

WANDA KŁOPOCKA

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: aniak@nencki.gov.pl

ENDOCYTOZA U PIERWOTNIAKÓW I W KOMÓRKACH TKANKOWYCH

WPROWADZENIE

Rozwój i funkcjonowanie komórek, zarówno tych swobodnie żyjących, jak i tkankowych, regulowane jest przez środowisko zewnętrzne. Oddziaływujące na błonę plazmatyczną bodźce powodują indukcję sygnałów, które wywołują odpowiednią reakcję komórki. Jedną z form reagowania komórek na bodźce zewnętrzne jest endocytoza, polegająca na wprowadzaniu do wnętrza komórki składników środowiska zewnętrznego. Droga endocytozy komórki pobiera ją, na przykład pokarm, czy cząsteczki regulatorowe. Zjawisko to włączone jest w procesy recyrkulacji receptorów oraz transportu wewnątrzkomórkowego. Endocytoza występuje u wszystkich Eukaryota, od pierwotniaków aż po komórki ssaków (z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów). O złożoności i uniwersalności endocytozy świadczy ogromna, dzięki intensywnym badaniom stale wzrastająca, liczba poznanych białek zaangażowanych w to zjawisko. Wiele z nich to konserwatywne białka występujące zarówno u pierwotniaków i drożdży, jak i kręgowców.

Znanych jest obecnie kilka odrębnych sposobów wprowadzania różnych substancji do komórek: (1) endocytoza zależna od klatryny —

białka, będącego głównym składnikiem struktury odpowiedzialnej za wpuklanie (inwaginację) błony i formowanie pęcherzyków endocytocytynych oraz (2) endocytoza niezależna od klatryny: pinocytoza i fagocytoza (SANDVIG i VAN DEURS 1994).

Endocytoza klatrynowa występuje u orzęsków, amebowej formy *Dictyostelium discoideum*, drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz w komórkach tkankowych. Mechanizm jej badany jest od lat głównie w komórkach ssaków. Do poznania przebiegu oraz mechanizmów molekularnych pinocytozy i fagocytozy, zjawisk występujących we wszystkich komórkach eukariotycznych, przyczyniły się w równej mierze badania prowadzone na pierwotniakach, drożdżach, jak i komórkach tkankowych.

W zjawiska endocytocytyczne zaangażowane są różne receptory, co umożliwia włączanie różnych dróg sygnałowych i odpowiednie reakcje komórki. Zjawiska te różnią się nie tylko morfologicznie, ale i mechanizmem molekularnym. Ich wspólną cechą jest udział aktynowego cytoskieletu.

ENDOCYTOZA KLATRYNOWA

Za pośrednictwem opłaszczonych pęcherzyków pobierane są zarówno cząsteczki wiążące się z błoną plazmatyczną (endocytoza receptorowa), jak i znaczniki endocytozy fazy płynnej.

Dictyostelium discoideum pozbawione klatryny ma wyraźnie zredukowaną endocytozę fazy płynnej (O'HALLORAU i ANDERSON 1992, ROBINSON 1994). Endocytoza receptorowa polega na

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — adenosynotryfosforan, cAMP — cykliczny adenosynomonofosforan, DG — diacylglicerol, EGF — naskórkowy czynnik wzrostu, EGFR — receptor EGF, ER — siateczka śródplazmatyczna, GTP — guanosynotryfosforan, PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu, PDGFR — receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu, PI-3K — fosfatydilinozytolo-3kinaza, PIP₂ — fosfatydilinozytobisfosforan, PIP₃ — fosfatydilinozytolotrisfosforan, PKA — kinaza białkowa A, PLA₂ — fosfolipaza A₂, PLC — fosfolipaza C

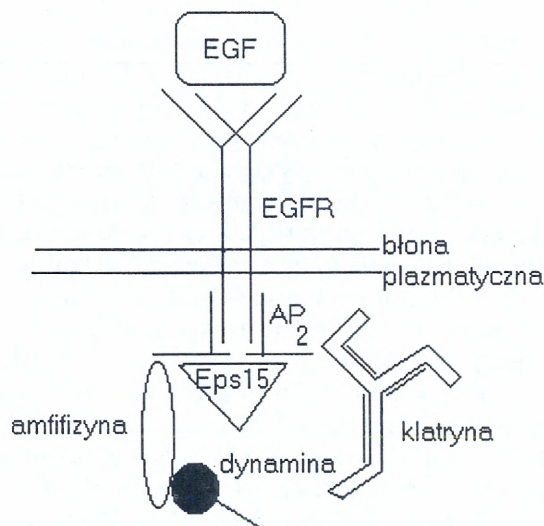
specyficznym wiązaniu i internalizacji różnych ligandów (cząsteczki związane przez białka), między innymi cząsteczek ważnych dla metabolizmu komórkowego, takich jak naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), insulina czy cholesterol. Indukują to zjawisko również peptydy chemotaktyczne, a także niektóre toksyny bakteryjne (toksyna cholery) i wirusy, na przykład wirus zapalenia płuc (FALLON i SCHWARTZ 1985).

W endocytozę klatrynową zaangażowanych jest wiele klas receptorów, również takich, które posiadają aktywność kinazy tyrozynowej. Są to, między innymi receptory dla insuliny i wspomnianych już czynników wzrostu. Posiadają one zewnętrzną domenę hydrofilową wiążącą ligand, hydrofobowy odcinek transbłonowy oraz regulatorową część cytoplazmatyczną o aktywności kinazy tyrozynowej. Reakcję inicjuje utworzenie kompleksu ligand-receptor, konsekwencją czego jest autofosforylacja cytoplazmatycznej domeny receptora, jego dimeryzacja i zmiany konformacyjne oraz ekspozycja kodu endocytotycznego dla wiązania czynników wymaganych do uruchomienia dalszych etapów procesu (MARSH i MCMAHON 1999). Poza fosforylacją cytoplazmatycznej domeny receptora ważną rolę w regulacji endocytozy przypisuje się również fosforylowanym produktom fosfatydyloinozytolu, które mogą modulować interakcje pomiędzy fosfotyrozynowymi resztami i białkami rozpoznającymi sygnał. W regulacji omawianego zjawiska w wielu przypadkach bierze również udział związane z receptorem białko G.

Do miejsc ufosforylowanych odcinka regulatorowego przyłączają się białka zawierające domenę SH₂, które tworzą podstawę dla wielu interakcji na drodze sygnałowej. Niektóre z nich biorą udział w kaskadzie przekazywania informacji umożliwiającej gromadzenie się aktywny pod kompleksami ligand-receptor. Przyłączanie innych umożliwia przemieszczanie się kompleksów ligand-receptor w płaszczyźnie błony, ich agregację w tak zwane „łatki” (ang. patches) i tworzenie w tych miejscach zagłębień (dołków) w wyniku wpuklania się błony. Białka te to kompleks adaptorowy-AP-2 (PEARSE 1988, MARSH i MCMAHON 1999) i klatryna (PEARSE 1975, SCHMID 1997). AP-2 bierze udział w organizacji sieci klatrynowej na cytoplazmatycznej powierzchni błony plazmatycznej.

Precyzyjny mechanizm odpowiedzialny za organizację kompleksu adaptorowego i klatryny nie jest do końca poznany, choć stale pojawiają się nowe dane dotyczące tego problemu. Wiadomo, że białko kompleksu adaptorowego wiąże się z cytoplazmatyczną domeną receptora i kla-

tryną w postaci zdefosforylowanej. W formie ufosforylowanej, w jakiej występuje w cytoplazmie jest nieaktywne. Nie zidentyfikowano dotąd kinazy (kinaz) i fosfatazy (fosfataz) regulujących ten proces. W regulacji funkcji AP-2 mogą brać udział również fosfatydyloinozytole. W organizacji kompleksu AP-2-klatryna bierze udział wiele białek (część z nich przedstawiono na Ryc. 1): Eps15 — będące substratem dla tyrozynowej kinazy receptora i modulujące funkcje AP-2, epsyna — wiążąca klatrynę i białka adaptorowe, synaptojanina — cytoplazmatyczna fosfatydyloinozytołofosfataza, wiążąca się z AP-2 i AP-180 — białko adaptorowe wiążące się z klatryną i odgrywające również kluczową rolę w formowaniu pęcherzyków synaptycznych (MARSH i MCMAHON 1999).

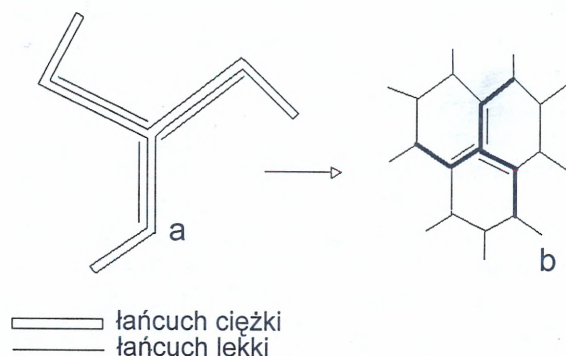


Ryc. 1. Schemat organizacji płaszcza klatrynowego w miejscu agregacji receptorów.

Funkcje białek przedstawionych na rysunku opisano w tekście.

Trójamienne cząsteczki klatryny zbudowane są z 3 ciężkich i 3 lekkich łańcuchów (Ryc. 2a) (SMITH i PEARS 1999). Te ostatnie pełnią funkcje regulatorowe (BRODSKY i współaut. 1991). Podjednostki lekkiego łańcucha mogą być fosforylowane oraz wiązać jony wapnia, kalmodulinę i białko szoku cieplnego — hsc70. Przyłączenie Ca²⁺ do domeny regulatorowej lekkiego łańcucha umożliwia wiązanie się ciężkich łańcuchów i organizację sieci (Ryc. 2b) (BRODSKY i współaut. 1991). W organizację klatryny włączona jest również dynamina (Ryc. 1) — cytoplazmatyczne białko mające aktywność GTP-azy (SCHMID 1997). Cząsteczki klatryny polimeryzują w charakterystyczną strukturę kraty o sześciokątnych oczkach (Ryc. 2b).

W połączeniu z innymi białkami tworzy ona tak zwany płaszcz na cytoplazmatycznej powierzchni błony pod agregatami receptorów. Płaska początkowo struktura podlega stopniowo deformacji, która zmienia krzywiznę błony powodując jej zagłębienie się (inwaginację). Powstają dołki, w których w wyniku agregacji i sekwestracji gromadzone są cząsteczki przeznaczone do pobierania (BRETSCHER i współaut. 1980). Mechanizm zmiany krzywizny błony nie został ostatecznie wyjaśniony.



Ryc. 2. Model cząsteczki klatryny (a), wpisany w sześciokątną kratę oplaszczającą dołki i pęcherzyki endocytotyczne (b).

Jednym z proponowanych sposobów wpuklania się płaskiej heksagonalnej sieci jest przekształcenie niektórych sześciokątów kraty w pięciokąty (HEUSER i EVANS 1980). Biofizyczna analiza wykazała, że na krzywiznę błony może wpływać, zachodząca podczas endocytozy, zmiana kompozycji lipidów, która narzuca formowanie struktur kulistych. Wiadomo, że białko mające aktywność transferazy lipidowej — endofilina, w interakcji z dynaminą zmienia krzywiznę błony właśnie poprzez modyfikację lipidów błonowych (RINGSTAD i współaut. 1999, SCHMIDT i współaut. 1999). W niektórych przypadkach w inwaginacji błony bierze również udział cytoszkielek aktynowy.

Następnym etapem endocytozy klatrynowej jest zamknięcie pęcherzyka i oddzielenie go od błony. Kluczową rolę w tym procesie pełni wspomniana już dynamina (VAN DER BLIEK 1999, MARSH i McMAHON 1999). Cytoplazmatyczne białko — amfifizyna (Ryc. 1), blokuje ją jednak aż do momentu, w którym pęcherzyk ma zostać oderwany od błony (MARSH i McMAHON 1999). Wówczas wiązanie GTP przez dynaminę umożliwia odłączenie jej od amfifizyny, oligomeryzację i utworzenie pierścienia wokół zagłębienia błony, tuż przy powierzchni komórki. Podstawy molekularne formowania pęcherzyka klatrynowego i oddzielania go od błony nadal nie są do

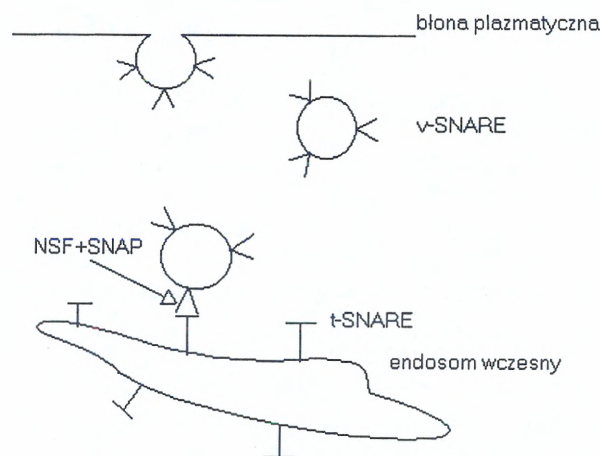
końca poznane. Wiadomo jednak, że proces ten wymaga GTP-azowej aktywności dynaminy.

Zaproponowano trzy mechanizmy odrywania pęcherzyków. Dwa pierwsze wyznaczają dynaminie podwójną rolę: (1) enzymu hydrolizującego GTP i (2) generatora siły umożliwiającej oderwanie pęcherzyka. Trzeci przypisuje dynaminie tylko funkcje enzymatyczne. Zgodnie z pierwszą propozycją, hydroliza GTP powoduje zmiany konformacyjne cząsteczek dynaminy, prowadzące do zaciskania pierścienia i tworzenia takiego przewężenia, które umożliwiłoby fuzję błon (SWEITZER i HINSHAW 1998). Według drugiej koncepcji, w wyniku hydrolizy GTP spiralna cząsteczka dynaminy wydłuża się dwukrotnie, rozciągając kanał łączący pęcherzyk z powierzchnią komórki (STOWELL i współaut. 1999). Wyniki ostatnich badań prowadzonych na komórkach, w których mutacja genu dynaminy uniemożliwia organizowanie się cząsteczek tego białka w wyniku hydrolizy GTP, przeczą jednak dwóm pierwszym koncepcjom sugerującym mechanochemiczną rolę dynaminy w uwalnianiu pęcherzyków. Ostatnio zaproponowany trzeci mechanizm ich odrywania wyznacza dynaminie jedynie funkcję regulatorową GTP-azy (SEVER i współaut. 1999).

W niektórych komórkach opisany powyżej szereg skomplikowanych procesów prowadzących do utworzenia pęcherzyka klatrynowego trwa tylko 1 minutę. W ciągu każdej minuty powstaje w komórce od kilkuset do ponad 1000 takich pęcherzyków (GAIDAROV i współaut. 1999, MARSH i McMAHON 1999). W synapsach cykl klatrynowy jest dużo szybszy (MARSH i McMAHON 1999).

Natychmiast po odłączeniu się pęcherzyka od błony plazmatycznej następuje dezorganizacja płaszcza klatrynowego, katalizowana przez wspomniane już białko szoku cieplnego hsc70, mające aktywność ATP-azy. Wyniki ostatnich badań wskazują na udział w tym procesie auksyliny — białka wiążącego klatrynę i hsc70 (SCHMID i współaut. 1984). Łączenie się hsc70 z regulatorową domeną lekkiego łańcucha klatryny możliwe jest dzięki lokalnym zmianom w stężeniu jonów wokół pęcherzyka (również jonów wapnia). Przyczyną tych zmian jest czasowy przepływ jonów przez błonę pęcherzyka, wynikający z różnicy stężeń pomiędzy wnętrzem pęcherzyka i cytoplazmą (BRODSKY i współaut. 1991). Kompleks adaptorowy pozostaje dłużej na powierzchni endosomów i nie wiadomo, w którym momencie transportu błon jest odłączany. Dezorganizacja klatryny jest niezbędna dla fuzji błon, która umożliwia segregację i transport pobranego materiału oraz białek i lipidów błonowych w komórce (SMYTHE i WARREN 1991).

W procesy te zaangażowany jest, podobnie jak w poprzednie etapy endocytozy, cały szereg białek regulatorowych i ich efektorów. Fuzje błon mogą być albo zależne od jonów wapnia, i wówczas biorą w nich udział aneksyny, białka wiążące fosfolipidy (transport fagocytarny) (LECAT i LAFONT 1999), albo przebiegać zgodnie z hipotezą SNARE. Komórki eukaryotyczne, od drożdży po komórki tkankowe, posiadają rodziny wzajemnie się rozpoznających białek v-SNARE i t-SNARE (receptory cytoplazmatycznego białka SNAP). Są to integralne białka błonowe wszystkich struktur biorących udział w transporcie wewnątrzkomórkowym. v-SNARE znajdują się na powierzchni pęcherzyków endocytotycznych oraz tych, które powstają z siateczki śródplazmatycznej (retikulum endoplazmatyczne — ER) i aparatu Golgiego. Błony, z którymi pęcherzyki te zlewają się, posiadają na swych powierzchniach białka t-SNARE. Są to błony aparatu Golgiego, ER, błona plazmatyczna oraz endosomy. Zakotwiczenie błony pęcherzyka w błonie akceptora to specyficzne wiązanie v-SNARE i t-SNARE (klucz — zamek). Fuzja błon staje się możliwa po przyłączeniu do takiej pary, za pośrednictwem białka SNAP, cytoplazmatycznej ATP-azy — NSF (Ryc. 3). Białko NSF umożliwia wykorzystanie energii chemicznej ATP dla



Ryc. 3. Lokalizacja v- i t-SNARE na powierzchni struktur endocytotycznych i udział białek NSF/SNAP w fuzji błon.

zmian konformacyjnych SNARE. NSF inicjuje fuzję błon w transporcie pęcherzyków z ER do aparatu Golgiego, transporcie w obrębie aparatu Golgiego, transporcie endosomalnym i podczas transcytozy, to jest przechodzenia pęcherzyków przez komórki spolaryzowane, np. nabłonkowe (ROTHMAN 1994, MELLMAN 1995, SOLLNER 1995, PELHAM 1999, ALLAN i BALCH 1999). Inaktywacja NSF powoduje akumulację pęche-

rzyków w cytoplazmie. W regulacji fuzji błon biorą również udział GTP-azy, kinazy lipidowe i fosfatazy. Aktywność PI-3K niezbędna jest dla fuzji błon, we wszystkich etapach endocytozy. Brak aktywności tego enzymu podczas endocytozy indukowanej, na przykład przez czynniki wzrostu, blokuje fuzję endosomów z lizosomami, wynikiem czego jest powrót EGFR i PDGFR do błony plazmatycznej (ROTH 1999).

Pozbawione płaszcza pęcherzyki endocytotyczne łączą się z endosomami wczesnymi. Tu zachodzi pierwszy etap segregacji pobranego przez komórkę materiału. Ta część, która podlega recyrkulacji, powraca do błony cytoplazmatycznej. Ta, która będzie dalej transportowana tworzy tak zwane endosomy późne. Podczas zachodzącej na tym poziomie segregacji powstają zawierające materiał przeznaczony do degradacji endosomy, które łączą się z lizosomami oraz pęcherzyki, których zawartość ma być usunięta z komórki (SMYTHE i WARREN 1991, GRUENBERG i MAXFIELD 1995) drogą egzocytozy. Drogi transportu endosomalnego przebiegają podobnie we wszystkich typach komórek i podczas różnych rodzajów endocytozy (Ryc. 4).

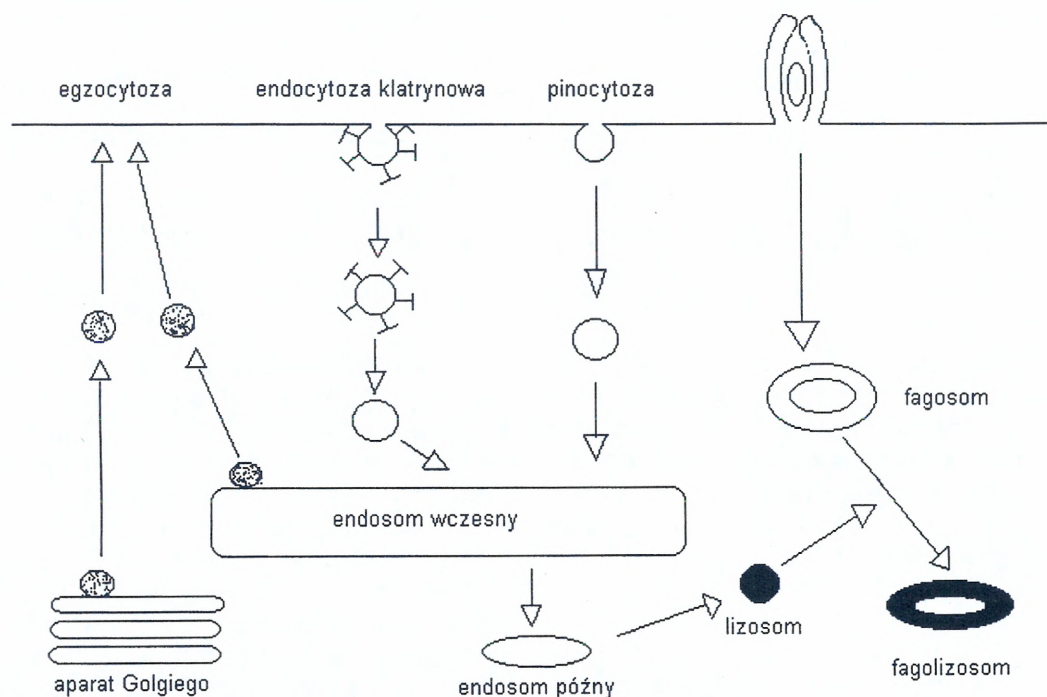
O tym, co stanie się z pobraną przez komórkę cząsteczką, decyduje receptor, a tym samym rodzaj sygnału. Na przykład autofosforylacja receptora PDGF (PDGFR) powoduje bezpośrednie wiązanie fosfatydyloinozytolo-3kinazy (PI-3K) do receptora, co ukierunkowuje jego transport do lizosomów, przeznaczając i receptor i ligand do degradacji. Natomiast w wyniku aktywacji receptora insuliny PI-3K wiąże się nie bezpośrednio z receptorem, ale z ufosforylowanymi za jego pośrednictwem białkami. Taki model aktywacji receptora umożliwia mu wielokrotne przemieszczanie się pomiędzy powierzchnią komórki i endosomami (CORVERA i CZECH 1998).

U orzęsków sieć pokrywająca zagłębienia błony i pęcherzyki endocytotyczne jest morfologicznie identyczna z płaszczem klatrynowym w komórkach ssaków (HEUSER i EVANS 1980, NILSSON i VAN DEURS 1983, MAHAFFEY i współaut. 1989). Badań biochemicznych tej struktury nie prowadzono.

Intensywne badania transportu błon w komórkach ssaków umożliwiły szczegółowe przedstawienie przebiegu tych procesów nie tylko w systemie endosomalnym, ale również fagosomalno-lizosomalnym i sekrecyjnym (patrz WASIK 1999). Drogi przekazywania pobranego materiału i jego segregacji u orzęsków poznane są niestety, jedynie fragmentarycznie. U *Tetrahymena* opisano system transportu fagocytarnego (NILSSON i VAN DEURS 1983), u *Paramecium* system fago-lizosomalny (FOK i ALLEN 1990)

oraz sekrecyjny (PLATTNER 1991). Badania prowadzone na *Paramecium multimicronucleatum* wykazały, że drogi endocytotycznego transportu błon u tego pierwotniaka podobne są do tych, które obserwuje się w komórkach ssaków, co dowodzi, że system endosomalny wykształcił się bardzo wcześnie w rozwoju ewolucyjnym zwierząt. *P. multimicronucleatum* posiada pulę opła-

aktynowego cytoszkieletu, lecz nie tylko w transporcie już uformowanych pęcherzyków, ale również w fazie ich formowania. W endocytozie dokonującej się za pośrednictwem klatryny, aktyna jest niezbędna w inwaginacji oplaszczonych fragmentów błony, np. na powierzchni apikalnej spolaryzowanych komórek nabłonka i u drożdży. Endocytoza klatrynowa w tych



Ryc. 4. Drogi transportu endocytotycznego.

Szczegółowe opisy dotyczących kolejnych rodzajów endocytozy w tekście.

szczonych, odrywających się od błony plazmatycznej pęcherzyków i nieopłaszczonych pęcherzyków endosomalnych, które w drodze fuzji łączą się z endosomami wczesnymi. Na tym etapie zachodzi oddzielenie elementów błony plazmatycznej od pobranego materiału. Jedne pęcherzyki wracają do błony komórkowej, drugie, zawierające materiał przeznaczony do degradacji utworzą endolizosomy. Przypuszcza się, że elementy błony plazmatycznej nie są degradowane, lecz, podobnie jak wiele komponentów błony i receptory komórek ssaków, podlegają recyrkulacji krążąc wielokrotnie pomiędzy endosomami i powierzchnią orzęska (ALLEN i współaut. 1992). Filamenty aktynowe oraz sieć mikrotubul ukierunkowuje i ułatwia transport pęcherzyków i endosomów zarówno u orzęsków, jak i w komórkach tkankowych (DURRBACH i współaut. 1996).

Wspólną cechą różnych dróg internalizacji jest, jak już wspomniałam we wstępie, udział

komórkach hamowana jest przez zmiany w aktynie i białkach ją wiążących (GOTTLIEB i współaut. 1993). Uważa się, że udział dwóch czynników, klatryny i aktyny, w tworzeniu pęcherzyków endocytotycznych jest w obu przypadkach wynikiem ewolucyjnego przystosowania komórek. Zarówno powierzchnia apikalna spolaryzowanych komórek nabłonkowych, jak i powierzchnia drożdży, wystawione są na działanie środowiska zewnętrznego. Inwaginacja błony musi więc przezwyciężyć turgor komórki (RIEZMAN 1993). Warunki panujące wewnątrz organizmów umożliwiły wyeliminowanie aktyny z tego procesu. Ostatnie dane wskazują jednak na udział w endocytozie tych komórek sieci aktynowej związanej z błoną. Wydaje się, że cytoszkielet aktynowy wyznacza miejsca formowania klatrynowych dołków oraz ogranicza ruch oderwanych od błony pęcherzyków do bardzo małych obszarów. Inhibitory organizacji aktyny zwiększają możliwość przemieszczania

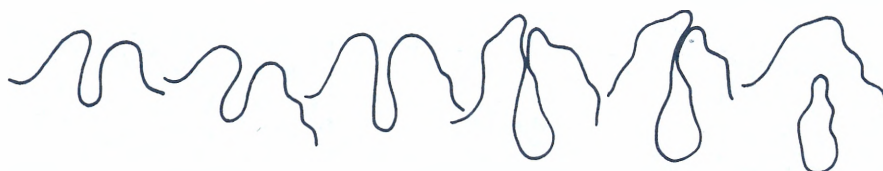
się pęcherzyków (GAIDAROV i współaut. 1999). Organizacja aktyny w strefie podbłonowej komórki jest zależna od informacji przekazywanej ze stymulowanej powierzchni. Receptor uruchamia odpowiednią drogę przekazywania syg-

nału, która umożliwia aktywację właściwych białek odpowiedzialnych za polimeryzację lub depolimeryzację aktyny oraz formowanie lub degradację sieci aktynowej.

ENDOCYTOZA NIEZALEŻNA OD KLATRYNY

Endocytoza niezależna od klatryny, a angażująca wyłącznie cytoszkielekt aktynowy, obejmuje dwa zjawiska: pinocytozę, dokonującą się

GREBECKA i KŁOPOCKA 1987, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988). U *A. proteus* podczas pinocytozy indukowanej, w miejscach agregacji receptorów



Ryc. 5. Kolejne etapy formowania kanału i pęcherzyka pinocytotycznego u *Amoeba proteus*.

Przebieg procesów omówiono w tekście.

za pośrednictwem licznych małych pęcherzyków zwanych pinosomami oraz fagocytozę, podczas której pochłaniany materiał zamykany jest w pojedynczym dużym fagosomie. Podstawą odmiennej morfologii obu zjawisk są różnice w organizacji aktyny wynikające z aktywacji różnych rodzajów receptorów.

PINOCYTOZA

Drogą pinocytozy receptorowej pobierane są ligandy, które nie agregują w dołkach klatrynowych. Podczas pinocytozy fazy płynnej aktywowana błona plazmatyczna zamyka w pinosomach otaczające komórkę środowisko. W zależności od rozmiarów formowanych podczas pinocytozy pęcherzyków zjawisko określa się jako makro- albo mikropinocytozę.

U *Amoeba proteus* występuje mikropinocytoza permanentna, zachodząca stale podczas migracji w rejonie uroidalnym komórki (WOHLFARTH-BOTTERMANN i STOCKEM 1966) oraz makropinocytoza indukowana (patrz literatura: GREBECKA i KŁOPOCKA 1987, STOCKEM i KŁOPOCKA 1988). Pierwsza odpowiada pinocytozie fazy płynnej w komórkach zwierzęcych (SANDVIG i VAN DEURS 1994). Zjawisko to związane jest z krążeniem błon pomiędzy powierzchnią komórki i jej wnętrzem, a wywoływane jest przez czynniki stale obecne w środowisku. Makropinocytoza angażuje całą powierzchnię komórki i jest związana zawsze z zahamowaniem migracji i drastycznymi zmianami kształtu ameby. Wywołują ją podane do środowiska kationy zarówno jedno-, jak i wielowartościowe. Zależnie od rodzaju induktora rozróżniamy endocytozę adsorpcyjną lub receptorową (patrz literatura:

powstają długie kanały (Ryc. 5). Inwaginacja błony i wydłużanie kanałów możliwe jest dzięki skurczowi zachodzącemu w skupionej pod agregatami receptorów sieci cytoszkieletalnej oraz wysuwaniu specjalnych nibynózek pinocytotycznych. Mechanizm ich wzrostu jest identyczny z obserwowanym w nibynózkach lokomotorycznych. Od kanału odrywają się kolejne pęcherzyki prawdopodobnie na skutek jego przewężania się w wyniku skurczu aktomiozynowej sieci podścielającej ściany kanałów i nibynózek (KLEIN i współaut. 1988, GREBECKA 1991) i fuzji błon. Dalsze etapy drogi transportu endocytotycznego wykazują duże podobieństwo do odpowiadających im procesów w komórkach zwierzęcych (STOCKEM i CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU 1993).

Formowanie struktur pinocytotycznych we wszystkich komórkach związane jest z reorganizacją aktyny i aktywnością kurczliwą podbłonowej sieci mikrofilamentów. Udział i funkcje białek podbłonowego cytoszkieletu w pinocytozie badano różnymi metodami: immunofluorescencyjnymi, biochemicznymi, genetycznymi. U *Acanthamoeba castellanii* oprócz aktyny wymagana jest podczas pinocytozy jedna z trzech izoform miozyny I — miozyna IB (BAINES i współaut. 1995). U *A. proteus* indukcja pinocytozy związana jest z aktywnością kurczliwą podbłonowego cytoszkieletu (patrz literatura KŁOPOCKA 1996), której towarzyszy częściowa dezorganizacja i depolimeryzacja aktyny, czego przejawem jest znaczny spadek zawartości aktyny filamentarnej (F-aktyna) w amebach w początkowym stadium reakcji (KŁOPOCKA i MAKUCH 2000). U *Dictyostelium discoideum* również wykazano korelację pomiędzy aktywnością

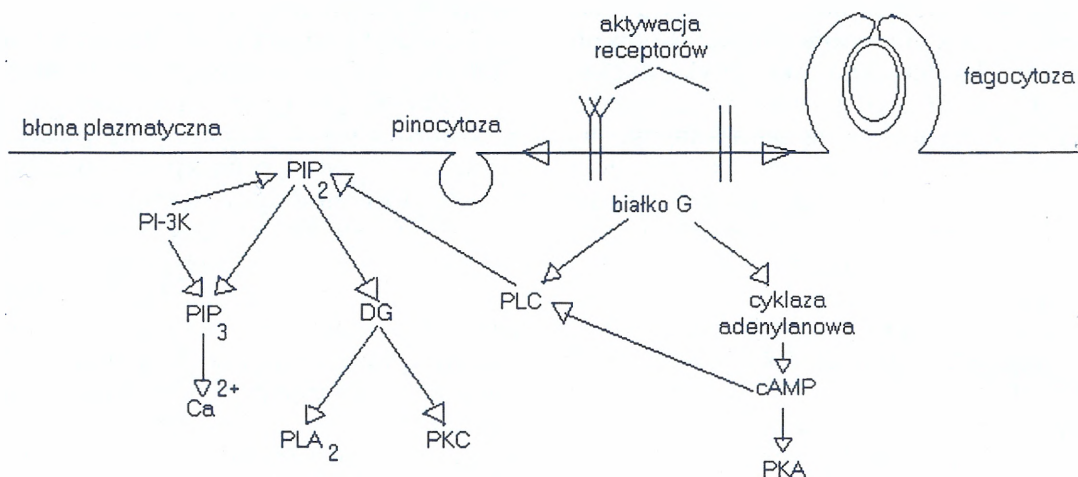
pinocytotyczną a ilością filamentarnej aktyny. Eksperymentalnie wywołana redukcja ilości F-aktyny w podbłonowym cytoszkielecie ułatwia i wzmacnia zarówno pinocytotyzację fazy płynnej, jak i receptorową. Odwrotnie, wzmożona asocjacja aktyny z siecią podbłonową ogranicza elastyczność błony i formowanie pinosomów (MAEDA i KAWAMOTO 1986). Dla pinocytoty u *Dictyostelium* niezbędne są izoformy miozyny I: IA, IB, IC (NOVAK i współaut. 1995).

Aktywowana przez bodźce pinocytotyczne droga sygnałowa dla reorganizacji aktyny u *A. proteus* wiedzie prawdopodobnie poprzez aktywację cykazy adenylanowej przez białko G, wzrost poziomu cAMP (cykliczny adenylozynomonofosforan) i aktywację białkowej kinazy A (PKA). Podstawą do takiej sugestii są wyniki badań wykazujące wzrost poziomu cAMP w komórce podczas pinocytoty indukowanej (PRUSCH i ROSCOE 1993) oraz wyizolowanie z *A. proteus* białka wiążącego GTP. Istnieją też dane, które wskazują, że podczas indukcji pinocytoty ma również miejsce aktywacja innego enzymu, a mianowicie fosfolipazy A₂ (PLA₂) (JOSEFSSON i współaut. 1988). Każda stymulacja prowadząca do obkurczania się ameby, również induktory pinocytotyczne, powoduje czasową mobilizację wapnia w jej cytoplazmie (KŁOPOCKA i POMORSKI 1996). Związana jest ona prawdopodobnie z aktywacją fosfolipazy C (PLC), kaskadą przemian fosfolipidów, wzrostem poziomu w komórce fosfatydyloinozytolotrójfosforanu (PIP₃), który pośredniczy w uwalnianiu wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych oraz diacylglicerolu (DG), aktywującego PKC i PLA₂ (Ryc. 6). Mechanizm taki dla komórek tkankowych postulują między innymi BERRIDGE (1986) oraz PODDANA i BARAŃSKA (1991). Ponieważ jednak

sygnał wapniowy jest wynikiem działania nie tylko bodźców pinocytotycznych (KŁOPOCKA i POMORSKI 1996), a DG nie stymuluje pinocytoty tak, jak czyni to cAMP (PRUSCH i THOMPSON 1995), wydaje się, że ta droga przekazywania sygnału nie jest specyficzna dla pinocytoty. Sugeruje się więc różnice w transdukcji sygnału dla pinocytoty i fagocytozy w komórkach *A. proteus*. Wtórny przekąźnik informacji w przypadku pinocytoty jest prawdopodobnie cAMP, a podczas reakcji fagocytarnej — diacylglicerol.

U *Dictyostelium discoideum* aktywacja receptorów powierzchniowych związanych z białkiem G i zaangażowanych w procesy pinocytotyczne uruchamia, podobnie jak u *Amoeba proteus*, obie drogi przekazywania informacji (JANSSENS i VAN HAASTERT 1987). Ponadto ma miejsce aktywacja PLC przez cAMP (patrz Ryc. 6) (DRAYER i współaut. 1994). Taka sama transdukcja sygnału odbywa się w tych komórkach podczas inicjacji fagocytozy. U *Dictyostelium* wykazano, że dla reorganizacji aktyny podczas pino- i fagocytozy niezbędna jest również aktywność enzymu PI-3K. Mutacje genu dla PI-3K u *Dictyostelium* powodują zaburzenia w przebiegu zarówno makropinocytoty, jak i fagocytozy. Komórki z defektem genu dla PI-3K mają znacznie zredukowany poziom fosfatydyloinozytolodwufosforanu (PIP₂) oraz PIP₃, co sugeruje, że PI-3K reguluje organizację aktyny poprzez modulowanie poziomu fosfolipidów (ZHOU i współaut. 1998).

Komórki tkankowe pobierają podczas pinocytoty tyle samo błony, co podczas endocytozy klatrynowej. Zjawisko to przyczynia się zatem w znacznym stopniu do pobierania fragmentów błony, na przykład wyspecjalizowanych domen



Ryc. 6. Drogi przekazywania sygnałów związane z aktywacją receptorów włączonych w endocytozę u *Amoeba proteus* i *Dictyostelium discoideum*.

takich jak desmosomy. Aktywność pinocytotyczna w komórkach tkankowych wzrasta podczas zjawiska zwanego fałdowaniem błony (ang. ruffling). Fałdowanie błon, będące morfologicznym przejawem aktywacji powierzchni, jest reakcją wielu typów komórek na niektóre bodźce zewnętrzne i wewnętrzne. Wywoływane jest ono między innymi przez czynniki wzrostu, mitogeny czy substancje chemotaktyczne. Biologiczna funkcja tego zjawiska nie jest jasna. Uważa się, że może być ono częścią reakcji chemotaktycznej oraz ułatwiać komórce intensywne pobieranie substancji właśnie drogą pinocytozy. Tworzące się fałdy błony formują bowiem pinosomy, podobnie jak pseudopodia formują fagosomy podczas fagocytozy. Powstawanie fałdów błony oraz pinosomów zależne jest od polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny. Kluczowym regulatorem organizacji aktyny dla tych procesów jest Rac — małe białko wiążące GTP, należące do rodziny białek Rho. W reorganizacji aktyny bierą również udział PI-3K oraz PLA₂. Aktywność PI-3K niezbędna jest także dla fuzji błon, która umożliwia zamykanie się pęcherzyków pinocytotycznych (RIDLEY 1994).

FAGOCYTOZA

Fagocytoza jest dla pierwotniaków oraz drożdży formą zdobywania pokarmu. Dla organizmów tkankowych jest jednym ze sposobów działania systemu obronnego.

Zjawisko inicjuje interakcja receptora fagocytarnego z ligandem znajdującym się na powierzchni pochłanianej cząstki. Aktywacja receptora uruchamia kaskadę sygnałową, której efektem jest lokalny wzrost polimeryzacji aktyny, rozwój pseudopodiów wokół pobieranego materiału i utworzenie wodniczki pokarmowej, zwanej fagosomem. Wszystkie te procesy muszą być bardzo precyzyjnie kontrolowane, aby pobierana cząstka nie była, na przykład tylko popychana przez rozwijające się pseudopodia, ale przez nie otaczana i zamykana w fagosomie.

Fagocytoza występuje u wszystkich pierwotniaków. W ten sposób pobierają pokarm nie tylko formy heterotroficzne, ale również autotroficzne gatunki wiciowców w wodach głębszych, gdzie światło jest mniej intensywne. Podstawowo selekcionują one zdobycz mechanicznie, stosując jako parametry rozmiar i kształt (MONGER i LANDRY 1991). Liczne gatunki wiciowców i orzęsków rozpoznają również bodźce chemiczne (VERTY 1991). Pomiędzy grupami taksonomicznymi, a nawet gatunkami występują różnice w sposobie rozpoznawania i internalizacji zdobyczy (RADEK i HAUSMANN 1994). Molekularny mechanizm formowania fagoso-

mu, jego odrywania i transportu jest jednak w tej grupie słabo poznany.

Dla ameb glebowych i wodnych źródłem pokarmu są bakterie, inne pierwotniaki i grzyby. Ameby trawia również te mikroorganizmy, które przeżywają w fagosomach innych komórek. *Dictyostelium* i drożdże fagocytują przede wszystkim bakterie.

Za wiązanie i pochłanianie drożdży u *Acanthamoeba* odpowiedzialny jest rozpoznający oligosacharydy receptor mannozowy. U *Dictyostelium* receptory włączone w fagocytozę również rozpoznają węglowodany na powierzchni bakterii. Bodźce aktywujące receptory fagocytarne u *A. proteus* i *D. discoideum* uruchamiają prawdopodobnie takie same drogi przekazywania sygnału, jak czynniki indukujące pinocytozę (patrz Ryc. 6). U przedstawiciela orzęsków, *Paramecium aurelia*, bodźce endocytotyczne, również wywołujące fagocytozę, aktywują receptor β -adrenergiczny. W przekazywaniu sygnału pośredniczy białko G, dla którego efektem w tym przypadku jest cyklaza adenylanowa, a wtórnym przekaźnikiem informacji — cAMP (WYROBA i PŁATEK 1999).

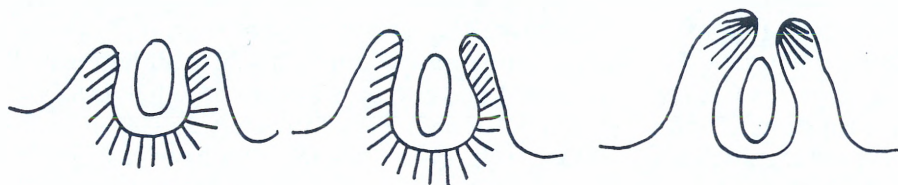
W drodze ewolucji wyspecjalizowały się w organizmach tkankowych ruchliwe komórki, zwane profesjonalnymi fagocytami. U kręgowców znane są dwie klasy fagocytujących leukocytów: polimorfonuklearne (neutrofile, eozynofile i bazofile) oraz mononuklearne (monocyty i makrofagi). Chronią one organizm przed patogenami pro- i eukariotycznymi, degradując je po pobraniu i przetwarzając ich antygeny w taki sposób, aby generowały reakcję immunologiczną. Oczyszczają ponadto organizm z obumarłych komórek i ich fragmentów. Poza profesjonalnymi fagocytami, u kręgowców fagocytują również komórki nabłonkowe, fibroblasty i limfocyty B (RABINOVITCH 1995).

Leukocyty, posiadające receptory wiążące oligosacharydy (np. receptor mannozowy u makrofagów) rozpoznają mikroorganizmy, na powierzchni których znajdują się reszty węglowodanowe. Jest to prymitywny sposób obrony przed patogenami, który istniał już przed pojawieniem się u owadów i kręgowców specjalnych cząsteczek opłaszczających patogeny. U ssaków są to immunoglobuliny, między innymi klasy IgG, IgM i cząsteczki układu dopełniacza (C). Immunoglobuliny powstają w układzie odpornościowym organizmu w odpowiedzi na infekcję i są rozpoznawane przez różne izoformy receptora Fc γ . Fagocytoza indukowana przez IgG inicjuje reakcję immunologiczną. Cząsteczki układu dopełniacza są stale obecne w organizmie i opłaszczają bakterie niespecyficznie. Rozpoznawane są przez receptory CR1 i CR3, biorące

również udział w adhezji komórkowej. Fagocytoza, w której pośredniczą (CR-fagocytoza), nie inicjuje reakcji immunologicznej (GREENBERG i SILVERSTEIN 1993, BROWN 1995).

Utworzenie kompleksu ligand-receptor jest koniecznym, ale nie wystarczającym warunkiem fagocytozy. Ligandy związane z nieaktywnymi receptorami pozostają przez długi czas nie pochłonięte. Fc receptory na powierzchni polimorfonuklearnych leukocytów są stale aktywne (RAVETCH i KINET 1991) — w przeciwieństwie do receptorów dla składników dopełniacza na niedojrzałych makrofagach, które wiążą ligandy, ale ich nie fagocytują (GREENBERG i SILVERSTEIN 1993). Te same receptory na powierzchni dojrzałych makrofagów w ogniskach zapalnych inicjują fagocytozę. Aktywacja tych receptorów związana jest z adhezją makrofagów do białek zewnątrzkomórkowej macierzy: fibronektyny, lamininy i kolagenu, która wiąże się z osiągnięciem przez komórki stanu dojrzałości i właści-

stki (GREENBERG i SILVERSTEIN 1993). Sygnał włączany w wyniku aktywacji Fcy receptorów stymuluje organizację aktyny w rejonie najbliższym receptora. F-aktyna, jak i białka wiążące aktynę: winkulina, α -aktynina, paksylina, filamina i talina, rozmieszczone są równomiernie wokół fagosomu pod błoną plazmatyczną (ALLEN i ADEREM 1996). Ten sam model fagocytozy indukuje również *Yersinia* — bakteria wnikaćca do komórek gospodarza. Białko — inwazyjna, znajdujące się na powierzchni bakterii, ma duże powinowactwo do β_1 -integryn, receptorów odpowiedzialnych przede wszystkim za adhezję komórek. Interakcja inwazyjny z β_1 -integrynami na powierzchni różnych fagocytujących komórek: nabłonkowych, limfocytów B czy makrofagów, uruchamia drogę przekazywania informacji, taką jak związanie cząsteczek IgG. Na rysunku 7 pokazano zmiany w układzie cytoszkieletu podczas formowania fagosomu, zgodnie z modelem „zippering”. W pewnym momencie



Ryc. 7. Schemat zmian rozmieszczenia filamentów aktynowych podczas formowania fagosomu — dotyczy zarówno pierwotniaków, jak i komórek tkankowych.

wego miejsca w organizmie. W aktywacji receptorów dla cząsteczek dopełniacza biorą również udział limfokiny — substancje wydzielane przez limfocyty T w miejscach zapalnych (WRIGHT i GRIFFIN 1985, BROWN 1995).

Transdukcja sygnału w obu rodzajach fagocytozy związana jest z fosforylacją reszt tyrozynowych cytoplazmatycznych domen receptorów agregujących po związaniu liganda (SEAMAN i współaut. 1996). Wynikiem aktywacji receptorów jest fosforylacja białek enzymatycznych, takich jak PI-3K (ARAKI i współaut. 1996), czy PLC (LIAO i współaut. 1992). Katalizują one formowanie PIP₃, który wpływa pośrednio lub bezpośrednio na organizację aktyny (DARBY i współaut. 1994). Pomiedzy fagocytozą Fcy receptorową a fagocytozą zachodzącą za pośrednictwem receptorów układu dopełniacza istnieją jednak zasadnicze różnice dotyczące struktury cytoszkieletu oraz morfologii. Podstawą tych różnic są prawdopodobnie różne modele fosforylacji zachodzące podczas transdukcji sygnałów dla obu rodzajów zjawisk (GREENBERG i współaut. 1993, ALLEN i ADEREM 1996). Immunoglobuliny inicjują model fagocytozy, zwany „zippering”. Wymaga on następujących po sobie interakcji liganda z receptorami, umożliwiając rozwój dużych fagocytarnych pseudopodiów ściśle przylegających do pochłanianej czą-

kontakt pomiędzy powierzchnią komórki i cytoszkieletem zostaje przerwany i aktyna koncentruje się we frontach wysuwanych pseudopodiów, co zapewnia receptorom większą labilność (ISBERG i NHIEU 1995). Podobny obraz rozkładu aktyny obserwuje się podczas fagocytozy u *A. proteus*.

Sygnał indukowany przez cząsteczki układu dopełniacza pozwala na organizację aktyny na dużym obszarze, sięgającym daleko od miejsca interakcji ligand-receptor. Podczas CR-fagocytozy F-aktyna, winkulina, α -aktynina i paksylina rozmieszczone są punktowo na powierzchni formowanego fagosomu (ALLEN i ADEREM 1996). Pochłanianie cząstki jakby zagłębiają się w komórkę, a otaczające je pseudopodia są znacznie mniej wysuwane ponad powierzchnię komórki. Jest to tak zwany model „triggering” fagocytozy. Charakteryzuje się on powstawaniem obszer-nych fagosomów oraz luźnym kontaktem pomiędzy pochłanianą bakterią a błoną, z wyjątkiem etapu inicjującego proces. W taki sposób fagocytowana jest, np. *Salmonella* przez komórki nabłonkowe jelita (SWANSON i BAER 1995). W opisanych modelach fagocytozy różny udział mają mikrotubule. CR-fagocytoza jest związana z rozplaszczaniem się komórek i zależna od obecności mikrotubul. Czynniki degradujące mikrotubule (kolchicina, nokodazol) blokują

zarówno rozplaszczanie się komórek, jak i ten rodzaj fagocytozy. Degradacja mikrotubul nie hamuje natomiast Fcy-receptorowej fagocytozy (ALLEN i ADEREM 1996).

Niezależnie jednak od modelu fagocytozy, a także rodzaju komórki, w której ona zachodzi, internalizacja materiału możliwa jest dzięki reorganizacji cytoszkieletu aktynowego (ALLISON i współaut. 1971). Reakcji fagocytarnej towarzyszy wzrost ilości F-aktyny w komórkach, osiągający maksimum po 5 min. od momentu interakcji ligand-receptor. Powrót do stanu wyjściowego zachodzi po 30 min. (GREENBERG i współaut. 1991). Skupiska filamentów aktynowych wokół formowanych fagosomów u ameb obserwowali JEON i JEON w 1983 r. W polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny bierze udział cały szereg białek wiążących aktynę i regulujących procesy jej polimeryzacji i depolimeryzacji. Należy do nich koronina — białko po raz pierwszy wyizolowane z *Dictyostelium*, biorące udział w modelowaniu aktynowego cytoszkieletu podczas fagocytozy i makropinocytozy (MANIAK i współaut. 1995). Mutanty *Dictyostelium* pozbawione koroniny wykazują zaburzenia we wszystkich procesach zależnych od aktyny. Białka podobne do koroniny regulują również polimeryzację aktyny u drożdży. Są też zasocjowane z aparatem fagocytarnym neutrofilii. Prowadzone na śluzowcu badania wykazały również, że na dynamikę aktynowego cytoszkieletu podczas formowania fagosomu ma wpływ profilina I i II, która pośredniczy w polimeryzacji aktyny (YUAN i CHIA 1999), kofilina — białko przyspieszające depolimeryzację aktyny (THERIOT 1997, YUAN i CHIA 1999) oraz α -aktynina, sieciująca filamenty aktynowe (FURUKAWA i FECHHEIMER 1994). Centralną rolę w polimeryzacji aktyny odgrywa scharakteryzowana niedawno rodzina białek — Arp2/3. Białka te odkryto w 1994 r. u *A. castellanii* (MACHESKY i współaut. 1994), potem zlokalizowano je u *Dictyostelium*, drożdży, w komórkach jeżowca i komórkach ssaków (MACHESKY i GOULD 1999). U drożdży z endocytozą związane jest Arp2. Mutant z defektem genu kodującego to białko ma zaburzoną endocytozę (MOREAU i współaut. 1997). Kompleks Arp2/3 aktywowany przez białka z rodziny WASP stymuluje polimeryzację aktyny. Sygnał dla tego procesu, zarówno z receptorów mających aktywność kinazy tyrozynowej, jak i związanych z białkiem G przekazywany jest za pośrednictwem Cdc42 — małego białka wiążącego GTP, należącego do rodziny białek Rho (MACHESKY i INSALL 1999, WELCH 1999).

Fagocytoza, podobnie jak inne zjawiska związane z ruchliwością komórek, angażuje oprócz aktyny i białek ją wiążących również białko motoryczne — miozynę. Aktywność kurczliwa cytoszkieletu wymagająca interakcji aktyna-miozyna niezbędna jest zarówno w procesie wysuwania pseudopodiów fagocytarnych, jak też zamykania fagosomu po otoczeniu przez pseudopodia pochłanianej cząstki (SWANSON i współaut. 1999). Udział miozyny stwierdzono podczas fagocytozy u *Amoeba proteus*. Wokół formujących się fagosomów u *A. castellanii* gromadzą się izoformy miozyny: IA i IB (BAINES i współaut. 1995, OSTAP i współaut. 1997). Nie wykryto miozyny II w pobliżu struktur fagocytarnych (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1998). Miozyna IB włączona jest także w fagocytozę u *Entamoeba histolytica* (VOIGHT i współaut. 1999). Również u *D. discoideum*, które od lat służy jako model w badaniach nad fagocytozą, nie stwierdzono udziału miozyny II w formowaniu fagosomów. U mutantu *Dictyostelium* pozbawionego miozyny II fagocytoza przebiega normalnie, choć inne funkcje komórki zależne od interakcji tego białka z aktyną są zaburzone (DE LOZANNE i SPUDICH 1987, FUKUI i współaut. 1990). Natomiast brak którejkolwiek z izoform miozyny I: IB, IC czy ID (badania na pojedynczych, podwójnych i potrójnych mutantach) znacznie hamuje fagocytozę. Ponieważ jednak fagocytoza jest zjawiskiem skomplikowanym i wieloetapowym, nie wiadomo jaki jest udział poszczególnych izoform tego białka w kolejnych stadiach fagocytarnej reakcji komórki (JUNG i współaut. 1996). Izoformę C miozyny I zlokalizowano też w obszarze dystalnym aparatu fagocytarnego w makrofagach (ALLEN i ADEREM 1996). Nie wykryto natomiast aktywności miozyny II podczas fagocytozy u makrofagów (DE LANEROLLE i współaut. 1993).

Aby fagosom mógł wejść w dalsze etapy fagocytozy konieczne jest usunięcie aktyny z jego powierzchni, tak jak konieczne jest usunięcie klatryny z powierzchni pęcherzyków endocytotycznych. Białka cytoszkieletalne biorące udział w procesie formowania fagosomu rozpraszają się po jego zamknięciu. Fuzje błon zachodzące podczas wewnątrzkomórkowego transportu fagocytarnego prowadzą do powstania bogatego w enzymy hydrolityczne fagolizosomu, w którym zachodzi trawienie pobranego materiału (BERON i współaut. 1995). Substancje zbędne i szkodliwe usuwane są z komórki drogą egzocytozy (patrz Ryc. 4).

PODSUMOWANIE

Endocytoza jest uniwersalnym zjawiskiem mającym różnorodne znaczenie dla komórek. Jak wspomniano we wstępie, dzięki różnym formom endocytozy komórki mogą pobierać pokarm i cząsteczki istotne dla ich metabolizmu, transportować różne substancje, wymieniać fragmenty błony plazmatycznej, czy wreszcie bronić organizmy tkankowe przed inwazją patogenów. Ważną cechą endocytozy jest zamykanie pochłanianego materiału w pęcherzykach. Takie odizolowanie od cytoplazmy zapewnia pobranym cząsteczkom właściwy transport w obrębie komórki i pomiędzy komórkami. Badania nad zjawiskami endocytotycznymi prowadzone są od ponad stu lat. W 1880 r. Elie Metchnikoff opisał fagocytozę u pierwotniaków, a następnie pokazał, że takie samo zjawisko u organizmów tkankowych jest ważnym mechanizmem obrony przed czynnikami patogennymi. Także i pinocytozę obserwowano wcześniej u pierwotniaków. W komórkach tkankowych Warren i Lewis opisali formowanie pęcherzyków podczas fałdowania błon dopiero 70 lat temu. Historię badań nad endocytozą podzielić można na trzy etapy: pierwszy do 1950 r. to obserwacje morfologiczne przy użyciu mikroskopu świetlnego, etap drugi — badania z zastosowaniem mikroskopii ele-

ktronowej i metod biochemicznych — lata 1950–1975, i etap ostatni, związany z rozwojem biologii błon i biologii molekularnej. W ostatnim ćwierćwieczu badano molekularne podstawy takich procesów endocytotycznych jak: drogi przekazywania sygnałów, formowanie pęcherzyków klatrynowych, fuzje błon czy reorganizacja cytoszkieletu. Wyizolowano, scharakteryzowano i sklonowano geny wielu białek zaangażowanych w endocytozę. Podjęto badania nad kontrolą zachowania i funkcji profesjonalnych fagocytów w miejscach zapalnych.

W historii badań nad endocytozą pierwotniaki, śluzowce i drożdże zajmują równie istotne miejsce co komórki tkankowe. Intensywne badania nad fagocytozą prowadzono u *Tetrahymena*. Pionierska praca dotycząca fuzji izolowanych fagosomów przeprowadzona została na *Acanthamoeba* (OATES i TOUSTER 1980). *Dictyostelium*, podobnie jak drożdże, jest ważnym obiektem w badaniach genetycznych nad endocytozą. Prowadzone na tych właśnie prostych organizmach badania — szczególnie nad fagocytozą — pozwoliły na zrozumienie wielu mechanizmów umożliwiających prawidłowy przebieg zjawiska.

ENDOCYTOSIS IN PROTOZOA AND TISSUE CELLS

Summary

Endocytosis, an important activity of virtually all eukaryotic cells is a complex process through which external material is internalized by surface membrane infolding and vesiculation. Internalization of membrane, fluid and receptor-bound ligands into cells occurs by some distinct endocytic mechanisms. One is dependent on clathrin and responsible for concentrative uptake of growth factors and other ligands. Clathrin-independent endocytosis consists of

two processes: pinocytosis and phagocytosis. The first contributes significantly to the total uptake of membrane and fluid in a cell. Phagocytosis in Protozoa is the primary mechanism by which these cells feed. In higher organisms phagocytosis is the process of recognition and engulfment of microorganisms and tissue debris that accumulate during infection, inflammation or wound repair.

LITERATURA

- ALLAN B. B., BALCH W. E., 1999. *Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments*. Science 285, 63–66.
- ALLEN L.-A. H., ADEREM A., 1996. *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. J. Exp. Med. 184, 627–637.
- ALLEN R. D., SCHROEDER Ch. C., FOK A. K., 1992. *Endosomal system of Paramecium: coated pits to early endosomes*. J. Cell Sci. 101, 449–461.
- ALLISON A. C., DAVIES P., DE PETRIS S., 1971. *Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis*. Nat. New Biol. 232, 153–155.
- ARAKI N., JOHNSON M. T., SWANSON J. A., 1996. *The role of phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages*. J. Cell Biol. 135, 1249–1260.
- BAINES I. C., CORIGLIANO-MURPHY A., KORN E. D., 1995. *Quantification and localization of phosphorylated myosin I isoforms in Acanthamoeba castellanii*. J. Cell Biol. 130, 591–603.
- BERON W., ALVAREZ-DOMINQUEZ C., MAYORGA L., STAHL P. D., 1995. *Membrane trafficking along the phagocytic pathway*. Trends Cell Biol. 5, 100–104.
- BERRIDGE M. J., 1986. *Cell signalling through phospholipid metabolism*. J. Cell Sci. 4 (Suppl.), 137–153.
- 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.
- BRODSKY F. M., HILL B. L., ACTON S. L., NATHKE I., WONG D. H., PONNAMBALAM S., PARHAM P., 1991. *Clathrin light chains, arrays of protein motifs that regulate coated vesicle dynamics*. TIBS 16, 208–213.

- BROWN E. J., 1995. *Phagocytosis*. BioEssays 17, 109–117.
- CORVERA S., CZECH M. P., 1998. *Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction*. Trends Cell Biol. 8, 442–446.
- DARBY C., GEHLEN R. L., SCHREIBER A. D., 1994. *Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein*. J. Immunol. 152, 5429–5437.
- DE LANEROLLE P., GORGAS G., LI X., SCHLUNS K., 1993. *Myosin light chain phosphorylation does not increase during yeast phagocytosis by macrophages*. J. Biol. Chem. 268, 16883–16886.
- DE LOZANNE A., SPUDICH J. A., 1987. *Distribution of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination*. Science 236, 1086–1091.
- DRAYER A. L., VAN DER KAAY J., MAYR G. W., VAN HAASSTERT P. J. M., 1994. *Role of phospholipase C in Dictyostelium formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase activity*. EMBO J. 13, 1601–1609.
- DURRBACH A., LOUVARD D., COUDRIER E., 1996. *Actin filaments facilitate two steps of endocytosis*. J. Cell Sci. 109, 457–465.
- FALLON R. J., SCHWARTZ A. L., 1985. *Receptor-mediated endocytosis and targeted drug delivery*. Hepatology 5, 899–901.
- FOK A. K., ALLEN R. D., 1990. *The phagosome-lysosome membrane system and its regulation in Paramecium*. Int. Rev. Cytol. 123, 61–94.
- FUKUI Y., DE LOZANNE A., SPUDICH J. A., 1990. *Structure and function of the cytoskeleton of a Dictyostelium myosin-defective mutant*. J. Cell Biol. 110, 367–378.
- FURUKAWA R., FECHHEIMER M., 1994. *Different localization of α -actinin and the 30kD actin-bundling protein in the cleavage furrow, phagocytic cup and contractile vacuole of Dictyostelium discoideum*. Cell Motil. Cytoskeleton 29, 46–56.
- GAIDAROV I., SANTINI F., WARREN R., KEEN J. H., 1999. *Spatial control of coated-pit dynamics in living cells*. Nature Cell Biol. 1, 1–7.
- 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.
- GREENBERG S., SILVERSTEIN S. C., 1993. *Phagocytosis*. [W:] *Fundamental Immunology*, PAUL W. E. (red.). Raven Press Ltd. New York, str. 941–964.
- GREENBERG S., CHANG P., SILVERSTEIN S. C., 1993. *Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J. Exp. Med. 177, 529–534.
- GREENBERG S., KHOURY J. E., DI VIRGILIS F., KAPLAN E. M., SILVERSTEIN S. C., 1991. *Ca^{2+} -independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J. Cell Biol. 113, 757–767.
- GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., 1987. *Pinocytoza i jej związki ze zjawiskami ruchowymi*. [W:] *Komórka — jej budowa i ruch*. MICHAJŁOW W., HAŁOŃ E. (red.). Ossolineum. Wrocław, Warszawa, Kraków, Gdańsk, Łódź, str. 187–212.
- GRĘBECKI A., 1991. *Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae*. Protoplasma 160, 144–158.
- GRUENBERG J., MAXFIELD F. R., 1995. *Membrane transport in the endocytic pathway*. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 552–563.
- HEUSER J., EVANS L., 1980. *Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts*. J. Cell Biol. 84, 560–583.
- ISBERG R. R., NHIEU G. T., 1995. *The mechanism of phagocytic uptake promote by invasin-integrin interaction*. Trends Cell Biol. 5, 120–124.
- JANSSENS P. M. W., VAN HAASSTERT P. J. M., 1987. *Molecular basis of transmembrane signal transduction in Dictyostelium discoideum*. Microbiol. Rev. 51, 396–418.
- JEON K. W., JEON M. S., 1983. *Generation of mechanical forces in phagocytosing amoebae: light and electron microscopic study*. J. Protozool. 30, 536–538.
- JOSEFSSON J.-O., ARVIDSON G., COBBOLD P., 1988. *Possible regulation of cation-induced pinocytosis in Amoeba proteus by phospholipase A*. Eur. J. Cell Biol. 46, 200–206.
- JUNG G., XUFENG W., HAMMER J. A. III, 1996. *Dictyostelium mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combination of shared and distinct functions*. J. Cell Biol. 133, 305–323.
- KLEIN H. P., KÖSTER B., STOCKEM W., 1988. *Pinocytosis and locomotion in Amoebae*. XVIII. *Different morphodynamic forms of endocytosis and microfilament organization in Amoeba proteus*. Protoplasma 2 (Suppl.), 76–87.
- KŁOPOCKA W., 1996. *Rola cytoszkieletu w endocytozie w komórkach tkankowych i pinocytozie u ameb*. Kosmos 45, 43–56.
- KŁOPOCKA W., MAKUCH R., *Zmiany struktury cytoszkieletu aktynowego podczas pinocytozy indukowanej u Amoeba proteus*. XXXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 2000. Komunikat.
- KŁOPOCKA W., POMORSKI P., 1996. *Cytoplasmic calcium transients in Amoeba proteus during induction of pinocytotic and non-pinocytotic rosettes*. Acta Protozool. 35, 169–175.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1998. *Participation of myosin I, spectrin analogue and tyrosine-phosphorylated proteins at early stages of phagocytosis in Acanthamoeba castellanii*. Acta Protozool. 37, 191–199.
- LECAT S., LAFONT F., 1999. *Annexins and their interacting proteins in membrane traffic*. Protoplasma 207, 133–140.
- LIAO F., SHIN H. S., RHEE S. C., 1992. *Tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 induced by cross-linking of the high-affinity of low-affinity Ec receptor for IgG in U937 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3659–3663.
- MACHESKY L. M., GOULD K. L., 1999. *The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer*. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 117–121.
- MACHESKY L. M., INSALL R. H., 1999. *Signalling to actin dynamics*. J. Cell Biol. 146, 267–272.
- MACHESKY L. M., ATKINSON S. J., AMPE C., VANDEKERCKHOVE J., POLLARD T. D., 1994. *Purification of a cortical complex containing 2 unconventional actins from Acanthamoeba by affinity-chromatography on profilin-agarose*. J. Cell Biol. 127, 107–115.
- MAEDA Y., KAWAMOTO T., 1986. *Pinocytosis in Dictyostelium discoideum cells. A possible implication of cytoskeletal actin for pinocytotic activity*. Exp. Cell Res. 164, 516–526.
- MAHAFFEY D. T., MOORE M. S., BRODSKY E. M., ANDERSON R. G. W., 1989. *Coat proteins isolated from clathrin coated vesicles can assemble into coated pits*. J. Cell Biol. 108, 1615–1624.
- MANIAK M., RAUCHENBERGER R., ALBRECHT R., MURPHY J., GERISCH G., 1995. *Coronin involved in phagocytosis. Dynamic particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag*. Cell 83, 915–924.
- MARSH M., MCMAHON H. T., 1999. *The structural era of endocytosis*. Science 285, 215–220.
- MELLMAN I., 1995. *Enigma variations: protein mediators of membrane fusion*. Cell 82, 869–872.
- MONGER B. C., LANDRY M. R., 1991. *Prey-size dependency of grazing by free-living marine flagellates*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 74, 239–248.

- MOREAU V., GALAN J.-M., DEVILLIERS G., HAGUENAUER-TSAPIS R., WINSOR B., 1997. The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 8, 1361-1375.
- NILSSON J. R., VAN DEURS B., 1983. Coated pits and pinocytosis in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* 63, 209-222.
- NOVÁK K. D., PETERSON M. D., REEDY M. C., TYTUS M. A., 1995. Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell Biol.* 131, 1205-1221.
- OATES P. J., TOUSTER O., 1980. In vitro fusion of *Acanthamoeba* phagosomes III. Evidence that cyclic nucleotides and vacuole subpopulations respectively control the rate and the extent of vacuole fusion in *Acanthamoeba* homogenates. *J. Cell Biol.* 85, 804-810.
- O'HALLORAU T. J., ANDERSON R. G. W., 1992. Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 118, 1371-1377.
- OSTAP E. M., MAUPIN P., DOBERSTEIN S. K., BAINES I. C., KORN E. D., POLLARD T. D., 1997. *Acanthamoeba* myosin-I isoforms concentrate to phagocytic and macropinocytic structures. Abstracts of the Cell Biology Meeting in Washington DC. 370a, 2147.
- PEARSE B. M. F., 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97, 93-98.
- PEARSE B. M. F., 1988. Receptor compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO J.* 7, 3331-3336.
- PELHAM H. R. B., 1999. SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp. Cell Res.* 247, 1-8.
- PLATTNER H., 1991. Ultrastructural aspects of exocytosis. [W:] *Membrane Fusion*. WILSHUT J., HOEKSTRA D. (red.). New York, Marcel Dekker, str. 571-598.
- PODDANA H., BARAŃSKA J., 1991. Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach. *Postępy Biochemii* 37, 2-5.
- PRUSCH R. D., ROSCOE J. C., 1993. A possible signal-coupling role for cyclic AMP during endocytosis in *Amoeba proteus*. *Tissue Cell* 25, 141-149.
- PRUSCH R. D., THOMPSON V. L., 1995. Diacylglycerol as a component of the signal-coupling pathway during the initiation of endocytosis in *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 279, 359-364.
- RABINOVITCH M., 1995. Professional and non-professional phagocytes: An introduction. *Trends Cell Biol.* 5, 85-87.
- RADEK R., HAUSMANN K., 1994. Endocytosis, digestion and defecation in flagellates. *Acta Protozool.* 33, 127-147.
- RAVETCH J. V., KINET J., 1991. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-492.
- RIDLEY A. J., 1994. Membrane ruffling and signal transduction. *Bioessays* 16, 321-327.
- RIEZMAN H., 1993. Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol.* 3, 273-277.
- RINGSTAD N., GAD H., LOW P., DI PAOLO G., BRODIN L., SHUPLIAKOV O., DE CAMILLI P., 1999. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24, 143-154.
- ROBINSON M. S., 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin. Cell Biol.* 6, 538-544.
- ROTH M. G., 1999. Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* 9, 174-179.
- ROTHMAN J. E., 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- SANDVIG K., VAN DEURS B., 1994. Endocytosis without clathrin. *Trends Cell Biol.* 4, Comment, 275-277.
- SCHMID S., 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 511-548.
- SCHMID S. L., BRAELL W. A., SCHLOSSMAN D. M., ROTHMAN J. E., 1984. A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by „uncoating ATPase”. *Nature* 311, 228-231.
- SCHMIDT A., WOLDE M., THIELE CH., KRATZIN H., PODTELEJNIKOV A. V., WITKE W., HUTTNER W. B., SOLING H.-D., 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-141.
- SEAMAN M. N. J., BURD CH.G., EMR S. D., 1996. Receptor signalling and the regulation of endocytic membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 549-556.
- SEVER S., MÜHLBERG A. B., SCHMID S. L., 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481-486.
- SMITH C. J., PEARSE B. M. F., 1999. Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* 9, Forum comment, 335-338.
- SMYTHE E., WARREN G., 1991. The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur. J. Biol.* 202, 689-699.
- SOLLNER T., 1995. SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett.* 369, 80-83.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. Ameboid movement and related phenomena. *Int. Rev. Cytol.* 112, 137-183.
- STOCKEM W., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M., 1993. Food uptake and digestion in amoebae. *Adv. Cell Molec. Biol. Membr.* 2B, 371-407.
- STOWELL M. H. B., MARKS B., WIGGE P., MCMAHON H. T., 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biol.* 1, 27-32.
- SWANSON J. A., BAER S. C., 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5, 89-93.
- SWANSON J. A., JOHNSON M. T., BENINGO K., POST P., MOOSEKER M., ARAKI N., 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* 112, 307-316.
- SWEITZER S. M., HINSHAW J. E., 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- THERIOT J. A., 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filaments turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136, 1165-1168.
- VAN DER BLIEK A. M., 1999. Is dynamin a regulator motor or a master regulator. *Trends Cell Biol.* 9, 253-254.
- VERITY P. G., 1991. Feeding in planktonic protozoans: evidence for non-random acquisition of prey. *J. Protozool.* 38, 69-76.
- VOIGT H., OLIVO J.-CH., SANSONETTI P., GUILLÉN N., 1999. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J. Cell Sci.* 112, 1191-1201.
- WASIK A., 1999. Proces sekrecji a tworzenie lorik u orzęsków z podrzędu tintinnina. *Kosmos* 48, 19-27.
- WELCH M. D., 1999. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* 9, Forum comment, 423-427.
- 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.
- WRIGHT S. D., GRIFFIN F. M. J., 1985. Activation of phagocytic cells C3 receptors for phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 38, 327-339.
- WYROBA E., PLATEK A., 1999. Modulation of endocytotic activity of *Paramecium* by the β -adrenergic ligands. *Acta Protozool.* 38, 5-14.

- YUAN A., CHIA C. P., 1999. Co-loss profilin I and II and cofilin with actin from maturing phagosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Protoplasma* 209, 214–225.
- ZHOU K., PANDOL S., BOKOCH G., TRAYNOR-KAPLAN A. E., 1998. Distribution of *Dictyostelium* PI-3K genes reduces [32 P] phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [32 P] phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis. *J. Cell Sci.* 111, 283–294.