

PINOCYTOZA

Wstęp.

Powszechny w komórkach eukariotycznych proces endocytozy to ustawiczne pobieranie ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki zarówno płynu, małych cząsteczek jak i makrocząsteczek, w drodze wpuklenia błony komórkowej i odcięcia pęcherzyka endocytarnego. Ze względu na rodzaj wchłanianego materiału i wielkość powstających pęcherzyków endocytarnych wyróżnia się 2 główne typy endocytozy: pinocytozę („picie komórki”) czyli wchłanianie płynu i cząsteczek przez małe pęcherzyki, zazwyczaj o średnicy <150nm oraz fagocytozę („jedzenie przez komórkę”) wchłanianie dużych cząstek (mikroorganizmy, szczątki komórkowe) przez pęcherzyki zazwyczaj o wielkości od 0,1µm do 10µm, zwane fagosomami. Podobnie jak endocytozę, również samą pinocytozę, przyjęto dzielić biorąc pod uwagę wielkość tworzonych pęcherzyków oraz mechanizm tworzenia endosomów, na makropinocytozę (pęcherzyki o średnicy od 100nm do 1µm) i mikropinocytozę (pęcherzyki mniejsze niż 150nm). Ze względu na sposób stymulowania pinocytozy i sam mechanizm tego zjawiska wyróżnia się pinocytozę fazy płynnej i pinocytozę adsorpcyjną. W procesie pinocytozy fazy płynnej (endocytoza niespecyficzna) do wnętrza pęcherzyka endocytarnego trafiają losowo cząsteczki rozpuszczone w płynie otaczającym komórkę. W procesie pinocytozy adsorpcyjnej, przebiegającej z udziałem receptorów (endocytoza specyficzna, selektywna) makrocząsteczki (zwane ligandami) wychwytywane są w sposób wybiórczy z otoczenia, dzięki uprzedniemu związaniu na powierzchni komórki przez specyficzne receptory błonowe, a endosom kierowany jest do charakterystycznego dla komórki szlaku endocytarnego, od którego typu zależą losy wchłoniętej makrocząsteczki.

Badania wykazały, że pinocyтую wszystkie komórki eukariotyczne, natomiast fagocytoza jest procesem charakterystycznym tylko dla niektórych typów komórek, zwanych fagocytami. Fagocytoza umożliwia komórkom pierwotniaków pobieranie substancji odżywczych z otoczenia, a wyspecjalizowanym komórkom organizmów tkankowych (makrofagi osiadłe i wędrujące, leukocyty obojętnochłonne), wychwytywanie i niszczenie mikroorganizmów patogennych (bakterie, wirusy) oraz obumarłych komórek własnego organizmu.

W procesie pinocytozy różne substancje (związki nieorganiczne i organiczne) zawarte w płynie otaczającym komórkę mogą być pobierane do jej wnętrza w sposób spontaniczny, dzięki ruchliwości błony komórkowej (endocytoza fazy płynnej). Natomiast pinocytoza adsorpcyjna (endocytoza receptorowa) np. przez pęcherzyki otoczone klatryną, kaweole lub pęcherzyki „nieopłaszczone”, umożliwia komórkom selektywne pobieranie ze środowiska zewnętrznego różnorodnych związków, głównie makrocząsteczek (cząstki LDL, witaminy, hormony, czynniki wzrostu, cytokiny, niektóre enzymy itd.).

Przyjmuje się też powszechny podział pinocytozy na ciągłą (lub konstytucyjną), która zachodzi stale w naturalnym środowisku oraz na ograniczoną w czasie pinocytozę indukowaną doraźnymi zmianami środowiska.

Pinocytozę indukowaną można łatwo wywołać eksperymentalnie w komórkach w hodowli, przez dodanie do płynu hodowlanego rozmaitych substancji indukujących, np. niektórych soli nieorganicznych, aminokwasów zasadowych, peptydów, białek lub barwników zasadowych. Proces ten zależy zarówno od rodzaju i stężenia stosowanej substancji, jak i pH roztworu indukującego. Adsorpcja czynników wywołujących pinocytozę na powierzchni komórki zmienia strukturę i własności błony komórkowej, polegające na zmianach konformacji białek błony i zmianach charakteru micelizacji lipidów, co prowadzi zarówno do zmian w przepuszczalności błony dla wody i elektrolitów jak i zmian w strukturze podbłonowej warstwy korytkalnej cytoplazmy komórek, a w konsekwencji do formowania pęcherzyków pinocytotycznych. Wykazano, że pinocytoza indukowana, wywoływana przez pojawienie się w środowisku zewnętrznym komórki odpowiedniego stężenia czynnika indukującego to proces, który wymaga energii metabolicznej i udziału struktur kurczliwych (cytoszkieletu aktynowego), a zatem zależy od temperatury i inhibitorów metabolizmu komórki.

Ćwiczenie ma na celu

Obserwację (w mikroskopie kontrastowo-fazowym) zjawiska pinocytozy indukowanej zachodzącej w różnych typach komórek eukariotycznych :

- w komórkach pierwotniaków (*Amoeba proteus*)
- w komórkach ssaków (makrofagi)

oraz sprawdzenie czy aktywność pinocytozy zależy od czynników zewnętrznych i stanu metabolicznego komórki (skład jonowy pożywki, pH, temperatura).

Wykonanie ćwiczenia:

Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczeń należy ustawić mikroskop MB-30S do pracy w kontraście faz dla obiektywu 20x (wkręcić zarówno obiektyw 20x PhA, jak i 20x PhS).

Część I - Wpływ czynników zewnętrznych (pH środowiska) na przebieg procesu pinocytozy. Doświadczenie przeprowadzić na komórkach *Amoeba proteus*.

1. Przygotować 4 czyste szkiełka nakrywkowe, 4 komory oraz 4 szkiełka zegarkowe.
2. Metoda pomiaru intensywności pinocytozy :
 - a) na szkiełko zegarkowe wlać ok. 1-2 ml roztworu, w którym będzie indukowana pinocytoza;
 - b) pokrętko zmiany powiększeń lupy binokularnej MST-131 ustawić na wartość 1 lub 1,6. Używając mikropipety pobrać pod lupą 3-5 głodzonych ameb, z jak najmniejszą ilością płynu hodowlanego, i przenieść je na szkiełko zegarkowe z roztworem indukującym (0.125 M NaCl). Włączyć stoper;
 - c) jak najszybciej pobrać ameby ze szkiełka zegarkowego i przenieść do czystej komory, którą należy nakryć szkiełkiem nakrywkowym;
 - d) znaleźć obraz 2 lub 3 ameb pod mikroskopem (w kontraście-faz). Obserwować pinocytozę w komórkach *Amoeba proteus* i liczyć pojawiające się kanały pinocytarne przez około 15 minut od chwili umieszczenia ameb w roztworze indukującym.
Zanotować liczbę kanałów, które pojawiły się w tym czasie, w roztworze o danym pH.
UWAGA: w celu obserwacji kanałów należy zmieniać ostrość śrubą mikrometryczną, gdyż kanały pojawiają się w różnych płaszczyznach obrazowych.
3. Wykonać pomiary intensywności pinocytozy komórek *Amoeba proteus* dla poniższych roztworów:
 - a) 0,125M NaCl pH = 5
 - b) 0,125M NaCl pH = 6,5
 - c) 0,125M NaCl pH = 8
 - e) 0,125M glutaminian sodu pH=8
4. Na podstawie otrzymanych wyników określić :
 - a) czy pH roztworu indukującego (0,125M NaCl) wpływa na aktywność procesu pinocytozy;
 - b) czy rodzaj anionu w roztworze indukującym (gdy kation jest taki sam) wpływa na przebieg procesu pinocytozy.

**Część II - Wpływ stanu metabolicznego komórki na przebieg procesu pinocytozy.
Doświadczenia przeprowadzić na mysich makrofagach linii P388D1 z hodowli komórkowej.**

1. Wyczyścić przygotowane komory i szkiełka nakrywkowe.
2. Oglądać komórki makrofagów w mikroskopie odwróconym.
Komórki wysiane są na szkiełka nakrywkowe, umieszczone w szalkach, i hodowlane w pożywce RPMI z dodatkiem 10% płodową surowicą wołową (FBS), w temp. 37° C.
3. Do małej szalki wlać 2 ml ciepłego (37°C) roztworu PBS z glukozą (1mg/ml) i 5% FBS (roztwór wcześniej przygotowany).
4. Z szalki hodowlanej wyjąć przy pomocy pęsety 1 szkiełko z komórkami i umieścić je w przygotowanym roztworze PBS.
Przepłukać komórki, a następnie szkiełko umieścić w komorze (komórkami do góry), zalać 20 µl roztworu PBS z glukozą i surowicą i nakryć szkiełkiem nakrywkowym.
5. Komórki oglądać w mikroskopie w kontraście faz i jasnym polu.
6. Do drugiej szalki również nalać 2 ml ciepłego roztworu PBS z glukozą i surowicą i umieścić w niej nowe szkiełko z komórkami.
7. Do szalki dodać znacznika endocytozy fazy płynnej jakim jest czerwien obojętna (NR), tak by stężenie końcowe barwnika wynosiło 0,05 mg/ml i starannie wymieszać (stężenie przygotowanego koncentratu czerwieni obojętnej wynosi 5 mg/ml).
Komórki inkubować z barwnikiem przez 10 minut w temp. 37°C.
8. Po upływie tego czasu szkiełko z komórkami wyjąć z roztworu i przepłukać ciepłym PBS z glukozą i surowicą, umieścić je w komorze, nałożyć kroplę PBS i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
Oglądać komórki w mikroskopie w kontraście faz i jasnym polu.
Porównać wygląd makrofagów inkubowanych w roztworze z czerwienią obojętną i hodowanych w pożywce bez barwnika (kontrola).
9. Analogicznie jak w punkcie 6, do małej szalki nalać 2 ml ciepłego roztworu PBS z glukozą i surowicą i umieścić w niej dwa szkiełka z komórkami, następnie dodać odpowiednie stężenie czerwieni obojętnej i umieścić komórki w lodówce (temp. ok. 4-6°C) na 10 minut
10. Po 10 minutach jedno szkiełko z komórkami wyjąć z pożywki i umieścić w zimnym PBS z glukozą i surowicą, przepłukać komórki w PBS (z lodówki) i sporządzić preparat, który oglądać w mikroskopie; natomiast szalkę z drugim szkiełkiem umieścić w cieplarni w 37°C na kolejne 10 minut, po tym czasie przepłukać komórki ciepłym PBS (37°C) i sporządzić z nich preparat, analogicznie jak poprzednio.
11. Oglądać sporządzone preparaty, porównać je z wcześniej przygotowanymi i wyciągnąć wnioski.
Określić, czy temperatura, w której inkubowane są komórki, wpływa na aktywność procesu pinocytozy, a jeśli tak, to wyjaśnić dlaczego?

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- Przebieg procesu endocytozy – drogi transportu pęcherzykowego w komórce (szlaki endocytarne; przedziały endosomalne)
- Różne mechanizmy endocytozy (fagocytoza, makropinocytoza, endocytoza przez pęcherzyki otoczone klatryną, endocytoza przez kaweole)
- Znaczenie procesu endocytozy dla komórki zwierzęcej i organizmu

Zalecana literatura:

- B. Alberts i inni.- „Podstawy Biologii Komórki”, red. H. Kmity i P. Wojtaszka, PWN 2005; Rozdz.15.
- B. Alberts et al. – Molecular Biology of the cell. – 4th. Ed. Garland Science 2002, part IV/13.
- T. Pollard. - Cell Biology - Wydawca: W.B. Saunders Company, 2007; chapter: 22.
- Strukturalne podstawy biologii komórki „Transport pęcherzykowy” – W. Kilariski, Warszawa 2003; rozdział: 5.1.
- D. Cichoń, M. Michalik. Wnikanie wirusów do komórek na drodze endocytozy – mechanizmy i wybrane aspekty kliniczne. Mikrobiologia Medycyna 4: 16-26, 2004.