomorfologicznym, drogę od skurczu do ruchu komórki: siłę napędową wytwarza skurcz w peryferyjnej ektoplazmie, przekaznikiem siły jest ciśnienie hydrostatyczne, masę komórki przenosi do przodu wewnętrzny strumień endoplazmy, a ciągłość i skuteczność całego procesu zapewnia nieustanna przemiana ektoplazmatycznego żelu w endoplazmatyczny sol, i odwrotnie. Nikt dzisiaj nie przeczy, że u ameb tak to się właśnie odbywa. Ale Mast oparł się tylko na morfologicznym zróżnicowaniu ich cytoplazmy, nadal nie

obecności również w cytoplazmie ameb włókien zbudowanych z tych samych dwóch białek kurczliwych, co w mięśniach: cienkich filamentów spolimeryzowanej aktyny oraz grubych filamentów miozynowych. Po kilkunastu latach mikroskopię elektronową wspomogła immunocytochemia; zastosowanie fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał po pierwsze umożliwiło pewną identyfikację białek wchodzących w skład aparatu kurczliwego różnych komórek (który zaczęto nazywać cytoszkieletem), a po drugie pozwoliło wykrywać je także w żywych, nie utrwalonych komórkach, a więc śledzić je w akcji. Szczególne zasługi w opisaniu ultrastruktury aparatu kurczliwego ameb miała szkoła niemiecka Wohlfarth-Bottermanna i Stockema, która jako pierwsza wykazała, że ma on postać podbłonowej sieci aktynowej, obecnie często zwanej korteksem kurczliwym (Ryc. 4), a w poznawaniu jego budowy cząsteczkowej grupy amerykańskie Korna, Pollarda i Taylora (por. prace przeglądowe KOMNICK i współaut. 1973, TAYLOR i CONDEELIS 1979, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988).

W cytoplazmatycznym cytoszkielecie ameb nie ma mikrotubul (pojawiają się one tylko w jądrze komórkowym w trakcie podziału). Aparat ruchowy ameb jest więc całkowicie odmienny od aparatu ruchowego orzęsków. Bicie rzęsek jest wynikiem wzajemnego przesuwania włó-



Ryc. 3. Schemat zróżnicowania cytoplazmy ameby na peryferyjny żelifikowany cylinder ektoplazmatyczny (ect) i wewnętrzną płynną endoplazmę (end).

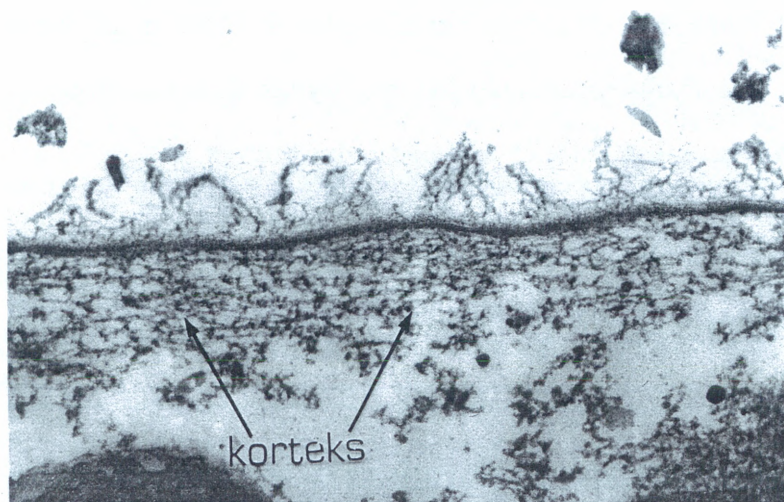
Cylinder ektoplazmatyczny pokazano jako otwarty w strefie czołowej (f) posuwającej się nibynóżki (ap); jest on zaś zamknięty w tyle ameby (t) i na końcu nibynóżki wycyfowanej (rp).

kien spolimeryzowanej tubuliny przez dyneinę (patrz art. FABCZAK i FABCZAK w tym numerze KOSMOSU), a skurcz korteksu ameb jest wywołany przesuwaniem filamentów spolimeryzowanej aktyny przez miozynę. Aktyna amebowa jest identyczna z mięśniową. Mięśniowa aktyna wprowadzona do komórki ameby wbudowuje się w jej cytoszkielet i normalnie w nim funkcjonuje. Miozyna wywołująca skurcz

podbłonowej sieci aktynowej ameb jest tego samego typu co w mięśniach (miozyna II). Co prawda, nie umiemy sobie jeszcze wyobrazić, jak miozyna przesuwa w korteksie ameby filamente aktynowe, które nie są ściśle uporządkowane jak w mięśniach, ale ułożone w trójwymiarową sieć. Grube filamente miozyny II towarzyszą aktynie wzdłuż całego obrzeża ameby, z wyjątkiem jej przedniej krawędzi, gdzie znaleziono inne miozyny, zwane miozynami I. Miozyny I są obecne także w wielu niemięśniowych komórkach tkankowych, gdzie pełnią inne funkcje (między innymi transportowe), a ich udział w aktywności skurczowej pozostaje dyskusyjny.

Ektoplazma ameby dlatego jest w stanie żelu, że aktyna ma w niej postać spolimeryzowanych filamentów (F-aktyna), ponadto spiętych w wielu punktach specyficznymi białkami wiążącymi filamente pomiędzy sobą. Szeroko znane białko spinające filamente aktynowe, zwane α -aktyniną, występuje powszechnie także u ameb. Przemiana ektoplazmatycznego żelu w endoplazmatyczny sol polega na depolimeryzacji F-aktyny, to znaczy na rozpadzie filamentów na monomery zwane G-aktyną. Dobudowywanie nowych odcinków cylindra ektoplazmatycznego w czole pełzającej ameby jest zaś wynikiem ponownej polimeryzacji G-aktyny i jej powrotu w postać F-aktyny. Polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny, a zatem nieprzerwana rekonstrukcja i dezintegracja aparatu ruchowego komórek ameboidalnych, jest pod kontrolą filaminy, profiliny i białek z rodziny żelsoliny.

Sam skurcz aktomiozynowego cytoszkieletu w korteksie ameby nie mógłby wywoływać wzrostu wewnątrzkomórkowego ciśnienia hydrostatycznego, a w następstwie powodować przepływu endoplazmy, gdyby sieć aktynowa nie miała względnie trwałych połączeń z wewnątrz-



Ryc. 4. Podbłonowa sieć aktynowa stanowiąca korteks kurczliwy *Amoeba proteus* (wg GREBECKIEJ i HREBENDY 1979).

na stronę błony komórkowej. W istocie rozciąga się ona pod błoną ameby cienką warstwą o grubości około 1 μm i wiąże się z błoną w funkcjonalny kompleks za pośrednictwem systemu kilku białek; najważniejsze z nich — spektryna oraz wspomniana już α -aktynina współdziałająca z winkuliną i taliną — są obecne w najrozmaitszych komórkach i zostały wykryte immunologicznie u różnych ameb; inne (jak np. pontikulina) mogą być specyficzne dla komórek amebowych określonego rodzaju.

Poza podbłonową siecią kortykalną F-aktyna w cytoszkielecie ameby występuje również w postaci wiązek przenikających głębsze warstwy cytoplazmy. Nie wiadomo, czy wiązki te uczestniczą w skurczu napędzającym ruch ameby; prawdopodobnie utrzymują one we względnie stałym położeniu jądro komórkowe i niektóre organelle (np. wodniczkę kurczliwą) pomimo przepływu strumienia otaczającej je endoplazmy. Mogą też przekazywać sygnały mechaniczne (zmiany naprężeń) od powierzchni komórki do jej wnętrza.

Równoległe do tych dowodów skurczowej natury ruchu ameb, które opierały się na strukturze ich aparatu ruchowego, gromadziły się też inne świadectwa uzyskiwane drogą ekspe-

rymentalnej interwencji w jego funkcje. Wspomnę tylko kilka ważniejszych. Cytoszkielecik ameby wyizolowany z komórki za pomocą detergentów kurczy się po dodaniu ATP w obecności jonów wapnia i magnezu, podobnie jak system aktomiozynowy mięśni *in vivo* i *in vitro*. Wywoływanie różnych reakcji ruchowych ameby i zmian jej kształtu rozmaitymi bodźcami może zmieniać proporcję udziału F-aktyny do G-aktyny w cytoplazmie. Wstrzykiwanie do wnętrza ameby białek z rodziny żelsoliny, które w innych komórkach rozcinają filamenty aktynowe, powoduje rozpad korteksu i wytworzenie wypustki w miejscu iniekcji. Wstrzyknięcie cytochalazyny, która hamuje polimeryzację aktyny dezorganizuje lub nawet wstrzymuje ruch ameby. Mutanty niektórych ameb zawierające tylko miozyny I, a pozbawione miozyny II, nadal wytwarzają wypustki, ale nie mogą się przemieszczać.

Funkcja napędowa skurczu w ruchu ameb stała się więc całkowicie pewna, a budowa i skład ich cytoszkieletu w znacznej mierze objaśniły molekularne podłoże zjawisk opisanych kiedyś na poziomie morfologicznym przez Masta.

SPÓR O LOKALIZACJĘ FUNKCJI NAPEĐOWYCH I STERUJĄCYCH RUCHEM AMEB

Już w początkach poznawania budowy aparatu ruchowego ameb wybuchł jednak nowy, bardzo ostry i długotrwały spór — o lokalizację siły napędowej w komórce ameby, a w konsekwencji także o sposób jej transmisji; czy skurcz z tyłu tłoczy zawartość komórki do przodu, czy odwrotnie — ciągnie ją skurcz zachodzący w przedniej krawędzi ameby. Spór ten zapoczątkowały prace Brytyjczyka Goldacre'a i Amerykanina Allena (GOLDACRE i LORCH 1950; GOLDACRE 1961; ALLEN 1961 a, b).

Goldacre zasadniczo przejął teorię Masta i starał się ją dostosowywać do ówczesnych poglądów na mechanizm skurczu, lecz nadał jej charakter skrajny głosząc, że skurcz zachodzi tylko w samym tylnym końcu ameby (Ryc. 5A), natomiast ektoplazma ścian bocznych jest bierna. Zauważmy, że do tłoczenia endoplazmy nie wystarcza sam ogólny wzrost wewnętrznego ciśnienia hydrostatycznego, lecz potrzebny jest jego gradient — ciśnienie w tyle komórki musi być wyższe, niż w przodzie. Teoria Goldacra (ang. tail contraction theory) tłumaczyła więc powstanie tej różnicy właśnie lokalną nadwyżką ciśnienia w kurczącym się tyle ameby.

Teoria Allena (ang. front contraction theory) powstała w całkowitej opozycji do poglądów

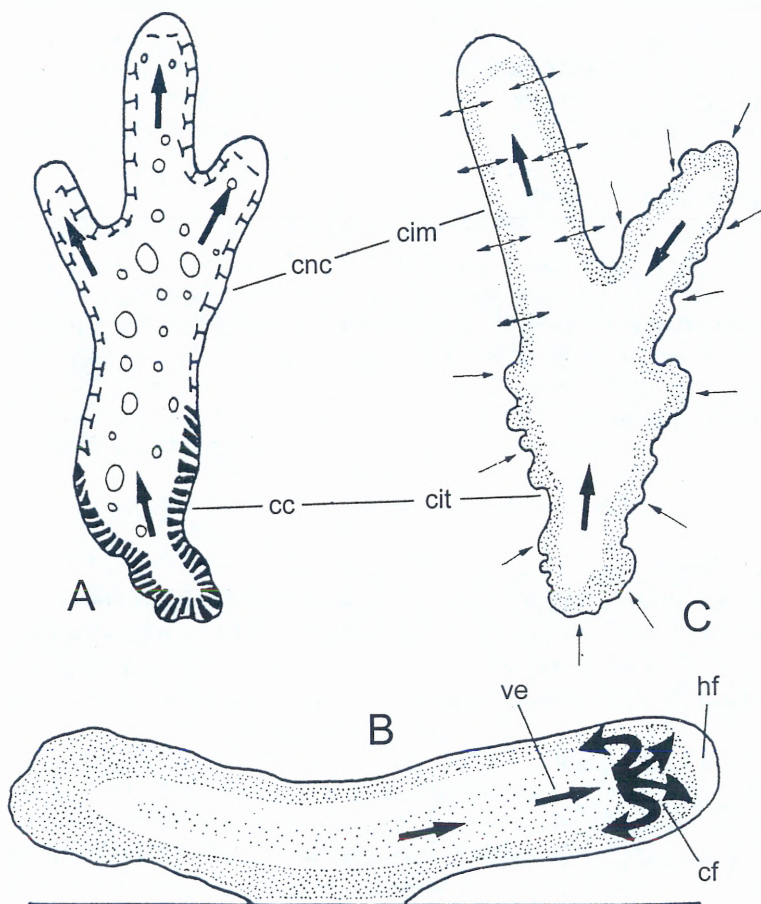
klasycznych i głosiła, że skurcz zachodzi pod przednią krawędzią ameby (Ryc. 5B), już w momencie żelifikacji endoplazmy i ciągnie endoplazmę, a w następstwie także ektoplazmę i całą komórkę do przodu. Konsekwencją tego poglądu było, po pierwsze, zaprzeczenie kurczliwości ektoplazmy i mniemanie że jej przesuw jest biernym rezultatem sił działających gdzieindziej; po drugie, odrzucenie roli ciśnienia hydrostatycznego w transmisji siły motorycznej, przypisanie zaś endoplazmie zdolności do przekazywania naprężeń mechanicznych; po trzecie, przypisanie nibynóżkom wysuwanych w strefie czołowej samodzielności działania, dzięki czemu mogą one kontrolować kierunek i prędkość ruchu całej ameby.

Rzecz ciekawa, że teorii Allena, choć dotyczyła ona ameb swobodnie żyjących, zaufało wielu uczonych zajmujących się komórkami tkankowymi, ale badacze ruchu pierwotniaków przyjęli ją bardzo krytycznie, preferując raczej teorię skurczu tylnego (np. RINALDI i JAHN 1963, GOLDACRE 1964, GRĘBECKI 1964, JAHN 1964, SERAVIN 1964, KOROHODA i STOCKEM 1975, GRĘBECKA i GRĘBECKI 1975, WEHLAND i współaut. 1979).

Zaangażowaliśmy się sami w ten spór starając się w naszej pracowni, prawie przez dwadzieścia lat, sprawdzać doświadczalnie główne założenia i konsekwencje obu konkurencyjnych teorii. Doszliśmy wkrótce do przekonania, że trzeba szukać jakiegoś nowego rozwiązania, gdyż żaden z proponowanych modeli nie może być słuszny — jeden z nich lepiej objaśnia te fakty, z którymi nie radzi sobie drugi, i odwrotnie. Po pierwsze, w teorii skurczu przedniego zaprzeczenie kurczliwości ektoplazmy było jaszkrawo niezgodne z gromadzącą się wiedzą o

dzie komórki automatycznie rozwiązywała tę trudność, zaś teoria skurczu tylnego nigdy nie potrafiła wyjaśnić, dlaczego reakcja przodu jest natychmiastowa, skoro motor jest w tyle.

Nasze badania w mikroskopie elektronowym (np. GRĘBECKA i HREBENDA 1979) potwierdzały wyniki innych, zwłaszcza Stockema i jego uczniów, że aktomiozynowy cytoszkielet jest rozmieszczony peryferyjnie (Ryc. 4), co przemawia za tłoczeniem zawartości komórki, nie za jej ciągnięciem. Mikrooperacje polegające na miejscowym zasysaniu endoplazmy (GRĘBECKA



Ryc. 5. Lokalizacja skurczu w komórce według trzech teorii ruchu ameb.

A — teoria skurczu tylnego, kurczliwość ograniczona do tylnej części korteksu (cc), korteks ścian bocznych niekurczliwy (cnc), schemat WEHLANDA i współaut. (1979); B — teoria skurczu przedniego, kurczliwość w pętli żelifikującej się endoplazmy (cf) i mechaniczne ciągnięcie zawartości komórki (ve), schemat w rzucie bocznym, hf przód ameby, wg ALLENA i TAYLORA (1975); C — teoria ogólnego skurczu kortykalnego, skurcz izotoniczny (cit) w okolicach wycyfowanych i izometryczny (cim) w przyrastających (wg GRĘBECKIEGO 1982).

peryferyjnym rozmieszczeniu F-aktynowego cytoszkieletu (por. poprzedni rozdział), co właściwie samo powinno wystarczyć do odrzucenia poglądów Allena; natomiast nie wykluczało to teorii skurczu tylnego, choć jednoznacznie jej nie dowodziło. Po drugie, eksperymentalnym dowodom Allena, że gradient ciśnienia hydrostatycznego nie ma znaczenia dla ruchu ameb, zaprzeczyły inne doświadczenia (RINALDI i współaut. 1975); rzecz więc wymagała dalszej weryfikacji. Po trzecie jednak, raczej Allen miał rację, że kontrola i sterowanie ruchem powinny odbywać się z przodu, bo przód pierwszy styka się z nowymi bodźcami, gdy ameba wędruje w środowisku; lokalizacja siły napędowej w przodu

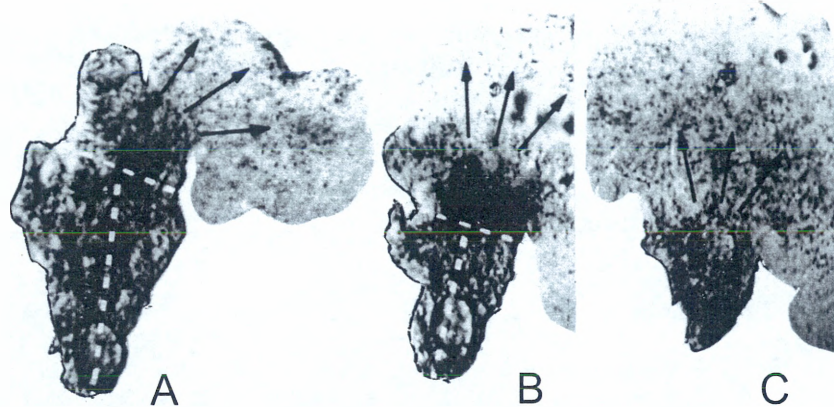
(1980) upewniły nas co do znaczenia gradientów ciśnienia hydrostatycznego dla jej przepływu. Nawet mikrooperacje polegające na nienaprawialnej perforacji przodu ameby (GRĘBECKA 1981) nie wstrzymywały funkcji ruchowych innych okolic komórki, które nadal kurczyły się i przesuwały do przodu, choć prowadziło to tylko do stopniowego wylewu endoplazmy na zewnątrz, aż do zupełnego wyczerpania zawartości komórki (Ryc. 6); to „samobójcze” zachowanie się ameby po całkowitym zniszczeniu jej przedniej części bezpośrednio dowodzi, że siła napędowa jej ruchu nie może być tam zlokalizowana.

Działaliśmy także miejscowo bodźcami świetlnymi skurczowymi (naświetlanie) i roz-

kurczowymi (zacienianie) na różne okolice ciała pełzającej ameby (GRĘBECKI 1981). Gdyby napęd funkcjonował w przedniej krawędzi, to skierowany na nią bodziec skurczowy powinien był przyspieszać ruch ameby, a rozkurczowy zwalniać go lub zatrzymywać. Wyniki były dokładnie odwrotne — naświetlanie przodu powodowało zatrzymanie ruchu i reorientację ameby, a jego zacienianie pobudzało ruch w dawnym kierunku. Natomiast, naświetlenie jakiegokolwiek innej okolicy komórki (niekoniecznie samego tyłu) przyspieszało jej ruch, a zacienienie zwalniało. Jeszcze raz więc doświadczenie bezpośrednio zaprzeczyło generacji siły napędowej w przodzie ameby, lecz nie potwierdziło poglądu, że jej wytwarzanie jest ograniczone tylko do samego tyłu komórki.

stanie skurczu (Ryc. 5C). W części tylnej, która nie jest przytwierdzona do podłoża, jego skutki są widoczne w postaci przesuwania się ektoplazmy do przodu, ubytku objętości i fałdowania powierzchni ameby (skurcz ma charakter izotoniczny). W strefie położonej zwykle w odległości około 1/3 długości ciała od przodu (GRĘBECKA i GRĘBECKI 1975) ameba w wielu punktach przylega do podłoża, a więc między tymi miejscami przyczepu skurcz korteksu nie może wywołać jego widocznego przesuwu, powoduje jednak naprężenie mechaniczne (tzn. ma charakter izometryczny). Teoria skurczu tylnego brała zaś pod uwagę tylko skurcz izotoniczny.

Jeżeli skurcz zachodzi w całej warstwie kortykalnej, to jak dochodzi do powstania różnicy ciśnienia hydrostatycznego między tyłem a



Ryc. 6. Skutki zniszczenia przodu czołowej nibynóżki *Amoeba proteus*.

A-C — kontynuacja skurczu kortykalnego w nieuszkodzonych środkowych i tylnych okolicach komórki prowadzi do wypływu endoplazmy na zewnątrz; białe linie w A i B pomagają ocenić ubytek objętości (wg GRĘBECKIEJ 1981).

Podobnie działają bodźce chemiczne. Już wcześniej było wiadome, że lokalny rozkurcz wywołany potraktowaniem jakiegokolwiek okolicy ciała ameby anestetykami prowadzi do powstania w tym miejscu nowej nibynóżki i wędrówkę komórki w kierunku bodźca rozkurczowego (GOLDACRE 1952, KOROHODA 1977).

Doszliśmy do wniosku, że poprawna teoria z jednej strony powinna dopatrywać się kontroli ruchu tam, gdzie jest ona biologicznie potrzebna, a więc z przodu, lecz z drugiej strony nie może lokalizować siły motorycznej w niezgodzie z rozmieszczeniem struktur kurczliwych w komórce. Rozwiązanie może polegać na przestrzennym rozdzieleniu funkcji napędowych i sterujących ruchem — kontrola prędkości i kierunku ruchu w przedniej krawędzi ameby, ale siła napędowa wszędzie poza nią, nie w samym tyle, lecz wszędzie tam, gdzie wzdłuż peryferii wciąż się kurczy sieć aktomiozynowa związana z błoną komórkową. Koncepcję tę nazwaliśmy teorią ogólnego skurczu kortykalnego (GRĘBECKI 1981, 1982 a, b).

Miejscowe stosowanie bodźców skurczowych i rozkurczowych pokazało, że cała warstwa kortykalna wzdłuż obrzeża komórki jest w

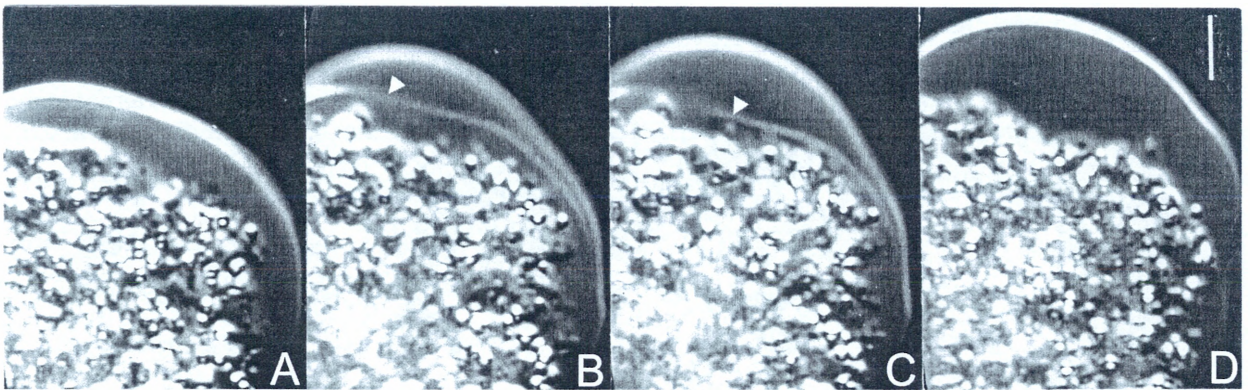
przodem ameby, która jest niezbędna dla uruchomienia przepływu endoplazmy? Takiego gradientu ciśnienia można osiągnąć dwoma sposobami; zamiast podnosić je w tyle, można równie dobrze obniżać je w przodzie. Podobnie jak w wodociągu — albo regulując pracę pomp, albo regulując zawory wylotowe. Teoria skurczu tylnego nie mogła wyjaśnić natychmiastowych reakcji przodu ameby, bo zakładała, że gradient ciśnienia powstaje wskutek jego przyrostu w tyle. Trudność ta zaś znika, jeżeli gradient jest spowodowany obniżeniem ciśnienia w przedniej krawędzi ameby. Wysuniętą przez nas teorię ogólnego skurczu kortykalnego można więc było także nazwać (może trafniej) teorią przedniej relaksacji.

Relaksacja w mięśniu oznacza, w sensie biochemicznym, rozłączenie (dysocjację) miozyny i aktyny. Brak grubych filamentów miozynowych pod przednią krawędzią ameby może wskazywać na podobny charakter jej relaksacji, ale nie jest to całkiem pewne. Pewna jest natomiast relaksacja w sensie biomechanicznym — rozerwanie w czole pełzającej ameby związku między dwiema strukturami, które muszą współdziałać w wytwarzaniu ciśnienia hydro-

statycznego, a mianowicie między korykalną siecią aktynową i błoną komórkową. W mikroskopie elektronowym spostrzeżono, równocześnie w pracowni Stockema i w naszej, że w przedniej krawędzi ameby sieć aktynowa nie jest związana z błoną, lecz odsunięta od niej o kilka μm (GRĘBECKA i HREBENDA 1979, WEHLAND i współaut. 1979). Stanowi ona jakby sito, które w strefie czołowej wysuwanej nibynóżki swobodnie przepuszcza płynną frakcję endoplazmy pod błonę. W rezultacie ciśnienie wewnątrzkomórkowe rzeczywiście musi w tym miejscu spadać powodując powstawanie gradientu wywołującego przepływ endoplazmy do przodu.

Rozrywanie związku kurczliwego cytoszkieletu z błoną jest zjawiskiem cyklicznym, które dopiero w dziesięć lat później udało nam się zaobserwować w żywych amebach (Ryc. 7),

już wcześniej STOCKEM i współaut. 1983, metodą immunofluorescencji]. Wówczas napływ cytoplazmy i ruch ameby do przodu chwilowo zwalniają lub ustają, ale po 2–3 sekundach znów następuje odklejenie odtworzonej warstwy kurczliwej i cykl się powtarza. Za każdym razem czołowa krawędź nibynóżki robi jeden „krok” do przodu. Jeśli zaś nie dojdzie do ponownego oderwania sieci aktynowej od błony, nibynóżka taka zacznie się cofać zgodnie ze skurczem cytoszkieletu w swych bocznych ścianach (Ryc. 8B). W takim przypadku sieć aktynowa zwykle odrywa się od błony w jakimś innym miejscu komórki, powstaje tam więc nowa nibynóżka, a w rezultacie cała ameba zmienia kierunek ruchu. Bodźce zewnętrzne zwane rozkurczowymi stymulują proces odrywania się korykalnej sieci aktynowej od błony, a bodźce



Ryc. 7. Przyżyciowa rejestracja odrywania się korteksu kurczliwego od błony komórkowej czołowej nibynóżki *Amoeba proteus*.

Po fazie ruchu zwolnionego (A) warstwa aktynowa (groty strzałek) odrywa się pod przednią krawędzią od błony, która uwypukla się (B i C) oraz posuwa się o kilka μm (D); skala 5 μm .

dzięki komputerowym technikom wzmacniania obrazu otrzymywanego w mikroskopie świetlnym (GRĘBECKI 1990). Jak pokazuje schemat na Ryc. 8A, od przedniej krawędzi pełznającej ameby odkleja się, mniej więcej co 2 sekundy, kurczliwa warstwa sieci aktynowej; do powstałego przestworu napływa przez nią płynna frakcja endoplazmy i wypycha błonę komórkową do przodu. Przedostaje się tam jednak wraz z nią zdepolimeryzowana G-aktyna, która wiąże się z błoną i polimeryzuje odtwarzając w ten sposób kurczliwą sieć peryferyjną (wykazali to

określane jako skurczowe hamują to zjawisko. Dlatego pierwsze z nich działają jako bodźce dodatnie, drugie zaś jako ujemne, a przednia krawędź ameby reaguje na nie natychmiast, chociaż to nie ona wytwarza siłę napędową ruchu. Przednie końce rosnących nibynóżek działają natomiast rzeczywiście jak zawory, których przemykanie lub otwieranie wyznacza drogi przepływu endoplazmy, a zatem kontroluje prędkość ruchu całej ameby i steruje jego kierunkiem.

UWAGI KOŃCOWE

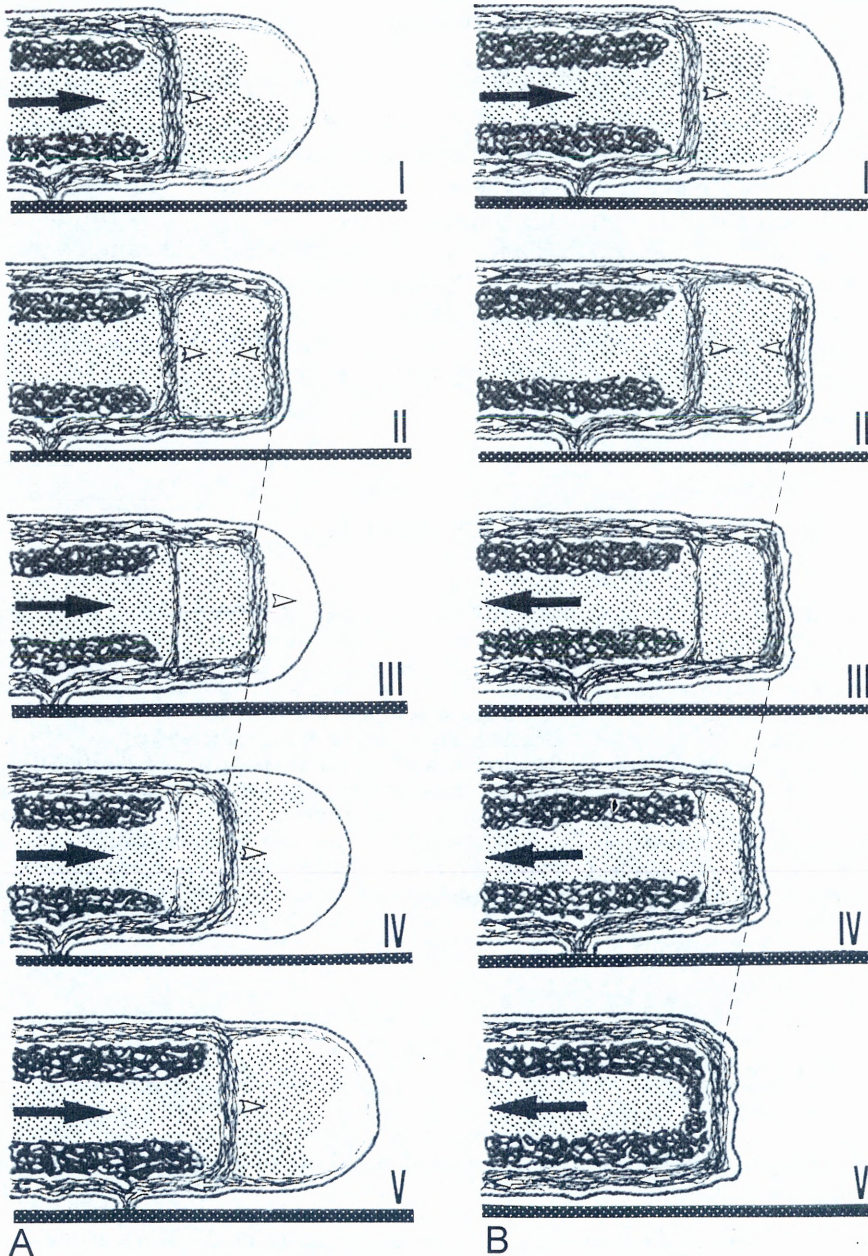
Objaśnienie mechanizmu ruchu ameb ogólnym skurczem korykalnym i przednią relaksacją doprowadziło nas w konsekwencji do badań, jak poszczególne struktury w komórce pełznającej ameby poruszają się względem siebie. Mię-

dzy innymi okazało się, że ektoplazma jest rzeczywiście nieruchoma tylko w tych miejscach, w których w danym momencie ameba przywiera do podłoża, wszędzie zaś poza nimi jest przesuwana przez sieć aktynową kurczącą się zawsze

dośrodkowo — ku punktom przyczepu. Gdy amebę całkowicie pozbawić możliwości przyczepu, oczywiście nie może się ona przemieszczać, lecz wcale to nie zatrzymuje wewnętrznej maszynierii — endoplazma wciąż płynie do przodu, tyle że ektoplazma jest wówczas wzdłuż całej komórki przesuwana do tyłu (GRĘBECKI 1984, 1994). Ruch rozmaitych znaczników na zewne-

wcześniej pisałem o nich po polsku w innych artykułach (GRĘBECKI 1992, 1993).

Nie chcąc przeciążyć tekstu informacjami zbędnymi dla niespecjalisty przedstawiałem strukturę i funkcje aparatu ruchowego ameb nie precyzując, jakich gatunków różne dane i interpretacje dotyczyły. Otóż, wszystkie dyskutowane koncepcje ogólne, poczynając od Masta,



Ryc. 8. Schemat kolejnych stadiów wysuwania (A) i wycofywania (B) czołowych nibynóżek (wg GRĘBECKIEGO 1990); widok z boku; objaśnienie w tekście.

trzniej powierzchni błony komórkowej ameby jest dwukierunkowy; jedne z nich poruszają się zgodnie z dośrodkowym lub wstecznym ruchem podbłonowego cytoszkieletu, inne zaś są unoszone, zgodnie z przepływem lipidów błonowych, do przodu (GRĘBECKI 1986, 1994). Nie omawiam tu tych spraw dokładniej, bo już

poprzez teorie Goldacra i Allena, po naszą własną, były oparte na badaniach wielkich ameb śluzowodnych należących do klasy Lobosea, rzędu Amoebida, zwłaszcza gatunków *Amoeba proteus* i *Chaos carolinensis*. Ze względu na swe rozmiary nadają się one najlepiej do doświadczeń na pojedynczych osobnikach, a także do

badan ultrastruktury. Na nich więc wykonywano, na przykład, eksperymenty wymagające mikromanipulacji, a także badania reakcji na bodźce działające lokalnie na określone miejsca w komórce. U nich też najwcześniej i najdokładniej poznano morfologię i ultrastrukturę aparatu ruchowego. Z różnych względów nie są one jednak dogodnym materiałem w badaniach biochemicznych. Wiele danych o białkach towarzyszących aktywie i regulujących funkcjonowanie aparatu ruchowego ameb pochodzi więc z badań niewielkiej ameby glebowej *Acanthamoeba castellanii* oraz amebowego stadium rozwoju śluzowca komórkowego *Dictyostelium discoideum* (patrz art. RĘDOWICZ w tym numerze KOS-MOSU). Część białek wykrywanych w ich cytoskieletcie znaleziono później także u *Amoeba proteus*, bądź wykazano przynajmniej, że po wprowadzeniu ich do wnętrza tej ameby w drodze mikroiniekcji spełniają one swe zwykłe funkcje. W ostatnich latach ameby *Dictyostelium* okazały się szczególnie przydatne do badań ruchu amebowego metodami inżynierii genetycznej.

Pozwolę sobie zakończyć ten artykuł trochę żartobliwą refleksją. Otóż ameba wydaje mi się najmańdrzejszym stworzeniem na świecie. Podąża ona bowiem ku swemu celowi (por. Ryc. 2) dokładnie w taki sposób, w jaki nauka zmierza ku prawdzie. Czoło ameby nigdy nie posuwa się zgodnie z wypadkowym kierunkiem ruchu całej komórki. Każda rosnąca i wiodąca nibynóżka okazuje się ślepym zaułkiem i zostaje wycofana na korzyść nowej. Tak samo każda dominująca teoria kończy się impasem i będzie zastąpiona inną. Spośród dwóch konkurujących nibynózek żadna nie wie gdzie wprost tam dokąd trzeba, tak jak żadna z konkurujących teorii nie jest we wszystkim prawdziwa. Każda nibynóżka — i każda teoria — odchylają się od celu, chociaż wszystkie razem od samego początku ostatecznie ku niemu zdołają. Spodziewam się więc, że teorię ogólnego skurczu kortykalnego i przedniej relaksacji spotka ten sam los — kiedyś ustąpi ona innej teorii, która jeszcze bardziej się zbliży do pełnej prawdy.

ARGUMENTS ABOUT MOVEMENT MECHANISM IN AMOEBAE

Summary

The correct idea that the motor force of movement in amoebae is generated as in muscles, by contraction, is very old (DUJARDIN 1835) but it was purely conjectural at the beginning. It became generally accepted, when MAST (1926) assumed that the contraction of gelated ectoplasmic cylinder at the cell periphery produces hydrostatic pressure, which squeezes the endoplasmic sol forwards, where it gellates again. This explanation, morphologically adequate, was still lacking evidence at the ultrastructural and molecular levels. The present knowledge about the actomyosin submembrane cytoskeleton of amoebae and actin binding proteins controlling its state and function, is summarized. In the sixties a controversy arose about the site of contraction: does a tail contraction squeeze the cell contents for-

wards (GOLDACRE 1961) or a contraction at the front pulls everything behind (ALLEN 1961)? Tail contraction is better compatible with organization of the cytoskeleton of amoebae, whereas the front contraction better explains why amoebae instantly react to stimuli encountered by their leading edge. The present author advanced a theory of general cortical contraction and frontal relaxation (GREBECKI 1981), claiming that the motor and steering functions in amoebae are spatially separated. The motor force is provided by the whole peripheral actin network, but hydrostatic gradients and the movement are controlled by pressure drop at the leading edge of amoeba. This is due to periodic detachment of actin network from the cell membrane at the front.

LITERATURA

- ALLEN R. D., 1961 a. A new theory of amoeboid movement and endoplasmic streaming. *Exp. Cell Res.* 8 (Suppl.), 17-31.
- ALLEN R. D., 1961 b. Amoeboid movement. [W:] *The Cell* BRACHET J., MIRSKY A. E. (red.), Academic Press, New York and London, 2, 135-216.
- ALLEN R. D., TAYLOR D. L., 1975. The molecular basis of amoeboid movement. [W:] *Molecules and Cell Movement*. INOUE S., STEVENS R. E. (red.), Raven Press, New York, str. 239-258.
- DUJARDIN F., 1835. *Recherches sur les organismes inférieurs*. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 4, 343-377.
- GOLDACRE R. J., 1952. The action of general anaesthetics on amoebae and the mechanism of the response to touch. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 6, 128-144.
- GOLDACRE R. J., 1961. The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback. *Exp. Cell Res.* 8 (Suppl.), 1-16.
- GOLDACRE R. J., 1964. On the mechanism and control of amoeboid movement. [W:] *Primitive Motile Systems in Cell Biology* ALLEN R. D., KAMIYA N. (red.), Academic Press, New York and London, str. 237-253.
- GOLDACRE R. J., LORCH I. J., 1950. Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. *Nature* 166, 487-499.
- GREBECKA L., 1980. Reversal of motor polarity of *Amoeba proteus* by suction. *Protoplasma* 102, 361-375.
- GREBECKA L., 1981. Motor effects of perforating peripheral cell layers of *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 106, 343-349.
- GREBECKA L., GREBECKI A., 1975. Morphometric study of moving *Amoeba proteus*. *Acta Protozool.* 14, 337-361.

- GREBECKA L., HREBENDA B., 1979. *Topography of cortical layer in Amoeba proteus as related to the dynamic morphology of moving cell.* Acta Protozool. 18, 493-502.
- GREBECKI A. 1964. *Modern lines in the study of amoeboid movement.* Acta Protozool. 2, 379-402.
- GREBECKI A., 1981. *Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications.* Europ. J. Cell Biol. 24, 163-175.
- GREBECKI A., 1982 a. *Supramolecular aspects of amoeboid movement.* Progress in Protozoology, Proc. VI Int. Congr. Protozool. str. 117-130.
- GREBECKI A., 1982 b. *Études expérimentales sur la localisation des fonctions motrices chez les amibes.* Ann. Biol. 21, 275-306.
- GREBECKI A., 1984. *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites.* Protoplasma 123, 116-134.
- GREBECKI A., 1986. *Two-directional pattern of movements on the cell surface of Amoeba proteus.* J. Cell Sci. 83, 23-35.
- GREBECKI 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.
- GREBECKI A., 1992. *Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych.* Kosmos 41, 7-38.
- GREBECKI A., 1993. *Ruchy lateralne podbłonowej sieci aktywnej w komórkach ruchliwych.* Post. Biol. Kom. 20 (Suppl. 2), 97-111.
- GREBECKI A., 1994. *Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae.* Int. Rev. Cytol. 148, 37-80.
- HUXLEY H. E., HANSON J., 1954. *Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation.* Nature 173, 971-976.
- JAHN T. L., 1964. *Relative motion in Amoeba proteus.* [W:] *Primitive Motile Systems in Cell Biology.* ALLEN R. D., KAMIYA N. (red.), Academic Press, New York and London, str. 279-302.
- KŁOPOCKA W., GREBECKI A., 1980. *Motor interdependence of pseudopodia in freely moving Amoeba proteus.* Acta Protozool. 19, 129-142.
- KOMNICK H., STOCKEM W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., 1973. *Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and amoeboid movement.* Int. Rev. Cytol. 34, 169-249.
- KOROHODA W., 1977. *Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of Amoeba proteus and its bearing on the theories of amoeboid movement.* Cytohiologie 14, 338-349.
- KOROHODA W., STOCKEM W., 1975. *On the nature of hyaline zones in the cytoplasm of Amoeba proteus.* Microscop. Acta 18, 75-90.
- MAST S. O., 1926. *Structure, movement, locomotion and stimulation in Amoeba.* J. Morphol. 41, 347-425.
- RINALDI R. A., JAHN T. L., 1963. *On the mechanism of amoeboid movement.* J. Protozool. 10, 344-357.
- RINALDI R. A., KOROHODA W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., 1975. *Some effects of externally applied pressure upon cytoplasmic movements in the amoeba Chaos chaos.* Acta Protozool. 14, 363-369.
- SERAVIN L. N., 1964. *Kritičeskij obzor sovremennych predstavlenij ob ameboidnym dvizenii.* Citologija 6, 653-667.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. *Amoeboid movement and related phenomena.* Int. Rev. Cytol. 112, 137-183.
- STOCKEM W., HOFFMANN H. U., GRUBER B., 1983. *Dynamics of the cytoskeleton in Amoeba proteus. I. Redistribution of microinjected fluorescein-labeled actin during locomotion, immobilization and phagocytosis.* Cell Tissue Res. 232, 79-96.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., 1979. *Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells.* Int. Rev. Cytol. 56, 57-144.
- WEHLAND J., WEBER K., GAWLITTA W., STOCKEM W., 1979. *Effects of the actin binding protein DNAase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure of Amoeba proteus. An attempt to explain amoeboid movement.* Cell Tiss. Res. 199, 353-372.