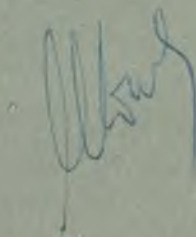


POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII



1968

tom 14

nr 4

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich stopnie i tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczyć numeracją rzymską a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

Załączniki do tekstu. Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzony kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zapatrzone w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górze” i „dół”.

Literatura. Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1968
tom XIV
zeszyt 4

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)
Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełkiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin)

Komitet Redakcyjny
Redaktor — Zofia Lassota
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki
Warszawa 12 ul Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1968

Nakład 2010 (1889+121)	Oddano do składania 19.VII.1968
Ark. wyd. 7,5; ark. druk. 6,25 wkl. kred.	Podpisano do druku w październiku 1968
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w listopadzie 1968
Cena zł 20.—	Zam. nr 1295/68. N-38.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

EUGENIUSZ GAŚSIOR*

Niektóre problemy translacji kodu genetycznego

Some Problems of the Genetic Code Translation

Recent data concerning the transfer step in protein synthesis is reviewed. The function of enzymes engaged in peptide bond synthesis and ribosome movement, as well as the process of chain initiation and termination are discussed.

W ostatnich latach obserwuje się niezwykle szybki postęp badań nad biosyntezą białka. W literaturze obcej (100, 102, 142), oraz w *Postęпах Biochemii* ukazało się wiele przeglądowych artykułów omawiających zagadnienia biosyntezy białek (87, 158, 159), kodu genetycznego (87, 158, 173) oraz struktury i funkcji rybosomów (57, 125). Niniejszy artykuł stanowi omówienie etapu przeniesienia reszty aminokwasowej z aminoacylo-tRNA na rybosomy z jednoczesnym utworzeniem wiązania peptydowego.

I. Aminoacylo-tRNA transferazy

Produktem reakcji aktywacji aminokwasów jest aminoacylo-tRNA. W procesie syntezy białka reszta aminokwasowa tego kompleksu przenoszona jest enzymatycznie na rybosomy i wbudowywana do tworzącego się polipeptydu (61, 68). Bliższe badania wykazały w każdym badanym dotąd materiale obecność conajmniej dwóch frakcji aktywnych w reakcji „transferazowej”.

Fessenden i Moldave (41, 42) za pomocą frakcjonowania siarczanem amonu wyodrębnili z wątroby szczura dwie frakcje enzymatyczne: transferazę I i II. Otrzymane preparaty były bardzo labilne i sto-

* Doc. dr, Katedra Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wykaz używanych skrótów: A, C, G, U, T — oznaczają odpowiednie mononukleotydy: adenyłowy, cytydyłowy, guanyłowy, urydyłowy i tymidyłowy, CCA — końcowy fragment części akceptorowej łańcucha sRNA, ψ — 5-rybozylouracyl, GMP-PCP — 5-guanyłometylenodwufosfonian, DEAE i TEAE — odpowiednio dwu- i trójetyloaminoetylocelulozy

sowana procedura izolowania nie dawała powtarzalnych wyników. W 1965 roku Gąsior i Moldave (49, 50) opisali nową wydajną metodę wyodrębniania transferaz względnie stabilnych. Wstępnie oczyszczone na żelu fosforanowo-wapniowym enzymy sączono przez *Sephadex* G-200 uzyskując całkowite rozdzielenie obu czynników enzymatycznych i ich kilkudziesięciokrotne oczyszczenie. W 1967 roku Klink i wsp. (81, 82) używając chromatografii na *TEAE*-celulozie uzyskali również dwie transferazy z wątroby szczura a także wołu (czynnik F-I i F-II) o własnościach podobnych do preparatów rozdzielonych na żelu *Sephadex* (50). Z doświadczeń Suttera i wsp. (155, 156) oraz Klinka i wsp. (81, 82) wynika, że transefaza II i czynnik F-I są aktywowane związkami sulfhydrylowymi. Związki te prawdopodobnie aktywują GTP-azę występującą w preparatach tych enzymów. Wątrobowe transferazy posiadają naturę komplementarną. Którykolwiek z enzymów użyty oddzielnie nie katalizuje reakcji przeniesienia aminokwasu do białka.

W latach 1962—64 otrzymano (6, 7) dwie transferazy z retikulocytów królika, które oczyszczono częściowo za pomocą adsorbpcji na żelu fosforanowo-wapniowym i chromatografii na *DEAE*-celulozie. Transferazy te: TF-1 i TF-2 odpowiadają transferazie I i II wątroby.

W 1963 roku w pracowni Lipmanna (2, 111, 112, 114) wyizolowano z *Escherichia coli* dwa czynniki białkowe A i B o funkcjach analogicznych do transferaz z tkanek zwierzęcych. Częściowo oczyszczone preparaty wykazywały naturę komplementarną. Niezależnie od własności transferazowych czynnik B wykazywał własności GTP-azy. Czynnik A był stabilny, podczas gdy czynnik B ulegał szybkiej inaktywacji cieplnej. W 1966 roku Nishizuka i Lipmann (117) stosując inną metodę rozdzielania i oczyszczania otrzymali dwie komplementarne frakcje T i G o własnościach podobnych do czynników A i B. Czynnik T okazał się jednak bardzo labilny, G natomiast trwały. Takie odwrócenie stabilności preparatów nasuwało przypuszczenie, że istnieje czynnik labilny występujący w zależności od użytej procedury bądź we frakcji B bądź T. Czynnik ten otrzymali Lucas-Lenard i Lipmann (93) z *Pseudomonas fluorescens*. Frakcja T na żelu *Sephadex* G-200 rozdzielała się na dwa aktywne czynniki: T_s — stabilny i T_u — niestabilny. Według tych autorów czynnik A z *E. coli* byłby równoważny T_s z *P. fluorescens*, zaś B — czynnikom G i T_u . Bakteryjne czynniki katalizujące przeniesienie aminokwasu nazwano czynnikami polimeryzującymi.

Ostatnio Ayuso i Heredia (8) otrzymali z częściowo oczyszczonego materiału (64) drożdży dwie, a Richter i Klink (133) trzy frakcje enzymów przenoszących.

Rola poszczególnych transferaz nie jest dokładnie poznana, jednak wiele danych doświadczalnych wskazuje na funkcje pełnione przez niektóre z nich.

II. Synteza wiązania peptydowego

1. Wiązanie aminoacylo-tRNA z rybosomami

Synteza wiązania peptydowego jest procesem złożonym i obejmuje szereg reakcji. Pierwszą z nich jest związanie aminoacylo-tRNA z rybosomami. Polega ono na specyficznym tworzeniu się par kodon-antykodon jak i na tworzeniu wiązań niespecyficznych.

Proces translacji kodu genetycznego jest zapoczątkowany przez utworzenie komplementarnego połączenia pomiędzy trójką zasad (kodonem) informacyjnego RNA (mRNA) związanego z podjednostką 30S rybosomu, a odpowiednim trypletem (antykodonem) aminoacylo-tRNA. Zastosowanie przez Khoranę i wsp. (80, 146, 147) syntetycznych oligo- i poli-rybonukleotydów o znanym składzie i sekwencji zasad pozwoliło na prawie jednoznaczne określenie poszczególnych trypletów kodujących aminokwasy. Tryplety oznaczone techniką sączkową Nirenberga i Lederera (115) oraz Khorany i wsp. (146, 147) zestawiono w tablicy 1. Te niezależnie prowadzone badania wykazały prawie całkowitą zgodność wyników.

Tablica 1

Skład trójek kodujących i odpowiadające im aminokwasy

	Pierwsza litera	Druga litera					Trzecia litera
		U	C	A	G		
U	Fen	UUU	UCU	UAU	UGU	Cys	U
		UUC		UCC			UAC
	Leu	UUA	UCA	UAA*	UGA*	Try	A
		UUG		UCG			UAG*
C	Leu	CUU	CCU	CAU	CGU	Arg	U
		CUC		CCC			CAC
	GluNH ₂	CUA	CCA	CAA	CGA	Arg	A
		CUG		CCG			CAG
A	Ileu	AUU	ACU	AAU	AGU	Ser	U
		AUC		ACC			AAC
	Met	AUA	ACA	AAA	AGA	Arg	A
		AUG		ACG			AAG
G	Val	GUU	GCU	GAU	GGU	Gli	U
		GUC		GCC			GAC
	Glu	GUA	GCA	GAA	GGA	Gli	A
		GUG		GCG			GAG

* -- Kodony nonsensowne, nie kodujące żadnego aminokwasu.

Reguła komplementacji zasad (116, 146, 148) dotyczy jedynie dwóch pierwszych zasad kodonu. Według Cricka (31) możliwość rozpoznawania różniących się trzecią zasadą kodonów przez ten sam antykodon związana jest z tworzeniem się „nieklasycznych” par zasad. Na przykład guanina tworząca „klasyczną” parę z cytozyną może tworzyć nieklasyczne połączenie z uracyłem. Podobnie występująca w antykodonach kilku akceptorowych tRNA hipoksantyna tworzy pary z uracyłem, cytozyną i adeniną (tablica 2). Obserwuje się zwykle trójki typu: XYU i XYC, oraz XYA i XYG, gdzie X i Y oznaczają dowolne zasady purynowe i pirymidynowe. Dla niektórych aminokwasów istnieją cztery tryplety synonimowe różniące się zasadą w pozycji 3 trójki kodującej (tablica 2). Z badań Holley'a i wsp. (69) nad oczyszczonym tRNA — akceptorem alaniny wynika, że jego antykodon o składzie IGC rozpoznaje kodony: GCU, GCC, GCA. Jeśli w tryplecie kodującym zmieniona będzie pierwsza zasada, kodon ten rozpoznawany będzie przez inny tRNA niż w przypadku zmiany zasady w trzeciej pozycji (148). Tłumaczyć to może zjawisko niejednoznaczności kodu genetycznego, a jednocześnie wyjaśniać fakt występowania w komórce kilku tRNA jako akceptorów danego aminokwasu.

Tablica 2

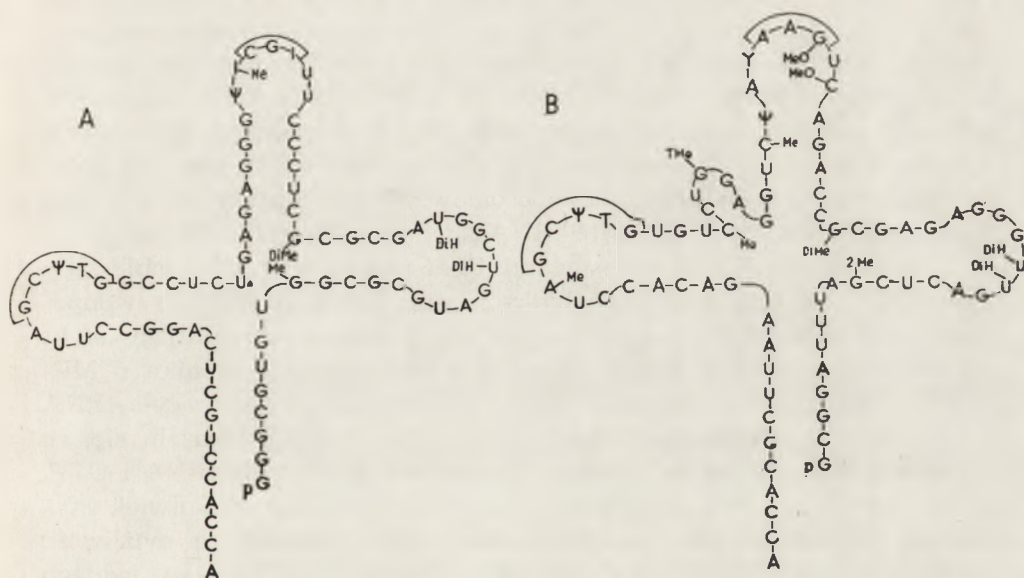
Tworzenie par pomiędzy zasadami kodonu i antykodonu (31) zgodnie z hipotezą tolerancji Cricka (*wobble hypothesis*)

Zasady antykodonu	Zasady w 3 pozycji kodonu
U	A G
C	G
A	U
G	U C
I	U C A

Wiązania wodorowe pomiędzy kodonem i antykodonem nie zapewniają trwałości kompleksu rybosomy-mRNA-aminoacylo-tRNA. Przenoszący kwas rybonukleinowy wiąże się dodatkowo z rybosomami w sposób niezależny od mRNA i aminokwasu, niezbędna jest jednak obecność końcowej trójki nukleotydów — CCA (15, 55). Sugeruje się również, że pentanukleotyd CTΨCG występujący we wszystkich badanych dotąd sRNA może uczestniczyć w wiązaniu ich z rybosomami (142, 183).

Wiązanie aminoacylo-tRNA z rybosomami, zarówno specyficzne jak

i niespecyficzne, zależy od pierwszo- i drugorzędowej struktury tRNA. Modyfikacja aminokwasu uprzednio przyłączonego do sRNA nie wpływa na proces wiązania tego kompleksu. Na przykład alanina związana z tRNA — akceptorem cysteiny (20), DOPA-tRNA powstały w wyniku utlenienia tyr-tRNA, czy wreszcie mieszane hybrydy szczawiooctan^{ASP}, otrzymane przez transaminację kwasu asparaginowego związanego z odpowiednim tRNA (160), były przyłączane do rybosomów, a także wbudowywane w białko (20). W pracowni Holley'a (69) wyodrębniono składający się z 77 nukleotydów tRNA — akceptor alaniny i oznaczono jego sekwencję. Skład nukleotydowy i hipotetyczne modele dwóch tRNA — akceptorów alaniny i fenyloalaniny — przedstawia rysunek 1. Przypuszcza się, że antykodony w różnych tRNA zlokalizowane są w pętlach utworzonych przez zagięcie łańcucha polinukleotydowego. W dalszym ciągu nie są znane centra warunkujące reakcje tRNA z syntetazami i czynnikami przenoszącymi aminoacylo-tRNA. Prawdopodobnie różnią się one składem od antykodonu.



Rys. 1. Model tRNA A) akceptora alaniny (69), B) akceptora fenyloalaniny (129); w pętlach zaznaczono prawdopodobne antykodony

Poznanie struktury rybosomu, a w szczególności sposobu upakowania kwasów nukleinowych i białek może ułatwić wyjaśnienie mechanizmu wiązania aminoacylo-tRNA. Wydaje się, że w procesie tym uczestniczą również białka rybosomów, bowiem rybosomy traktowane enzymami proteolitycznymi wykazują mniejszą zdolność wiązania zarówno aminoacylo-tRNA jak i poliU (78, 109). Ilość przyłączonego aminoacylo-tRNA wskazuje na obecność dwóch miejsc wiążących na rybosomie (63, 172).

Kaji i wsp. (79, 157) wykazali, że w preparatach zdysocjowanych rybosomów (niskie stężenie jonów Mg^{2+}) tylko jedna cząsteczka aminoacylo-tRNA, bądź tRNA wiąże się z podjednostką 30S rybosomu, zaś wolna podjednostka 50S nie jest zdolna do wiązania aminoacylo-tRNA. Przy wyższych stężeniach Mg^{2+} , po asocjacji podjednostek 30 i 50S na rybosom 70S przyłącza się druga cząsteczka aminoacylo-tRNA. Drugie miejsce wiążące byłoby zatem dostępne, czy też odtwarzałoby się dopiero w wyniku asocjacji podjednostek rybosomowych.

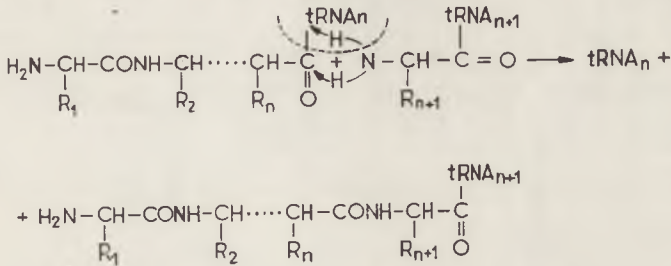
Wettstein i Noll (180) sugerują obecność trzeciego miejsca, wiążącego przejściowo deacylowany tRNA, powstający w wyniku syntezy wiązania peptydowego.

Do niedawna przeważała opinia, że proces przyłączania aminoacylo-tRNA do rybosomów jest reakcją nieenzymatyczną (15, 28, 151). Wiązanie może bowiem zachodzić w niskiej temperaturze, jak również w obecności oczyszczonych rybosomów, nie zawierających enzymów supernatantu komórkowego (28, 151, 156). Nowsze dane wskazują na udział jednego z enzymów przenoszących w reakcji wiązania aminoacylo-tRNA z rybosomami. Funkcję enzymu wiążącego (ang. *binding enzyme*) spełniają w obecności GTP transferaza TF-1 retikulocytów, jak również transferaza I z wątroby szczura (72). W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że preparat enzymu tworzy kompleks z aminoacylo-tRNA, a nie z wolnym sRNA (71); deacylowany tRNA nie działa hamująco na przyłączenie aminoacylo-tRNA do rybosomów. Wskazywałoby to (71, 72), że kompleks enzym-aminoacylo-tRNA spełnia istotną funkcję w interakcji aminoacylo-tRNA z rybosomami. Choć proces ten jest stymulowany przez GTP nie zaobserwowano hydrolizy tego związku (72). Prawdopodobnie działanie GTP jest niespecyficzne, ponieważ stymulujący efekt wywiera również jego analog 5'-guanylo-metylenodwufosfonian (GMP-PCP). Na udział transferazy *E.coli* i GTP w wiązaniu aminoacylo-tRNA z rybosomami wskazuje szereg badań (3, 58, 59, 130). Okazało się, że czynnik T (lub T_0) z *E.coli* tworzy kompleks z aminoacylo-tRNA i GTP, które również w tym przypadku nie ulega hydrolizie jakkolwiek stymuluje reakcję wiązania z rybosomami. Należy dodać, że możliwość nieenzymatycznego (72) przyłączania aminoacylo-tRNA do jednego z miejsc wiążących na rybosomie brana jest w dalszym ciągu pod uwagę (142).

2. Procesy polimeryzacji

Synteza polipeptydu jest ciągiem naprzemian po sobie następujących reakcji przyłączania aminoacylo-tRNA i tworzenia kolejnych wiązań peptydowych. Nukleofilowa grupa $-NH_2$ aminoacylo-tRNA reaguje z grupą estrową peptydylo-tRNA (rysunek 2), w wyniku czego tworzy się nowe wiązanie peptydowe i odszczepia się tRNA przyłączony uprzednio do

reszty peptydowej. Nowopowstały peptyd związany jest zawsze z cząsteczką tRNA (55), a poprzez tRNA z rybosomem. Zabezpiecza to trwałość kompleksu mRNA-rybosom-peptydylo-tRNA. Translacja informacyjnego RNA rozpoczyna się od 5' skrajnego nukleotydu i biegnie w kierunku 3' (136, 164). Syntetyzowany polipeptyd narasta stopniowo od strony N-końcowego aminokwasu (9, 37, 136).



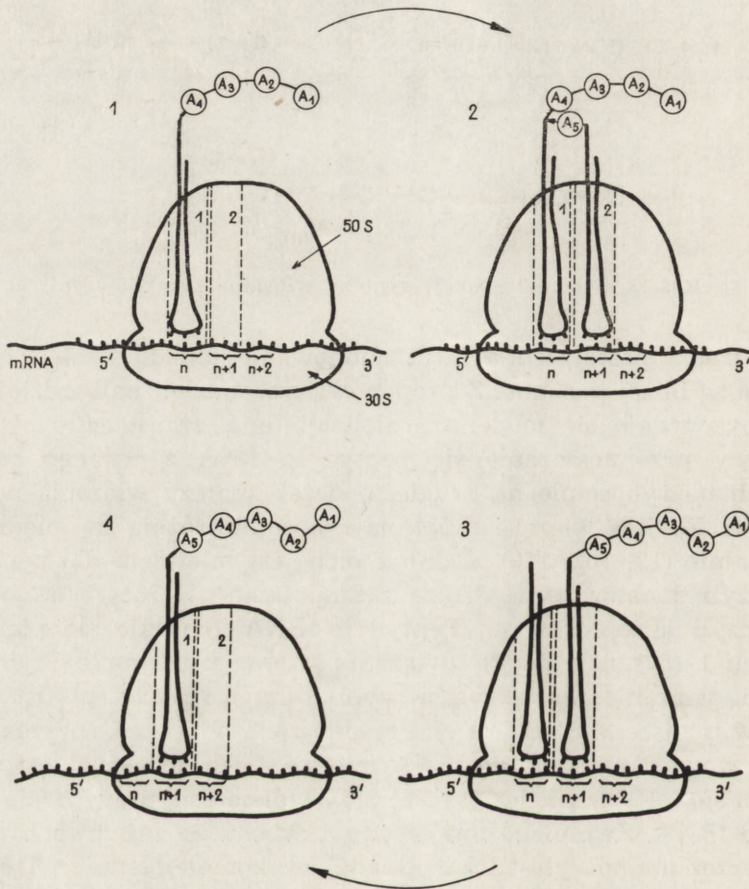
Rys. 2. Schemat reakcji syntezy wiązania peptydowego

Organizacja przestrzenna i funkcjonowanie układu syntetyzującego białko nie są bliżej poznane. Z proponowanych modeli najbardziej prawdopodobny wydaje się model translokacji (ang. *translocational model*) zakładający przemieszczanie się peptydylo-tRNA z jednego z miejsc wiążących na rybosomie na drugie, podczas syntezy wiązania peptydowego (174). Miejsca wiążące tRNA na rybosomie różnią się między sobą funkcjonalnie (12, 102, 119). Jedno z nich jest miejscem dla peptydylo-tRNA czyli donatorowym, drugie zaś miejscem wiążącym aminoacylo-tRNA, czyli akceptorowym. Peptydylo-tRNA znajduje się pierwotnie w miejscu 1 (rysunek 3). Po związaniu w miejscu 2 aminoacylo-tRNA tworzy się wiązanie peptydowe, w wyniku czego reszta peptydowa przenosi się w miejsce 2. Stąd jest ona przenoszona w reakcji enzymatycznej do właściwego dla peptydylo-tRNA miejsca 1, co związane jest z przesunięciem się mRNA o jeden tryplet przy jednoczesnym wyparciu deacylowanego tRNA. Zwolnione miejsce 2 na rybosomie zajmowane jest następnie przez aminoacylo-tRNA posiadający komplementarną trójkę zasad w stosunku do nowego kodonu i proces syntezy wiązania peptydowego powtarza się. W procesie tym uczestniczyłyby zatem conajmniej dwa enzymy: jeden powodujący przemieszczanie peptydylo-tRNA, a jednocześnie przesuwanie się mRNA i drugi syntetyzujący wiązanie peptydowe.

Translokaza tRNA. Dla enzymu przemieszczającego peptydylo-tRNA z jednego na drugie miejsce wiążące zaproponowano nazwę translokazy tRNA (102, 166). Enzym ten nie jest bliżej scharakteryzowany i wiadomości o jego funkcji mają charakter fragmentaryczny i w dużej mierze spekulatywny.

Według Schweeta i Heintza (142) transferaza retikulocytów

TF-1, enzym wiążący aminoacylo-tRNA, bierze udział również w reakcji translokacji. W procesie przemieszczania tRNA na rybosomach u *E.coli* bierze prawdopodobnie udział czynnik G (118). Enzym ten ma własności GTP-azy, której aktywność zależy od rybosomów. W obecności oczyszczonych rybosomów i czynnika T zależność pomiędzy ilością rozłożonego GTP a ilością powstałych wiązań peptydowych jest stechiometryczna



Rys. 3. Czteroetapowy model translokacji

(19, 29). Nishizuka i Lipmann (118) próbują porównać funkcję GTP-azy zależnej od rybosomów do funkcji ATP-azy mięśniowej. Skurcz rybosomu umożliwiałby usunięcie deacylowanego tRNA i przemieszczenie się peptydylo-tRNA pociągające za sobą przesunięcie rybosomu o jeden tryplet kodujący. Na związek GTP z funkcją translokazy wskazują również badania Seedsa i Conway'a (144), z których wynika, że GTP usuwa deacylowany sRNA umożliwiając tym samym wędrówkę rybosomu wzdłuż nici mRNA. Można przypuszczać, że translokaza u *E.coli*

jest kompleksem enzymów zawierającym rozpuszczalny składnik G i składnik nierozpuszczalny, związany strukturalnie lub przejściowo z rybosomami. Nie jest wykluczone, że czynnik T uczestniczy również w reakcji translokacji (102). Pewne dane wskazują, że funkcję translokazy spełnia transferaza II wątroby szczura (101).

Dotychczasowe badania, chociaż nie wyjaśniły mechanizmu działania translokazy tRNA, wskazały jednak na funkcję GTP. Dawniejsze sugestie jakoby GTP dostarczał energii do syntezy wiązania peptydowego wydają się mało prawdopodobne. ΔF dla reakcji hydrolizy peptydylo-tRNA wynosi bowiem -7 kcal, jest to ilość wystarczająca dla utworzenia wiązania peptydowego (74).

Transferaza peptydylowa. Wiązanie peptydowe syntetyzowane jest w obecności enzymu, dla którego proponowano różne nazwy jak: syntetaza peptydowa (7), polimeraza aminokwasowa i transferaza peptydylowa (102). Ta ostatnia nazwa jest najbardziej zgodna z zasadami nomenklatury enzymów, jeśli weźmie się pod uwagę, że w czasie syntezy tego wiązania następuje przeniesienie reszty peptydylowej z peptydylo-tRNA na aminoacylo-tRNA.

Monro i wsp. (102) wysuwają przypuszczenie, że wiązania peptydowe są syntetyzowane przez enzym związany ze strukturą rybosomu a nie enzym supernatantu komórkowego, na co wskazują obserwacje nad wpływem puromycyny na syntezę białek. Puromycyna na rybosomie prawdopodobnie zajmuje miejsce akceptorowe i jako analog strukturalny aminoacylo-tRNA wchodzi w reakcję z peptydylo-tRNA. Deacylowany tRNA uwalnia się, a utworzone połączenie peptydylo-puromycyna odłącza się od rybosomu. Tworzenie się wiązania peptydowego pomiędzy grupą aminową puromycyny a grupą estrową peptydylo-tRNA jest reakcją enzymatyczną. Warunkiem niezbędnym dla przebiegu reakcji jest obecność rybosomów. Monro i wsp. (102) stwierdzili, że wielokrotne oczyszczanie rybosomów *E.coli* nie zmniejsza szybkości reakcji puromycyny z resztą peptydową co sugeruje, że enzym związany jest ze strukturą rybosomu. Na szybkość reakcji w minimalnym stopniu wpływa podjednostka 30S rybosomu, co nasuwa przypuszczenie, że enzym zintegrowany jest z podjednostką 50S. Niewrażliwość na inhibitory grup -SH, brak hamującego wpływu GMP-PCP i inne dane wskazywałyby, że enzym ten jest różny od rozpuszczalnych czynników T i G z *E.coli*. Potwierdzają to wyniki badań Rychlika (135), który stwierdził, że odszczepienie polilizylo-puromycyny z kompleksu poliA-rybosomy-polilizyna zachodzi w nieobecności supernatantu komórkowego, zatem może być katalizowane przez enzym strukturalny rybosomu.

Na podstawie przytoczonych danych zarysowuje się podział uczestniczących w syntezie białka enzymów na rozpuszczalne i mocno związane ze strukturą rybosomu. Jest rzeczą charakterystyczną że enzymy rozpuszczalne, a zwłaszcza czynnik G i T_u oraz transferaza II wątroby

szczurzej, *in vitro* łatwo łączą się z rybosomami. W przypadku transferazy II wykazano powstawanie kompleksu rybosomy-transferaza II-GTP (145, 155, 156). Utworzenie takiego kompleksu podczas preinkubacji enzymu z rybosomami znacznie zwiększa początkową szybkość syntezy polipeptydu. Podobne wyniki otrzymał Mosteller i wsp. (107).

Nowe światło na zagadnienie rozmieszczenia enzymów w rybosomach rzucają badania Malkina i Richa (95). Trawienie związanego z rybosomami polipeptydu wykazało obecność fragmentu złożonego z 30—35 aminokwasów, opornego na enzymy proteolityczne: trypsynę, chymotrypsynę, pronazę i papainę. Fragment ten jak sugerują autorzy stanowi część syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego. Przypuszcza się, że oporny fragment jest ochroniany przez rybosom, znajdując się pod jego powierzchnią. Reakcje związane z syntezą polipeptydu odbywałyby się zatem wewnątrz rybosomu, a nie na jego powierzchni. Tworzenie się kompleksów transferaz z rybosomami mogłoby być związane z penetracją rozpuszczalnych frakcji enzymatycznych do wnętrza rybosomu, czemu sprzyja jego uwodniona struktura.

III. Synteza polipeptydów w układach heterologicznych

Heterologiczny układ syntetyzujący białko zawiera rybosomy i supernatant pochodzące z dwóch różnych źródeł. Obie te komponenty (rybosomy i supernatant) można wymieniać w różnych systemach bakteryjnych (38, 62, 93, 124), jak również pomiędzy tkankami różnych zwierząt (25, 113, 131, 149), roślin i drożdży (124). Nieaktywnym układem jest mieszanina supernatantu bakteryjnego z rybosomami organizmów wyższych i *vice versa* (14, 62, 113, 123, 131), co tłumaczy się swoistością gatunkową enzymów supernatantu komórkowego. Badania przy użyciu oczyszczonych transferaz z *E.coli* i wątroby szczurzej sugerują, że oba enzymy wykazują swoistość gatunkową (52).

Z dotychczasowych obserwacji wynika, że zjawisko swoistości ograniczone jest jedynie do tych układów heterologicznych, w których obie komponenty pochodzą z komórek zawierających rybosomy o różnych stałych sedymentacji (bakterie — 70S i organizmy wyższe — 80S) (124). Przyjęcie modelu rybosomu jako złożonego kompleksu rozpuszczalnych i strukturalnych, dopełniających się wzajemnie elementów, mogłoby tłumaczyć zjawisko swoistości. W heterologicznym układzie: wątroba i *E.coli* — odpowiadające sobie enzymy przenoszące różniły się znacznie masami cząsteczkowymi (50), co może wykluczać ich komplementarność z obcymi rybosomami. Niewątpliwie w grę wchodzić mogą również różnice w konformacji poszczególnych enzymów, bądź też pewne właściwości samych rybosomów. Badania nad swoistością strukturalnych białek

obu podjednostek rybosomów mogą przyczynić się do bliższej charakterystyki zjawiska specyficzności enzymów rozpuszczalnych (36, 70, 91).

Należy podkreślić minimalną swoistość aminoacylo-tRNA (czy też jej całkowity brak) w omawianej reakcji (51, 161).

IV. Zastosowanie antybiotyków w badaniach nad mechanizmem biosyntezy białka

Liczne antybiotyki hamują syntezę białka. Miejscem ich działania jest etap przeniesienia aminokwasu z aminoacylo-tRNA do białka, jakkolwiek mechanizm działania poszczególnych związków jest różny. Ta właśnie odmienność działania antybiotyków umożliwia bliższą charakterystykę niektórych reakcji zachodzących w końcowej fazie procesów biosyntezy.

1. Hamowanie wiązania aminoacylo-tRNA z rybosomami

Antybiotyki z grupy tetracyklin hamują proces przyłączania aminoacylo-tRNA do kompleksu mRNA-rybosomy (22, 66, 153) co można tłumaczyć ich konkurencją z aminoacylo-tRNA o miejsce na rybosomie (99). Według Suareza i Nathansa (153) stopień zahamowania nigdy nie przekracza 50%, mogłoby to wskazywać, że tylko jedno miejsce wiążące rybosomu jest blokowane. Tetracykliny wiążą się zarówno z podjednostką 30S jak i 50S (34). Również antybiotyk edeina hamuje tę reakcję (67, 86), jakkolwiek w nieco odmienny sposób.

2. Hamowanie syntezy wiązania peptydowego

Wiele antybiotyków, a wśród nich puromycyna, gugerotyna, chloramfenikol i aktydion, hamuje proces syntezy wiązania peptydowego.

Puromycyna i gugerotyna. Oba antybiotyki wykazują podobieństwo strukturalne do aminoacylo-tRNA. W przeciwieństwie jednak do puromycyny gugerotyna nie uwalnia polipeptydów z rybosomów, a nawet hamuje działanie puromycyny (18, 22). Gugerotyna działa prawdopodobnie na reakcję syntezy wiązania peptydowego (18, 22). Mechanizm działania puromycyny omówiono poprzednio.

Chloramfenikol. Mechanizm działania chloramfenikolu na syntezę białek mimo wielu badań nie został ostatecznie poznany. Ponieważ chloramfenikol hamuje uwalnianie peptydów przez puromycynę (166) miejscem jego działania jest prawdopodobnie reakcja syntezy wiązania peptydowego, a nie przyłączanie mRNA jak sugerowano wcześniej (22, 73, 178). Julian (76) oraz Weber i De Moss (175) stwierdzili, że w obecności chloramfenikolu syntetyzowane są jedynie krótkie peptydy.

Chloramfenikol wiąże się z podjednostką 50S bakteryjnych rybosomów. Coutsogeorgopoulos (30) postuluje, że ze względu na podobieństwo strukturalne chloramfenikolu do antybiotyków nukleozydowych (gugerotyna) może on konkurować jako analog strukturalny aminoacylo-tRNA o miejsce wiążące na rybosomie. Przypuszcza się, że chloramfenikol blokuje miejsce peptydowe (104), a także hamuje reakcję katalizowaną przez transferazę peptydylową (32). Stopień zahamowania syntezy białka zależy od rodzaju polinukleotydu użytego jako mRNA (85). Może to być związane z dostępnością, lub zmianą w ukształtowaniu miejsca wiążącego na rybosomie, zależnie od dodanego polinukleotydu.

W materiale zwierzęcym chloramfenikol nie hamuje syntezy białka w stężeniach, które hamują syntezę u bakterii. Jest rzeczą interesującą, że procesy związane z syntezą immunoglobulin są wrażliwe na ten antybiotyk (179).

Aktydion. Antybiotyk ten i inne związki należące do grupy antybiotyków glutarimidowych hamują syntezę białek w tkankach zwierzęcych i drożdżach, nie działają natomiast na bakterie. Działanie aktydionu przypomina pod pewnymi względami działanie chloramfenikolu: syntetyzowane są jedynie krótkie peptydy, a uwalnianie peptydów z rybosomów przez puromocynę jest hamowane (40, 181). Działanie aktydionu od innych antybiotyków wyróżnia jego zdolność do zapobiegania odszczepianiu się rybosomów z polirybosomalnego kompleksu (22, 56, 181). Fakt ten może ułatwić zrozumienie mechanizmu powstawania i rozpadu polirybosomów. Mechanizm działania aktydionu nie jest całkowicie wyjaśniony, nie rozstrzygnięto między innymi czy miejscem działania tego antybiotyku są rybosomy, czy też enzymy supernatantu komórkowego (40).

3. Antybiotyki zmieniające własności kodujące kompleksu mRNA-rybosomy

Streptomycyna, neomycyna i inne antybiotyki aminonukleozydowe powodują błędne odczytanie mRNA. Streptomycyna wiąże się z podjednostką 30S rybosomu wywołując ze względu na swój polikationowy charakter pewne zmiany konformacyjne rybosomu, zmieniające wzajemne interakcje rybosomów, mRNA i aminoacylo-tRNA. Wynikiem tego jest błędne rozpoznanie i odczytanie kodonów (35, 60, 141) i synteza polipeptydu o zmienionym składzie i sekwencji aminokwasów. Błędy w odczytywaniu kodu wywołane przez streptomocynę można rozpoznać badając proces wiązania aminoacylo-tRNA przez rybosomy w obecności różnych polirybonukleotydów. Pestka, Marshall i Nirenberg (127) zaobserwowali, że w obecności poli U streptomycyna stymuluje wiązanie izoleucylo-tRNA przez układ poli U-rybosomy. Efekt jej działania zależy od długości łańcucha polinukleotydowego, stężenia jonów magnezu oraz od rodzaju preparatu rybosomów. Pestka (128)

stwierdził bowiem, że wpływ streptomycyny na wiązanie pewnych aminoacylo-tRNA przez matrycę poliU-reasocjowane rybosomy, jest zupełnie inny niż w przypadku rybosomów nie poddawanych dysocjacji i reasocjacji. Kaji i Kaji (77), oraz Knippenberg i wsp. (83) wykazali, że streptomycyna może hamować lub stymulować wiązanie i inkorporację poszczególnych aminoacylo-tRNA i aminokwasów w układach kierowanych przez poliU lub wirusowy RNA (84), w zależności od stężeń poszczególnych składników mieszaniny inkubacyjnej. Nie stwierdzono, aby streptomycyna hamowała łączenie się poliU, czy innego polirybonukleotydu z rybosomami. Bliższa charakterystyka działania streptomycyny i neomycyny wymaga poznania struktury rybosomów.

V. Zapoczątkowanie i zakończenie syntezy łańcucha polipeptydowego

Rozpoczęcie syntezy polipeptydu związane jest z utworzeniem połączenia informacyjnego RNA z rybosomami. Z doświadczeń *in vitro* wiadomo, że proces ten zależy od odpowiedniego i raczej wysokiego stężenia jonów magnezu i własności użytego polinukleotydu (162). Polirybonukleotydy o wyraźnej strukturze drugorzędowej wiążą się z rybosomami trudniej niż polinukleotydy jednoniciowe. Prawdopodobnie mRNA wiązany jest z RNA podjednostki 30S rybosomu poprzez mostki magnezowe łączące ujemnie naładowane grupy fosforanowe obu kwasów (44). Rola białka rybosomu w utrzymaniu odpowiedniej konformacji rRNA jest niewątpliwa (33). Bliżej nie wyjaśniony wpływ na proces wiązania naturalnego mRNA *in vitro* wywiera sRNA (126).

Doświadczenia Nomury i wsp. (120, 121) i innych autorów (39, 75, 96, 97, 143) wskazują na istotną rolę podjednostki 30S w tworzeniu kompleksu 30S mRNA, do którego następnie przyłącza się inicjujący syntezę polipeptydu czynnik — *N*-formylometionylo-tRNA i podjednostka 50S. Dane te poparte są obserwacjami, że *in vivo* w komórce *E.coli* nie występują wolne rybosomy, ale ich podjednostki lub polirybosomy (143). Przypuszcza się, że z chwilą ukończenia syntezy łańcucha polipeptydowego polirybosomy rozpadają się na podjednostki zdolne do ponownego łączenia się z mRNA i tworzenia polirybosomów (96, 120). W syntetyzującej komórce zachodziłoby nieprzerwane krążenie podjednostek rybosomowych pomiędzy pulą wolnych podjednostek a polirybosomami.

Na podstawie wielu obserwacji nad wiązaniem *in vitro* naturalnych mRNA z rybosomami sądzi się, że w procesie tym bierze udział bliżej nieokreślony czynnik białkowy (38, 108, 132). Nie wiadomo czy tworzenie kompleksu podjednostka 30S-mRNA jest również reakcją enzymatyczną. Bez względu na mechanizm tworzenia się takiego kompleksu wydaje się,

że przyłączanie podjednostki 30S rybosomu do naturalnego mRNA musi być na tyle specyficzne, żeby zagwarantować rozpoznanie kodonu startowego, wyznaczającego miejsce dla pierwszego aminokwasu w łańcuchu białkowym.

1. N-formylometionylo-tRNA i jego funkcja. Kodony startowe

Podstawą poszukiwań kodonu startowego i badań nad mechanizmem zapoczątkowywania procesu translacji były doniesienia Wallera (170) wskazujące na metioninę jako główny N-końcowy aminokwas w białkach *E.coli*. Marckerowi i Sangerowi (98) udało się wyodrębnić kompleks N-formylometionylo-tRNA, który w doświadczeniach *in vitro* (23, 176) przenosił N-formylmetioninę do białka jako aminokwas N-końcowy. Rolę N-formylometionylo-tRNA jako „inicjatora” syntezy polipeptydów u drobnoustrojów wkrótce potwierdziły badania nad syntezą kierowaną naturalnymi (1, 16, 23, 84, 176), oraz wieloma syntetycznymi polirybonukleotydami (24, 54, 89, 110, 137, 152, 154). We wszystkich przypadkach końcowym aminokwasem była N-formylmetionina.

Z *E.coli* wyizolowano dwa różne tRNA — akceptory metioniny (23): tRNA_F tworzący kompleks metionylo-tRNA_F, w którym metionina ulega formylacji w obecności kwasu N¹⁰-tetrahydrofoliowego i odpowiedniej, wyizolowanej ostatnio, transformylazy (36) oraz tRNA_M tworzący kompleks z metioniną, nie ulegający formylowaniu. Transformylaza metionylo-tRNA_F rozpoznaje jedynie komponentę nukleinową kompleksu, a nie aminokwas (169). Specyficzność tRNA_F uwidocznia się również w reakcji jego przyłączenia do odpowiedniego kodonu mRNA, uzależnionej tylko w minimalnym stopniu od aminokwasu. Kodonem startowym, od którego rozpoczyna się proces translacji kodu jest tryplet AUG(24, 154), może nim być również GUG i GUA (54). Te bowiem kodony wykazują zdolność do wiązania N-formylometionylo-tRNA_F a także metionylo-tRNA_F.

Kodon startowy znajduje się na końcu lub w pobliżu końcowego 5' nukleotydu RNA informacyjnego. Sundarajan i Thach (154) stwierdzili, że syntetyczny pentanukleotyd ApApApUpG stymuluje przyłączanie metionylo-tRNA_F, a nie lizylo-tRNA mimo, że pierwsza trójka AAA koduje lizynę. Natomiast pentanukleotyd ApApApCpG, nie zawierający kodonu startowego, wiąże lizylo-tRNA. Sugeruje to, że poza funkcją wiążącą, kodon AUG spełnia również rolę selektora fazy w procesie translacji kodu genetycznego (89, 154). W wielocistronowych mRNA kodon startowy może stać na początku poszczególnych cistronów. Umożliwia to przyłączanie rybosomów w miejscach startowych i jednoczesną syntezę wielu białek zaprogramowanych przez wielocistronowy informacyjny kwas rybonukleinowy (182). Zakłada się jednocześnie, że kodon startowy nowego cistronu powinien być poprzedzony przez tryplet non-

sensowny, nie wiążący żadnego aminoacylo-tRNA. Tylko w takich warunkach bowiem AUG może być odczytywany w pozycji wewnętrznej przez inicjator *N*-formylometionylo-tRNA_F (47). AUG nie poprzedzony trypletem nonsensownym i znajdujący się wewnątrz łańcucha polinukleotydowego, odczytywany jest przez metionylo-tRNA_M.

Reakcja zapoczątkowująca proces translacji jest stymulowana przez dwa czynniki enzymatyczne f_1 i f_2 wyodrębnione w pracowni Ochoa (137, 152) z rybosomów *E.coli*. Obie frakcje enzymatyczne różnią się od dotychczas wyizolowanych enzymów biorących udział w syntezie białek, a ich funkcja nie jest związana z formylacją metioniny. Przyspieszają one znacznie proces wiązania inicjatora z kodonem AUG, szczególnie wyraźnie przy niskich stężeniach jonów magnezu (poniżej 10 mM) (94, 138). Należy podkreślić, że f_1 i f_2 nie wpływają na wiązanie metionylo-tRNA_M ani innego aminoacylo-tRNA (137). Przy niskich stężeniach Mg^{2+} obok czynników enzymatycznych stymulujący wpływ na wiązanie *N*-formylometionylo-tRNA wywiera również GTP (4, 5, 90, 122). GMP-PCP może zastępować GTP w tej reakcji, co dowodzi, że stymulującemu działaniu nie towarzyszy hydroliza do GDP i ortofosforanu, a funkcja GTP w wiązaniu inicjatora nie jest skojarzona z jego późniejszą hydrolizą (5).

Wpływ stężenia jonów magnezowych i rodzaj użytego mRNA na procesy translacji warto bliżej omówić. Kolakofsky i Nakamoto (84) wykazali, że w obecności dużych stężeń Mg^{2+} (powyżej 20 mM) i użytych jako mRNA syntetycznych polinukleotydów aminoacylo-tRNA może zapoczątkować syntezę polipeptydu. Natomiast przy niskich stężeniach jonów magnezu i w podwyższonej temperaturze synteza polipeptydu zależna jest od obecności *N*-formylometionylo-tRNA lub peptydylo-tRNA. W obecności naturalnych mRNA bez względu na stężenie Mg^{2+} potrzebny jest zawsze inicjator.

N-formylometionylo-tRNA_F a także *N*-acetylometionylo-tRNA_F wiążą się prawdopodobnie w miejscu peptydowym rybosomu, bowiem po dodaniu do układu puromycyny powstają odpowiednie dwupeptydy (12, 184).

In vivo *N*-formylometionylo-tRNA_F jest jedynym dotychczas wykrytym czynnikiem inicjującym u bakterii. Formylacja metioniny upodobnia powstały kompleks do peptydylo-tRNA. Umieszczenie go w miejscu peptydowym rybosomu i zajęcie miejsca aminokwasowego przez odpowiedni aminoacylo-tRNA prowadzi do utworzenia pierwszego wiązania peptydowego.

Rola reakcji formylacji metionylo-tRNA_F sprowadza się prawdopodobnie do usunięcia dodatniego ładunku grupy NH_3^+ aminokwasu. Wykazano bowiem, że inne pochodne aminokwasowe na przykład *N*-acetylo-fenyloalanylo-tRNA mogą *in vitro* pełnić również funkcję inicjatora syntezy polifenylalaniny w obecności jonów magnezu w niskich stęże-

niach (94). Podobną rolę spełnia peptydylo-tRNA (84). Metionylo-tRNA_M umieszcza się prawdopodobnie w miejscu aminokwasowym rybosomu, gdyż nie jest wrażliwy na puromycynę (12).

Wielokrotnie wykazano, że do syntezy pierwszego wiązania peptydowego niezbędne są GTP i enzymy supernatantu (65, 94, 165). W oparciu o hipotezę Monro (102) i model translokacji Zamir, Leder i Elson (184), oraz Monro (103) przypuszczają, że rola GTP w tej reakcji związana jest z enzymatycznym przeniesieniem inicjatora do właściwego miejsca peptydowego na rybosomie. Podkreślają oni jednocześnie, że syntezę pierwszego wiązania peptydowego katalizuje transferaza peptydylowa rybosomów w nieobecności źródła energii i rozpuszczalnych enzymów. Sprawdzenie słuszności tej koncepcji wymaga dalszych badań.

In vivo powstałe białko nie zawiera *N*-formylometioniny. Poza białkami *E.coli* i niektórych innych bakterii również rzadko spotyka się metioninę w *N*-końcowej pozycji w białkach. Świadczy to, że reszta formylowa lub formylo-metionina są odszczepiane przez komórkowe peptydazy i aminohydrolazę formylometioniny (43), być może jeszcze przed odłączeniem polipeptydu od rybosomu (1). Należy podkreślić, że poza retikulum cytami (119) nie stwierdzono tworzenia się *N*-formylometionylo-tRNA w komórkach zwierzęcych.

2. Kodony nonsensowne. Zakończanie syntezy łańcucha białkowego

Podobnie jak inicjacja tak i zakończenie syntezy łańcucha polipeptydowego i jego uwalnianie z rybosomów zależy od składu i sekwencji pewnych trypletów mRNA, które nie mogą być odczytywane przez cząsteczki aminoacylo-tRNA. Są to tak zwane kodony „nonsensowne”. Na podstawie teoretycznych przesłanek można wnosić, że kodon nonsensowny powinien znajdować się przy 3' końcu jednocistronowego RNA, albo poprzedzać początek poszczególnych cistronów w wielocistronowym RNA.

Z doświadczeń nad syntezą polipeptydów kierowaną przez różne syntetyczne polirybonukleotydy wynika, że uwalnianie utworzonego polipeptydu związane jest z obecnością kodonów zawierających w swoim składzie adeninę i uracyl (88, 163). Takanaami i Yan (163) wykazali, że poliU i poliUC nie mają zdolności uwalniania zsyntetyzowanego w ich obecności polipeptydu, podczas gdy polimery zawierające w swojej cząsteczce A, U i I umożliwiają odszczepienie. Dalszych dowodów na funkcję nonsensownych kodonów dostarczyły badania Brennera i wsp. (10, 140) nad mutantami faga T₄. Wynikiem mutacji typu „amber” i „ochre” było utworzenie się kodonów nonsensownych wewnątrz łańcucha polinukleotydowego, co prowadziło do syntezy niekompletnych łańcuchów białkowych główki bakteriofaga. Translacja odpowiedniego ci-

stronu kończyła się w miejscu zmutowanym, zawierającym nonsensowny kodon.

Kodony nonsensowne mogą być odczytywane, jeśli zachodzi równoczesna mutacja supresorowa. Dotyczy ona w ogólności zmian prowadzących w końcowym efekcie do modyfikacji niektórych rodzajów tRNA. Zmodyfikowany prawdopodobnie w antykodonie tRNA zdolny jest do odczytywania nonsensownego trypletu i podstawienia w łańcuchu polipeptydowym aminokwasu w miejscu zmutowanym. W mutacji typu „amber” w wyniku supresji na miejsce glutaminy (CAG) czy tryptofanu (UGG) podstawiana jest seryna (kodon UCG). Analiza składu trypletów wykazała, że nonsensownym kodonem mutacji „amber” jest UAG (10, 177), a mutacji „ochre” — UAA (10, 46). Ostatnie badania (11) wskazują na tryplet UGA jako trzeci nonsensowny kodon. Poza mutantami bakteriofagów tryplety UAG i UAA występują u mutantów *E.coli* syntetyzujących niekompletną fosfatazę alkaliczną (46, 48, 177). Kodony nonsensowne *in vitro* również nie wiążą tRNA (115, 146, 165).

Niewiele jest danych na temat funkcjonowania tych trypletów w biosyntezie kompletnych białek *in vivo*. Przypuszcza się, że głównie UAA odpowiedzialny jest za zakończenie syntezy polipeptydu (88). Uwalnianie cząsteczki białkowej z rybosomu katalizowane jest prawdopodobnie przez enzym uwalniający (ang. *release factor*) (17).

VI. Uwagi końcowe

Dalszy rozwój badań nad biosynteza białek, a przede wszystkim wyjaśnienie mechanizmu działania i funkcji enzymów nie są możliwe bez dokładnego poznania struktury rybosomów. Badania koncentrują się dotychczas głównie na charakterystyce białek rybosomów, sposobie ich upakowania w rybosomie i funkcji w procesie syntezy białek cytoplazmatycznych. Ten kierunek badań uzasadniają liczne obserwacje wskazujące, że białko rybosomów uczestniczy bezpośrednio, lub wpływa pośrednio na wiele reakcji etapu translacji kodu genetycznego. Niektóre wyniki badań warte są krótkiego omówienia.

Białko rybosomu, stanowiące około 40% jego masy, wykazuje uderzającą heterogenność. Przez bezpośrednią ekstrakcję, a następnie rozdział elektrofoteryczny na żelu akryloamidowym, lub chromatografię na karboksylometylo-celulozie, rozdzielono je na 20—30 różnych frakcji (53, 92, 105, 106, 167, 171), przedstawiających, jak się wydaje, indywidualne białka (17). Cechą charakterystyczną białek rybosomów jest ich niewielka masa cząsteczkowa, wynosząca średnio 25 000 oraz własności zasadowe. Z rybosomów *E. coli* wyodrębniono (106) kwaśną komponentę, zwaną białkiem A, stanowiącą około 5% całkowitej ilości białka rybosomów. Nie wiadomo czy białko kwaśne występuje w rybosomach

innych bakterii, nie zawierają go rybosomy zwierzęce (92). Część białek zasadowych rybosomów bakterii różni się od analogicznych białek ssaków, co może sugerować odmienną funkcję i decydować o specyficzności białek strukturalnych rybosomu.

Specjalną technikę badań nad strukturą rybosomów i funkcją białek stosują Spirin i wsp. (91, 150) oraz Hosokawa i wsp. (70). W obecności dużych stężeń chlorku cezu od rybosomów odszczepia się znaczna część białek strukturalnych, z których następnie w odpowiednich warunkach można rekonstruować rybosomy. Rekonstruowane cząstki wykazują znaczną aktywność w reakcji wbudowywania aminokwasów pod warunkiem, że podjednostki 50S i 30S są zrekonstruowane z właściwych im białek.

Badania fizykochemiczne wykazują, że rRNA znajduje się na powierzchni rybosomu (44, 139). W tworzeniu kompleksu rRNA-białko (21) nie uczestniczą prawdopodobnie aminokwasy zasadowe białek rybosomu. Jak sugeruje F u r a n o i wsp. (44) białko „okrywałoby” jedynie zasady nukleotydów rRNA, których reszty cukrowe i fosforanowe znajdowałyby się na powierzchni rybosomu.

W ostatnich latach wykryto i częściowo scharakteryzowano nowy rodzaj związanego z rybosomami RNA o stałej sedymentacji 5S (13, 26, 45, 134). Różni się on składem nukleotydowym od tRNA (4S RNA) i nie ma własności akceptorowych dla aminokwasów. Jego masę cząsteczkową określono na około 51 000 (27). Występuje on zarówno w rybosomach drobnoustrojów jak i w rybosomach tkanek zwierzęcych (13, 45). Funkcja tego polinukleotydu jest przedmiotem wielu badań.

Przedstawione dane wskazują na nowy kierunek badań, istotny dla zrozumienia funkcji rybosomów jak i wielu reakcji sprzężonych z rybosomami, stwarzający niewątpliwie nowe perspektywy dla dalszych badań nad biosyntezą białka.

LITERATURA

1. Adams J. M., Capecchi M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 147 (1966).
2. Allende J. E., Monro R., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1211 (1964).
3. Allende J. E., Seeds N. W., Conway T. W., Weissbach H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1566 (1967).
4. Allende J. E., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 82 (1967).
5. Anderson J. S., Bretscher M. S., Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **215**, 490 (1967).
6. Arlinghaus R., Favelukes G., Schweet R. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 92 (1963).
7. Arlinghaus R., Shaeffer J., Schweet R. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1291 (1964).

8. Ayuso M. S., Heredia C. F., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 199 (1967).
9. Bishop J. O., Schweet R. S., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 235 (1961).
10. Brenner S., Stretton A. O. W., Kaplan S., *Nature* **206**, 994 (1965).
11. Brenner S., Barnett L., Katz E. R., Crick F. H. C., *Nature* **213**, 449 (1967).
12. Bretscher M. S., Marcker K. A., *Nature* **211**, 380 (1966).
13. Brown D. D., Litna E., *J. Mol. Biol.* **20**, 95 (1966).
14. Canning L., Griffin A. C., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 522 (1965).
15. Cannon M., Krug R., Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **7**, 360 (1963).
16. Capecchi M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1517 (1966).
17. Capecchi M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1144 (1967).
18. Casjans S. R., Morris A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 677 (1965).
19. Chan M., McCorquodale D. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 3116 (1965).
20. Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Roy W. J., Benzer S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1086 (1962).
21. Choi Y. S., Carr C. W., *J. Mol. Biol.* **25**, 331 (1967).
22. Clark J. M. Jr., Chang A. Y., *J. Biol. Chem.* **240**, 4734 (1965).
23. Clark B. F., Marcker K. A., *Nature* **211**, 378 (1966).
24. Clark B. F., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **17**, 394 (1966).
25. Clouet D. H., Ratner M., Williams N., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 142 (1966).
26. Comb D. G., Katz S., *J. Mol. Biol.* **8**, 790 (1964).
27. Comb D. G., Zehavi-Willner T., *J. Mol. Biol.* **23**, 441 (1967).
28. Conway T. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1216 (1964).
29. Conway T. W., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1462 (1966).
30. Coutsogeorgopoulos C., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 214 (1966).
31. Crick F. H. C., *J. Mol. Biol.* **19**, 548 (1966).
32. Cundliffe E., McQuillen K., *J. Mol. Biol.* **30**, 137 (1967).
33. Dahlberg J. E., Haselkorn R., *J. Mol. Biol.* **24**, 83 (1967).
34. Day L. E., *J. Bacteriol.* **92**, 197 (1966).
35. Davies J., Gilbert W., Gorini L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 883 (1964).
36. Dickerman H. W., Steers E. Jr., Redefield B. G., Weissbach H., *J. Biol. Chem.* **242**, 1522 (1967).
37. Dintzis H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 247 (1961).
38. Eisenstadt J. M., Brawerman G., *Biochemistry* **5**, 2777 (1966).
39. Eisenstadt J. M., Brawerman G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **58**, 1560 (1967).
40. Felicetti L., Colombo B., Baglioni C., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, **120** (1966).
41. Fessenden J. M., Moldave K., *Biochemistry* **1**, 485 (1962).
42. Fessenden J. M., Moldave K., *J. Biol. Chem.* **238**, 1479 (1963).
43. Fry K. T., Lamborg M. R., *J. Mol. Biol.* **28**, 423 (1967).
44. Furano A. V., Bradley D. F., Childers L. G., *Biochemistry* **5**, 3044 (1966).
45. Galibert F., Larsen C. J., Lelong J. G., Boiron M., *Nature* **207**, 1039 (1965).
46. Gallucci E., Garen A., *J. Mol. Biol.* **15**, 193 (1966).
47. Ganoza M. C., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **55**, 162 (1966).
48. Garen A., Garen S., Wilhelm R. C., *J. Mol. Biol.* **14**, 167 (1965).
49. Gąsior E., Moldave K., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 679 (1965).
50. Gąsior E., Moldave K., *J. Biol. Chem.* **240**, 3346 (1965).

51. Gaśsior E., Ibuki F., Moldave K., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 204 (1966).
52. Gaśsior E., Sz waj M. — w przygotowaniu do druku.
53. Gesteland R. F., Staehelin T., *J. Mol. Biol.* **24**, 149 (1967).
54. Ghosh H. P., Soll D., Khorana H. G., *J. Mol. Biol.* **25**, 275 (1967).
55. Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **6**, 389 (1963).
56. Godchaux W., Adamson S. D., Herbert E., *J. Mol. Biol.* **27**, 57 (1967).
57. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **12**, 413 (1966).
58. Gordon J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1574 (1967).
59. Gordon J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 179 (1968).
60. Gorini L., Kataja E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 995 (1964).
61. Grossi L. C., Moldave K., *J. Biol. Chem.* **235**, 2370 (1960).
62. Grünberger D., *Collection Czech. Chem. Commun.* **29**, 2400 (1964).
63. Hawtrey A. O., Nourse L. O., King H. W., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 409 (1966).
64. Heredia C. F., Halvorson H. O., *Biochemistry* **5**, 946 (1966).
65. Hershey J. W., Thach R. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 759 (1967).
66. Hierowski M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 594 (1965).
67. Hierowski M., Kuryło-Borowska Z., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 578 (1965).
68. Hoagland M. B., Stephenson M., Scott J., Hecht L., Zamec-nik P., *J. Biol. Chem.* **231**, 241 (1958).
69. Holley R., Apgar J., Everett G., Madison J., Marquisee M., Merrill S., Penwick I., Zamir A., *Science* **147**, 1462 (1965).
70. Hosokawa K., Fujimura R. K., Nomura M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 198 (1966).
71. Ibuki F., Gaśsior E., Moldave K., *J. Biol. Chem.* **241**, 2188 (1966).
72. Ibuki F., Moldave K., *J. Biol. Chem.* — w druku.
73. Jardetsky O., *J. Biol. Chem.* **238**, 248 (1963).
74. Jencks W. P., Cordes S., Carrinolo J., *J. Biol. Chem.* **235**, 3608 (1960).
75. Joklik W. W., Becker Y., *J. Mol. Biol.* **13**, 511 (1965).
76. Julian G., *J. Mol. Biol.* **12**, 9 (1965).
77. Kaji H., Kaji A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 213 (1965).
78. Kaji H., Suzuka I., Kaji A., *J. Mol. Biol.* **18**, 219 (1966).
79. Kaji H., Suzuka I., Kaji A., *J. Biol. Chem.* **241**, 1251 (1966).
80. Khorana H. G. w *Genetic Elements*, red. D. Shugar, Academic Press, PWN, Londyn, New York, Warszawa 1966, str. 209.
81. Klink F., Kramer G., Nour A. M., Peterson K. G., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 360 (1967).
82. Klink F., Kloppsteck K., Kramer G., Dimigen J., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 373 (1967).
83. Knippenberg P., Claason J., Grijm-Vos M., Veldstra H., Bosch L., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 461 (1965).
84. Kolakofsky D., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1786 (1966).
85. Kučan Z., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **239**, 516 (1964).
86. Kuryło-Borowska Z., Hierowski M., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 590 (1965).
87. Kwiatkowska J., *Post. Biochem.* **11**, 267 (1965).
88. Last J. A., Stanley W.M. Jr., Salas M., Hille B., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1062 (1967).
89. Leder P., Bursztyn H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1579 (1966).
90. Leder P., Nau M. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **58**, 774 (1967).
91. Lerman M. I., Spirin A.S., Gavrilova L. P., Golov V. F., *J. Mol. Biol.* **15**, 266 (1966).

92. Low R. B., Wool I. G., *Science* **155**, 330 (1967).
93. Lucas-Lenard J., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1562 (1966).
94. Lucas-Lenard J., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1050 (1967).
95. Malkin L.I., Rich A., *J. Mol. Biol.* **26**, 329 (1967).
96. Mangiarotti G., Schlessinger D., *J. Mol. Biol.* **29**, 395 (1967).
97. Mangiarotti G., Schlessinger D., *J. Mol. Biol.* **20**, 123 (1966).
98. Marcker K. A., Sanger F., *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).
99. Maxwell I. H., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 337 (1967).
100. Moldave K., *Annual Rev. Biochem.* **34**, 419 (1965).
101. Moldave K., doniesienie ustne.
102. Monro R. E., Maden B.E.H., Traut R. R., w *Genetic Elements*, red. D. Shugar, Londyn, New York, Warszawa, Academic Press, PWN 1966, str. 179.
103. Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **26**, 147 (1967).
104. Monro R. E., Vazquez D., *J. Mol. Biol.* **28**, 161 (1967).
105. Möller W., Chrambach A., *J. Mol. Biol.* **23**, 377 (1967).
106. Möller W., Widdowson J., *J. Mol. Biol.* **24**, 367 (1967).
107. Mosteller R. D., Culp W., Hardesty B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1817 (1967).
108. Nair K. G., Arnstein H.R.V., *Biochem. J.* **97**, 595 (1965).
109. Nair K. G., Zak R., Rabinowitz M., *Biochemistry* **5**, 2674 (1966).
110. Nakamoto T., Kolakofsky D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 606 (1966).
111. Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **28**, 227 (1963).
112. Nathans D., Lipmann F., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 126 (1960).
113. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 497 (1961).
114. Nathans D., Allende J. E., Conway T. W., Spyrides G. J., Lipmann F., *Informational Macromolecules*, red. H. J. Vogel, V. Bryson, J. O. Lampen, Academic Press, 1963, str. 349.
115. Nirenberg M. W., Leder P., *Science* **145**, 1399 (1964).
116. Nirenberg M.W., Leder P., Bernfield M., Brimacombe R.L., Trupin J. S., Rottman F. M., O'Neil C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1161 (1965).
117. Nishizuka Y., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 212 (1966).
118. Nishizuka Y., Lipmann F., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 344 (1966).
119. Noll H., *Science* **151**, 1241 (1966).
120. Nomura M., Lowry C. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 946 (1967).
121. Nomura M., Lowry C. V., Guthrie C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1487 (1967).
122. Ohta T., Sarkar S., Thach R.E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1138 (1967).
123. Parisi B., Ciferri O., *Biochemistry* **5**, 1638 (1966).
124. Parisi B., Milanosi G., Van Etten J. L., Perani A., Ciferri O., *J. Mol. Biol.* **28**, 295 (1967).
125. Passent J., *Post. Biochem.* **12**, 397 (1966).
126. Perzyński S., Szafranski P., *Biochem. J.* **103**, 1c (1967).
127. Pestka S., Marshall R., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 639 (1965).
128. Pestka S., *J. Biol. Chem.* **241**, 367 (1966).
129. RayBhandary U. L., Chang S. N., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskinson R. M., Khorana H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 751 (1967).
130. Ravel J. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1811 (1967).
131. Rendi R., Ochoa S., *Science* **133**, 1367 (1961).
132. Revel M., Gros R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 124 (1966).

133. Richter D., Klink F., *Biochemistry* **6**, 3569 (1967).
134. Rosset R., Monier R., Julien J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**, 87 (1964).
135. Rychlik I., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 425 (1966).
136. Salas M., Smith M. A., Stanley W. M., Wahba A. J., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **240**, 3988 (1965).
137. Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 287 (1967).
138. Salas M., Miller M. J., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1865 (1967).
139. Santer M., Smith J. R., *J. Bacteriol.* **92**, 1099 (1966).
140. Sarabhai A. S., Stretton A. O. W., Brenner S., Bolle A., *Nature* **201**, 13 (1964).
141. Schwartz J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1133 (1956).
142. Schweet R. S., Heintz R., *Annual Rev. Biochem.* **35**, 723 (1966).
143. Schlessinger D., Mangiarotti G., Apirion D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1782 (1967).
144. Seeds N. W., Conway T. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 111 (1966).
145. Skogersen L., Moldave K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 568 (1967).
146. Söll D., Ohtsuka E., Jones D. S., Lohrmann R., Hayatsu H., Nishimura S., Khorana H. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1378 (1965).
147. Söll D., Jones D. S., Ohtsuka E., Faulkner R. D., Lohrmann R., Hayatsu H., Khorana H. G., Cherayil J. D., Hampel A., Bock R. M., *J. Mol. Biol.* **19**, 556 (1966).
148. Söll D., RayBhandary U. L., *J. Mol. Biol.* **29**, 113 (1967).
149. Spector A., Travis D., *J. Biol. Chem.* **246**, 1290 (1966).
150. Spirin A. C., Lerman H. I., Gawriłowa Ł. P., Bielicyna N. W., *Biochimija* **31**, 424 (1966).
151. Spyrides G. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1220 (1964).
152. Stanley W. M., Salas M., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 290 (1966).
153. Suarez G., Nathans D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 743 (1965).
154. Sundarajan T. A., Thach R. E., *J. Mol. Biol.* **19**, 74 (1966).
155. Sutter R. P., Gaśsior E., Moldave K., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 719 (1965).
156. Sutter R. P., Moldave K., *J. Biol. Chem.* **241**, 1698 (1966).
157. Suzuka I., Kaji H., Kaji A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1483 (1966).
158. Szafranski P., *Post. Biochem.* **5**, 67 (1959).
159. Szafranski P., Klita S., *Post. Biochem.* **11**, 459 (1965).
160. Szafranski P., Klita S., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 61 (1964).
161. Takada M., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1875 (1966).
162. Takanami M., Okamoto T., *J. Mol. Biol.* **7**, 323 (1963).
163. Takanami M., Yan Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1450 (1965).
164. Thach R. E., Cecere H. A., Sundarajan T. A., Doty P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1167 (1965).
165. Thach R. E., Dewey K. F., Mykolayewicz N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1103 (1967).
166. Traut R. R., Monroe R., *J. Mol. Biol.* **10**, 63 (1964).
167. Traut R. R., Moore P. B., Delius H., Noller H., Tissieres A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1294 (1967).
168. Trupin J. S., Rottman R. M., Brimacombe R. L., Leder P., Bernfield M. R., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 807 (1965).

169. Trupin J. S., Dickerman H., Nirenberg M. W., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 50 (1966).
170. Waller J. P., *J. Mol. Biol.* **7**, 483 (1963).
171. Waller J. P., *J. Mol. Biol.* **10**, 319 (1964).
172. Warner J., Rich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1134 (1964).
173. Wartak J., *Post. Biochem.* **9**, 367 (1963).
174. Watson J. D., cyt. wg 102.
175. Weber M. J., De Moss J. S. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1224 (1966).
176. Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 155 (1966).
177. Weigert M. G., Garen A., *Nature* **206**, 992 (1965).
178. Weisberger A. S., Armentrout S., Wolfe S. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 86 (1963).
179. Weisberger A. S., Wolfe S., *Federation Proc.* **23**, 976 (1964).
180. Wettstein R. O., Noll H., *J. Mol. Biol.* **11**, 35 (1965).
181. Williamson A., Schweet R. S., *J. Mol. Biol.* **11**, 358 (1965).
182. Viñuela E., Salas M., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 729 (1967).
183. Zamir A., Holley R., Marquisee M., *J. Biol. Chem.* **240**, 1267 (1965).
184. Zamir A., Leder P., Elson D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1794 (1966).

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *

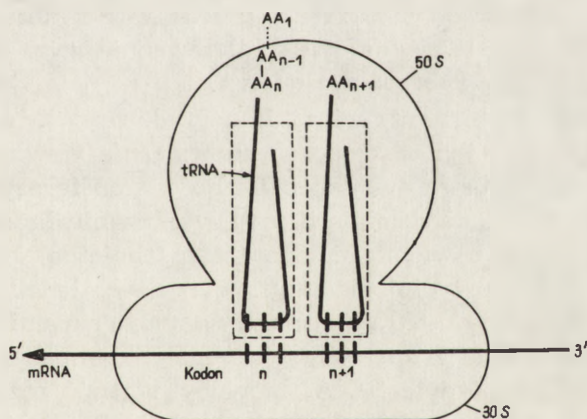
N-formylometionylo-tRNA jako inicjator syntezy łańcucha polipeptydowego

N-formylmethionyl-tRNA as initiator of polypeptide chain synthesis

The biosynthesis and properties of *N*-formylmethionyl-tRNA as well as its role in the initiating of polypeptide chain synthesis are discussed.

Synteza łańcucha peptydowego odbywa się na rybosomach podczas wzajemnego oddziaływania informacyjnego RNA i aminoacylo-tRNA w obecności enzymów zawartych w rozpuszczalnej frakcji białek komórkowych, GTP oraz jedno- i dwuwartościowych kationów. Właściwe odczytanie informacji genetycznej o sekwencji i ilości aminokwasów w łańcuchu wymaga precyzyjnie działającego mechanizmu zapoczątkowującej syntezę. Konieczne są tak zwane „znaki przestankowe”, czyli sygnały mówiące o początku i końcu łańcucha polipeptydowego.

Rozpoznanie właściwego aminoacylo-tRNA ma miejsce na podjednostce 30S rybosomu, w wyniku interakcji kodonu zawartego w cząsteczce mRNA z antykodonem w cząsteczce tRNA (rysunek 1).



Rys. 1. Interakcja rybosomu, mRNA i tRNA podczas biosyntezy białek (10).

* Dr, Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa.

Wykaz używanych skrótów:

f¹⁰FH₄ — formylotetrahydrofolan

GMP-PCP — 5'-guanylo-metylenodwufosfonian

Adenozynowy koniec tRNA związanego z cząsteczką aminokwasu łączy się z tak zwanym receptorowym miejscem podjednostki 30S rybosomu, podczas gdy analogiczny fragment tRNA, niosący grupę peptydylową, wiąże się z donatorowym miejscem na podjednostce 50S rybosomu (11, 64). Podczas wydłużania łańcucha polipeptydowego następuje przeniesienie grupy peptydylowej, połączonej jeszcze z tRNA, na aminoacylo-tRNA. Wiązanie peptydowe tworzy się w wyniku kondensacji grupy-NH₂ aminoacylo-tRNA z grupą karboksylową polipeptydu. Procesowi temu towarzyszy rozszczepienie jednej cząsteczki GTP (74).

Zamir i Leder (105) przypuszczali, że w procesach przenoszenia grupy peptydylowej uczestniczy enzym związany z podjednostką 50S rybosomu. Monro i wsp. (63, 64) stwierdzili, że istotnie transferaza polipeptydylowa jest związana z podjednostką 50S rybosomu w pozycji umożliwiającej kontakt z obydwojema rodzajami tRNA.

Po utworzeniu wiązania peptydowego uwalnia się tRNA połączony dotąd z fragmentem peptydylowym, a wydłużony o jeden aminokwas peptydylo-tRNA przesuwa się na miejsce donatorowe z jednoczesnym przesunięciem wzdłuż mRNA. W ten sposób na rybosomie zwalnia się miejsce receptorowe na przyjęcie nowego aminoacylo-tRNA. Synteza polipeptydu przebiega do momentu pojawienia się w łańcuchu mRNA sygnału informującego o zakończeniu łańcucha (32, 43, 44, 100).

Synteza łańcucha polipeptydowego rozpoczyna się wówczas, gdy na rybosomie znajdują się: fragment mRNA zawierający kodon inicjujący i przynajmniej dwa ułożone obok siebie aminoacylo-tRNA. Zdaniem Nakamoto i Kolakofsky'ego (68) prawidłowe rozpoczęcie syntezy łańcucha polipeptydowego zależy przede wszystkim od usytuowania dwóch aminoacylo-tRNA na rybosomie, w mniejszym zaś stopniu od specyficznego wiązania rybosomu z mRNA.

Przy założeniu, że pierwsze wiązanie peptydowe w łańcuchu polipeptydowym powstaje w ten sam sposób co wiązanie wewnątrz łańcucha, wyłania się sprawa substratowej specyficzności transferazy polipeptydylowej (76). Transferaza ta działająca przy wydłużaniu łańcucha polipeptydowego, rozpoznaje bowiem nienaładowaną (obojętną) grupę amidową peptydylo-tRNA, zaś przy inicjowaniu syntezy tego łańcucha substratami jej są dwa aminoacylo-tRNA z naładowanymi grupami-NH₃⁺. Teoretycznie zmodyfikowanie grupy-NH₃⁺ jednego z aminoacylo-tRNA, upodabiające go do peptydylo-tRNA, mogłoby ułatwić rozpoznanie tego związku przez transferazę (76). Tego typu pochodna aminoacylo-tRNA powinna być kodowana przez specjalny, inicjujący kodon. Wykrycie N-formylo-metionilo-tRNA w *E. coli* (61) uprawdopodobniło taką hipotezę.

Stwierdzono, że w białkach *E. coli* grupy aminowe metioniny stanowią prawie połowę ilości grup N-końcowych (102), a co więcej, że białka otoczki niektórych fagów, syntetyzowane *in vitro* w ekstraktach bezko-

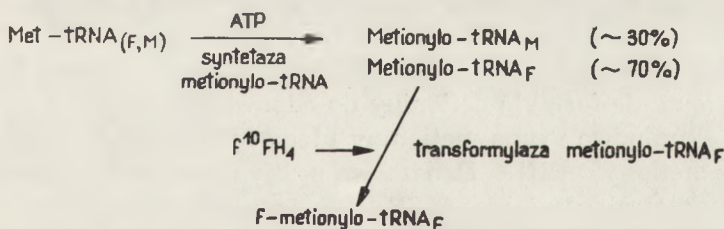
mórkowych *E. coli* pod wpływem RNA z fagów M17 i f2, zawierają formylometioninę jako N-końcowy aminokwas (1, 36, 86, 103). Wysłunięto zatem hipotezę, że formylometionina stanowi uniwersalny inicjator w biosyntezie białek (13, 14, 97). Ponieważ jednak w otocze białkowej samego faga f2 alanina a nie formylometionina jest N-końcowym aminokwasem (36) przypuszczano, że grupa formylowa lub też cała formylometionina ulega odszczepieniu na drodze enzymatycznej (36, 106). Wykryto też enzym, który wybiórczo odszczepia grupę formylową od dwupeptydu formylometionylo-alaniny, a nie uwalnia tej grupy połączonej z pojedynczym aminokwasem (36). Nie udało się jednak, jak dotąd, znaleźć enzymu odszczepiającego formylometioninę od łańcucha polipeptydowego.

W białkach *E. coli* dotychczas nie wykryto innych uformylowanych aminokwasów prócz formylometioniny (36, 61), a coraz większa liczba danych doświadczalnych wskazuje na związek N-formylometionylo-tRNA z mechanizmem inicjującym syntezę białek, przynajmniej w systemach bakteryjnych.

I. Biosynteza formylometionylo-tRNA

Przyłączenie aminokwasów do swoistych dla nich tRNA następuje pod wpływem określonych syntetaz aminoacylo-tRNA (6). Wiązanie metioniny z tRNA katalizuje specyficzna syntetaza metionylo-tRNA (7, 61, 70, 92).

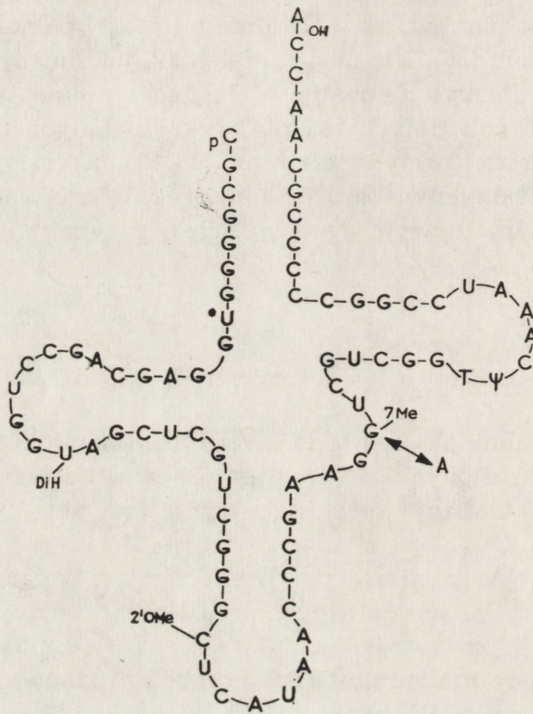
Metionylo-tRNA dzieli się na dwie frakcje różniące się szybkością wędrowania w czasie jonoforezy na żelu i odznaczające się różną zdolnością formylacji przez transformylazę (rysunek 2): nie formylowany, szybciej wędrujący metionylo-tRNA_M oraz formylowany, wolniej poruszający się, metionylo-tRNA_F (18, 20, 41, 57, 60).



Rys. 2. Biosynteza formylometionylo-tRNA_F

Dotychczas udało się ustalić sekwencję nukleotydomową jedynie w metionylo-tRNA_F (rysunek 3) (25). Stwierdzono, że trójnukleotyd CAU pełni funkcję antykodonu, a tworzenie par pomiędzy zasadami rozpoczyna się metionylo-tRNA_F od końca wiążącego aminokwas, od zasady nr 6 a nie od zasady nr 5, jak to ma miejsce w innych tRNA. Autorzy podkreślają, że obecność U jako trzeciej zasady w antykodonie umożliwia,

zgodnie z hipotezą tolerancji Cricka (ang. *wobble hypothesis*), odczytywanie zarówno A jak i G obecnych w kodonie. W cząsteczce metionyno-tRNA_F wykazano także obecność kilku zmetylowanych zasad (25). Nishimura i wsp. (73) wykazali, że przynajmniej 30 nukleotydów w metionyno-tRNA_F i metionyno-tRNA_M ułożonych jest w tej samej kolejności, co może sugerować, że różnice pomiędzy nimi polegają przede wszystkim na ich odmiennej strukturze czwartorzędowej.



Rys. 3. Model tRNA_F wyizolowanego z *E.coli* CA 265 (25)

Marcker i Sanger (61) nie zdołali wykryć enzymu katalizującego przyłączenie formylometioniny do odpowiedniego tRNA i przypuszczają, że α -aminowa grupa metioniny ulega formylacji dopiero po utworzeniu się metionyno-tRNA. Donatorem grupy formylowej w tym procesie jest formylotetrahydrofolan, $f^{10}FH_4$, lub jego trójglutamyłowa pochodna (1, 18, 22, 24, 30, 57, 86). Transformylazę metionyno-tRNA z *E. coli* B. oczyszczono 1500 razy i oznaczono, że jej ciężar cząsteczkowy wynosi około 25 000 (22, 23, 24). Supernatanty pozostałe po odwirowaniu rybosomów z preparatów *E. coli* K12, *Streptomyces antibioticus*, *Lactobacillus leichmanii* i *Clostridium tetanomorphum* formylują metionyno-tRNA_F zarówno z *E. coli* (29), jak i ze świnki morskiej (15), wydaje się zatem, że sekwencja nukleotydów określająca specyficzność formylacji jest w tych tRNA zliżona (24).

Fakt formylowania wybiórczo metionylo-tRNA_F (a nie metionylo-tRNA_M) wskazuje, że transformylaza metionylo-tRNA rozpoznaje łańcuch polinukleotydowy RNA przenoszącego. Natomiast analogi metioniny etionina i norleucyna po zacylowaniu tRNA ulegają formylacji z taką samą wydajnością jak metionylo-tRNA, co świadczy o niezdolności transformylazy do rozróżnienia tych aminoacylo-tRNA (96). Trupin i wsp. (96) przypuszczają zatem, że oba analogi mogą zastępować metioninę w inicjowaniu łańcucha polipeptydowego, zwłaszcza, iż wiadomo, że mogą one być wbudowywane do białek *E. coli* zamiast metioniny (82).

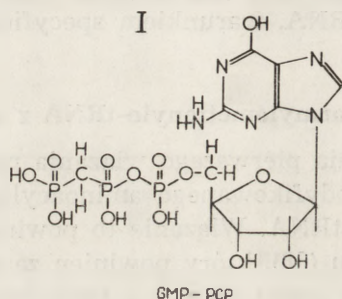
Transformylaza metionylo-tRNA_F, w obecności metionylo-tRNA_F jak również tRNA_F jest oporna na inaktywację cieplną i inaktywację wywołaną działaniem trypsyny, ponieważ prawdopodobnie w nieobecności donatora formylu tworzy się kompleks enzymu z tymi związkami. Fakt, że ochraniający wpływ metionylo-tRNA_F jest większy niż tRNA_F może wskazywać, iż obecność wiązania estrowego sprzyja połączeniu tRNA z enzymem a także sugerować, że wiązanie to jest drugim, obok sekwencji nukleotydów w RNA, warunkiem specyficzności formylacji metionylo-tRNA_F.

II. Wiązanie formylometionylo-tRNA z rybosomami

Warunkiem utworzenia pierwszego wiązania peptydowego jest wiązanie z rybosomami zmodyfikowanego aminoacylo-tRNA przypominającego budowę peptydylo-tRNA. Wiązanie to powinno zależeć od specjalnego inicjującego kodonu (68), który powinien zapewniać jeden schemat odczytywania informacji genetycznej, uniemożliwiać błędne odczytywanie kodu (ang. *out-of-phase reading*) oraz umożliwiać zachodzenie syntezy polipeptydów od określonego punktu (94). Przyjmując, że rolę analogu peptydylo-tRNA pełni formylometionylo-tRNA_F badano zależność wiązania metionylo-tRNA z rybosomami w układzie opracowanym przez Nirenberga i Ledera (71) od różnych związków typu pUpUpUp (16, 18, 41, 48, 58, 91). Nie ulegający formylacji metionylo-tRNA_M wiąże się z rybosomami *E. coli* jedynie w obecności AUG, właściwego kodonu dla metioniny (72), przy optymalnym stężeniu jonów Mg²⁺ wynoszącym 0,03M (19, 41, 89). Metionylo-tRNA_F, jak również formylometionylo-tRNA_F, wiążą się z rybosomami najsilniej w obecności AUG, słabiej zaś przy GUG i UUG, a najsłabiej w obecności CUG (18, 19, 49, 59) przy trzykrotnie niższym stężeniu Mg²⁺ (59).

Wiązanie formylometionylo-tRNA_F z rybosomami, zachodzące w obecności naturalnego (z fagów) lub syntetycznego mRNA zależy od czynników enzymatycznych F₁ i F₂, związanych z rybosomami (9, 16, 28, 54, 8, 79, 84, 90, 101). Czynniki te stymulują proces wiązania w zależności od stężenia jonów Mg²⁺ w mieszaninie inkubacyjnej (2, 5, 83, 84); dość znacznie przy stężeniach Mg²⁺ niższych niż 10 mM, natomiast mniej przy wyższych stężeniach Mg²⁺ (84). Należy podkreślić, że czynniki F₁ i F₂ nie

wpływają na wiązanie nieuforylowanej pochodnej metionyno-tRNA_F ani też metionyno-tRNA_M (4,484). Podczas wiązania formylometionyno-tRNA_F z rybosomami niezbędne jest GTP (3, 4, 5, 50, 80, 84). GTP może niekiedy być zastąpione w tym procesie przez ATP i ITP (4), a w pewnych warunkach także przez analog GTP, GMP-PCP (5'-guanylo-metylenodwufosfonian, wzór I) (4, 67, 80), który jest inhibitorem syntezy białek u *E. coli* (37), natomiast GDP hamuje wiązanie formylometionyno-tRNA_F z rybosomami (50). W tym etapie syntezy polipeptydu nie następuje więc hydroliza GTP, a zatem jego rola nie podlega na dostarczeniu energii. Początkowo przypuszczano (3), że GTP tworzy kompleks z białkiem czynników inicjujących F₁ i F₂, jednakże okazało się, iż bardziej oczyszczone preparaty F₁ i F₂ odznaczają się słabą zdolnością do wiązania GTP (2), oraz że GTP tworzy kompleks z czynnikiem T_U, niezbędnym przy polimeryzacji aminokwasów, a występującym jako zanieczyszczenia w preparatach F₁ i F₂ (74). Tak więc rola GTP przy wiązaniu formylometionyno-tRNA_F wymaga jeszcze wyjaśnienia.



W układzie zawierającym obok rybosomów 70S podjednostki 30S i 50S oraz mRNA z faga f2, formylometionyno-tRNA_F wiąże się jedynie z podjednostką 30S, zaś metionyno-tRNA_M — z kompleksem 30S-50S lub z rybosomem 70S (88, 78). Dodanie podjednostki 50S do układu specyficznie hamowało wiązanie formylometionyno-tRNA_F przez podjednostkę 30S stymulując zarazem wiązanie innych aminoacylo-tRNA kierowane przez inne kodony. Ostatnio liczni badacze potwierdzili wybiórcze wiązanie formylometionyno-tRNA_F przez podjednostkę 30S rybosomu (29, 33, 39, 85), w której według Eisenstadta i Brawermana (29) zlokalizowane są czynniki inicjujące F₁ i F₂.

Do rozstrzygnięcia czy kodon inicjujący rozpoznawany jest przez metionyno-tRNA_F czy też formylometionyno-tRNA_F, może przyczynić się wyjaśnienie czy formylacja metionyno-tRNA następuje przed czy po związaniu z rybosomami.

Leder i Bursztyń (48) wykazali, że w obecności kodonu AUG formylometionyno-tRNA słabiej wiąże się z rybosomami *E. coli* niż metionyno-tRNA_F, co wskazywałoby na formylację metionyno-tRNA_F już po związaniu go z kompleksem rybosom-mRNA (45, 47). Ponadto prawdopodobnie to samo miejsce na rybosomie mogą zajmować formylometio-

nylo-tRNA_F, metionylo-tRNA, jak również tRNA, co stwarza możliwość kompetycji (48).

Nakamoto i wsp. (26, 27, 42, 68) są natomiast zwolennikami poglądu, że formylacja następuje przed związaniem aminoacylo-tRNA z rybosomami, ponieważ formylometionylo-tRNA wzmacnia w pewnych warunkach syntezę białek w ekstraktach *E. coli*. Ponadto bardzo duża aktywność formylacji w ekstraktach *E. coli*, utrzymująca niezwiązany z rybosomami metionylo-tRNA w stanie maksymalnego uformyłowania (27) oraz dane Marckera i Sanguera (61) o występowaniu u *E. coli* połowy metionylo-tRNA w stanie uformyłowanym, wykluczają zdaniem Economou i Nakamoto (27) formylację metionylo-tRNA na rybosomie. Fakt, że przy niskich stężeniach jonów Mg²⁺ (5 mM) wiąże się z rybosomami więcej formylometionylo-tRNA_F niż metionylo-tRNA_F (84) popiera także hipotezę Nakamoto.

III. Wbudowywanie metioniny i formylometioniny do polipeptydów

U *E. coli* obydwa rodzaje RNA przenoszącego dla metioniny wykazują różną specyficzność w stosunku do różnych syntetycznych mRNA (17, 43, 59): w obecności poli UG wbudowuje się w polipeptydy jedynie metionina z metionylo-tRNA_F, podczas gdy w obecności poli UAG donatorami metioniny są zarówno metionylo-tRNA_F jak i metionylo-tRNA_M, przy czym ten ostatni jest efektywniejszy. Około 70% ³⁵S-metioniny pochodzącej z ³⁵S-metionylo-tRNA_F pojawia się na końcu polipeptydu o wolnej grupie -NH₂, Metioninę z metionylo-tRNA_M znajdowaną natomiast wewnątrz łańcucha (58, 59).

Triplet AUG koduje wbudowywanie formylometioniny do białek *E. coli* zarówno wtedy, gdy znajduje się on na początku oligonukleotydu ApUpG(pU)₂₅ — jak też gdy tkwi wewnątrz oligonukleotydu ApApApUpG(pU)₂₅, przy czym w obecności tego ostatniego pomimo, że AAA koduje wbudowywanie lizyny, formylometionina stanowiła pierwszy aminokwas w zsyntetyzowanym polipeptydzie (2, 94). Dane te, jak i fakt wbudowywania formylometioniny także pod wpływem UpUpG(pU)₂₅ (94), zgodne są z omówionymi już obserwacjami różnych autorów o wiązaniu formylometionylo-tRNA_F z rybosomami w obecności zarówno AUG jak i UUG. Na translację syntetycznych oligonukleotydów wpływają również czynniki F₁ i F₂. W obecności poli UG (5:1) i poli UAG (6:1:1) zwiększają one dwa do trzech razy wbudowywanie fenyloalaniny i metioniny (101). W obecności AUG(A)_n czynniki te stymulują przede wszystkim wbudowywanie metioniny z formylometionylo-tRNA_F, w bardzo słabym zaś stopniu z metionylo-tRNA_F (84). Wydaje się, że działanie czynników F₁ i F₂ jest specyficznie związane z tripletem AUG umieszczonym na końcu 5' mRNA, ponieważ nie wpływają one na wbudowywanie aminokwasów w obecności syntetycznych oligonukleotydów typu poli A

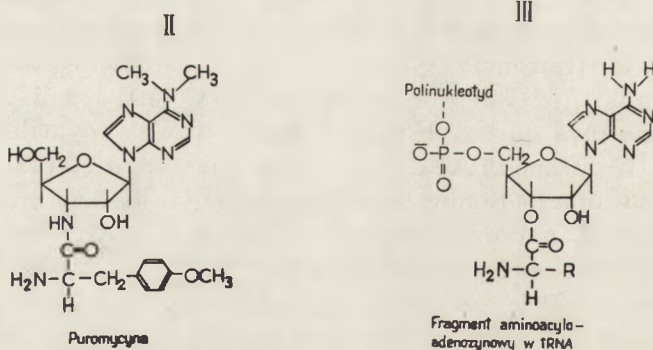
(84) oraz nukleotydów zawierających AGU i GGU na początku łańcucha mRNA (101). Zwiększenie intensywności wbudowywania niektórych aminokwasów do polipeptydu pod wpływem czynników F_1 i F_2 w obecności nadmiaru enzymów przenoszących, pozwala przypuszczać, że jeden z tych czynników jest enzymem specyficznie katalizującym tworzenie pierwszego wiązania peptydowego pomiędzy *N*-formylometioniną z *N*-formylometionylo-tRNA i następnym aminoacylo-tRNA związanym z akceptorową częścią rybosomu (10,101).

Sundararajan, Thach i wsp. (91, 94) zajęli się zagadnieniem czy AUG spełnia wymagania stawiane kodonowi inicjującemu syntezę łańcucha polipeptydowego. Okazało się, że AUG w wielu oligonukleotydach uniemożliwia rozpoznanie kodonu zachodzącego (ang. *overlapping*), pozwala zaś na tłumaczenie kodonów przyległych. Na przykład w nukleotydzie ApUpGpUpUp(pU)₁₂ przy 0,01M stężeniu jonów magnezu nie jest tłumaczony kodon GUU, natomiast jest tłumaczony kodon UUU (94). AUG kieruje odczytywaniem kodonu w kierunku od końca 5' do 3', przy czym prawdopodobnie nie jest konieczna jego obecność na końcu 5'.

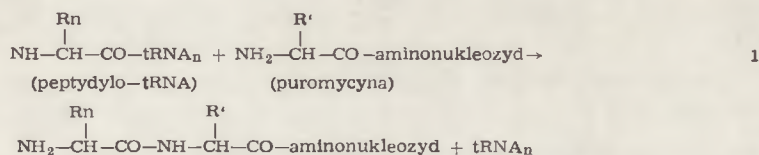
Oprócz AUG rolę kodonu inicjującego może także pełnić GUG oraz w pewnych określonych warunkach także i GUA (34). Wykrycie więcej niż jednego inicjującego kodonu, wiążące się z zagadnieniem degeneracji kodonu w pierwszej i trzeciej pozycji trypletu, nasuwa myśl o specyficzności ich rozpoznawania oraz o istnieniu kilku inicjujących tRNA. Ponieważ dotychczas dostępne metody wskazują na homogenność metionylo-tRNA_F Ghosh, Söl i Khorana (34) sugerują, że rozpoznanie AUG i GUG jest możliwe dzięki specyficznemu ich wiązaniu z określonymi częściami rybosomu. Biologiczne znaczenie występowania kilku kodonów inicjujących mogłoby polegać przy różnej ich wydajności na regulowaniu ilości i szybkości syntezy różnych białek.

IV. Badania mechanizmu syntezy pierwszego wiązania peptydowego

Do poznania tego mechanizmu przyczyniło się zastosowanie związków o budowie analogicznej do substratów uczestniczących w reakcji



Puromycyna (II), która przypomina budową adenzyno-aminokwasową (III) część aminoacylo-tRNA (104), a nie ma części warunkujących jej specyficzność i decydujących o jej łączeniu się z rybosomami, wchodząc w reakcję z peptydylo-tRNA powoduje powstanie kompleksu, który odłącza się od rybosomu (21, 55, 95), co hamuje syntezę białek. Zdaniem Smitha i wsp. (88) reakcja ta (reakcja 1) jest analogiczna do syntezy wiązania peptydowego.



Puromycyna w określonych warunkach może także reagować z formylometioniną dając formylometionylo-puromycynę (10, 46, 83, 105). Synteza ta zachodzi w obecności kodonu AUG, rybosomów i czynników F_1 i F_2 , a źródłem formylometioniny może być formylometionylo-tRNA_F, lub jego końcowy fragment otrzymany przez trawienie rybonukleazą T_1 i zidentyfikowany jako CAACCA-formylometionina (65, 66). Natomiast metionina związana z tRNA_M nie łączy się z puromycyną. Podobnie, acetylowa pochodna metionylo-tRNA_F reaguje z puromycyną w odróżnieniu od acetylometionylo-tRNA_M (10). Wyniki te jak również fakt, że CAACCA-formylometionina reaguje z puromycyną jedynie w obecności podjednostki 50S rybosomu (63) przemawiają za przypuszczeniem, że formylometionylo-tRNA_F lokuje się na rybosomie w miejscu donatorowym, zajmowanym podczas wydłużania łańcucha polipeptydowego przez peptydylo-tRNA, dzięki czemu możliwe jest rozpoczęcie syntezy łańcucha (105). Decydującą rolę odgrywa tu, zdaniem Bretschera (10) i Ledera (45) struktura tRNA_F.

Reakcja formylometionylo-tRNA z puromycyną wymaga obok kodonu i czynników F_1 i F_2 , także obecności GTP (38, 67). Co więcej, formylometionylo-tRNA_F związany z rybosomami przy udziale GMP-PCP, nie reaguje ani z puromycyną ani z innymi aminoacylo-tRNA. GMP-PCP hamuje także syntezę formylometionylo-fenylalaniny (93). Wyniki te w przeciwieństwie do danych Nishizuki i Lipmanna (75) przemawiają za udziałem GTP również i w syntezie pierwszego wiązania peptydowego.

AUG koduje wbudowywanie zarówno formylometioniny jak i metioniny, istotne staje się zatem rozpoznanie przez ten kodon formylometionylo-tRNA_F i metionylo-tRNA_M, zawierających ten sam antykodon. Sundararajan i Thach (91) decydującą rolę przypisują współdziałaniu tych aminoacylo-tRNA z określonym miejscem rybosomu. W procesie zapoczątkowywania łańcucha, kodon AUG znajdujący się w pobliżu lub na końcu 5' mRNA oddziałuje według nich na część donatorową rybosomu, zajmowaną przy wydłużaniu łańcucha przez peptydy-

ło-tRNA, kodując tym samym wiązanie formylometionyno-tRNA_F i wbudowywanie formylometioniny. Natomiast AUG ulokowany wewnątrz łańcucha mRNA, oddziałując na receptorową część rybosomu, zajmowaną przez aminoacylo-tRNA, decyduje o wiązaniu metionyno-tRNA_M i w konsekwencji o wbudowywaniu metioniny. Za taką sugestią przemawiają wyniki badań z zastosowaniem puromycyny jak również doświadczeń nad syntezą polimetioniny (34), wykazujące, że formylometionyno-tRNA_F wiąże się z donatorową częścią rybosomu, zaś metionyno-tRNA_M z jego częścią receptorową. Za wiązaniem metionyno-tRNA_M z receptorową częścią rybosomu przemawia też fakt, że metionyno-tRNA_M wiąże się z rybosomami przy podobnym stężeniu jonów Mg jak wymagane do wiązania innych aminoacylo-tRNA (69, 99).

Można sugerować następującą kolejność reakcji wymaganych do rozpoczęcia syntezy łańcucha polipeptydowego: w wyniku interakcji metionyno-tRNA_F z kompleksem rybosom-kodon tworzy się złożony kompleks inicjujący, przy czym o dołączeniu go do donatorowej części rybosomu decyduje sama struktura metionyno-tRNA_F. Formylacja metionyno-tRNA_F związanego z rybosomami prowadzi do zmian konfiguracji metionyno-tRNA, nie wywiera natomiast wpływu na rozpoznanie kodonu (48). Po utworzeniu kompleksu formylometionyno-tRNA_F-rybosom-kodon możliwe jest już powiązanie z następnym aminoacylo-tRNA i utworzenie pierwszego wiązania peptydowego.

Ostatnie badania coraz wyraźniej wskazują na rolę struktury rybosomu w oddziaływaniu kodon-antykonon (77, 78, 85). Przypuszcza się, że dla zainicjowania syntezy łańcucha konieczna jest dysocjacja rybosomu 70S na podjednostki 30S i 50S, zachodząca pod wpływem kodonu determinującego koniec polipeptydu. Nomura i Lowry (77) sądzą, że podjednostki 30S rybosomu, występujące u *E. coli* (35, 40, 56), rozpoznają kodon inicjujący AUG i wiążą wybiórczo formylometionyno-tRNA_F tworząc kompleks formylometionyno-tRNA_F-podjednostka 30S, kodon, który udało się wyizolować (33, 77). Dopiero w następnym etapie dołącza się do tego kompleksu podjednostka 50S (77, 78). Powstają wówczas właściwe warunki do utworzenia pierwszego wiązania peptydowego i translacji dalszych kodonów znajdujących się w mRNA, w tym także kodonu AUG dla metioniny.

N-formylometionyno-tRNA_F jest niezbędnym czynnikiem w inicjacji, między innymi ze względu na zwiększenie stabilności połączenia rybosomu z kodonem inicjującym. Wiadomo jednak, że synteza homopolipeptydów przy użyciu syntetycznych oligonukleotydów typu poli U zachodzi w nieobecności specjalnego inicjatora. Według Nakamoto i Kolakofsky'ego (68) już samo zastosowanie jonów Mg²⁺ w stężeniach wyższych niż 0,01M wystarcza do stabilizacji kompleksu rybosom-kodon. Synteza polifenylalaniny w tych warunkach nie wymaga czynników inicjujących (54). Jednak jeśli syntezę tę prowadzić w obecności

poli U przy niższych stężeniach Mg^{2+} (0,006M), to wówczas zależy ona w bardzo znacznym stopniu od dodanych formylometionylo-tRNA lub peptydylo-tRNA (69). Przy 0,004M stężeniu jonów Mg^{2+} rolę czynnika inicjującego w syntezie polifenyloalaniny może również pełnić *N*-acetylofenyloalanylo-tRNA (52, 53, 69, 98). Co więcej, rybosomowe czynniki F_1 i F_2 jak również GTP, stymulują, podobnie jak w przypadku *N*-formylometionylo-tRNA_F, wiązanie *N*-acetylofenyloalanylo-tRNA z rybosomami (53, 69). Wyniki te potwierdzają hipotezę Nakamoto i Kofsky'ego, że właściwe ułożenie kilku aminoacylo-tRNA wystarcza do zainicjowania syntezy polipeptydu.

Formylometionylo-tRNA_F można uważać za inicjatora syntezy polipeptydów w bezkomórkowych układach bakteryjnych. Wyodrębnienie tego związku także z retikulocytów królika wskazywać może na jego bardziej uniwersalną rolę w biosyntezie białka (76). Jeśli tak jest, to synteza białek zależy również od dostępności fragmentów jednowęglowych i tetrahydrofolanu, niezbędnych do uformylenia metionylo-tRNA_F. Pewne potwierdzenie tej sugestii stanowi zarówno wysoka zdolność do inicjowania syntezy łańcucha polipeptydowego *in vitro* w retikulocytach (76), komórkach zawierających znaczną ilość enzymu syntetyzującego formylotetrahydrofolan (8), jak również uzależnienie wbudowywania aminokwasów do białek *E.coli* od dostępności formylometionylo-tRNA_F lub f^5FH_4 w warunkach zahamowania syntezy bądź tetrahydrofolanu (30, 51, 87) bądź też formylometionylo-tRNA_F (31).

LITERATURA

1. Adams J. M., Capecchi M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 147 (1966).
2. Allende J. E., Seeds N. W., Conway T. W., Weissbach H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1566 (1967).
3. Allende J. E., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 82 (1967).
4. Anderson J. S., Bretscher M. S., Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **215**, 490 (1967).
5. Anderson J. S., Dahlberg J. E., Bretscher M. S., Revel M., Clark B. F. C., *Nature* **216**, 1072 (1967).
6. Berg P., *Ann. Rev. Biochem.* **30**, 293 (1961).
7. Berg P., Bergmann F. H., Ofengrand E. J., Dieckemann M., *J. Biol. Chem.* **236**, 1726 (1961).
8. Bertino J. R., Simmons B., Donohue D. M., *J. Biol. Chem.* **237**, 1314 (1962).
9. Brawerman G., Eisenstadt J. M., *Biochemistry* **5**, 2784 (1966).
10. Bretscher M. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 289 (1966).
11. Bretscher M. S., Marcker K. A., *Nature* **211**, 380 (1966).
12. Brown J. C., Doty P., *Fed. Proc.* **26**, 457 (1967).
13. Capecchi M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1517 (1966).

14. Capecchi M. R., Abstr. I, Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo, Symp. I—4,3 1967.
15. Caskey C. T., Beaudet A., Wilcox M., Nirenberg M., *Fed. Proc.* **26**, 349 (1967).
16. Clark B. F. C., *J. Mol. Biol.* **28**, 167 (1967).
17. Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **207**, 1038 (1965).
18. Clark B. F. C., Marcker K. A., Abstr. III FEBS Meeting Warsaw 1966, G 11, str. 12.
19. Clark B. F. C., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **17**, 394 (1965).
20. Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **211**, 378 (1966).
21. Coutsogeorgopoulos C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 352 (1967).
22. Dickerman H. W., Steers E., jr., Redfield B. G., Weissbach H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 287 (1966).
23. Dickerman H. W., Smith B. Ch., *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 105 (1967).
24. Dickerman H. W., Steers E., jr., Redfield B. G., Weissbach H., *J. Biol. Chem.* **242**, 1522 (1967).
25. Dube S. K., Marcker K. A., Clark B. F. C., Cory S., *Nature* **218**, 232 (1968).
26. Economou A. E., Kolakofsky D., Nakamoto T., *Fed. Proc.* **26**, 457 (1967).
27. Economou A. E., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1033 (1967).
28. Eisenstadt J. M., Brawerman G., *Biochemistry* **5**, 2777 (1966).
29. Eisenstadt J. M., Brawerman G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1560 (1967).
30. Eisenstadt J. M., Lengyel P., *Science* **154**, 524 (1966).
31. Eisenstadt J. M., Lengyel P., Abstr. IV Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo Sessions A-F, C-101 (1967).
32. Ganoza M. C., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 273 (1966).
33. Ghosh H. P., Khorana H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 2455 (1967).
34. Ghosh H. P., Söl D., Khorana H. G., *J. Mol. Biol.* **25**, 275 (1967).
35. Green M.H., Hall B. D., *Biophys. J.* **1**, 517 (1961).
36. Gussin G. N., Capecchi M. R., Adams J. M., Argetsinger J. E., Tooze J., Weber K., Watson J. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 257 (1966).
37. Hershey J. W. B., Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **18**, 68 (1966).
38. Hershey J. W. B., Thach R. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 759 (1967).
39. Hille M. B., Miller M. J., Iwasaki K., Wahba A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1652 (1967).
40. Kaempfer R. O. R., Meselson M., Kaskas H. J., *J. Mol. Biol.* **31**, 277 (1968).
41. Kellogg D. A., Doctor B. P., Loebel J. B., Nirenberg M. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 912 (1966).
42. Kolakofsky D., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1786 (1966).
43. Khorana H. G., Büchi H., Ghosh H., Gupta N., Jacob T. M., Kössel H., Morgan R., Narang S. A., Ohtsuka E., Wells R. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 39 (1966).
44. Last J. A., Stanley W. M., jr., Salas M., Hille M. B., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1062 (1967).

45. Leder Ph., *Fed. Proc.* **26**, 457 (1967).
46. Leder Ph., Bursztyn H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 233 (1966).
47. Leder Ph., Bursztyn H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1579 (1966).
48. Leder Ph., Bursztyn H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 297 (1966).
49. Leder Ph., Clark B.F.C., w Genetic Elements, Properties and Function, Symposium on III FEBS Meeting, PWN, Warszawa 1967, str. 263.
50. Leder Ph., Nau M. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 774 (1967).
51. Lengyel P., Eisenstadt J., Abstr, IV, Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo, Sessions A-F, C-100 (1967.)
52. Lipmann F., Lucas-Lenard J., Nishizuka Y., Gottesman M. E., Gordon J., Takeda M., Wakabayashi K., Ganoza M. C., Abstr. I, Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo, Symp. II-4,6 (1967).
53. Lucas-Lenard J., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1050 (1967).
54. Lucas-Lenard J., Haenni A. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 554 (1968).
55. Maden B. E. H., Traut R. R., Monro R. E., Abstr. III FEBS Meeting, Warszawa 1966, F 56, str. 205.
56. Mangiarotti G., Schlessinger D., *J. Mol. Biol.* **20**, 123 (1966).
57. Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **14**, 63 (1965).
58. Marcker K. A., Abstr. II FEBS Meeting Vienna 1965, str. 280.
59. Marcker K. A., Clark B. F., Anderson J. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant* **31**, 279 (1966).
60. Marcker K. A., Dube S., Clark B. F. C., Abstr. IV FEBS Meeting Oslo, str. 229 (1967).
61. Marcker K. A., Sanger F., *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).
62. Matthaei H., Voigt H. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 730 (1967).
63. Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **26**, 147 (1967).
64. Monro R. E., Maden B. E. H., Traut R. R., w Genetic Elements, Properties and Function, Symposium on III FEBS Meeting, PWN, Warszawa 1967, str. 179.
65. Monro R. E., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **25**, 347 (1967).
66. Monro R. E., Vazquez D., *J. Mol. Biol.* **28**, 161 (1967).
67. Mukundan M. A., Hershey J. W. B., Dewey K. F., Thach R. E., *Nature* **217**, 1013 (1968).
68. Nakamoto T., Kolakofsky D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 606 (1966).
69. Nakamoto T., Hamel E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 238 (1968).
70. Neale S., Abstr. IV FEBS Meeting, Oslo, str. 369 (1967).
71. Nirenberg M., Leder Ph., *Science* **145**, 1399 (1964).
72. Nirenberg M., Leder Ph., Bernfield M., Brima'combe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1161 (1965).
73. Nishimura S., Narushima U., Harada F., Saneyoshi M., Abstr. IV, Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo, Sessions A-F (1967).
74. Nishizuka Y., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 212 (1966).
75. Nishizuka Y., Lipmann F., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 344 (1966).
76. Noll H., *Science* **151**, 1241 (1966).
77. Nomura M., Lowry Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 946 (1967).
78. Nomura M., Lowry Ch., Guthrie Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1487 (1967).

79. Ochoa S., Wahba A. J., Stanley W. M., Salas M., Vinuela E., Smith M. A., Hille M. B., Last J. A., Elson N. A., Abstr. IV, Seventh Intern. Congr. of Biochem. Tokyo, Sessions A-F (1967)
80. Ohta T., Sarkar S., Thach R. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1638 (1967).
81. Revel M., Gros F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 124 (1966).
82. Richmond M. H., *Bacteriol. Rev.* **26**, 398 (1962).
83. Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 387 (1967).
84. Salas M., Miller M. J., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1865 (1967).
85. Schlessinger D., Mangiarotti G., Apirion D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1782 (1967).
86. Schwartz J. H., *J. Mol. Biol.* **30**, 309 (1967).
87. Shih A. Y., Eisenstadt J., Lengyel P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1599 (1966).
88. Smith J. D., Traut R. R., Blackburn G. M., Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **13**, 617 (1965).
89. Söll D., Cherayil J., Jones D. S., Faulkner R. D., Hempel A., Bock R. M., Khorana H. G., *Cold Spring Harbor. Symp. Quant* **31**, 51 (1966).
90. Stanley W. M., jr., Salas M., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 290 (1966).
91. Sundararajan T. A., Thach R. E., *J. Mol. Biol.* **19**, 74 (1966).
92. Svensson J., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 253 (1967).
93. Thach R. E., Dewey K. F., Mykolajewicz N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1103 (1967).
94. Thach R. E., Sundararajan T. A., Dewey K. F., Brown J. C., Doty P., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 85 (1966).
95. Traut R. R., Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **10**, 63, (1964).
96. Trupin J., Dickerman H. W., Nirenberg M., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 50 (1966).
97. Vinuela E., Salas M., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 729 (1967).
98. Verhoef N. J., Reinecke C. J., Bosch L., *Biochim. Biophys. Acta* **149**, 305 (1967).
99. Voigt H. P., Matthaei H., *Z. Physiol. Chem.* **349**, 65 (1968).
100. Wahba A. J., Last J. A., Stanley W. M., jr., Salas M., Hille M. B., Ochoa S., Abstr. IV FEBS Meeting Oslo 1967, str. 122.
101. Wahba A. J., Salas M., Stanley W. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 103 (1966).
102. Waller J. P., *J. Mol. Biol.* **7**, 483 (1963).
103. Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder H. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 155 (1966).
104. Yarmolinsky M. B., de la Haba G. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1721 (1959).
105. Zamir A., Leder Ph., Elson D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1794 (1966).
106. Zinder N. D., Engelhardt D. L., Webster R. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant.* **31**, 251 (1966).

JANINA MALEC*

Białka jądra komórkowego a mechanizm kontroli genetycznej

Nuclear Proteins and the Mechanism of Gene Control

The actual views on some properties and possible function in gene control of histones and other nuclear proteins are presented.

Równocześnie z gromadzeniem wiadomości o roli DNA w mechanizmie działania genów oraz o sposobie przekazywania informacji genetycznej z DNA na komórkowy aparat biosyntezy białka, coraz większe zainteresowanie zaczął budzić mechanizm kontroli genów, stanowiący podstawę rozwoju i różnicowania poszczególnych komórek organizmu.

Według przyjętego poglądu każda (lub ściślej prawie każda) komórka w organizmie zawiera pełny komplet genów warunkujących różne funkcje rozmaitych rodzajów komórek, a więc taki sam zestaw DNA. W każdej komórce zatem musi działać aktualnie nie cały zestaw genów, lecz tylko jego część, prawdopodobnie zresztą niewielka, nadając tej komórce jej tylko właściwy charakter funkcjonalny i strukturalny. Ilustracją tej sytuacji może być cytowane według Buscha i Steele (19) obliczenie: komórka wątroby ludzkiej zawiera 8—12 pg DNA, zaś średni ciężar cząsteczkowy nukleotydów wynosi 325. Liczba nukleotydów w jądrze waha się więc w granicach $1,5—1,9 \times 10^{10}$. Ponieważ trzy nukleotydy kodują jeden aminokwas, a dwupasmowy DNA koduje jedno pasmo mRNA, całkowita liczba jednostek kodujących w jednym jądrze mieści się w granicach $2,2—3,5 \times 10^9$. Jeżeli przyjąć dalej, że średni ciężar cząsteczkowy DNA w komórce wynosi 10^7 to odpowiada to około 700 000 cząsteczek DNA, z których każda zawiera około 5 000 efektywnych kodonów, przy założeniu, że nie ma wśród nich informacji nonsensownych. Tak więc dwupasmowy DNA każdej komórki mógłby kodować około 3 000 000 różnych białek o średnim ciężarze cząsteczkowym 50 000 czyli zbudowanych z około 400 aminokwasów. Przypuszcza się zaś, że aktualnie działa w komórce przeciętnie około 30 000 matryc. Musi zatem istnieć jakiś mechanizm, który włącza lub wyłącza aktywność pewnych genów w zależności od charakteru komórki. Jeżeli jednak każda komórka

* Dr med., Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, Warszawa

tego samego organizmu posiada ten sam zestaw DNA, to oczywiście DNA nie może sam pełnić roli regulatora tego procesu.

Jacob i Monod (45) przypuszczali, że rolę regulatora pełni RNA, co jednakże wydaje się mało prawdopodobne, już choćby ze względów ilościowych, ponieważ stanowi on mniej niż 20% kompleksu dezoksyrybonukleoproteinowego chromosomu. Natomiast białka stanowią blisko 60% całej masy chromosomu i z tego względu białko jądrowe mogłoby być regulatorem procesów genetycznych. W 1943 roku Stedmanowie (79) wysunęli hipotezę, że regulatorem tym są histony. Podstawą jej było stwierdzenie, że w różnych rodzajach komórek histony występują w niejednakowych ilościach, przy czym komórki znajdujące się w spoczynku zawierają ich procentowo znacznie więcej niż komórki intensywnie dzielące się, przede wszystkim komórki embrionalne i nowotworowe. Hipoteza ta, mająca dzisiaj znaczenie już raczej tylko historyczne, stała się jednym z bodźców do intensywnych badań nad białkami jądra komórkowego.

Białka jądrowe, chociaż stanowią bardzo złożoną grupę białek, można ogólnie podzielić na dwie duże grupy: białka zasadowe i białka kwaśne i jakkolwiek niewątpliwie istnieją w jądrze bardzo ścisłe związki między nimi, ich własności są dostatecznie różne, aby rozpatrywać je jako odrębne jednostki zarówno pod względem strukturalnym jak funkcjonalnym.

I. Białka zasadowe

Białka zasadowe wyodrębnione z kompleksów nukleoproteidowych różnego typu komórek początkowo podzielono na dwie grupy: na protaminy (pochodzące z komórek spermy ryb) i histony (z komórek somatycznych). Podział ten stał się w ostatnich latach przedmiotem żywych sporów nomenklaturowych w związku z trudnością sformułowania zgodnej ze współczesnym stanem wiedzy definicji obu tych rodzajów białek. Jakkolwiek większa część zawartych w jądrze komórkowym białek zasadowych znajduje się w kompleksie z DNA w chromatynie komórki interfazowej, białka takie znajdują się również i w soku jądrowym. Termin histony nie jest więc synonimem białek zasadowych jądra komórkowego. W roku 1963 Murray (61) sformułował następującą definicję, wspólną dla protamin i histonów, określając je razem terminem histonów: „histony są to białka zasadowe, które niekiedy są związane z DNA”. Interpretując fakt objęcia wspólną nazwą białek zaliczanych dotychczas do dwóch odrębnych grup Murray podkreśla, że podział ten był najzupełniej umowny i w świetle współczesnego stanu wiedzy utrzymywanie go dłużej jest nieuzasadnione. Histony i protaminy mogą być bowiem uważane za białka homologiczne, a różnice między nimi nie są ani większe ani inne niż pomiędzy poszczególnymi typami histonów. W definicji Murraya

została również pominięta właściwość uważana jeszcze niedawno za charakterystyczną cechą histonów, a mianowicie brak w ich składzie aminokwasowym tryptofanu i cysteiny. Za pomocą bardziej nowoczesnych metod analitycznych stwierdzono bowiem obecność obu tych aminokwasów w preparatach histonów, nie wiadomo jednak czy jest ona związana z zanieczyszczeniami preparatów histonowych jakimiś innymi białkami czy też te aminokwasy stanowią właściwy składnik jakiegoś typu histonów.

Swój zasadowy charakter zawdzięczają histony sięgającej 30% zawartości zasadowych aminokwasów, przede wszystkim lizyny i argininy. Stosunek ilościowy histonów do DNA w kompleksie nukleohistonowym nie jest jeszcze całkowicie ustalony. Według większości badaczy (54, 69) grupy aminowe histonów występują w ilości odpowiadającej około 80—90% grup fosforanowych DNA, *Dou n c e* (34) jednakże utrzymuje, że w normalnej wątrobie stosunek ten dochodzi do 2, podczas gdy w wątrobie regenerującej i guzach nowotworowych jest bliski 1. Pełny preparat histonów wyekstrahowanych kwasem z jąder komórkowych jest zawsze złożoną mieszaniną tych białek, która w elektroforezie na żelu skrobiowym (38, 48, 62, 63) i żelu akrylamidowym (29, 62) daje kilkanaście prążków. Liczne próby frakcjonowania tych heterogennych preparatów w różnych laboratoriach i różnymi metodami nie doprowadziły dotychczas do otrzymania żadnej z frakcji w stanie całkowitej homogenności. Ustalono jednak, że mogą być one podzielone na grupy różniące się zawartością zasadowych aminokwasów. Wobec narastającego zamętu nomenklaturowego *Phillips* (69) zaproponował w 1962 roku tymczasowy, opisowy podział histonów na następujące frakcje:

	Stosunek liz : arg
Frakcja bogata w lizynę	4
Frakcja średnio bogata w lizynę	1—4
Frakcja bogata w argininę	1

Różnice w składzie i w sekwencji aminokwasów między głównymi grupami histonów jak również między peptydami, pochodzącymi z różnych frakcji (21, 69), nasuwają przypuszczenie, że nieregularność w układzie reszt zasadowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego histonów poszczególnych rodzajów musi powodować nieregularność wiązania histonów z DNA. Jest zatem raczej nieprawdopodobne, aby jedyną rolą histonów w nukleoproteidowym kompleksie było proste zobojętnianie reszt fosforanowych DNA, jak to początkowo przypuszczano. Jakkolwiek proponowano kilka modeli kompleksu DNA z histonem, żaden z nich nie jest całkowicie zadowalający (15). Za pomocą fizycznych metod badania struktury makrocząsteczek, przede wszystkim analizy rentgenowskiej i w podczerwieni, stwierdzono, że czysty DNA przedstawia strukturę

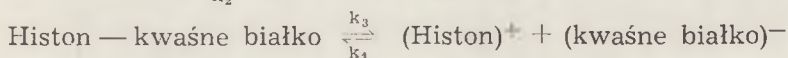
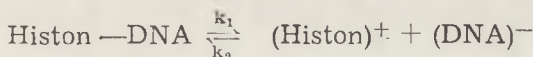
może blokować więcej niż jeden kodon lub jeżeli zablokowanie jednego kodonu byłoby wystarczające dla zahamowania syntezy całego łańcucha RNA, wówczas w jądrze znajduje się znacznie więcej histonów niż to jest potrzebne dla zablokowania całego genomu. Z drugiej strony, jak już wspomniano wyżej, histony znajdujące się w jądrze zawierają wystarczającą ilość grup aminowych dla zablokowania 80—90% grup fosforanowych DNA.

Jeżeli histony spełniałyby rzeczywiście funkcję regulatora syntezy RNA na matrycy DNA blokując poszczególne geny, to powinny istnieć jakaś wysoce swoista interakcja pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami DNA a blokującymi je histonami. Nasuwa się więc pytanie, czy histony posiadają wystarczającą ilość informacji, aby pełnić tę funkcję, a jeżeli tak, to jak te informacje są w nich zaszyfrowane? W takim wypadku wydaje się konieczne istnienie co najmniej setek histonów różniących się budową chemiczną, wzajemnymi stosunkami ilościowymi, szybkością syntezy itp., właściwych poszczególnym tkankom tego samego organizmu i odmiennych dla organizmów różnych gatunków. Na występowaniu tego rodzaju różnic świadczących o swoistości narządowej i gatunkowej histonów opierali swoją teorię Stedmanowie. Jednakże wraz z rozwojem metod izolowania i badania histonów okazało się, że poza niewielkimi różnicami w składzie względnie w sekwencji aminokwasów (ang. *finger-printing*) podobnymi do tych, jakie stwierdzono w wielu innych białkach zwierzęcych, nie występują żadne istotne różnice jakościowe między histonami różnych narządów i różnych gatunków ssaków (22, 23, 37, 38, 54, 65, 69), a nawet ryb (67) i guzów nowotworowych (31, 32, 37, 53, 54, 65). Jediną tkanką zwierzęcą zawierającą odmienny od innych tkanek zwierzęcych skład histonów są — według niepotwierzonego dotychczas doniesienia Neelina i wsp. (64) — erythrocyty kurczęcia. Odmienny skład histonów stwierdzono także w pszenicy (48), w której nie ma frakcji bogatej w argininę. Toteż obecnie uważa się, że przynajmniej w tkankach zwierzęcych istnieje nie więcej niż około 20 typów histonów, z których znakomitą większość stanowi około 8—10 typów. Według Phillipsa (69) jeden typ histonu jest związany z wieloma grupami fosforanowymi DNA, a związek ten raczej nie jest przypadkowy.

Doniesienia na temat swoistości hamującego działania głównych frakcji histonowych na syntezę RNA są kontrowersyjne. Allfrey i wsp. (4, 5, 6) oraz Huang i wsp. (44) stwierdzili, że frakcja bogata w lizynę różni się swoimi hamującymi własnościami od frakcji bogatej w argininę. Ming i wsp. (58) badając inhibicję polimerazy RNA przez histony zaobserwowali, że w układzie izolowanych jąderek wytwarzają się różne typy RNA (C+G lub U+A) w zależności od dodania do układu różnych frakcji histonowych. Barr i Butler (7) natomiast utrzymują, że działanie histonów jest nieswoiste. Także w badaniach nad wiązaniem się wyodrębnionego DNA z różnymi frakcjami histonów nie zna-

leżono żadnego dowodu na swoistość interakcji pomiędzy poszczególnymi typami histonów a fragmentami łańcuchów DNA o różnym składzie (47, 49). Zaobserwowano jednak, że pełny preparat DNA wykazuje różną zdolność wiązania poszczególnych frakcji histonowych. Do wytrącenia tej samej ilości DNA z roztworu potrzeba dużo mniejszej ilości frakcji F 1 (0,6—0,8 mg na 1 mg DNA) niż frakcji pozostałych, a największej ilości frakcji F 2a (2,6 mg na 1 mg DNA). Efekt ten trudno jest przypisać prostej różnicy wartości dodatniego ładunku na cząsteczkach poszczególnych typów histonów. Pochodzi on raczej, jak sugerują autorzy doświadczenia, z różnicy ilości reszt zasadowych dostępnych (na skutek odpowiedniego ułożenia przestrzennego cząsteczki histonu) dla reszt fosforanowych DNA. Jest możliwe na przykład, że histony typu frakcji F 1 są rozciągnięte wzdłuż pasm DNA, pokrywając dzięki temu znacznie większą część cząsteczki DNA niż inne typy histonów o odmiennym kształcie cząsteczek. Różnice w układzie przestrzennym kompleksów różnych typów histonów z DNA mogłyby wpływać na kondensację względnie rozluźnienie zwojów DNA, jak to proponował Zubay. Nie są to jednak różnice o tym stopniu swoistości i zróżnicowania, aby jedynie od nich mogła być uzależniona całość procesów kontroli genetycznej. Wobec tych faktów wydaje się więc bardzo nieprawdopodobne, aby kontrola poszczególnych genów należała wyłącznie do samych histonów, są one raczej czynnikiem generalnie blokującym cały genom. Musiałyby zatem istnieć jeszcze inne, bardziej swoiste czynniki kierujące procesem odblokowywania pojedynczych genów względnie nadające tę swoistość histonom.

Czynnikiem nadającym histonom swoistość mogłoby być na przykład tworzenie odwracalnego kompleksu kwaśnego białka z histonem, jak to proponują Busch i wsp. (20):



Według Butlera (24) kwaśne białka tworzą połączenia z pewną częścią DNA chromosomów stanowiącego jakby rdzeń chromosomu, podczas gdy pozostała przeważająca część DNA występuje w postaci nukleohistonu. DNA rdzenia chromosomu, związany z kwaśnym białkiem, funkcjonowałby jako gen regulujący, zaś histony regulowałyby aktywność genów operatorowych. W takim wypadku możnaby się było spodziewać, że białka związane z genem regulującym tworzą się bezpośrednio na miejscu swojego przeznaczenia lub w bardzo bliskim jego sąsiedztwie. Wyniki doświadczeń Patela i Wanga (68) sugerujące, że kwaśne białka chromatyny są tworzone bezpośrednio na matrycy DNA, pasują z tego punktu widzenia do hipotezy Butlera. Udział kwaśnych białek w mechanizmie kontroli genetycznej zapewniłby znacznie szersze możliwości swoistego sprawowania tej kontroli, bowiem z uwagi na swój kwaśny

charakter białka te mają dużo bardziej urozmaicone możliwości tworzenia swoistych wiązań z DNA, na przykład wiązań wodorowych, podczas gdy histony są związane z DNA wyłącznie lub prawie wyłącznie przez wiązania jonowe.

Ostatnie lata przyniosły szereg informacji, które znowu zwracają większą uwagę na histony w procesie regulacji genetycznej i każą wątpić, czy rola ich w tym procesie jest rzeczywiście tak bierna i nieswoista jak to wynikałoby z poprzednio otrzymanywnych wyników. Źródłem bardzo znacznej ilości tych informacji są badania nad stymulowanymi fitohemaglutyniną (PHA) limfocytami, które są szczególnie dogodnym modelem dla eksperymentów nad aktywacją aparatu genetycznego komórki. Jak wiadomo, po dodaniu PHA w odpowiednim stężeniu do zawiesiny prawidłowych limfocytów z krwi obwodowej następuje ich transformacja w formy blastyczne, przy czym stwierdza się najpierw znaczne wzmoczenie biosyntezy białka i RNA, następnie zaś DNA i wystąpienie mitoz (28, 71). Na modelu tym stwierdzono, że bardzo wczesnym objawem aktywacji genomu, w okresie gdy nie ma jeszcze śladu wzmoczenia syntezy histonów i DNA, występuje intensywne acetylowanie i metylowanie histonów (3, 71), nie hamowane przez inhibitory biosyntezy białka, na przykład puromycynę. W tym samym okresie, mniej więcej już po upływie 60 minut od dodania PHA, a jeszcze przed pobudzeniem syntezy jakiegokolwiek białka lub RNA, zaobserwowano sięgające 100% wzmoczenie inkorporacji radioaktywnego fosforu do białek jądra, przy czym najwyższy obrót związanego z białkiem fosforu obserwuje się we frakcji kwaśnych białek chromatyny (50). Co więcej, wyższa koncentracja fosfoproteidów występuje w regionach luźnej, czyli czynnej w procesie syntezy RNA chromatyny. Fosforylacja białek jest również niezależna od procesu biosyntezy białka i nie ulega zahamowaniu przez inhibitory tej syntezy. Kwaśne białka chromatyny zawierają fosfor w stosunkowo dużej ilości to znaczy około 1—1,2%, co odpowiada 4—5 grupom fosforanowym na 100 reszt aminokwasowych (50). Jest zatem bardzo prawdopodobne, że obecność fosfoproteidów o dużym skupieniu ładunków ujemnych uwarunkowanych obecnością fosforu, może zmodyfikować interakcję pomiędzy histonami a DNA w odpowiednim obszarze chromatyny i w ten sposób wpłynąć na aktywność matrycy DNA. Stwierdzono zresztą, że *in vitro* zachodzi interakcja fosfoproteidów z histonami i że utworzenie kompleksu z tymi białkami zmniejsza hamujące działanie histonów na zależną od DNA syntezę RNA (50, 51). W histonach obecne są także grupy -SH i fosforanowe, ilość ich jest różna w różnych frakcjach histonowych (46, 66, 70); obok zatem acetylowania i metylowania reakcje fosforylacji oraz utleniania grup -SH w histonach i innych białkach jądra mogą stanowić procesy wpływające na zdolność syntezy RNA w nukleochromatynie.

W teorii wyjaśniającej mechanizm kontroli ekspresji genów musi zna-

leżć się również wyjaśnienie faktu ciągłej syntezy histonów w komórkach nie dzielących się. Ponieważ akumulacja ich występuje wyłącznie w związku z replikacją DNA, całkowita ich ilość w jądrze jest ściśle skorelowana z ilością DNA. Tymczasem, jak już wspomniano powyżej, we wszystkich komórkach zachodzi obrót histonów i jest on różny w czterech różnych frakcjach histonowych w komórkach tego samego rodzaju. Histony nie są więc częścią stałego aparatu genetycznego komórki. Spadling i wsp. (77) postulują istnienie dwóch zasadniczych pod względem funkcjonalnym frakcji histonów w komórce — frakcji metabolicznie stałej oraz frakcji ulegającej stałemu obrotowi. Frakcja o większej aktywności metabolicznej zawierałaby histony znajdujące się w pobliżu genów aktualnie czynnych w syntezie RNA, współdziałające w tej syntezie oraz ulegające odnowie wraz z obrotem RNA. Frakcja metabolicznie stała byłaby związana z genami o aktywności potencjalnej, lecz nie działającymi aktualnie. Koncepcja, że histony mogą być bezpośrednio zaangażowane w metabolizmie RNA jest tym bardziej interesująca, że Huang i Bonner (43) w kiełkach grochu, a Benjamin i wsp. (8) w komórkach ssaków znaleźli kompleks histonu z RNA. RNA ten był odporny na działanie RN-azy do czasu uwolnienia z kompleksu i heterogenny w gradiencie sacharozy, a jego skład wskazywał, że nie był to ani RNA rybosomów ani przenoszący. Bardzo ciekawe z tego punktu widzenia wydają się również obserwacje Bonnera (13), że RNA występujący w kompleksie z histonem jest równocześnie związany z DNA na co wskazuje fakt, że sedymentuje on razem z DNA nawet po enzymatycznym odtrawieniu z kompleksu komponentu histonowego. W związku z tym Bonner sugeruje, że rolą histonu w kompleksie RNA-nukleohiston jest blokowanie odpowiedniego odcinka DNA, zaś RNA — funkcja operatora—detektora sekwencji nukleotydów DNA. Za słusnością tej sugestii przemawia wspomniany już fakt, że RNA związany z histonem jest wysoce niejednorodny. Próby jego hybrydyzacji z DNA całego genomu wykazały, iż w stanie wysycenia tym RNA związaniu ulega około 5% całkowitego DNA, podczas gdy tylko 0,3% tego samego DNA tworzy hybrydy z RNA rybosomów, a około 0,05% z RNA przenoszącym z tych samych komórek.

Z zagadnieniem udziału białek w procesie kontroli genetycznej wiąże się ściśle problem zaburzenia tej kontroli w komórkach nowotworowych. Toteż od wielu lat trwają badania mające na celu wykrycie cech różniących białka jądra komórki prawidłowej i nowotworowej. Badania te jednakże nie wniosły dotychczas nic prawdziwie istotnego. Sygnalizowany z kilku pracowni fakt znalezienia jakiegoś specjalnego histonu występującego wyłącznie w komórkach nowotworowych (określanego nazwą RP-P-L) (14, 30, 56), nie został potwierdzony i właściwie jedyną bezsporną różnicą pomiędzy białkami komórki nowotworowej a prawidłowej jest aktywność metaboliczna histonów. Mianowicie w komórkach nowo-

tworowych zdolność wbudowywania aminokwasów do histonów jest wyższa niż do białek homogenatu z całej komórki oraz do białek frakcji cytoplazmatycznych, podczas gdy w komórkach prawidłowych wbudowywanie do histonów jest mniejsze niż do innych białek komórkowych (16, 18, 21, 78). Trzeba dodać jednak, że nie jest to wyłącznie cecha komórek nowotworowych, gdyż szybkość obrotu histonów rośnie wraz ze wzrostem szybkości podziałów komórkowych tkanki (39, 52, 81). Wreszcie coraz większe zainteresowanie budzą stosunkowo dotychczas bardzo mało zbadane dwa inne zjawiska, w których zachodzi w warunkach fizjologicznych aktywacja genomu pod wpływem bodźca pochodzącego z zewnątrz komórki: transformacja komórek pod wpływem antygeny oraz reakcja komórki wrażliwej na stymulację hormonalną. Istnieją nieliczne na razie doniesienia, że zarówno w komórkach stymulowanych antygenem (9) jak i pod wpływem działania hormonów (74, 75) zachodzą zmiany w histonach. Bliższe poznanie obu tych procesów rzuci niewątpliwie dodatkowe światło na działanie mechanizmów kontroli genetycznej.

LITERATURA

1. Alfert M., Geschwind I. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **39**, 991 (1953).
2. Alfert M., w *The Chemical Basis of Heredity*, red. W. D. Mc Elroy i B. Glass, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, str. 186.
3. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 786 (1964).
4. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 414 (1963).
5. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1590 (1962).
6. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 247 (1963).
7. Barr G. C., Butler J. A. V., *Nature* **199**, 1170 (1963).
8. Benjamin F., Levander O. A., Gellhorn A., De Bellis R. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 585 (1966).
9. Black M. M., Ausley H. R., *J. Cell. Biol.* **26**, 797 (1965).
10. Bloch D. P., *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 137 (1962).
11. Bloch D. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 324 (1962).
12. Bonner J., Huang R. C., *J. Mol. Biol.* **6**, 169 (1963).
13. Bonner J., w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis*, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—Londyn—New York 1967, str. 211.
14. Busch H., *An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell*, Academic Press New York—Londyn 1962.
15. Busch H., *Histones and other Nuclear Proteins*, Academic Press, New York—Londyn 1965.
16. Busch H., Davis J. R., Anderson D. C., *Cancer Res.* **18**, 916 (1958).
17. Busch H., Firszt D. C., Lipsey A., Kohen A., Amer S., *Biochem. Pharmacol.* **7**, 123 (1961).
18. Busch H., Starbuck W. C., *Annual Rev. Biochem.* **33**, 519 (1964).

19. Busch H., Steele V. J., *Advan. Cancer Res.* **8**, 42 (1964).
20. Busch H., Steele V. J., Hnilica L. S., Taylor C. W., Mavioglu H., *J. Cell Com. Physiol.* **62**, 95 (1963).
21. Butler J. A. V., w *The Nucleohistones*, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 36.
22. Butler J. A. V., *J. Gen. Physiol.* **45**, 195 (1962).
23. Butler J. A. V., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**, 349 (1963).
24. Butler J. A. V., *Nature* **207**, 1041 (1965).
25. Butler J. A. V., Cohn F., *Biochem. J.* **87**, 330 (1963).
26. Callan H. G., Mac Gregor H. C., *Nature* **181**, 1479 (1958).
27. Choraży M., Bendich A., Borenfreund E., Hutchison D. J., *J. Cell Biol.* **19**, 59 (1963).
28. Cooper H. L., Rubin H. D., *Blood* **25**, 1014 (1965).
29. Cruft H. J., w *The Nucleohistones*, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 72.
30. Davis J. H., Busch H., *Cancer Res.* **19**, 1157 (1959).
31. Davison P. F., *Biochem. J.* **66**, 703 (1957).
32. Davison P. F., *Biochem. J.* **66**, 708 (1957).
33. De D. N., *Nature* **203**, 343 (1964).
34. Dounce A. L., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**, 126 (1963).
35. Flamm W. G., Birnstiel M. L., w *The Nucleohistones*, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 230.
36. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1026 (1963).
37. Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 163 (1966).
38. Hnilica L. S., Johns E. W., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **82**, 123 (1962).
39. Hnilica L. S., Kappler H. A., Hnilica V. S., *Science* **150**, 1470 (1965).
40. Holoubek V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **110**, 759 (1962).
41. Horn E. C., Ward C. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 776 (1957).
42. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1216 (1962).
43. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 960 (1965).
44. Huang R. C., Bonner J., Murray K., *J. Mol. Biol.* **8**, 54 (1964).
45. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
46. Jellum E., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 95 (1966).
47. Jellum E., Nygaard O. F., Harrington E., Eldjarn L., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 612 (1966).
48. Johns E. W., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **84**, 436 (1962).
49. Johns E. W., Butler J. A. V., *Nature* **204**, 853 (1964).
50. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1182 (1966).
51. Langan T. A., w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis*, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—Londyn—New York 1967, str. 233.
52. Laurence D. J. R., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **96**, 53 (1965).
53. Laurence D. J. R., Phillips D. M. P., Butler J. A. V., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 338 (1966).
54. Laurence D. J. R., Simson P., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **87**, 200 (1963).
55. Littau V. C., Burdiele C. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1204 (1965).
56. Mac Gillivray A. J., Greenwood F. C., *Biochem. J.* **85**, 39P (1962).

57. Mazia D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9**, 40 (1941)
58. Ming C., Hnilica L. S., Hulbert R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 626 (1965).
59. Mirsky A. E., Ris H. J., *J. Gen. Physiol.* **31**, 7 (1947).
60. Mirsky A. E., Ris H. J., *J. Gen. Physiol.* **34**, 475 (1950).
61. Murray K., w The Nucleohistones, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day. Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 15.
62. Murray K., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 209 (1965).
63. Neelin J. M., Connel G. E., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 539 (1959).
64. Neelin J. M., Butler G. C., cyt. wedlug H. Busch, Histones and Other Nuclear Proteins, Academic Press, New York—Londyn, 1965.
65. Neidle A., Waelsch H., *Science* **145**, 1059 (1964).
66. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **102**, 631 (1967).
67. Palau J., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **100**, 779 (1966).
68. Patel G., Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 314 (1965).
69. Phillips D. M., *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **12**, 211 (1962).
70. Phillips D. M., *Biochem. J.* **97**, 669 (1965).
71. Pogo B. G., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 805 (1966).
72. Prescott D. M., *Exptl. Cell Res.* **19**, 228 (1960).
73. Ris H., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—Londyn—New York 1967, str. 11.
74. Sluyser M., *Nature* **211**, 1347 (1966).
75. Sluyser M., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—Londyn—New York 1967, str. 225.
76. Somers C. E., Cole A., Hsu T., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**, 220 (1963).
77. Spadling J., Kajiwara K., Mueller G. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1535 (1966).
78. Starbuck W. C., Busch H., *Cancer Res.* **20**, 891 (1960).
79. Stedman E., Stedman E., *Nature* **152**, 556 (1943).
80. Stedman E., Stedman E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 244 (1947).
81. Steele W. J., Busch H., *Cancer Res.* **23**, 1153 (1963).
82. Strozier W. N., Nyhan W. L., *Cancer Res.* **22**, 1332 (1962).
83. Swift H., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**, 54 (1963).
84. Swift H., w The Nucleohistones, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day. Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 169.
85. Taylor J. H., w Molecular Genetics, część I, red. J. H. Taylor, Academic Press, Londyn 1963, str. 65.
86. Wang T. Y., *J. Biol. Chem.* **242**, 1220 (1967).
87. Wolff S., w Intern. Symp. Genes and Chromosomes Structure and Function, red. J. S. Valencia i R. F. Grell, National Cancer Inst., Bethesda, Maryland, 1965, str. 155.
88. Zubay G., w The Nucleohistones, red. J. Bonner i P. Ts'o, Holden-Day. Inc. San Francisco—Londyn—Amsterdam 1964, str. 95.
89. Zubay G., Doty P., *J. Mol. Biol.* **1**, 1 (1959).
90. Zubay G., Wilkins M.H.F., *J. Mol. Biol.* **4**, 444 (1962).

LUDWIKA ZAGÓRSKA*

Informacja genetyczna w rozwoju zarodkowym

Expression of Gene Action during Embryogenesis

Synthesis of mRNA and protein during embryogenesis is described. The mechanisms of the control of embryonic development are discussed.

Informacje genetyczne dotyczące budowy i funkcji organizmów przekazywane są z pokolenia na pokolenie za pośrednictwem kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Informacje te zapisane sekwencją zasad DNA decydują o swoistości syntetyzowanych białek. Odczytywanie informacji zachodzi w dwóch etapach: w pierwszym (transkrypcja) — tworzy się mRNA o sekwencji zasad komplementarnej do matrycy DNA i w tej formie zapis zostaje przeniesiony do rybosomów — miejsca syntezy białka; w drugim etapie (translacja) na podstawie informacji zawartej w mRNA syntetyzuje się białko (23, 38, 41, 51). Zespół białek istniejący w komórce decyduje o jej fenotypie.

Nie wszystkie jednak informacje zawarte w DNA zostają wykorzystane przez komórkę. Przykładem mogą tu być komórki zróżnicowanych tkanek. We wszystkich tych komórkach występuje taki sam DNA (33), jednakże w zależności od rodzaju tkanki syntetyzują one różne białka i spełniają różne czynności.

Podobnie jest również w czasie rozwoju embrionalnego. Jeżeli przyjąć, że w wyniku podziałów mitotycznych następuje zawsze wierna replikacja DNA, każda komórka rozwijającego się zarodka powinna zawierać DNA będące kopią DNA zapłodnionego jaja. W czasie rozwoju powstają jednak stopniowo z jednej komórki, jaką jest zapłodnione jajo, różne typy komórek. Zachodzi więc pewien wybór informacji zawartych w DNA — w zależności od etapu rozwoju i od umiejscowienia komórki, tylko pewna część tych wiadomości zostaje wykorzystana.

Musi zatem istnieć precyzyjny mechanizm kontrolujący akcję genów podczas rozwoju embrionalnego. Zakłada się, że może on działać zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. W pierwszym przypadku odczytywane byłyby tylko pewne określone odcinki nici DNA, w związku

* Mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

z czym tworzący się mRNA niósłby tylko informację zawartą w tych fragmentach. W drugim przypadku, mRNA istniejący w komórce zawierałby całość informacji zapisanej w DNA, ale w takiej formie, że tylko część z nich byłaby dostępna dla aparatu syntezy białka.

I. Układ syntezy białka w niezapłodnionym i zapłodnionym jaju

W niezapłodnionym jaju synteza białka nie odbywa się (26, 50). Liczne prace wskazują jednak, że zawiera ono wszystkie elementy układu biosyntezy białka. Z prac Maggio i Catalano oraz Stavvy'ego i Grossa (50) wynika, że w niezapłodnionym jaju występują wszystkie czynniki rozpuszczalne biorące udział w powstawaniu białka.

Wykazano także, że w niezapłodnionym jaju występuje mRNA. Brown i Littna (4) po wstrzyknięciu $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ w jajo *Xenopus laevis* przed owulacją wyizolowali z niezapłodnionych jaj heterogeny, wysokocząsteczkowy ^{32}P -RNA, który został zsyntetyzowany w czasie oogenezy. Jajo zawiera 1—6 μg tego typu RNA, co stanowi ilość 100—600 razy większą od ilości DNA zawartego w jaju (6). Obecność wysokocząsteczkowego nierybosomowego RNA stwierdzono również w jaju jeżowca (17, 18, 54). Maggio i wsp. (26) wykazali, że RNA z niezapłodnionych jaj jeżowca *Paracentrotus* stymuluje włączenie aminokwasów do białek w układzie bezkomórkowym pochodzącym z wątroby, zatem spełnia rolę mRNA. Slater i Spiegelman (43) stwierdzili, że RNA z niezapłodnionego jaja jeżowca *Lytechinus pictus* wykazuje w układzie bezkomórkowym z *E. coli* tylko 4—5% aktywności w porównaniu z oczyszczonym RNA faga MS-2, uważanym za czysty mRNA. Zatem mRNA stanowi w niezapłodnionym jaju jeżowca 4—5% ogólnej ilości RNA.

Za istnieniem mRNA w niezapłodnionym jaju przemawiają również pewne dane pośrednie. Bezjądrowe fragmenty jaja jeżowca, pobudzone partenogenetycznie do rozwoju, początkowo syntetyzują białko z taką samą intensywnością co normalne zarodki (3, 13). Synteza białka zachodzi także w zarodkach rozwijających się w obecności aktynomycyny D (15, 16, 19, 44) hamującej syntezę RNA zależną od DNA. W obydwu tych przypadkach synteza mRNA nie może zachodzić, należy zatem przyjąć, że syntezą białka w pierwszych etapach rozwoju zarodka kieruje mRNA, który był obecny w jaju przed zapłodnieniem.

Można więc powiedzieć, że niezapłodnione jajo posiada zmagazynowany RNA; zawarta w nim informacja nie jest jednakże odczytywana przed zapłodnieniem.

W niezapłodnionym jaju stwierdzono również obecność rybosomów (21, 26, 30, 50) w większości występujących w postaci monosomów (21, 50). Przypuszczano, że aktywność ich jest upośledzona, ponieważ RNA

z wątroby szczura słabo stymulował włączenie aminokwasów w obecności rybosomów z niezapłodnionego jaja jeżowca (26). Jednakże okazało się, że te same rybosomy przeprowadzają włączanie fenyloalaniny do białek pod wpływem poli U, matrycy o większym powinowactwie do rybosomów niż obcy gatunkowo RNA z wątroby (34, 35, 36). Nie wydaje się zatem aby struktura rybosomów z niezapłodnionego jaja była zmieniona w sposób naruszający ich aktywność. Koncepcję tę potwierdzają badania Slatera i Spiegelmana (42), którzy stwierdzili, że skład zasad i własności chemiczne rybosomowego RNA z jaj jeżowca przed zapłodnieniem są takie same jak u wczesnych zarodków, posiadających aktywnie działające rybosomy.

Brak syntezy białka w niezapłodnionym jaju można wyjaśnić przyjmując, że pomiędzy mRNA i rybosomami nie zachodzi interakcja i tym samym informacja niesiona przez mRNA nie może zostać odczytana. Niełączenie się mRNA z rybosomami mogłoby być spowodowane zablokowaniem miejsc przyczepu na rybosomie lub też zablokowaniem mRNA. Według Monroy'a i wsp. (34) w niezapłodnionym jaju istnieją białkowe inhibitory, które uniemożliwiają syntezę białka. Zdolność do tej syntezy zostaje przywrócona po usunięciu inhibitorów, prawdopodobnie w wyniku działania specyficznych proteaz, których aktywność w jaju po zapłodnieniu wyraźnie wzrasta (24).

Są dane (30) wskazujące, że mRNA w niezapłodnionym jaju zawarty jest w cząstkach cięższych od rybosomów. Mano i Nagano (30) porównali stymulację włączenia aminokwasów do białek przez RNA wyizolowany z różnych frakcji komórkowych z niezapłodnionego i zapłodnionego jaja (tablica 1). Okazało się, że RNA wykazujący aktywność mRNA związany jest przed zapłodnieniem z frakcją osiadającą podczas wirowania przy 12 000 g, natomiast po zapłodnieniu przemieszcza się on

Tablica 1

Wpływ mRNA izolowanego z różnych frakcji subkomórkowych jaja na włączanie aminokwasów do białek * (wg 30)

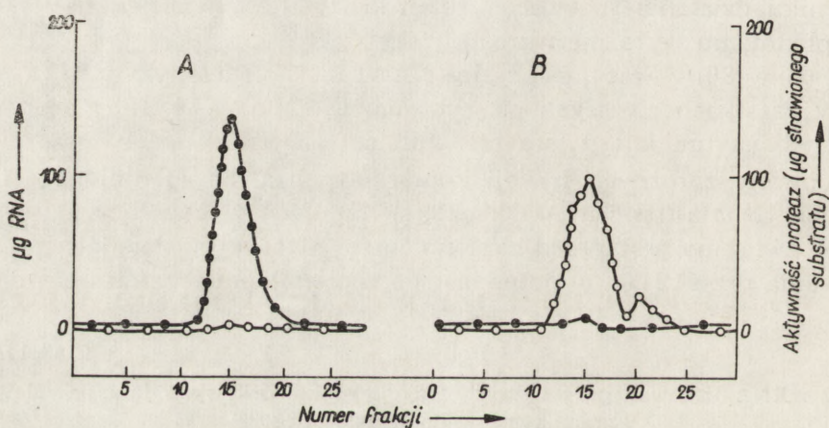
Fracje otrzymane z jaj	Bez dodatku mRNA	Z dodatkiem mRNA			
		homogenatu	osadu 12 000g	mikrosomów	supernatantu 105 000 g
Przed zapłodnieniem	38	256	334	80	158
Po zapłodnieniu	202	307	93	328	252
Przed zapłodnieniem po działaniu trypsyny	73	321	176	317	218

* układ włączający pochodzi z jaja niezapłodnionego. Wyniki podano w imp/min/mg białka

do frakcji mikrosomowej i supernatantu 105 000 g. Cząstki przechowujące mRNA, który nie bierze udziału aktualnie w syntezie białka zostały przez Spirina (46) nazwane informosomami; zawarty w nich mRNA chroniony jest przed degradacją.

Jak widać z tablicy 1 przemieszczenia aktywności mRNA analogiczne do tych, które zachodzą po zapłodnieniu, występują również pod wpływem działania trypsyny na niezapłodnione jajo (30). Trypsyna uwalnia zapewne mRNA związany we frakcji cięższej od rybosomów.

Mano (29) wykazał, że w wyniku zapłodnienia jaja z informosomów uwalnia się mRNA, a proces ten związany jest z aktywacją specyficznych proteaz. Stwierdził on (rysunek 1), że we frakcji subkomórkowej niezapłodnionego jaja wykrywa się aktywności proteaz. Po zapłodnieniu z frakcji tej znika RNA, a jednocześnie pojawia się aktywność proteolityczna co sugeruje, że z tymi samymi cząstkami, które przechowują mRNA, związane są specyficzne proteazy. Uwolniony w wyniku zapłodnienia mRNA łączy się z rybosomami z wytworzeniem polisomów. Obecność polisomów w zapłodnionym jaju, w przeciwieństwie do jaja niezapłodnionego potwierdzają również inni autorzy (21, 49).



Rys. 1. Lokalizacja aktywności proteolitycznej i mRNA w subfrakcjach komórki jajowej: A) przed zapłodnieniem, B) 10 minut po zapłodnieniu

Frakcje „informosomów” to jest osady otrzymane podczas wirowania przy 8 000 g przez 10 min. poddano wirowaniu (130 580 g, 150 min.) w gradiencie sacharozy (wg 29).

- — ● — ● RNA
- — ○ — ○ aktywność proteaz

Można zatem przyjąć, że niezapłodnione jajo zawiera zmagazynowany mRNA, niezdolny do translacji i związany z frakcją komórkową różną od rybosomów.

Po zapłodnieniu mRNA uwolniony najprawdopodobniej na drodze proteolizy służy w pierwszych stadiach rozwojowych jako matryca w aktywnie przebiegającej w tym okresie syntezie białka.

II. RNA i synteza białka w trakcie embriogenezy

Jak wykazały ostatnie badania (1, 4, 5, 17, 19, 36, 47, 55) wkrótce po zapłodnieniu w zarodkach rozpoczyna się synteza RNA — głównie mRNA. Początkowo niewielki poziom tej syntezy wzrasta wyraźnie w stadium późnej blastuli. We wczesnych stadiach rozwojowych tworzy się również tRNA (1, 7). Rybosomowy RNA występujący we wczesnych zarodkach pochodzi z komórki jajowej (10), a synteza nowych jego porcji rozpoczyna się dopiero od momentu gastrulacji (4, 9, 19).

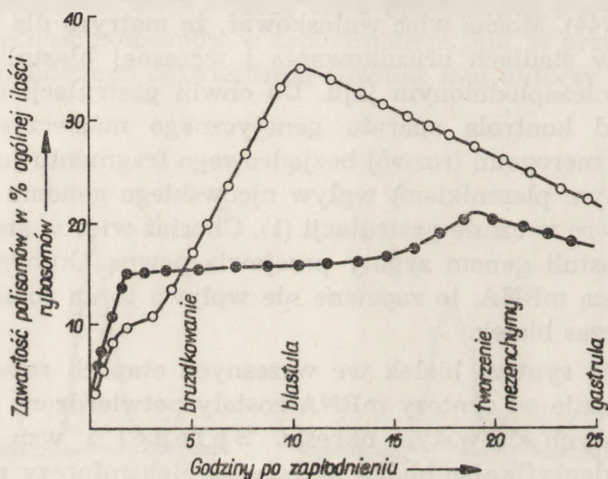
Nowopowstały po zapłodnieniu mRNA nie bierze udziału w syntezie białka zachodzącej we wczesnych stadiach embriogenezy (okresy bruzdkowania i wczesnej blastuli). W zarodkach jeżowca rozwijających się w obecności aktynomycyny D, a więc w warunkach uniemożliwiających powstawanie mRNA zachodzi synteza białka, rozwój przebiega normalnie do stadium gastruli, potem jednak zarodki giną (19). Również u osłonicy aktynomycyna D nie wpływa na syntezę białka zachodzącą zaraz po zapłodnieniu (44). Można więc wnioskować, że matryca dla białek syntetyzowanych w stadiach bruzdkowania i wczesnej blastuli istnieje już wcześniej w niezapłodnionym jaju. Do chwili gastrulacji zatem rozwój przebiega pod kontrolą aparatu genetycznego macierzystej komórki. W przypadku merogonii (rozwój bezjądrowego fragmentu jaja zapłodnionego normalnym plemnikiem) wpływ ojcowskiego genomu zaczyna wyrażać się dopiero w czasie gastrulacji (1). Chociaż więc w stadiach bruzdkowania i blastuli genom zygoty przejawia pewną aktywność, wyrażającą się syntezą mRNA, to zapewne nie wpływa to na rodzaj syntetyzowanych wówczas białek.

Sugestie, że synteza białek we wczesnych etapach rozwojowych zachodzi niezależnie od syntezy mRNA zostały potwierdzone przez analizę białek tworzących się w tym okresie. Spiegel i wsp. (45) podając ^{14}C -walinę i identyfikując białka za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym stwierdzili, że zarodki jeżowca rosnące w obecności aktynomycyny D produkowały w ciągu 3—4 godz. po zapłodnieniu takie same białka co zarodki kontrolne. Podobne wyniki otrzymali Terman i Gross (52), stosując jednak do wykrywania radioaktywnych frakcji białkowych czulszą metodę — autoradiografię. Typy białek tworzących się w stadium zygoty i stadium blastuli są podobne (52). A więc białka syntetyzowane w tych stadiach nie są jeszcze charakterystycznymi białkami zarodka. Ich rodzaj nie zmienia się wraz z jego rozwojem — tym samym nie mogą być one związane z różnicowaniem się zarodka.

Ponieważ synteza białka konieczna jest do przebiegu podziałów komórkowych, sugerowano, że syntetyzowane po zapłodnieniu białka związane są z aparatem mitotycznym (19, 28, 48). Jednakże Wilt i wsp. (57) wykazali, że dodatek puromycyny do zarodków jeżowca w 30 minut po zapłodnieniu nie hamował mitoz aż do 100 minut po zapłodnieniu. W za-

rodzku musi zatem istnieć pewien zapas białek aparatu mitotycznego, najprawdopodobniej pochodzący z komórki jajowej, a nowosyntetyzowane we wczesnych stadiach embriogenezy białka, zdaniem autorów, nie są związane z aparatem mitotycznym.

Silver i Comb (40) przeprowadzając analizę białek syntetyzowanych u jeźowca w czasie pierwszych stadiów rozwojowych stwierdzili, że przynajmniej jedna z grup białek rozpuszczalnych w kwasie octowym związana jest z frakcją jądrową. Są one selektywnie syntetyzowane we wczesnej blastuli. Autorzy sugerują, że białka te, chociaż ich skład aminokwasowy różni się od składu aminokwasowego zasadowych białek z jąder ssaków, mogą spełniać podobną regulacyjną rolę co histony; tym bardziej, że ich synteza poprzedza bezpośrednio moment wzmożonej syntezy mRNA. Nie wykazano jednak, że białka te *in vivo* połączone są z DNA, trudno więc jeszcze wyciągać ostateczne wnioski co do ich znaczenia.



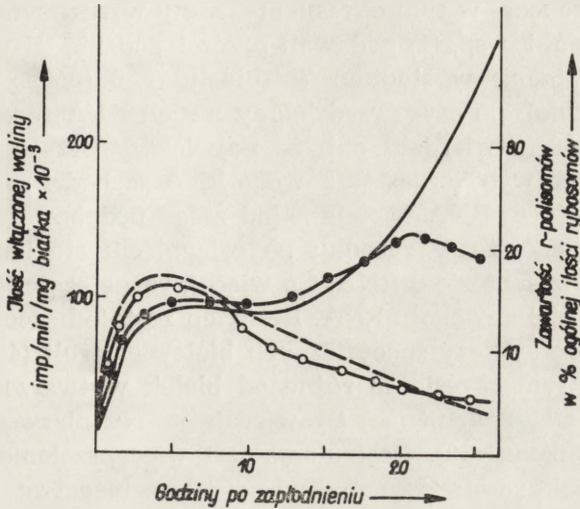
Rys. 2. Zawartość poszczególnych klas polisomów w rosących zarodkach jeźowca (wg 22)

—●— r-polisomy

—○— s-polisomy

Powstający w pierwszym okresie po zapłodnieniu mRNA nie bierze udziału w zachodzącej podówczas syntezie białka, jest więc prawdopodobnie w jakiś sposób magazynowany w zarodku. Stavy i Gross (50) stwierdzili, że mRNA w zarodkach zmagazynowany jest, podobnie jak w jajach, we frakcji ciężkich cząstek, a więc w pewnej klasie polisomów. W cytoplazmie zarodków jeźowca obecne są dwie grupy polisomów: szybko sedymentujące o stałej sedymentacji 300S, oznaczane jako r-polisomy (ang. *rapid polysomes*) i sedymentujące wolniej s-polisomy (ang. *slow polysomes*) o stałej sedymentacji 200S, przy czym r-polisomy są aktywne w syntezie białka, podczas gdy s-polisomy wykazują tylko nie-

wielką aktywność (47). Infante i Nemer (22) zbadali tworzenie się obu klas polisomów w rosnących zarodkach jeżowca, a także wpływ aktynomycyny D na ten proces oraz na syntezę białka w zarodku.



Rys. 3. Zawartość r-polisomów i szybkość syntezy białka w zarodkach jeżowca (wg 22)

- r-polisomy
- r-polisomy w obecności aktynomycyny D
- włączanie waliny
- włączanie waliny w obecności aktynomycyny D

Stwierdzili oni (rysunek 2), że ilość s-polisomów w zarodkach w pierwszych etapach po zapłodnieniu gwałtownie wzrasta, osiąga maksimum w stadium blastuli i od tego momentu zaczyna maleć. Ilość r-polisomów również gwałtownie wzrasta, po czym utrzymuje się na stałym poziomie podczas bruzdkowania i blastulacji, aby ponownie wzrosnąć przed okresem gastrulacji. Ponieważ odbywa się to jednocześnie ze spadkiem zawartości s-polisomów, autorzy uważają, że r-polisomy tworzą się w zarodku kosztem s-polisomów. Aktynomycyna D hamuje powstawanie s-polisomów. W związku z tym autorzy przyjmują, że nowosyntetyzowany mRNA gromadzi się właśnie w s-polisomach. Hamując powstawanie s-polisomów aktynomycyna D powoduje tym samym spadek ilości r-polisomów w zarodku (rysunek 3). Zmianom zawartości r-polisomów zarówno w zarodkach kontrolnych jak i rosnących w obecności aktynomycyny D, odpowiadają zmiany w szybkości syntezy białka. Wydaje się zatem, że syntetyzowany bezpośrednio po zapłodnieniu mRNA istotnie jest gromadzony w nieaktywnych polisomach o stałej sedymentacji 200S, a przed gastrulacją polisomy te są zastępowane przez aktywne w syntezie białka ciężkie polisomy o stałej sedymentacji 300S. Trzeba podkreślić, że ilość s-polisomów zmniejsza się po blastulacji, wiadomo zaś, że mRNA tworzący się bezpośrednio po zapłodnieniu konieczny jest do przebiegu gastrulacji (44), oba zjawiska są więc zbieżne w czasie.

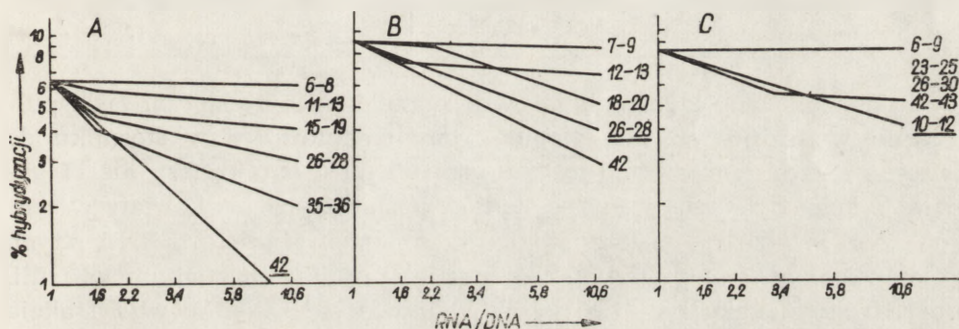
Jak już wspomniano, poziom syntezy mRNA w stadiach bruzdkowania i blastuli jest nieznaczny, wzrasta jednak wyraźnie w okresie poprzedzającym bezpośrednio gastrulację. W zarodkach żaby *Xenopus laevis* na przykład zachodzi w tym okresie stokrotny wzrost syntezy RNA (12). Bachvarova i wsp. (1) podawali przez 1 godzinę ^3H -urydynę zarodkom *Xenopus laevis* w stadium 7* (blastula), 9 (późna blastula) i 10 (wczesna gastrula), po czym wydzielony z nich RNA rozdzielali na żelu *Sephadex G-100*. Stwierdzili oni, że największy przyrost ilości nowosyntetyzowanego wysokocząsteczkowego RNA zachodzi pomiędzy stadiami 7 i 9, przy czym RNA ten ma skład zasad podobny do DNA. Można więc przypuszczać, że w zarodku po osiągnięciu stadium 8 następuje wyraźny skok w syntezie mRNA. Co więcej, różne części zarodka syntetyzują różne ilości nowego mRNA. RNA ten zostaje bezpośrednio zużyty jako matryca do syntezy specyficznych białek gastruli (44). Białka syntetyzowane w tym okresie są różne od białek wytwarzanych w czasie bruzdkowania i blastulacji (52) i zawierają po raz pierwszy typy białek dorosłego organizmu (39). Gastrulacja jest więc przełomowym okresem w rozwoju zarodka: do tego momentu rozwój przebiegał zgodnie z matrycą wytworzoną jeszcze przed zapłodnieniem — teraz po raz pierwszy kontrolę nad rozwojem przejmuje genom zarodka i dochodzi do aktywacji pewnych genów, związanej zapewne z zaczynającym się różnicowaniem zarodka.

Przytoczone badania nad syntezą mRNA nie mówią nic czy produkowany w kolejnych stadiach rozwojowych mRNA jest taki sam czy różny ani czy poszczególne regiony zarodka wytwarzają różne rodzaje RNA. Odpowiedzi na te pytania próbowano uzyskać porównując różne preparaty zarodkowego mRNA metodą hybrydyzacji (11, 12, 14, 15). Metoda ta, oparta na zdolności do tworzenia hybrydów przez komplementarne odcinki kwasów nukleinowych pozwala stwierdzić, czy dane preparaty RNA posiadają jakieś wspólne sekwencje. Denis (11, 12), badał metodą hybrydyzacji mRNA syntetyzowane w poszczególnych stadiach rozwojowych *Xenopus laevis* (rysunek 4). Stosował on dwa typy doświadczeń: 1) badanie kompetycji pomiędzy znakowanym RNA z zarodka w określonym stadium i nieznakowanym RNA z tego samego lub innego stadium rozwojowego i 2) mierzenie nasycenia DNA przez radioaktywne RNA z poszczególnych okresów rozwojowych.

Rysunek 4A przedstawia kompetycję pomiędzy pulsowo znakowanym RNA ze stadium 42 i nieznakowanymi RNA ze stadiów wcześniejszych. Wskazuje on, że sekwencja nukleotydomowa RNA z bruzdkującego jaja jest całkowicie różna od sekwencji RNA z kijanki, a wraz z rozwo-

* Rozwój embrionalny *Xenopus laevis* został usystematyzowany i podzielony na poszczególne etapy opatrzone kolejnymi numerami (37). Systematyka ta jest głównie przyjętą w literaturze przedmiotu i dlatego stosowana jest w tym artykule.

jem zarodka powstający RNA staje się stopniowo coraz bardziej podobny do RNA ze stadium kijanki. Z rysunku 4B widać, że im zarodki są starsze tym większe jest podobieństwo pomiędzy ich RNA a RNA ze stadium pączka ogonowego. RNA ze stadium kijanki wykazuje nawet większy stopień kompetycji niż sam ze sobą RNA ze stadium pączka ogonowego, ponieważ prawdopodobnie wszystkie typy RNA, które występują w stadium pączka ogonowego obecne są również w starszych zarodkach, ale w większej ilości kopii. Rysunek 4C wskazuje, że preparaty RNA z neuruli i późniejszych stadiów wykazują mniejszy stopień kompetycji niż sam ze sobą RNA z gastruli. Świadczy to, że RNA z gastruli zawiera pewne sekwencje nukleotydowe, które później, w starszych, zróżnicowanych zarodkach już nie występują. Na podstawie tych doświadczeń obliczono że RNA z gastruli zawiera 18%, a RNA ze stadium pączka ogonowego 66% sekwencji nukleotydowych obecnych w RNA ze stadium kijanki.



Rys. 4. Współzawodnictwo o miejsce na DNA między różnymi preparatami RNA z zarodków *X. laevis* (wg 12)

- A) pomiędzy RNA ze stadium kijanki i RNA ze stadiów wcześniejszych,
 B) pomiędzy RNA ze stadium pączka ogonowego i RNA ze innych stadiów,
 C) pomiędzy RNA ze stadium gastruli i RNA z innych stadiów.

Cyfry przy krzywych oznaczają stadia rozwojowe odpowiadające następującym etapom embriogenezy (według Nieuwkoopa i Fabera (37)):

6-9 bruzdkowanie	26-30 stadium pączka ogonowego
11-13 gastrula	35-42 stadium kijanki
15-25 neurula	

Z pracy Denisa wynikają następujące wnioski: a) w stadium gastruli syntetyzowany jest pewien typ mRNA, którego starsze zarodki już nie syntetyzują, b) wraz z rozwojem wzrasta podobieństwo między mRNA zarodka a mRNA organizmu dorosłego, c) wszystkie fragmenty DNA aktywne w syntezie RNA w stadium pączka ogonowego są również aktywne w syntezie mRNA późniejszych stadiów rozwojowych. Zatem, zdaniem autora, w czasie rozwoju ujawniają się kolejno nowe obszary genomu.

Denis określił również stopień homologii pomiędzy preparatem RNA z różnych stadiów rozwojowych *X. laevis* i DNA tej żaby (tablica 2).

Zastosował niezależnie dwa typy znakowania RNA: a) ciągły — przez podanie ^{32}P -ortofosforanu samicom przed owulacją, co zapewnia radioaktywność puli nukleotydowej przez cały okres rozwoju, b) pulsowy — podając w określonych momentach rozwoju przez 1 godzinę $^{14}\text{CO}_2$ i izolując RNA z zarodków po 11 godzinach od podania izotopu.

Tabela 2

Ilość hybrydującego RNA w zarodkach *X. laevis* w różnych stadiach rozwojowych (wg 12)

Etap rozwoju zarodka	Typ znakowania	Ilość hybrydującego RNA (m μ g)	% nasycenia DNA
Gastrula	^{32}P — ciągłe	12	2,4
	$^{14}\text{CO}_2$ — 11 godz.	13	2,4
Stadium pączka ogonowego	^{32}P — ciągłe	34	5,0
	$^{14}\text{CO}_2$ — 11 godz.	24	3,0
Pływająca kijanka	^{32}P — ciągłe	78	8,5
	$^{14}\text{CO}_2$ — 11 godz.	42	1,8

RNA izolowany z gastruli zarówno po znakowaniu ciągłym jak i pulsowym wykazuje ten sam stopień komplementarności w stosunku do DNA, a zatem czas trwania mRNA gastruli musi być krótszy niż 11 godzin. Z kolei RNA izolowany ze stadiów późniejszych, znakowany w sposób ciągły, wykazuje większy stopień komplementarności niż RNA z tych stadiów znakowany pulsowo. W starszym zarodku od stadium gastruli, obok frakcji znakującej się szybko, pojawia się zatem pewna frakcja mRNA stabilna, o długim okresie półtrwania. Izotop podany po gastrulacji nie znakuje jej, co wskazuje na to, że została ona wytworzona we wcześniejszych stadiach rozwojowych i fragmenty DNA, które były aktywne w jej syntezie przestały już działać. Jednak produkty tych części genomu czynne są nadal w formie stabilnego mRNA. Doświadczenia Flickingera i wsp. (14), oparte również na hybrydyzacji, wskazują ponadto, że w stadium pączka ogonowego RNA z części grzbietowej jest różny od RNA z części brzusznej.

Również badania nad rodzajami mRNA u jeźowca potwierdziły pogląd, że w stadium gastrulacji następuje nie tylko ilościowy skok w produkcji mRNA, ale także powstają pewne odmiany specyficzne tylko dla tego stadium (54).

III. Uwagi końcowe

Przedstawione w poprzednich rozdziałach fakty wskazują, że regulacja rozwoju zarodkowego zwierząt dotyczy zarówno procesu transkrypcji jak i translacji.

Zaraz po zapłodnieniu w jaju rozpoczyna się synteza mRNA, a jej intensywność wzrasta bardzo wydatnie w okresie gastrulacji (1). Syntetyzowany w tym stadium mRNA, różny od RNA ze stadiów wcześniejszych, staje się coraz bardziej podobny do mRNA dorosłego organizmu. Odczytywanie genomu jest więc stopniowe: początkowo jest on prawie w całości zablokowany, potem zaś uaktywnia się coraz więcej jego fragmentów. Mamy tu też do czynienia z inhibicją transkrypcji, pewne rodzaje mRNA bowiem, które na krótko pojawiają się w gastruli, w następnych stadiach rozwojowych już nie występują (12).

Coraz szerzej przyjmowany jest pogląd, że w organizmach wyższych transkrypcja kontrolowana jest przez zasadowe białka jądra komórkowego (8). Ilość histonów w jądrach różnych tkanek jest prawdopodobnie różna (8), podczas gdy ilość DNA w jądrach komórek z różnych tkanek jest taka sama (33). Zawartość histonów może się zmieniać w zależności od stadium rozwoju zarodka (2). W rozwijających się zarodkach jeźowca tworzy się pewna frakcja białek jądrowych, zbliżona do histonów, której można przypisywać rolę regulatora syntezy mRNA w embriogenezie. Histony hamują *in vitro* biosyntezę mRNA w układzie zawierającym polimerazę RNA, trójnukleotydy i *primer* DNA, przy czym całkowite zahamowanie osiąga się przy stosunku wagowym histonów do DNA równym 1:1 (20). Histony prawdopodobnie ilościowo wiążą DNA nie dopuszczając do tworzenia się na nim matrycy RNA. Wstrzyknięte do jąder jaj żaby histony hamują rozwój zarodka w stadium późnej blastuli (31, 53).

Można więc przypuszczać, że transkrypcja w procesie rozwoju zarodkowego regulowana jest zgodnie ze schematem działalności genu proponowanym przez Mirsky'ego (32), zakładającym regulację syntezy mRNA przez stopniowe odłączanie się histonu od nici DNA, co umożliwia odczytanie informacji genetycznej.

Liczne fakty doświadczalne wskazują jednak, że w czasie pierwszych stadiów rozwojowych biosynteza białka kontrolowana jest także na poziomie translacji. Obecny w jaju nieaktywny w biosyntezie białka mRNA występujący w formie tak zwanego zamaskowanego mRNA (46) zaczyna spełniać rolę matrycy dopiero po zapłodnieniu. Odmaskowanie w momencie zapłodnienia odbywa się prawdopodobnie przez proteolityczne uwolnienie mRNA ze struktur rybonukleoproteidowych (informosomów) (30, 46).

Również mRNA tworzący się w pierwszych stadiach po zapłodnieniu znajduje się w postaci zamaskowanej (22). Wskutek zablokowania w nieaktywnych polisomach 200S mRNA z wczesnych stadiów rozwojowych zostaje odblokowany dopiero przed gastrulacją pod wpływem działania trypsyno-podobnych proteaz (27) i staje się matrycą do syntezy białek specyficznych dla tego stadium.

LITERATURA

1. Bachvarova R., Davidson E. H., Allfrey V. G., Mirsky A. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 358 (1966).
2. Bloch D. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 324 (1962).
3. Brachet J., Ficq A., Tencer R., *Exptl. Cell Res.* **32**, 168 (1963).
4. Brown D. D., Littna E., *J. Mol. Biol.* **8**, 669 (1964).
5. Brown D. D., Littna E., *J. Mol. Biol.* **8**, 688 (1964).
6. Brown D. D., Littna E., *J. Mol. Biol.* **20**, 81 (1966).
7. Brown D. D., Littna E., *J. Mol. Biol.* **20**, 95 (1966).
8. Busch H., *Histones and Other Nuclear Proteins*, Academic Press, New York, 1965.
9. Comb D. K., Katz S., Branda R., Pinzino C., *J. Mol. Biol.* **14**, 195 (1965).
10. Davidson E. H., Allfrey V. G., Mirsky E. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 501 (1964).
11. Denis H., *J. Mol. Biol.* **22**, 269 (1966).
12. Denis H., *J. Mol. Biol.* **22**, 285 (1966).
13. Denny P. C., Tyler A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 245 (1964).
14. Flickinger R. A., Greene R., Kohl D. H., Miyagi M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1712 (1966).
15. Gross P. R., Cousineau G. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 321 (1963).
16. Gross P. R., Cousineau G. H., *Exptl. Cell Res.* **33**, 368 (1964).
17. Gross P. R., Kraemer K., Malkin L. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 569 (1965).
18. Gross P. R., Malkin L. J., Hubbard M., *J. Mol. Biol.* **13**, 463 (1965).
19. Gross P. R., Malkin L. J., Moyer W. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 407 (1964).
20. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1216 (1962).
21. Hultin T., *Expt. Cell Res.* **44**, 608 (1964).
22. Infante A. A., Nemer M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 681 (1967).
23. Lengyel P., *J. Gen. Physiol.* **49**, 305 (1966).
24. Lundblad G., *Nature* **163**, 643 (1949).
25. Maggio R., Catalano C., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 164 (1963).
26. Maggio R., Vittorelli M. L., Rinaldi A. M., Monroy A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 436 (1964).
27. Maggio R., Vittorelli M. L., cyt. wg Monroy A., Gross P., *IEG Nr 7, Sc. Memo* 583 (1966).
28. Mangan J., Miki-Noumura T., Gross P. R., *Science* **147**, 1575 (1965).
29. Mano Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 216 (1966).
30. Mano Y., Nagano H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 210 (1966).
31. Markert C. L., Ursprung H., *Develop. Biol.* **7**, 560 (1963).
32. Mirsky A. E., w *Proceedings of Vth Internatl. Congress of Biochemistry (Moscow 1961) tom 2*, red. O. Lindberg, Pergamon Pres, PWN, Oxford, Warszawa 1963, str. 73.
33. Mirsky A. E., Osawa S., w *The Cell*, tom 2, red. J. Brachet, A. E. Mirsky, Academic Press, New York 1961, str. 677.
34. Monroy A., Maggio R., Rinaldi A. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 107 (1965).
35. Nemer M., Bard S.G., *Science* **140**, 664 (1963).
36. Nemer M., Infante A. A., *Science* **150**, 217 (1965).

37. Nieuwkoop P.D., Faber J., Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), North-Holland Publ., Co., Amsterdam 1956.
38. Nirenberg M., The Harvey Lectures 1963/64, ser. 59, Academic Press, 1965, str. 155.
39. Ranzi S., w Proceedings of Symposium on Germ Cells and Development, Pallanze, 1960, str. 604, cytowane wg Monroy A., Maggio R., *Advan. Morphogenesis* 3, 113 (1964).
40. Silver D. J., Comb D. G., *Develop. Biol.* 16, 107 (1967).
41. Singer M.F., Leder P., *Ann. Rev. Biochem.* 35, 195 (1966).
42. Slater D., Spiegelman S., *Biophys. J.* 6, 385 (1966).
43. Slater D., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 56, 164 (1966).
44. Smith K. D., *J. Exptl. Zool.* 164, 393 (1967).
45. Spiegel M., Ozaki H., Tyler A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21, 135 (1965).
46. Spirin A. S., w Current Topics in Developmental Biology, tom 1, red. A. Monroy, A. A. Mascona, Academic Press, New York 1966.
47. Spirin A.S., Nemer M., *Science* 150, 214 (1965).
48. Stafford D.W., Iverson R.M., *Science* 143, 580 (1964).
49. Stafford D.W., Sofer W.H., Iverson R.M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52, 313 (1964).
50. Stavy L., Gross P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 57, 735 (1967).
51. Szafranski P., Klita S., *Post. Biochem.* 11, 459 (1965).
52. Terman S.A., Gross P.R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21, 595 (1965).
53. Ursprung H., Markert C.L., *Develop. Biol.* 8, 309 (1963).
54. Whiteley A.M., McCarthy B. J., Whiteley H. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 55, 519 (1966).
55. Wilt F.H., *Develop. Biol.* 9, 299 (1964).
56. Wilt F.H., Hultin T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9, 313 (1962).
57. Wilt F.H., Sakai H., Mazia D., *J. Mol. Biol.* 27, 1 (1967).

The first part of the study is devoted to a general survey of the history of the ...
 The second part is devoted to a detailed study of the ...
 The third part is devoted to a study of the ...
 The fourth part is devoted to a study of the ...
 The fifth part is devoted to a study of the ...
 The sixth part is devoted to a study of the ...
 The seventh part is devoted to a study of the ...
 The eighth part is devoted to a study of the ...
 The ninth part is devoted to a study of the ...
 The tenth part is devoted to a study of the ...
 The eleventh part is devoted to a study of the ...
 The twelfth part is devoted to a study of the ...
 The thirteenth part is devoted to a study of the ...
 The fourteenth part is devoted to a study of the ...
 The fifteenth part is devoted to a study of the ...
 The sixteenth part is devoted to a study of the ...
 The seventeenth part is devoted to a study of the ...
 The eighteenth part is devoted to a study of the ...
 The nineteenth part is devoted to a study of the ...
 The twentieth part is devoted to a study of the ...

MARTA RYTEL *, JAN W. SZARKOWSKI **,
TOMASZ GOŁASZEWSKI ***

Przemiany kwasów nukleinowych w komórce i organellach u glonu *Acetabularia* sp.

Metabolism of Nucleic Acids in the Cell and Organellae of Alga *Acetabularia* sp.

The literature data concerning the nucleic acid metabolism in *Acetabularia* are discussed under the aspects of functional and constitutional peculiarities of this alga.

Glon *acetabularia* jest cennym obiektem dla badań biochemicznych w dziedzinie stosunków i związków metabolicznych między poszczególnymi organellami komórkowymi. Wypływa to przede wszystkim z faktu, że jako jedyny spośród organizmów wyższych jest on zdolny do życia przez dłuższy okres czasu po usunięciu jądra komórkowego. W pozbawionych jądra komórkach lub nawet we fragmentach komórkowych przebiega nadal fotosynteza (28, 65, 66) i synteza białek (1, 16, 17, 67); fragmenty te zdolne są również do morfogenezy (37, 41). Dojrzały glon jest zróżnicowany na trzy podstawowe elementy — chwytники, trzonek plechy i kapelusz, pełniący rolę organu generatywnego. Jądro komórkowe glonu — osiągające niespotykane u innych organizmów rozmiary (do 80 μ średnicy) — umieszczone jest w chwytniku, który można w stosunkowo łatwy sposób odciąć od plechy. Dzięki temu *acetabularia* jest doskonałym obiektem badań nad metabolicznymi zależnościami między organellami i nad autonomią metaboliczną chloroplastów.

Dokładniejsze opisy dotyczące stanowiska systematycznego *acetabularii*, morfologii i anatomii jej komórki oraz rozwoju osobniczego organizmu podaliśmy w oddzielnej publikacji (37). Tam też odsyłamy czytelnika zainteresowanego badaniami nad metabolizmem innych niż kwasy nukleinowe związków.

W 1934 roku H ä m m e r l i n g (41) badając glon z rodzaju *acetabularia* stwierdził, że po usunięciu chwytника wraz z jądrem, trzonek

* Mgr Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

** Doc. Dr Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

*** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

plechy jest zdolny do wytworzenia „organoidu” generatywnego — kapelusza i niekiedy — do regeneracji chwytników. Hämmerling wysunął hipotezę o istnieniu niezdefiniowanych „substancji kształtotwórczych” (morfogenetycznych) nagromadzających się w cytoplazmie i warunkujących właściwe różnicowanie komórek. Ponieważ zdolność do życia i morfogenezy komórek pozbawionych jądra jest ograniczona w czasie — w przeciwieństwie do długowieczności całych komórek — Hämmerling przypuszczał, iż „substancje kształtotwórcze” syntetyzowane są w jądrze komórkowym, a stamtąd dyfundują do cytoplazmy; byłyby to zatem — używając dzisiejszej terminologii — przenośniki informacji z jądra do reszty komórki. Chociaż zgodnie z danymi współczesnej biochemii „substancje kształtotwórcze” najbardziej odpowiadają informacyjnemu RNA (18, 33, 54, 74, 77), to jednak są również sugestie, że mogą to być pewne klasy białek, syntetyzowanych pod kontrolą odpowiednich mRNA. Tym samym kwas rybonukleinowy byłby jednym z ogniw w tym procesie (15, 25, 29, 50). Przypuszczano też, że substancjami morfogenetycznymi mogą być nukleoproteidy (74). O zawiłości problemu świadczą wyniki badań Z e t s c h e’ go (78, 79), które doprowadziły go do wniosku, że istnieją dwie odmienne pule przenośników informacji koniecznych do rozwoju trzonka plechy i kapelusza.

Badania nad metabolizmem RNA u acetabularii rozpoczęły się stosunkowo niedawno. Największe zainteresowanie budziła możliwość syntezy RNA w bezjądrowych fragmentach komórek glonu. Brachet i Szafarz (22) badając fragmenty komórek *Acetabularia mediterranea* stwierdzili, że wbudowywanie znakowanego kwasu orotowego do RNA fragmentów z jądrem było jedynie nieznacznie wyższe niż do RNA fragmentów bezjądrowych. Co więcej, stosunek aktywności właściwych piętna wbudowanego do fragmentów jądrzastych i bezjądrowych prawie nie zmieniał się przez około trzy miesiące po usunięciu jądra, wahając się w granicach 1,2—1,5. Natężenie metabolizmu RNA po usunięciu jądra z komórki nie ulegało zatem poważniejszym zmianom przez dłuższy czas. Syntezę RNA w bezjądrowych fragmentach komórek glonu potwierdzili Vanderhaeghe i Szafarz (68), a Baltus i Six (4) ustalili, że ilość RNA w takich fragmentach podwaja się w ciągu pięciu dni po denukleacji. De Vitry (31) wykazała, że znakowana trytem metylocytozyna włącza się do RNA cytoplazmy — zdaniem autorki do RNA przenoszącego aminokwasy — zarówno we fragmentach jądrzastych jak i bezjądrowych komórek glonu. Według Naora’y i wsp. (48), bezpośrednio po usunięciu jądra ilość RNA obniża się, co jest wyrazem „szoku chirurgicznego”, później jednak powoli narasta i po trzech tygodniach od operacji fragmenty bezjądrowe osiągają 80% ilości RNA obecnej w cytoplazmie nienaruszonej komórki. Z wykresów Richtera (52, 53) wynika, że po usunięciu jądra z komórki, u *Acetabularia mediterranea* nie ma żadnego przyrostu RNA, choć przez 28 dni widoczny jest wyraż-



Fot. 1. Widok ogólny kolcnii glonu *Acetabularia mediterranea* (7)

ny przyrost ilości białka. Zdaniem tego autora, niezmiennosc ilości RNA może jednak wskazywać na pewną syntezę tego związku w cytoplazmie, ponieważ w tym samym czasie musi zachodzić proces jego odnawiania. Schweiger i Bremer (57, 58) stwierdzili, iż w normalnych warunkach oświetlenia fragmenty bezjądrowe glonu nie zwiększają ilości RNA, natomiast fragmenty bezjądrowe komórek etiolowanych przez 10 dni przed usunięciem jądra wykazują przyrost netto RNA. Zdaniem autorów, z jądra przenikają do cytoplazmy jakieś substancje niezbędne do syntezy RNA poza jądrem. Transport tych substancji zachodzi intensywnie w ciemności, lecz ich „uaktywnianie” w cytoplazmie następuje dopiero na świetle. Tak więc jądro byłoby nieodzowne dla prawidłowej syntezy RNA, dostarczając metabolitów kierujących poza jego obrębem tym procesem. Metabolitami tymi mogłyby być „substancje morfogenetyczne” Hämm erlinga. Zdaniem Werza (72), nie jest wykluczone, że „substancje morfogenetyczne” wytwarzane są w cytoplazmie pod kontrolą pewnej puli „pierwotnego” RNA pochodzącego z jądra. RNA ten mógłby być wytwarzany i transportowany nawet w ciemności, lecz dopiero na świetle uczynniałby nieaktywne „substancje morfogenetyczne” lub sam by się w nie przekształcał. Jądro u acetabularii, podobnie jak u innych organizmów, jest miejscem najaktywniejszego metabolizmu kwasów nukleinowych i białek w komórce. Istnieje wiele danych świadczących o bardzo aktywnym wbudowywaniu znakowanego fosforanu do RNA jądrowego (42, 62) oraz o włączaniu do jądra prekursorów RNA i DNA (50, 51) a także znakowanych aminokwasów (50). Szczególnie aktywnym metabolizmem tych związków odznacza się jąderko acetabularii (25, 62, 69), które — jak się dzisiaj sądzi — pełni ważną rolę w gospodarce RNA komórki. Jak doniósł niedawno Brachet (10, 32a), jąderkowy RNA u acetabularii różni się od RNA występującego w jąderku innych organizmów. Jego skład nie przypomina RNA rybosomów (z charakterystyczną przewagą guaniny nad innymi zasadami), natomiast jest zbliżony raczej do składu nukleotydowego DNA jądrowego — ilość guaniny odpowiada ilości cytydyny a ilość adeniny — ilości uracylu. Może to świadczyć, iż jąderko acetabularii jest miejscem syntezy przede wszystkim RNA podobnego do DNA. Niemniej jednak jądro nie jest jedynym miejscem w komórce acetabularii, gdzie można obserwować intensywny metabolizm RNA.

Olszewska i Brachet (49, 50), śledząc autoradiograficznie rozmieszczenie znakowanej adeniny i guaniny wbudowanych do komórek glonu, zaobserwowali występowanie swoistego gradientu. Po kilkunastu godzinach włączania piętna, najsilniejszą promieniotwórczość wykrywali oni w części apikalnej (wierzchołkowej) trzonka plechy. Rejon szczytowy trzonka, a więc strefa jego wzrostu (3 mm od szczytu), odznaczał się po 24 godzinach włączania prekursorów RNA trzy razy większą aktywnością niż rejon podstawy trzonka, przylegający do chwytników.

Trzonek wykazywał więc apikalno-bazalny gradient aktywności metabolicznej RNA, odpowiadający nierównomiernemu stężeniu RNA w trzonku. Z badań szkoły H ä m m e r l i n g a (40, 71, 73, 75) wiadomo, że w normalnych warunkach oświetlenia część wierzchołkowa trzonka jest znacznie bogatsza w RNA i białko niż rejon podstawkowy. Ten ostatni odcinek wzbogaca się w RNA w czasie etiologowania nienaruszonych komórek acetabularii (40, 42). Część wierzchołkowa — rejon wzrostowy trzonka plechy — wykazuje też szczególne nagromadzenie białek; w związku z tym warto wspomnieć, iż omawiany glon był jednym z obiektów służących do udowodnienia tezy B r a c h e t a i C a s s p e r s o n a o udziale kwasów nukleinowych w biosyntezie białek. Rejony wierzchołkowe trzonka wykazują największą zdolność przeżywania w nieobecności jądra w komórce (40, 42); jednocześnie przede wszystkim one zdolne są do morfogenezy — tam właśnie gromadzą się „substancje morfogenetyczne” (42, 77). Fakty te sugerują ścisłą zależność między owymi substancjami i RNA. Według danych S t i c h a i P l a u t a (63), a także D e V i t r y (32), rybonukleaza dodana do pożywki wzrostowej acetabularii hamuje nieodwracalnie morfogenezę fragmentów bezjądrowych, a jedynie czasowo zatrzymuje wzrost i różnicowanie komórek nienaruszonych. Podobne skutki wywołuje działanie światłem nadfioletowym na jądrzaste i bezjądrowe fragmenty glonu (33, 76). Wyniki te wskazywałyby pośrednio na rolę RNA jądrowego w kierowaniu morfogenezą plechy. Podobne wnioski nasuwają wyniki wielu prac (7, 8, 13, 19, 51, 58, 77, 78) wskazujące, że aktynomycyna D (hamująca wybiórczo syntezę RNA zależną od DNA) znacznie silniej hamuje wzrost i morfogenezę komórek nienaruszonych acetabularii, bądź ich jądrzastych fragmentów (do cytolizy komórki włącznie (6)), słabiej natomiast wpływa na fragmenty bezjądrowe. D e V i t r y (27, 28) wykazała, że ^{14}C -aktynomycyna włącza się nie tylko do jądra lecz także do chloroplastów, co nasuwa przypuszczenie o udziale tych ostatnich w procesach wzrostu i morfogenezy plechy. 5-fluoro-dezoksyurydyna — antymetabolit syntezy DNA blokujący syntezę kwasu tymidylowego (29) — znacznie silniej hamuje morfogenezę fragmentów jądrzastych niż bezjądrowych glonu (30). Zdaniem D e V i t r y (29), związek ten może bądź hamować transport RNA z jądra do cytoplazmy, doprowadzając między innymi do powstania „odwróconego” gradientu metabolicznego RNA w trzonku, bądź też powoduje powstawanie nietypowego DNA, nie przenikającego przez błonę jądrową lub nieaktywnego jako matryca do transkrypcji określonych frakcji RNA.

Synteza różnych klas RNA i DNA w nieobecności jądra badana często właśnie u *Acetabularia* sp. ściśle wiąże się z zagadnieniem autonomności chloroplastów w komórce roślinnej.

Występowanie heterogennego RNA w plesze glonu stwierdzono za pomocą wirowania w gradiencie sacharozy (3, 45, 46). Niektórzy autorzy

ze szkoły Bracheta, na przykład Ceska (23), jak też sam Brachet (14) są zdania, że w nieobecności jądra w komórce nie może zachodzić synteza wysokopolimeryzowanego RNA a tylko synteza sRNA (31). W takim ujęciu, biogeneza rybosomów lub synteza rybosomowego RNA odbywałaby się pod kontrolą jądra (10, 14). W jądrze, być może w jąderku, zachodziłby proces tworzenia rybosomów (34, 72), które transportowane byłyby przez pory w błonie jądrowej (73) do strefy cytoplazmy wokół jądra. Pogląd taki popierałby obserwacje (21), że leworfanol — związek hamujący preferencyjnie syntezę rybosomowego RNA — działał bardziej destrukcyjnie na fragmenty bezjądrowe niż na fragmenty jądrzaste komórek acetabularii. Zdaniem Bracheta (14), w nieobecności jądra u acetabularii możliwy jest proces programowania rybosomów już uprzednio w pełni uformowanych. Proces ten polega na przyłączeniu nici mRNA do zespołu rybosomów i tworzeniu układów polisomowych. Ciekawe formy polisomowe o charakterze rozetkowym zaobserwowano w trzonku plechy acetabularii (34). Pewne doniesienia wskazują jednak, że rybosomowy RNA może syntetyzować się u acetabularii nawet w nieobecności jądra. Stwierdzono mianowicie, że bezjądrowe fragmenty glonu silniej niż jądrzaste włączają 8-¹⁴C-adeninę i ³²P-fosforan do RNA rybosomów (64) oraz, że we fragmentach komórkowych *Acetabularia crenulata* synteza rybosomowego i rozpuszczalnego RNA, w przeciwieństwie do mRNA, odbywa się przez około 30 dni po usunięciu jądra (70). Są też dane (56), że i u *Acetabularia mediterranea* synteza RNA rybosomów może zachodzić w nieobecności jądra.

Problemem syntezy różnych klas RNA u acetabularii zajął się szerzej Janowski (45, 46). Technika chromatografii kolumnowej na metyloowanej albuminie uzyskał on trzy frakcje, znakowanego uprzednio *in vivo* RNA zarówno z jądrzastych jak i bezjądrowych fragmentów komórek *Acetabularia mediterranea*. W obu typach fragmentów synteza niskocząsteczkowego RNA (frakcja 1) zachodzi głównie we frakcjach podkomórkowych nie zawierających chloroplastów. Druga frakcja to RNA wysokopolimeryzowany, syntetyzowany zarówno w chloroplastach jak i poza nimi, a trzecia frakcja — heterogenna chromatograficznie i zawierająca DNA — jest syntetyzowana w plastydach. Zatem chloroplasty acetabularii aktywnie uczestniczyłyby w metabolizmie kwasów nukleinowych. Plastydy tego glonu stanowią ciekawy wyjątek spośród chloroplastów innych roślin, gdyż skupiają w sobie około 80% RNA cytoplazmy (38, 47). Naora i wsp. (47) stwierdzili, że po usunięciu jądra z komórki acetabularii, ilość RNA w plastydach zwiększa się, natomiast we frakcji mikrosomów i w supernatancie uzyskiwanym po ich odwirowaniu — maleje. Ponieważ transport RNA z cytoplazmy do plastydów nie zachodzi, autorzy przyjęli ten fakt jako dowód realnej syntezy RNA w chloroplastach. Jeśli synteza taka rzeczywiście ma miejsce należałoby oczekiwać obecności DNA w tej organelli.

Istotnie, obecność DNA w chloroplastach acetabularii wykazali Baltus i Brachet (2) oraz Gibor i Izawa (35). Ci ostatni otrzymywali chloroplasty z hodowanych w aseptycznych warunkach glonów pozbawionych uprzednio jąder komórkowych. Wynik ten nabiera więc wyjątkowych walorów dowodowych, ponieważ uzyskiwane z innych organizmów chloroplasty z reguły bywają zanieczyszczone materiałem pochodzenia jądrowego. Według Bracheta (8), charakterystyka fizykochemiczna DNA plastydów acetabularii wskazuje na odmiennność jego składu nukleotydowego od DNA jądrowego.

Usunięcie jądra komórkowego nie wpływa na intensywność włączania znakowanej tymidyny do DNA chloroplastów acetabularii (60). Ilość plastydialnego DNA we fragmentach bezjądrowych glonu hodowanych w warunkach normalnego oświetlenia zwiększa się dwukrotnie w ciągu około 15 dni po denukleacji komórki (44). W tym czasie — przez 21 do 28 dni — odbywają się podziały chloroplastów (9, 12, 24, 60), co wskazywałoby, że w nieobecności jądra w plesze, DNA plastydów ulega replikacji (26, 44, 60). Zdaniem Bracheta i Goffeau (20, 36) DNA ten mógłby odgrywać rolę matrycy w syntezie mRNA w plastydach. Chloroplasty izolowane z bezjądrowych fragmentów plechy *Acetabularia mediterranea* jedenastego dnia po operacji, silnie wbudowują bowiem znakowane aminokwasy (20, 36), a do ich RNA wbudowywane są znakowane prekursorzy: uracyl (55) oraz adenina i kwas orotowy (47). Ponieważ procesy wcielania prekursorów RNA i aminokwasów są wrażliwe na dezoksyrybonukleazę i aktynomycynę (36, 55) a wiadomo, że antybiotyk ten hamuje aktywność polimerazy RNA zależnej od DNA (18, 59), wniosek Bracheta i Goffeau (20, 36) jest zatem uzasadniony. Przemawia za nim też fakt włączania na świetle przez plastydy (z fragmentów bezjądrowych) nukleozydotrójfosforanów, substratów dla polimerazy RNA zależnej od DNA (55).

Chloroplasty wykazują zatem daleko posuniętą autonomię metabolizmu kwasów nukleinowych. Zachodzi w nich również intensywna synteza białek (24, 38). Najprawdopodobniej również mitochondria wykazują pewną autonomię w tym względzie. Green i wsp. (39) stwierdzili, że organella ta u acetabularii zawiera DNA odmienny od DNA chloroplastów.

Życie komórek acetabularii pozbawionych jądra jest znacznie ograniczone w czasie. Dla zachowania ciągłości genetycznej organizmu jądro jest niezbędne, pomimo możliwości replikacji DNA plastydów. Być może, do matrycy plastydów muszą być dostarczane pewne metabolity pochodzenia jądrowego, na przykład określone frakcje długotrwałego mRNA. Stabilność informacyjnego RNA byłaby jedną z cech charakterystycznych acetabularii wyróżniającą ją spośród innych systemów biologicznych (10, 15). Zdaniem Sironvala (61), w niektórych procesach komórkowych, na przykład asymilacji dwutlenku węgla i wydzielania

tlenu u acetabularii odgrywałoby rolę wzajemne oddziaływanie na siebie informacyjnych RNA pochodzenia jądrowego i plastydialnego.

Acetabularia jest też cennym obiektem w badaniach nad wpływem cytoplazmy na jądro komórkowe. Zaburzenie procesów dostarczających energię, które zachodzą w cytoplazmie, na przykład dwunitrofenolem (11, 40) rozkojarzającym fosforylację i utlenianie, bądź też przez etiologowanie komórki (40, 42, 43), wywołuje poważne zmiany degeneracyjne w jądrze komórkowym, między innymi obniżenie intensywności metabolizmu RNA (11, 40, 42). Zdaniem Bracheta (10), jednym z najciekawszych problemów biochemicznych, jakie należy wyjaśnić w badaniach nad acetabularią, jest zagadnienie natury czynników cytoplazmatycznych wpływających na intensywność procesów transkrypcji jądrowego RNA i replikacji DNA.

Niewyjaśniona w pełni natura hämerlingowskich „substancji morfogenetycznych” zwraca uwagę badaczy na rolę kwasów rybonukleinowych, a także pewnych białek, w procesach przekazywania informacji koniecznych dla prawidłowej morfogenezy plechy acetabularii. Rozszerzając dawniejsze sugestie B e t h a (5), Z e t s c h e (78, 79) opowiedział się za istnieniem kilku pul przerośników informacji genetycznej i przypuszcza, że wzrost trzonka i chwytników oraz budowa kapelusza odbywa się pod kontrolą odmiennych pul przerośników syntetyzowanych w jądrze z udziałem odpowiednich genów. Geny te, czynne już we wczesnych etapach rozwoju zygoty nieodróżnicowanej na poszczególne organoidy, kierują syntezą przerośników obu typów jednocześnie. Przerośniki z kolei — również jednocześnie i w sposób ciągły a nie jednorazowo — są transportowane z jądra do cytoplazmy i tam gromadzone. Te z nich, które warunkują rozwój kapelusza plechy, początkowo pozostają tam w stanie nieaktywnym. Natomiast przerośniki kierujące rozwojem trzonka i chwytników działają od razu. Wykorzystywanie informacji zawartych w przerośnikach wprzęgniętych w procesy wzrostu kapelusza zaczyna się dopiero wówczas, gdy trzonek osiągnie maksymalne rozmiary. Wnioski te wyciągnął Z e t s c h e (79) z następujących doświadczeń. Część bazalną trzonka plechy wraz z chwytnikami umieszczał on w różnych odstępach czasu po odcięciu części wierzchołkowej w środowisku z aktywnymyocyną (10 µg/ml), w wyniku czego synteza RNA zależna od DNA była hamowana. Po usunięciu antybiotyku z pożywki i po odcięciu chwytника z jądrem, pozostała część bazalna trzonka wykazywała tym większą zdolność do różnicowania (wykształcała tym większy kapelusz), im więcej upłynęło czasu od odcięcia szczytowej części trzonka do momentu umieszczenia części podstawkowej trzonka w środowisku z antybiotykiem. Świadczyło to, że przebieg morfogenezy regulowany był niejako ilością przerośników informacji wytworzonych w jądrze komórkowym. Jak już podkreślaliśmy wyżej, „substancje morfogenetyczne” gromadzą

się przede wszystkim w części wierzchołkowej trzonka (42, 77), a ta — w przytoczonym doświadczeniu Zetsche'go (79) — została odcięta.

Następstwo czasowe rozwoju trzonka i kapelusza w ontogenezie acetabularii jest najprawdopodobniej — zdaniem autora — odzwierciedleniem kolejnej aktywacji przekaźników informacji dla obu procesów a nie aktywacji genów kierujących syntezą tych przekaźników. Aktywacja przekaźników byłaby regulowana na poziomie translacji kodu genetycznego. Zetsche (78) jest zdania, że przekaźnikami informacji są informacyjne kwasy rybonukleinowe o długim półokresie trwania a nie białka; bowiem puromycyna hamująca biosyntezę białek na poziomie rybosomu, hamowała wprawdzie ich syntezę u acetabularii, nie wpływała natomiast na transport „substancji morfogenetycznych”. Substancje te, nagromadzające się w cytoplazmie nawet w obecności puromycyny w pożywce wzrostowej acetabularii, zaczynają kierować syntezą białek po usunięciu antybiotyku (78). Jeśli bowiem bazalne fragmenty trzonka plechy wraz z ryzoidem, a więc fragmenty jądrzaste, były przetrzymywane przez 10 dni w środowisku zawierającym puromycynę, a potem usuwano z nich jądro i z kolei — antybiotyk z pożywki, otrzymywano bezjądrowe fragmenty bazalne trzonka zdolne do intensywnej syntezy białka. Natomiast fragmenty komórkowe traktowane puromycyną w nieobecności jądra po zmianie pożywki nie syntetyzowały białek. Jeśli interpretacja Zetsche'go jest prawidłowa, poważnie zbliżylibyśmy się do poznania natury „substancji morfogenetycznych” acetabularii i lepszego zrozumienia roli kwasów nukleinowych w morfogenezie komórki.

LITERATURA

1. Baltus E., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 337 (1959).
2. Baltus E., Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 490 (1963).
3. Baltus E., Quertier J., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 192 (1966).
4. Baltus E., Six N., dane niepublikowane, cyt. wg 10.
5. Beth K., *Z. Naturforsch. sect. B* **10**, 267 (1955).
6. Boloukhère-Presburg M., *J. Microscop.* **4**, 363 (1965).
7. Brachet J., *Acad. Roy. Belg. Bull.* **49**, 862 (1963).
8. Brachet J., *Acad. Roy. Belg. Bull.* **51**, 257 (1965).
9. Brachet J., *Arch. Biol. (Liège)* **76**, 611 (1965).
10. Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta Library*, red. V. V. Koningsberger, L. Bosch, Elsevier Publish. Comp. 1967, tom 10, str. 330.
11. Brachet J., *The Cell*, tom 2, str. 771, red. J. Brachet, A. Mirsky, 1961.
12. Brachet J., *Nature* **186**, 194 (1960).
13. Brachet J., *Nature* **199**, 714 (1963).
14. Brachet J., *Nature* **213**, 650 (1967).
15. Brachet J., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **15**, 99 (1965).
16. Brachet J., Chantrenne H., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **60**, 547 (1952).
17. Brachet J., Chantrenne H., Vanderhaege F., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 544 (1955).
18. Brachet J., Denis H., *Nature* **198**, 205 (1963).

19. Brachet J., Denis H., De Vitry F., *Develop. Biol.* **9**, 398 (1964).
20. Brachet J., Goffeau A., *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* **259**, 2899 (1964).
21. Brachet P., Six N., *Planta* **68**, 225 (1966).
22. Brachet J., Szafarz D., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 588 (1953).
23. Ceska M., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **70**, 566 (1962).
24. Clauss H., *Planta* **52**, 334 (1958).
25. De Vitry F., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **47**, 1325 (1965).
26. De Vitry F., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **47**, 1353 (1965).
27. De Vitry F., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **47**, 1375 (1965).
28. De Vitry F., *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* **258**, 4829 (1964).
29. De Vitry F., *Develop. Biology* **9**, 484 (1964)
30. De Vitry F., *Exptl. Cell Res.* **25**, 697 (1962).
31. De Vitry F., *Exptl. Cell Res.* **31**, 376 (1963).
32. De Vitry F., *Protoplasma* **55**, 313 (1962).
- 32a. Edström J. E., Janowski M., Hanock-Quertier J., Tencer R., Brachet J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 406 (1968).
33. Errera M., Vanderhaeghe F., *Exptl. Cell Res.* **13**, 1 (1957).
34. Gansen P. van, Bolouckère-Presburg M., *J. Microscop.* **4**, 347 (1965).
35. Gibor A., Izawa M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1162 (1963).
36. Goffeau A., Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 302 (1965).
37. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J. W. — w druku.
38. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **10**, 491 (1964)
39. Green B., Heilporn V., Limbosch S., Boloukhère M., Brachet J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1351 (1967).
40. Hämmerling J., *Annual Rev. Plant. Physiol.* **14**, 65 (1963).
41. Hämmerling J., *Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ.* **131**, 1, 181 (1934). cyt. wg 29.
42. Hämmerling J., Hämmerling Ch., *Planta* **52**, 516 (1959).
43. Hämmerling J., Werz G., *Z. Naturforsch. sect. B*, **13**, 449 (1958).
44. Heilporn-Pohl V., Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 429 (1966).
45. Janowski M., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **71**, 819 (1963).
46. Janowski M., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 399 (1965).
47. Naora H., Naora H., Brachet J., *J. Gen. Physiol.* **43**, 1083 (1960).
48. Naora H., Richter G., Naora H., *Exptl. Cell Res.* **16**, 434 (1959).
49. Olszewska M. J., Brachet J., *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **68**, 693 (1960).
50. Olszewska M. J., Brachet J., *Exptl. Cell Res* **22**, 370 (1961).
51. Olszewska M. J., De Vitry F., Brachet J., *Exptl. Cell Res.* **24**, 58 (1961).
52. Richter G., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 407 (1959).
53. Richter G., *Naturwissenschaften* **44**, 520 (1957).
54. Richter G., *Planta* **52**, 554 (1959).
55. Schweiger H. G., Berger S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 533 (1964).
56. Schweiger H. G., Berger S., Dillard W. L., Gibor A., Materiały VII Międzynarodowego Kongresu Biochemii, Tokyo 1967, Symp. VII, str. 407.
57. Schweiger H. G., Bremer H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 50 (1961).
58. Schweiger H. G., Bremer H. J., *Exptl. Cell Res.* **20**, 617 (1960).
59. Schweiger H. G., Schweiger E., *Naturwissenschaften* **50**, 620 (1963).
60. Shephard D. C., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 635 (1965).
61. Sironval C., Le Chloroplaste, Croissance et Vieillessement, red. C. Sironval, Mason et Cie, Paris 1967, str. 263.

62. Stich H., Hämmerling J., *Z. Naturforsch. sect. B*, **8**, 329 (1953).
63. Stich H., Plaut W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 119 (1958).
64. Sutter R. P., Whitman S. L., Webster G., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 233 (1961).
65. Vanden Driessche T., *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 456 (1966).
66. Vanden Driessche T., *Exptl. Cell Res.* **42**, 18 (1966).
67. Vanderhaeghe F., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **60**, 190 (1952).
68. Vanderhaeghe F., Szafarz D., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **63**, 267 (1955).
69. Vanderhaeghe F., Thésè, Université Libre de Bruxelles 1957, cyt. wg 50.
70. Webster G., Whitman S. L., Heinz R. L., *Plant Physiol. Suppl.* **37**, XX (1962).
71. Werz G., *Planta* **55**, 22 (1960).
72. Werz G., *Planta* **57**, 636 (1962).
73. Werz G., *Planta* **62**, 255 (1964).
74. Werz G., *Z. Naturforsch. sect. B*, **16**, 126 (1961).
75. Werz G., Hämmerling J., *Planta* **53**, 145 (1959).
76. Werz G., Hämmerling J., *Z. Naturforsch. sect. B*, **16**, 829 (1961).
77. Zetsche K., *Natuwissenschaften* **51**, 18 (1964).
78. Zetsche K., *Z. Naturforsch. sect. B*, **21**, 88 (1966).
79. Zetsche K., *Z. Naturforsch. sect. B*, **21**, 375 (1966).

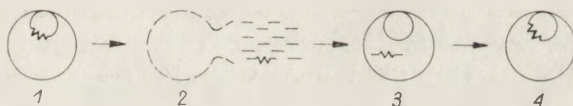
MIROŚŁAWA PIECHOWSKA *

Transformacja bakterii

Bacterial Transformation

The characteristics of biologically active DNA, the state of bacterial competence, the uptake and integration of donor DNA and the phenotypic expression of the transferred genetic information are described.

Transformacja jest procesem międzykomórkowego przenoszenia informacji genetycznej, polegającym na wnikięciu do komórek bakterii—biorców cząsteczek DNA, pochodzących z bakterii—dawców, i zastąpieniu przez nie odpowiednich fragmentów genomu. Informacja genetyczna kontrolowana przez wbudowany fragment DNA ujawnia się w komórce biorcy i jest przekazywana z pokolenia na pokolenie (2, 4, 21, 41, 50, 71) (rysunek 1).



Rys. 1. Schemat procesu transformacji.

1. Komórka bakterii—dawcy. ———— — odcinek chromosomu różniący się od odpowiedniego odcinka biorcy (marker).
2. Rozpuszczenie ściany komórkowej, pęknięcie chromosomu i uwolnienie DNA z komórki dawcy.
3. Komórka biorcy, która pobrała cząsteczkę DNA dawcy zawierającą marker.
4. Komórka transformanta powstała w wyniku włączenia markera do chromosomu biorcy.

Transformację bakterii można uzyskać przy użyciu zabitych lub rozpuszczonych komórek dawców, a także wyodrębnionego z nich DNA. W artykule omówiono tylko te zjawiska towarzyszące transformacji, które są poznane w stopniu umożliwiającym użycie stosunkowo prostych i ścisłych sformułowań, licząc na możliwość pełniejszego zaspokojenia zainteresowań czytelnika przez wcześniejsze artykuły przeglądowe (5, 44, 54, 100, 104) oraz szczegółowe publikacje cytowane w tekście.

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki P.A.N. Warszawa.

I. Wstępna charakterystyka procesu transformacji

Dla uzyskania transformacji *in vitro* z hodowli bakterii izoluje się komórki mutanta, na przykład opornego na streptomycynę, i rozmnaża się je, a następnie wyodrębnia DNA. Oczyszczone DNA, dodane do płynnej hodowli wyjściowego szczepu, wrażliwego na streptomycynę, wywołuje przekształcenie niektórych bakterii w komórki odporne na ten antybiotyk. Wyodrębnienie uzyskanych transformantów wymaga jedynie dodania streptomycyny, która powoduje obumarcie nietransformowanej części populacji.

Procent transformowanych komórek hodowli biorcy zależy od rodzaju użytych bakterii i transformowanych cech oraz innych warunków doświadczenia. Przy stałej gęstości bakterii — biorców liczba transformantów zależy od stężenia dodawanego DNA, a w pewnym zakresie stężeń jest do niego wprost proporcjonalna. Liczba transformantów, otrzymywana przy nasycającym stężeniu DNA, charakteryzuje zdolność szczepu biorcy do ulegania transformacji, natomiast najniższe stężenie DNA, przy którym otrzymuje się jednego transformanta, charakteryzuje stężenie biologicznie aktywnych cząsteczek w preparacie DNA.

Zjawisko transformacji *in vitro* ma zasięg dość ograniczony. W ciągu dwudziestu kilku lat badań udało się wywołać transformację zaledwie u kilkudziesięciu szczepów, przynależnych do dziewięciu grup rodzajowych bakterii. Najlepiej poznano 4 układy transformacji: *Diplococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus* grupy H. Wachlarz cech używanych w transformacji jest znacznie bardziej urozmaicony, tak więc przekazywane są cechy oporności na antybiotyki lub sulfonamidy, wytwarzania różnych enzymów, wytwarzanie rzęsek, wytwarzanie otoczki itd. Wybór rodzaju transformowanych cech jest uzależniony od celu jakiemu mają służyć doświadczenia, jak również od stopnia trudności metody selekcji transformantów i od wydajności transformacji. Wiadomo bowiem, że u jednego bakteryjnego szczepu — biorecy wydajność transformacji poszczególnych cech może wykazywać znaczne różnice.

II. Charakterystyka transformującego DNA

1. Postać DNA wyodrębnionego z bakterii i jej pochodzenie

Używanie chemicznie czystego DNA do transformowania cech umożliwia badanie zależności między budową a funkcją materiału genetycznego. Z badań autoradiograficznych bakteryjnych chromosomów (12) i z ich obrazów elektronomikroskopowych (22, 59, 70) wynika, że chromosom bakteryjny jest pojedynczą, nitkowatą cząsteczką DNA o ciężarze czą-

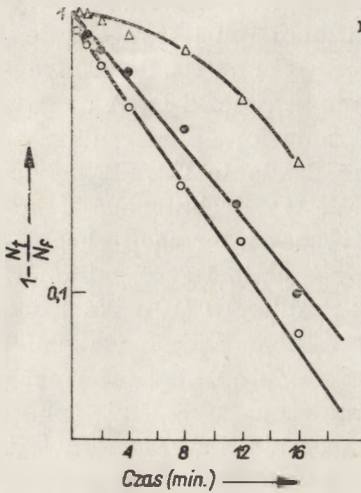
steczkowym około $1,4 \times 10^9$ do 2×10^9 daltonów. Częsteczka ta ma średnicę około 25 Å, długość od 0,7 do 1 mm i występuje prawdopodobnie w zamkniętej, kolistej postaci (12). Chromosom bakteryjny zawiera od 2,3 do 3,3 milionów par nukleotydów, a zatem przy udziale wszystkich nukleotydów jednej nici w trójkowym zapisie aminokwasów jego DNA nosiłoby zapis około 0,8 do 1,1 miliona aminokwasów, co odpowiada liczbie mniej więcej 3000 cząsteczek białek, zbudowanych średnio z 300 aminokwasów. Cienka i długa nić bakteryjnego chromosomu jest mechanicznie nietrwała i w czasie oczyszczania ulega rozerwaniu na 100 do 200 fragmentów. Nawet znacznie krótsze od chromosomu cząsteczki DNA ulegają rozerwaniu pod wpływem intensywnego mieszania, przepuszczania roztworów przez cienkie igły od strzykawek lub działanie ultradźwięków (19, 20, 26, 48, 69). Poszczególne cząsteczki DNA wyodrębnionego z komórek zawierają więc tylko fragmenty genetycznej informacji chromosomu, mają one ciężar cząsteczkowy wynoszący średnio 10—20 milionów (wartości skrajne od kilku do czterdziestu kilku milionów (10)). Na jedną cząsteczkę o ciężarze cząsteczkowym około 10 milionów przypada mniej więcej 15 genów. Powstaje pytanie — w jakim stopniu układ informacji genetycznej cząsteczek DNA odpowiada liniowemu układowi genów w chromosomie bakteryjnym i jakie ma to znaczenie dla transformacji. Rozpatrując losy dwóch cech A i B, których zapis położony jest w pewnej odległości na chromosomie (97), można przewidzieć, że po wyodrębnieniu DNA, któremu towarzyszy przypadkowe pęknięcie chromosomu otrzymamy trzy rodzaje cząsteczek: zawierające cechę A, zawierające cechę B oraz, w przypadku dostatecznie małej odległości między zapisem cech, cząsteczki z dwoma cechami A i B. Procentowa zawartość cząsteczek z dwoma cechami powinna zależeć od odległości między ich zapisem w chromosomie. Otrzymane cząsteczki z jedną badaną cechą nie będą jednakowe pod względem składu i sekwencji nukleotydów, ponieważ pęknięcia poszczególnych chromosomów mogą wystąpić w różnej odległości od obszaru zapisu danej cechy. W przypadku wystąpienia dwóch cech w jednej cząsteczce DNA mogą one być łącznie przekazywane transformowanej komórce (tak zwane „cechy związane”).

2. Cechy niezależne i związane

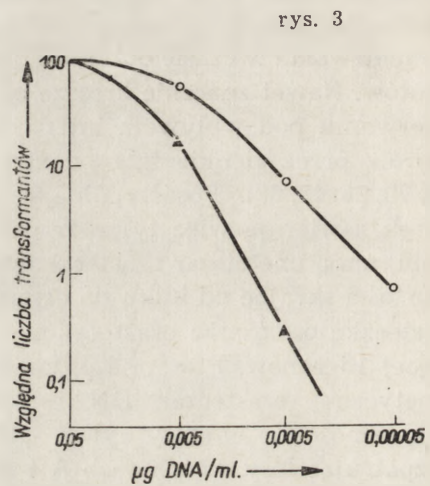
Cechy związane rozpoznaje się przede wszystkim na podstawie częstotliwości występowania „podwójnych transformantów” to znaczy uzyskujących dwie cechy. Jest ona bowiem zawsze większa od iloczynu częstotliwości występowania transformantów pojedynczych cech tworzących parę. Przez częstotliwość występowania transformantów rozumie się stosunek liczby transformantów do liczby wszystkich komórek w populacji bakterii.

Transformacja cech związanych podlega takim samym prawom jak

transformacja cech pojedynczych; przy stałej gęstości bakterii liczba transformantów podwójnych jest wprost proporcjonalna do stężenia DNA, przy czym jest ona stałą frakcją pojedynczych transformantów bez względu na stężenie DNA (38). Równoczesna transformacja dwóch związanych cech jest liniową funkcją czasu tak samo jak transformacja pojedynczych cech (rysunek 2).



rys. 2



rys. 3

Rys. 2. Kinetyka podwójnych, niezwiązanych transformacji w hodowli *H. influenzae*. Według Goodgala (38).

$\log (1 - N_t/N_f)$ jest wykreślony w funkcji czasu.

N_t = liczba transformantów w czasie t , N_f = maksymalna liczba transformantów otrzymywana po 25–30 minutach kontaktu DNA z populacją biorcy.

— Δ — Δ — Δ — podwójne, odporne na streptomycynę i katomycynę transformanty otrzymywane przy użyciu mieszaniny dwóch preparatów DNA: wyodrębnionego z komórek opornych na streptomycynę i z komórek opornych na katomycynę.

— ● — ○ — ● — pojedyncze transformanty odporne na streptomycynę

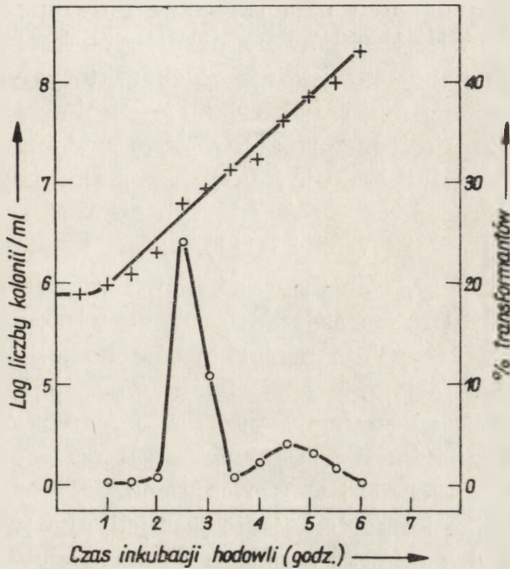
— ○ — ○ — ○ — pojedyncze transformanty odporne na katomycynę.

Rys. 3. Wpływ stężenia DNA na względną liczbę podwójnych transformantów uzyskujących niezwiązane cechy oporności na streptomycynę i erytromycynę (—▲—▲—) w hodowli biorcy *H. influenzae*. Dla porównania wykres wpływu stężenia DNA na względną liczbę pojedynczych transformantów, opornych na streptomycynę lub erytromycynę (○—○—○—). Według Goodgala (38).

W przypadku cech niezwiązanych również pojawiają się podwójne transformanty, jednak zależność pomiędzy ich liczbą a stężeniem DNA, przy stałej gęstości bakterii, jest zależnością drugiego rzędu. Częstotliwość występowania podwójnych transformantów jest bowiem równa iloczynowi częstotliwości występowania pojedynczych transformantów w populacji biorcy. Zmiany względnej liczby pojedynczych i podwójnych transformantów dwóch niezwiązanych cech w funkcji stężenia DNA przedstawia rysunek 3 (38). Kinetyka podwójnych transformacji dwóch niezwiązanych cech również wykazuje zależność drugiego rzędu (rysunek 2).

III. Bakterie zdolne do transformacji

Do uzyskania transformacji nie wystarcza dodanie transformującego DNA do hodowli bakterii. Bakterie te muszą być zdolne do pobrania DNA, do wbudowania go w chromosom i do ulegania dalszym skomplikowanym procesom, prowadzącym do ujawnienia nowej cechy. Stan zdolności do ulegania transformacji nazywany jest kompetencją. Jest to przejściowy stan fizjologiczny (rysunek 4) występujący tylko w ściśle określonych warunkach hodowli: *pH*, temperatury, stężenia jonów, składu pożywki, napowietrzania itp. Zmiana tych warunków wywołuje drastyczne zmiany wydajności transformacji (7, 35, 65, 66, 103, 110, 120).



Rys. 4. Wzrost i kompetencja szczepu *Challis* należącego do paciorkowców hemolizujących grupy H. Według Piechowskiej i Shugara — wykres nie publikowany.

Wzrost mierzony w jednostkach tworzących kolonie. Wartości otrzymane przez posiew próbki hodowli płynnej na podłoże stałe.

Kompetencja mierzona w jednostkach tworzących kolonie transformantów opornych na dwuhydrostreptomycynę. Warunki transformacji według Piechowskiej i Shugara (93).

Wiadomości o istocie stanu kompetencji są dotychczas tak ograniczone, że nie pozwalają na wywołanie transformacji u dowolnie wybranych bakterii. Na podstawie pewnych faktów można jednak niekiedy wyłuszczyć przyczyny wyników dodatnich lub ujemnych. Zauważono na przykład, że w pięciu układach transformacji (paciorkowce hemolizujące — szczep *Challis*, *D. pneumoniae*, *B. subtilis*, *B. cereus* i *H. influenzae*) pojawienie się stanu kompetencji jest warunkowane wytwarzaniem przez bakterie tak zwanego „czynnika kompetencji” (6, 16, 28, 87, 112), który prawdopodobnie pełni istotną rolę w aktywnym transporcie czą-

steczek DNA przez ścianę komórkową. Czynniki kompetencji wytwarzany przez paciorkowce (szczep *Challis*) oraz *D. pneumoniae* i *B. subtilis* ulega inaktywacji pod wpływem proteolitycznych enzymów, jest więc najprawdopodobniej białkiem lub jego aktywna część jest białkowa (16, 24, 112). Ciężar cząsteczkowy czynnika kompetencji u *D. pneumoniae* wynosi około 10 000 (113). Natomiast w układzie transformacji *H. influenzae* czynnik kompetencji jest niskocząsteczkową substancją dializującą przez półprzepuszczalne błony, której aktywność jest tylko częściowo niszczone przez enzymy proteolityczne (6).

Informacje o przypuszczalnej roli czynnika kompetencji w procesie wnikania DNA do komórek biorców pochodzą z immunologicznych badań kompetentnych hodowli paciorkowców i dwoinek zapalenia płuc. Okazało się, że surowice królików uodpornionych komórkami zawierającymi czynnik kompetencji pozbawiają go charakterystycznej aktywności, a reagując z kompetentnymi bakteriami — zmniejszają wiązanie DNA przez komórki i hamują transformację. Prawdopodobnie surowica odpornościowa inaktywuje, lub blokuje znajdujące się na powierzchni kompetentnych komórek receptory DNA, których część składową może stanowić czynnik kompetencji (77, 85, 86, 111).

Czynnik kompetencji, pochodzący z hodowli szczepu *Challis* może wywoływać pobieranie DNA oraz transformację u niepobierającego DNA szczepu *Wicky*, należącego do paciorkowców hemolizujących grupy H (24, 82, 88). Jednakże działanie czynnika kompetencji jest ograniczone, na przykład czynnik wytwarzany przez *D. pneumoniae* może wywoływać kompetencję w hodowli *D. pneumoniae* lub *Streptococcus viridans*, ale nie może u *H. influenzae* i *Escherichia coli*.

Obecność czynnika kompetencji nie jest jedynym warunkiem wystąpienia transformacji, ponieważ znane są bakterie wytwarzające go i pobierające DNA, ale niezdolne do transformacji (90). Oczywiście jest, że nie mogą one ulegać dalszym etapom procesu polegającym na włączeniu DNA dawcy do chromosomu i na zmianach w metabolizmie komórek biorców.

Procentową zawartość kompetentnych komórek w populacji biorycy określa się na podstawie wydajności transformacji. Najczęściej wydajność transformacji jednej cechy wynosi kilka procent, ale zdarza się również wyższa (42, 52). U *H. influenzae* uzyskano 40 procentową wydajność sumarycznej transformacji pięciu niezależnych cech (40), a w przypadku *Streptococcus* — 50 lub 60 procentową wydajność (w zależności od szczepu biorycy) transformacji dwóch niezależnych cech (91). Wydajności transformacji wyrażane są zawsze w jednostkach tworzących kolonie, ponieważ używane bakterie występują zarówno w postaci pojedynczych komórek jak i w postaci skupisk złożonych z kilku do kilkunastu komórek. Przeliczenie otrzymanych wartości na procent transformowanych komórek wymaga mikroskopowego oznaczenia częstości występowania poszcze-

gólnych rodzajów skupisk w populacji biorcy i obliczenia prawdopodobieństwa występowania transformowanych komórek w skupiskach (92). Według takiego obliczenia u paciorkowców szczepu *Challis* 50% transformowanych jednostek tworzących kolonie odpowiada 21% transformowanych komórek w populacji biorców.

Określenie liczby transformowanych komórek w populacji nie jest jednoznaczne z określeniem liczby komórek pobierających DNA. Autoradiograficzne badania Younga (119) wykazały, że w populacji *B. subtilis* procent transformowanych komórek jest pięciokrotnie niższy od procentu komórek pobierających DNA. Przyczyną tego może być zbyt mała liczba transformowanych cech, niewystarczająca do wykrycia wszystkich rekombinantów, lub też występowanie rekombinacji tylko w pewnej frakcji komórek pobierających DNA (patrz dodatek I).

IV. Przebieg reakcji między cząsteczkami DNA i bakteriami

1. Wnikanie DNA do bakterii biorców

Pierwszym etapem wnikania jest odwracalna adsorpcja cząsteczek DNA na powierzchni komórek, odbywająca się z tak dużą szybkością, że jej czas nie daje się zmierzyć. Drugi etap polega na trwałym wiązaniu DNA z komórkami bakterii (w sposób zabezpieczający cząsteczki przed działaniem DN-azy (67) co można oznaczyć dodając DNA znakowane izotopami radioaktywnymi a także ciężkimi. Trwałe wiązanie takiej ilości DNA, która zapewnia otrzymanie jednego transformanta wymaga 4 do 5 sekund u *H. influenzae* (108), a około 2 minut u *B. subtilis* (68, 105). Otrzymanie jednego podwójnego transformanta nabywającego dwie związane cechy wymaga dłuższego czasu pobierania DNA przez komórki niż otrzymanie pojedynczych transformantów, przy czym wartość stosunku liczby podwójnych transformantów do liczby pojedynczych transformantów rośnie do wartości granicznej wraz z przedłużaniem czasu kontaktu DNA z bakteriami. Co więcej — w przypadku różnych par związanych cech — minimalny czas pobierania DNA, konieczny dla otrzymania jednego podwójnego transformanta, jest liniową funkcją odległości między cechami tworzącymi parę. Wskazuje to, że cząsteczka DNA wnika do komórki bakteryjnej równolegle do swojej dłuższej osi (68, 105).

Ilość DNA pobranego przez populację bakterii zwiększa się wraz ze wzrostem kompetencji hodowli i stężenia DNA aż do osiągnięcia ilości cząsteczek nasycających komórki biorcy (7, 29, 39, 67). Ilość DNA, pobraną przez jedną komórkę, oblicza się dzieląc całą ilość DNA, związaną przez populację, przez liczbę transformantów uzyskujących jedną, nową cechę dziedziczną. Jedna komórka transformanta *H. influenzae* może pobrać 120 cząsteczek DNA (39, 99), a komórka transformanta *D. pneu-*

moniae — około 500 cząsteczek DNA (29, 67). Wartości te można traktować jedynie jako orientacyjne, ponieważ wiadomo, że liczba transformantów uzyskujących jedną cechę jest mniejsza od liczby wszystkich zdolnych do transformacji komórek i prawdopodobnie jeszcze mniejsza od liczby wszystkich komórek pobierających DNA w danej populacji (40, 119).

2. Rekombinacja genetyczna

Komórki kompetentne mogą pobierać nie tylko cząsteczki transformującego DNA, ale również heterologiczny DNA pochodzący z innego gatunku lub rodzaju bakterii, a nawet wyodrębniony z komórek zwierzęcych (67, 99, 101). Pomimo związania z komórką biorcy heterologiczny DNA na ogół nie wywołuje transformacji, ponieważ jest ona możliwa jedynie przy dużym podobieństwie składu i sekwencji nukleotydów DNA dawcy i biorcy. Zależność tę wykryli Marmur, Falkow i Mandel (72) gromadząc dowody wykazujące, że cząsteczki DNA pochodzące z bakterii, pomiędzy którymi zachodzi transformacja, mogą tworzyć połączenia hybrydowe po denaturacji i renaturacji cieplnej. W mieszaninach DNA, wyodrębnionego z bakterii—biorców, z DNA, które nie może wywołać transformacji cząsteczki hybrydowe nie tworzą się. Przypuszcza się zatem, że wystąpienie rekombinacji genetycznej wymaga utworzenia przejściowego połączenia pomiędzy chromosomem biorcy a DNA dawcy, opartego na komplementarności zasad rekombinujących cząsteczek DNA.

Los DNA dawcy w komórkach bakterii badano metodami fizykochemicznymi, polegającymi na użyciu DNA dawcy znakowanego izotopami ciężkimi i radioaktywnymi oraz metodami biologicznymi. Te ostatnie polegają na oznaczeniu transformującej aktywności nowowprowadzonej cechy dawcy w lizatach komórek biorcy, sporządzonych w różnym czasie po pobraniu DNA. W doświadczeniach tych szczep biorcy był biologicznie znakowany jedną cechą (A), a DNA dawcy — drugą cechą (B), przy czym obie cechy miały tę właściwość, że gdy znajdowały się w jednym preparacie DNA, zachowywały się jak cechy związane. W takim układzie miarą rekombinacji genetycznej było pojawienie się w lizatach komórek biorcy DNA noszącego związane cechy (AB). Okazało się, że stopień powiązania cech A i B po rekombinacji jest taki sam jak w DNA pochodzącym z komórek nabywających te same cechy drogą mutacji. Oznacza to, że transformowana cecha włącza się do chromosomu biorcy zawsze w to samo, ściśle określone miejsce. W podobnych układach, wykorzystujących pary związanych cech, ustalono ponadto, że nowa cecha zajmuje w chromosomie miejsce odpowiadającej jej cechy allelicznej (38, 51, 55).

Pierwszego dowodu włączenia części DNA dawcy do chromosomu biorcy dostarczyło porównanie szybkości inaktywacji transformowanej

cechy w DNA dawcy, znakowanym ^{32}P , z szybkością inaktywacji tej samej cechy znajdującej się w DNA biorcy, wyodrębnionym po rekombinacji genetycznej. Biologiczna aktywność badanej cechy maleje z taką samą szybkością w obu wypadkach. Wynik ten miał rozstrzygające znaczenie dla ukształtowania poglądów na transformację w okresie, gdy poważnie traktowano teorię tak zwanej „zmiany matrycy”. Według niej rola pobranego DNA dawcy miałyby polegać na tym, że stanowiłby on wzorzec do replikacji niektórych odcinków chromosomu biorcy. Zakładając, że rozpad ^{32}P w DNA z takim samym prawdopodobieństwem uszkadza biologiczną aktywność dawcy jak i biorcy, Fox (32) obliczył, że wielkość wbudowanego fragmentu DNA odpowiada cząsteczce o ciężarze około 600 000 daltonów. Podobnych dowodów wbudowania fragmentu DNA dawcy dostarczył pomiar czasu inaktywacji transformowanej cechy przez promieniowanie UV, gdy tyminę DNA dawcy zastąpiono przez 5-bromouracyl zwiększający wrażliwość DNA na działanie ultrafioletu. Badana cecha wykazała taką samą wrażliwość na promieniowanie UV zarówno wtedy, gdy znajdowała się w DNA dawcy, jak i wówczas, gdy jej aktywność była już związana z DNA biorcy (107).

Wielu informacji o losie transformującego DNA w komórkach biorcy dostarczyły badania, w których używano DNA dawcy znakowanego izotopami radioaktywnymi oraz ciężkimi. Znakowanie takie w połączeniu z techniką ultrawirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu (75) pozwala odróżnić „ciężkie” DNA dawcy i „lekkie” DNA biorcy, tworzące osobne, dobrze oddzielone pasma. Wyniki badań w układach transformacji *D. pneumoniae*, *B. subtilis* i *H. influenzae* wykazały zarówno podobieństwo jak i różnice między układami.

3. Rekombinacja genetyczna u *D. pneumoniae*

Pierwszym badanym i stosunkowo najdokładniej poznanym jest układ transformacji *D. pneumoniae* (34, 60, 62).

W doświadczeniach Lacksa (60, 62) bakterie biorcy pobierały w ciągu 15 minut DNA znakowany ^{32}P . Następnie były one, po różnych okresach czasu, rozpuszczane i odbiałczane. Frakcjonowanie w kolumnie wypełnionej metylovaną albuminą na ziemi okrzemkowej oraz analiza DNA bakterii w gradiencie gęstości CsCl pozwoliło ustalić ciężar cząsteczkowy i strukturę drugorzędową pobranego DNA. Okazało się, że natychmiast po wnikięciu do komórki 50% radioaktywnego materiału znajdowało się we frakcji DNA będącego w formie pojedynczych łańcuchów. Pozostały ^{32}P był równo rozdzielony pomiędzy natywne DNA i dializujące cząsteczki, składające się z nieorganicznych fosforanów, glicerofosforanu oraz czterech 5'-dezoksynukleotydów. Radioaktywność frakcji natywnego DNA Lacks tłumaczy wykorzystaniem produktów degradacji pobranego DNA, prawdopodobnie 5'-nukleotydów, do normalnej syntezy

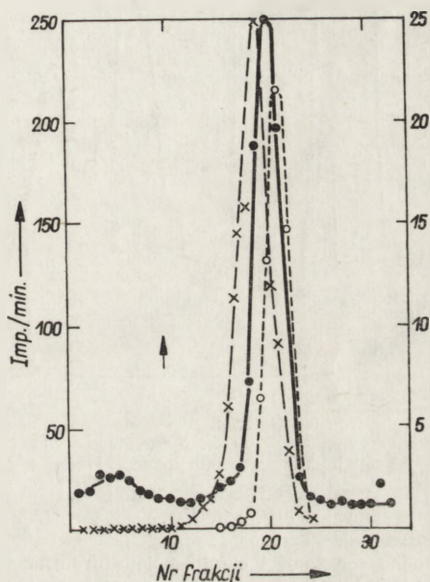
komórkowego DNA. Tłumaczenie to opiera się na braku aktywności cech dawcy w DNA biorcy w początkowym etapie transformacji, i na występowaniu radioaktywności we frakcji natywnego DNA biorcy nawet po pobraniu heterologicznego, nietransformującego ^{32}P -DNA. Znakowane fosforany nieorganiczne, wykrywane w tym wczesnym etapie transformacji, najprawdopodobniej pochodzą z defosforylacji nukleotydów. Obecność ^{32}P w glicerofosforanie może być wynikiem ustalenia się równowagi między znakowanymi fosforanami nieorganicznymi a pulą glicerofosforanu w komórce.

Ponieważ prawie połowa wnikającego do komórek DNA ulega pokawałkowaniu, a druga połowa jest przekształcona w formę pojedynczego łańcucha L a c k s (60, 61) uważa, że przemiany te są podstawową reakcją towarzyszącą przechodzeniu DNA przez ścianę komórek *pneumococcus*. Wyobraża je sobie jako „przewlekanie” cząsteczek przez ścianę komórkową przy aktywnym udziale DN-azy niszczącej tylko jeden łańcuch DNA, rozpoznawany na podstawie polarności (63).

W ciągu następnych 10 minut inkubacji bakterii, które pobrały ^{32}P -DNA zanika frakcja jednołańcuchowego DNA, jednocześnie pojawia się radioaktywność we frakcji natywnych cząsteczek DNA i nowowprowadzona cecha ujawnia biologiczną aktywność. Do frakcji natywnego DNA zostaje włączona w sposób trwały mniej więcej $\frac{1}{5}$ materiału radioaktywnego, wprowadzonego do komórek.

Dalszy los DNA pobranego przez komórki *D. pneumoniae* badali F o x i A l l e n (34) używając znakowanego fosforem ^{32}P , deuterem ^2H oraz ciężkim azotem ^{15}N DNA dawcy, który miał cechę oporności na streptomycynę. Odbiałczone lizaty komórkowe biorcy, sporządzone w różnych odstępach czasu po pobraniu transformującego DNA, były frakcjonowane w gradiencie gęstości chlorku cezu. Jak się okazało, po włączeniu nowej cechy do genomu biorcy ciężki, transformujący DNA jest związany z DNA biorcy w ten sposób, że jego charakterystyczna gęstość w CsCl jest zamaskowana (rysunek 5). Połączenie to prawdopodobnie jest kowalentne, ponieważ utrzymuje się po denaturacji cieplnej a także alkalicznej, która niszczy wiązania wodorowe pomiędzy zasadami azotowymi komplementarnych łańcuchów DNA. Ponadto działanie sił ścinających, prowadzące do zmniejszenia ciężaru cząsteczkowego DNA z 20 do 1 miliona, powoduje przesunięcie zawierających nowowprowadzoną cechę cząsteczek do pozycji pośredniej między gęstością DNA dawcy i biorcy. Tam też znajduje się materiał radioaktywny DNA dawcy (rysunek 6A). W tym stanie, denaturacja cieplna prowadzi do wydzielenia zdenaturowanego ciężkiego DNA, znakowanego ^{32}P , tak samo jak DNA dawcy (rysunek 6B). Jest to dowodem, że DNA, które w wyniku działania sił ścinających znalazło się w pozycji o gęstości pośredniej pomiędzy gęstością DNA dawcy i biorcy, było hybrydem mającym jeden łańcuch „lekki”, a drugi „ciężki”.

Jest to chyba najbardziej przekonujący dowód świadczący o tym, że biologiczna aktywność nowonabytego genu zawarta jest w natywnych cząsteczkach DNA biorcy w postaci kowalentnie z nim związanych jednołańcuchowych fragmentów DNA dawcy. Ciężar cząsteczkowy tych fragmentów, wydzielonych po sonikacji i denaturacji cieplnej preparatu, wynosi około $1/2$ miliona, co stanowi $1/40$ część dwułańcuchowej cząsteczki transformującego DNA o ciężarze cząsteczkowym 2×10^7 (patrz dodatek II).



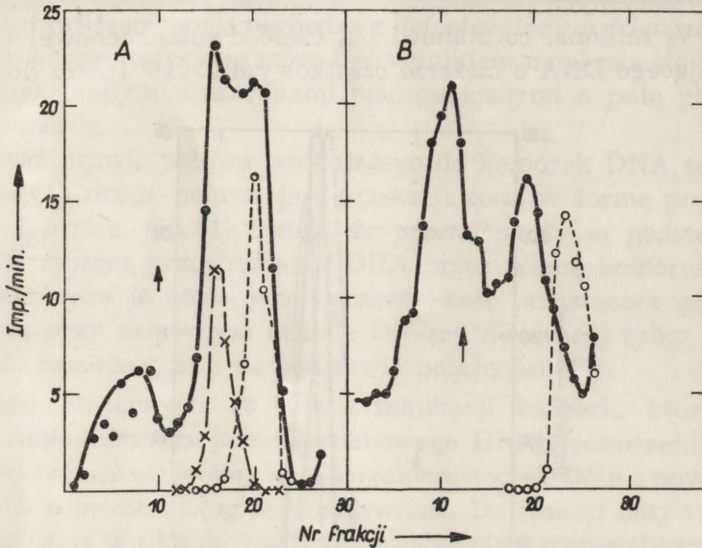
Rys. 5. Rozkład gęstości DNA wyodrębnionego z bakterii biorców potraktowanych potrójnie znakowanym (^{32}P , ^{15}N , ^2H) transformującym DNA w ciągu 15 min. w 37°C , a następnie inkubowanych 3 min. w 37°C . Strzałka wskazuje oczekiwane położenie „ciężkiego” DNA. Według Foxa (33).

- rozkład radioaktywności DNA dawcy
- x—x—x—x— rozkład transformującej aktywności DNA dawcy
- o—o—o—o— rozkład transformującej aktywności DNA biorcy

Skala po prawej stronie oznacza liczbę transformantów w ml pomnożoną przez 5×10^{-3} w przypadku markera dawcy a przez 10^{-6} w przypadku markera biorcy.

O wnoszeniu nowych cech dziedzicznych do chromosomu biorcy przez jeden z komplementarnych łańcuchów DNA dawcy świadczą również badania Guilda i Robisona (43). Po częściowym rozdziale komplementarnych łańcuchów DNA z *D.pneumoniae* za pomocą wirowania w gradencie gęstości chlorku cezu przy pH 12, wykazali oni aktywność transformującą frakcji odpowiadających zarówno „lekkemu” jak i „ciężkiemu” łańcuchowi DNA. Całkowity rozdziel komplementarnych łańcuchów DNA z *D.pneumoniae* przeprowadzili Roger, Beckmann i Hotchkiss (95) na drodze frakcjonowania zdenaturowanego DNA na kolumnach z metylowanej albuminy. Każda z otrzymanych komplementarnych frakcji DNA wywoływała transformację. Oznacza to, że nowa

cecha dziedziczna może być włączona do chromosomu biocy nie tylko w postaci właściwego jej zapisu, lecz także w postaci sekwencji nukleotydów komplementarnych do tego zapisu, będących matrycą do replikacji fragmentów polinukleotydowych, odczytywanych przez polimerazę DNA.



Rys. 6. Rozkład gęstości ekstraktów zawierających DNA z transformowanych bakterii. Według Foxa (33).

DNA dawcy potrójnie znakowane (^{32}P , ^{15}N , ^2H).

Rys. A. Ekstrakty poddane sonikacji

Rys. B. Ekstrakty poddane sonikacji i ciepłej denaturacji.

Strzałki wskazują oczekiwane położenie ciężkiego natywnego DNA dawcy.

●—● rozkład radioaktywności DNA dawcy

x—x rozkład transformującej aktywności DNA dawcy

○—○ rozkład transformującej aktywności DNA biocy.

Skala po prawej stronie oznacza liczbę transformantów w 1 ml pomnożoną przez 1,25 w przypadku markera dawcy, a pomnożoną przez 10^{-3} w przypadku markera biocy.

Wnioski o włączeniu DNA dawcy do jednej z komplementarnych nici chromosomu biocy uzyskały dodatkowe potwierdzenie w wynikach interesujących doświadczeń Guerriniego (cytowane według (33)). Bezpośrednio po pobraniu DNA przez hodowlę bioców Guerriniego doprowadził do zabicia 95% tworzących kolonie jednostek działaniem ultradźwięków, po którym w skupiskach komórek *D. pneumoniae* mogła pozostać najwyżej jedna żywa bakteria. Badanie potomstwa tych pojedynczych transformantów wykazało, że jest ono mieszane: złożone z transformowanych i nietransformowanych komórek, co uważa się za świadectwo segregacji heterozygotycznych transformantów (patrz dodatek III).

4. Rekombinacja genetyczna u *H. influenzae* i *B. subtilis*

Analogiczne badania nad transformacją *H. influenzae* (80, 107, 115, 116, 117) oraz *B. subtilis* (10, 11, 89) również dostarczyły dowodów wbu-

dowywania fragmentów DNA dawcy do chromosomu biorecy. Prawdopodobnie i w tych układach włączane są fragmenty pojedynczych łańcuchów DNA dawcy (11, 80), jednak z chromosomów rekombinantów *B.subtilis* ani *H.influenzae* nie udało się dotąd wydzielić fragmentów DNA dawcy. Dokonano jedynie pomiarów przesunięć pasm znakowanych cząsteczek DNA rekombinantów poddanych sonikacji, denaturacji oraz ultrawirowaniu w gradiencie gęstości chlorku cezu. Po pobraniu DNA przez komórki biorców *B.subtilis* i *H.influenzae* nie wykrywa się w nich jednołańcuchowego DNA dawcy w formie niezwiązanej z chromosomem. Z lizatów komórkowych można natomiast wyodrębnić pobrane DNA dawcy w rodzimej formie dwułańcuchowej charakteryzującej się pełną aktywnością transformującą (80). Przypuszcza się jednak, że losy DNA po wnikięciu do komórek oraz proces integracji pobranego DNA w trzech badanych układach są w istocie takie same, różnice polegałyby tylko na szybkości przebiegu poszczególnych reakcji wiodących do wytworzenia transformantów (80). W przypadku *B.subtilis* przypuszczenia takie są poparte wynikami badań Chilton (17), która wykazała aktywność transformującą pojedynczych łańcuchów DNA, co jest jednak sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami Rownda, Greena i Doty (73, 96, 98). W przypadku *H.influenzae* sytuacja jest jeszcze bardziej niejasna, ponieważ pewne fakty świadczą o włączaniu dwułańcuchowych fragmentów DNA dawcy do chromosomu biorecy (47, 114). Herriott (47) stwierdził bowiem, że hybrydowe DNA mające w jednym łańcuchu cechę oporności na streptomycynę, a w drugim, komplementarnym łańcuchu — cechę oporności na nowobiocynę, przekazywało obie te cechy jako związane, podobnie jak normalny, transformujący DNA, wyodrębniony z komórek mutantu *B.subtilis* opornego na oba antybiotyki (patrz dodatek IV).

Zarówno w przypadku *D.pneumoniae* jak i *B.subtilis* i *H.influenzae* usiłowano wyjaśnić czy rekombinacja genetyczna wymaga aktywnego udziału syntezy DNA w komórce. Syntezę tę hamowano 5-fluorodezoksyurydyną (31), bądź przeniesieniem bakterii do soli fizjologicznej (115) lub, w przypadku użycia tymino-zależnych szczepów biorców, usunięciem tyminy z pożywki (9), co jednak nie miało zupełnie wpływu na rekombinację genetyczną. Inna metoda polegała na hodowaniu w pożywce zawierającej 5-bromouracyl zależnych od tyminy bakterii-biorców, które następnie przenoszono do pożywki z tyminą i transformującym DNA. Lizaty komórek, które uprzednio pobrały DNA, wirowane w gradiencie gęstości chlorku cezu wykazywały transformującą aktywność rekombinantów tylko w paśmie ciężkiego DNA; pasmo hybrydowe, zsyntetyzowanego *de novo* DNA nie miało nowej aktywności transformującej (9). Tylko ten ostatni rodzaj doświadczeń dostarcza przekonujących dowodów braku wykrywalnego udziału syntezy DNA w rekombinacji. W innych bowiem doświadczeniach frakcja komórek kompetentnych nie była po-

zbawiona surowców do syntezy DNA, mając bogate zasoby nukleotydów pochodzących z degradacji części pobranego transformującego DNA. Ponieważ komórki te stanowiły nikłą frakcję całej populacji biocy, odbywającą się w nich synteza DNA mogła pozostać niezauważona.

Dotychczas dane świadczą o degradacji tej części pobranego DNA, która nie została włączona do chromosomu. Przypuszcza się, że produkty degradacji są częściowo zużywane do syntezy nowego DNA w komórce (11, 60, 80, 107). Można dodać, że rekombinacja genetyczna odbywa się normalnie w warunkach zahamowania syntezy RNA i białek (49).

Nadzieję na wyjaśnienie mechanizmu genetycznej rekombinacji kojarzy się ostatnio z odkryciem enzymów biorących udział w ciemnej reaktywacji DNA naświetlonego promieniami ultrafioletowymi (76, 102, 106) oraz ligazy polinukleotydowej (81, 118). Enzymy reaktywujące wycinają oligonukleotydowe fragmenty pojedynczych łańcuchów z dwułańcuchowych cząsteczek DNA, natomiast ligaza łączy kowalentnymi wiązaniami krótkie odcinki polinukleotydów 5'-fosforanów wtedy gdy tworzą one wodorowe wiązania z komplementarnym łańcuchem wysokocząsteczkowego polinukleotydu. Zgodnie z dzisiejszymi poglądami ten rodzaj aktywności enzymatycznej powinien odgrywać rolę katalityczną przy włączaniu fragmentów DNA dawcy do chromosomu biocy.

V. Fenotypowe ujawnienie nowonabytych cech

Transformujący DNA, który wniknął do komórek bakterii, nie może być źródłem informacji dla syntezy białek przed włączeniem do genomu gospodarza, ale i po tym wydarzeniu nie od razu następuje ujawnienie nowych cech. Jedynym wyjątkiem jest natychmiastowe rozpoczęcie wytwarzania transformowanej amylomaltazy u *D.pneumoniae* (64). W pozostałych, znanych przypadkach fenotypowe wyrażenie nowej cechy odbywa się z pewnym opóźnieniem, niejednakowym dla różnych komórek danej populacji. Pojawienie się pełnej liczby transformantów wymaga zwykle 1 do 2-godzinnej inkubacji hodowli po kilku minutowym okresie pobierania DNA. Zatem czas fenotypowego wyrażenia transformacji jest kilkakrotnie dłuższy od czasu trwania jednej generacji bakterii (1, 30, 53, 79, 87, 94). Nasuwa się pytanie czy komórki transformantów przestają się dzielić w tym okresie czy też zmniejszona aktywność metaboliczna jest charakterystyczną cechą kompetentnej frakcji hodowli (79). Na razie można tylko powiedzieć, że prawdopodobnie oba przypuszczenia są słuszne. Za jednym z nich przemawia obserwacja N e s t e r a (78), który stwierdził, że zarówno transformanty jak i kompetentna frakcja populacji *B.subtilis* jest oporna na działanie penicyliny; świadczy to o zahamowaniu wzrostu, ponieważ antybiotyk ten działa jedynie na dzielące się bakterie. Drugie przypuszczenie znajduje potwierdzenie w wynikach badań grupy C a n e l l a k i s a (58), które dowodzą, że stan fizjologiczny komórek *B.subtilis* po pobraniu DNA różni się od stanu komórek kom-

petentnych, co wyraża się zwiększoną opornością transformantów na działanie puromycyny i aktynomycyny D. Wyniki te są zgodne z zaobserwowanym przez Gimlina i wsp. (37) hamowaniem wzrostu populacji *B.subtilis* przez transformujący DNA oraz z ostatnimi doniesieniami Piechowskiej i Shugara (91), z których wynika, że transformujący DNA może nawet wywołać obumarcie części kompetentnej populacji bakterii.

VI. Występowanie transformacji w naturze

Z doświadczeń Griffitha (41) wynika, że jest możliwe przeprowadzenie transformacji *in vivo* drogą podskórnego lub dootrzewnego wstrzyknięcia zabitego szczepu dawcy i żywego szczepu biorcy. Austrian (3) oraz Ottolenghi i MacLeod (84) uzyskali transformację również w przypadku wstrzyknięcia obu żywych szczepów — dawcy i biorcy.

Wielu badaczy stwierdziło nagromadzenie się DNA w pożywkach, na których rosły różne bakterie, jak *D.pneumoniae* (83), *Streptococcus* (25), *B.subtilis* (27), *Neisseria meningitidis* (13), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes faecalis* (14, 15) oraz *Micrococcus halodenitrificans* (109). W niektórych przypadkach (13, 27) udowodniono, że wydzielone DNA odznacza się transformującą aktywnością. Dotychczas nie wyjaśniono czy zewnątrzkomórkowe DNA gromadzi się na skutek aktywnego wydzielania czy też obumierania i lizy niektórych komórek (patrz dodatek V). Wiadomo, że DNA może być uwalniany przez komórki pod wpływem działania antybiotyków (51).

Transformacja *in vitro* zachodząca we wspólnej hodowli szczepów dawcy i biorcy wskazuje na możliwość występowania podobnych procesów w naturze. Mogłyby one prowadzić do wytwarzania się nowych i niekiedy lepiej przystosowanych do środowiska mikroorganizmów. Przemawiają za tym doświadczenia Conanta i Sawyera (18), którzy umieścili żywe, słabo wirulentne szczepy biorcy i dawcy *D.pneumoniae* w środowisku ich naturalnego występowania — w drogach oddechowych myszy i otrzymali jako produkt transformacji silnie chorobotwórczy szczep dwoinek zapalenia płuc.

VII. Zastosowanie transformacji

Transformacja znajduje tak szerokie zastosowanie, że jej opis mógłby być przedmiotem niejednego artykułu. Należy więc chociaż wymienić dziedziny, którym ona służy.

Dla genetyków transformacja stanowi stosunkowo prosty układ do badań nad rekombinacją genetyczną występującą u wszystkich organiz-

mów żywych oraz do szczegółowego mapowania krótkich odcinków chromosomów bakteryjnych (27).

Systematycy traktują transformację jako sprawdzian podziału rodzajów bakterii na gatunki (72), ponieważ warunkiem jej występowania jest daleko idące podobieństwo pomiędzy chromosomami dawcy i biorcy.

Fizykochemikom, zajmującym się kwasami nukleinowymi, transformacja służy do ustalenia zależności między składem chemicznym, konfiguracją przestrzenną i wielkością a biologiczną aktywnością cząstek DNA.

Dla biologów i biochemików, transformacja jest modelowym układem w badaniach nad oddziaływaniem pomiędzy cząsteczkami DNA i żywymi komórkami w ich naturalnym środowisku. Zainteresowanie tym modelem wzrosło w ostatnich latach na skutek wykrycia rakotwórczego działania DNA wirusów (23, 36, 56, 57) i DNA wyodrębnionego z tkanek zwierzęcych (45, 46, 74) (tak zwana transformacja nowotworowa). O istnieniu wspólnych punktów w układach, w których występuje DNA i komórki bakteryjne względnie zwierzęce świadczą niedawne odkrycia z zakresu transfekcji. Okazało się mianowicie, że kompetentne komórki *B. subtilis* mogą pobrać DNA wyodrębniony z wirusów polyoma wywołujących nowotwory zwierzęce. Pobranie takiego DNA prowadzi do rozmnożenia i uwolnienia z bakterii normalnych wirusów polyoma, zakaźnych dla komórek zwierzęcych (8). Jest to jedno z odkryć, które przyczyniają się do uwidocznienia jedności świata organizmów żywych.

Autorka dziękuje Międzynarodowej Organizacji Zdrowia oraz *Wellcome Trust* za finansową pomoc udzieloną na badania własne, których wyniki są dyskutowane w niniejszym przeglądzie.

LITERATURA

1. Abe M., Mizuno D., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 464 (1959).
2. Alloway J. L., *J. Exp. Med.* **57**, 265 (1933).
3. Austrian R., *Bact. Rev.* **16**, 31 (1952).
4. Avery O. T., MacLeod C. M., McCarthy M., *J. Exp. Med.* **79**, 137 (1944).
5. Bańkowska E., Dobrzański W. T., Osowiecki H., *Post. Biochem.* **12**, 189 (1966).
6. Barnhart B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **142**, 465 (1967).
7. Barnhart B. J., Herriott R. M., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 25 (1963).
8. Bayreuther K. E., Romig W. R., *Science* **146**, 778 (1964).
9. Bodmer W. F., *J. Mol. Biol.* **14**, 534 (1965).
10. Bodmer W. F., *J. Gen. Physiol.* **49**, 233 (1966).
11. Bodmer W. F., Ganesan A. T., *Genetics* **50**, 717 (1964).
12. Cairns J., *J. Mol. Biol.* **6**, 208 (1963).

13. Catlin B. W., *J. Bacteriol.* **79**, 579 (1960).
14. Catlin B. W., *Science* **124**, 441 (1956).
15. Catlin B. W., Cunningham L. S., *J. Gen. Microbiol.* **19**, 522 (1958).
16. Charpak M., Dedonder R., *Compt. Rend.* **260**, 5638 (1965).
17. Chilton M. D., *Science* **157**, 817 (1967).
18. Conant J. E., Sawyer W. D., *J. Bacteriol.* **93**, 1869 (1967).
19. Davison P. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1560 (1959).
20. Davison P. F., *Nature* **185**, 918 (1960).
21. Dawson M. H., Sia R. H. P., *J. Exp. Med.* **54**, 681 (1931).
22. Dennis E. S., Wake R. G., *J. Mol. Biol.* **15**, 435 (1966).
23. DiMayorka G. A., Eddy B. E., Stewart S. E., Hunter W. S., Fried C., Bendich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1805 (1959).
24. Dobrzański W. T., Osowiecki H., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **14**, 765 (1966).
25. Dobrzański W. T., informacja ustna.
26. Doty P., MacGill B. B., Rice S. A., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **44**, 432 (1958).
27. Ephrussi-Taylor H., Symposium on the Mutational Process, Prague, August 9—11 1965, str. 127.
28. Felkner J. C., Wyss O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 94 (1964).
29. Fox M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 83 (1957).
30. Fox M. S., *J. Gen. Physiol.* **42**, 737 (1959).
31. Fox M. S., *Nature* **187**, 1004 (1960).
32. Fox M. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1043 (1962).
33. Fox M. S., *J. Gen. Physiol.* **49**, 183 (1966).
34. Fox M. S., Allen M. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 412 (1964).
35. Fox M. S., Hotchkiss R. D., *Nature* **179**, 1322 (1957).
36. Gerber P., *Virology* **16**, 96 (1961).
37. Gimlin D. M., Hardman S. D., Kelley B. N., Butler G. C., Leach F. R., *J. Bacteriol.* **92**, 366 (1966).
38. Goodgal S. H., *J. Gen. Physiol.* **45**, 205 (1962).
39. Goodgal S. H., Herriott R. M., w *The Chemical Basis of Heredity*, red. McElroy i Glass, The Johns Hopkins Press, New York 1957, str. 336.
40. Goodgal S. H., Herriott R. M., *J. Gen. Physiol.* **44**, 1201 (1961).
41. Griffith F., *J. Hyg. Camb.* **27**, 113 (1928).
42. Guild W. R., DeFilippes F. M., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 241 (1957).
43. Guild W. R., Robison M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 106 (1963).
44. Hayes W., *J. Gen. Microbiol.* **45**, 385 (1966).
45. Hays E. F., *Nature* **201**, 780 (1964).
46. Hays E. F., Carr J. A., *Cancer Res.* **22**, 1319 (1962).
47. Herriott R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 146 (1961).
48. Hershey A. D., Burgi E., *J. Mol. Biol.* **2**, 143 (1960).
49. Hirokawa H., Ikeda J., *J. Bacteriol.* **92**, 455 (1966).
50. Hotchkiss R. D., w *Les Unités Biologique doués de continuité génétique*, wyd. C.N.R.S., Paris 1948, str. 55.
51. Hotchkiss R. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 457 (1951).
52. Hotchkiss R. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **40**, 49 (1954).
53. Hotchkiss R. D., w *The Chemical Basis of Heredity*, red. McElroy i Glass, The Johns Hopkins Press, New York 1957, str. 321.
54. Hotchkiss R. D., w *Procedures in Nucleic Acid Research*, red. G. L. Cantoni, D. R. Davies, Harper and Row. Publ., New York 1966, str. 541.
55. Hotchkiss R. D., Marmur J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **40**, 55 (1954).
56. Ito Y., *Virology* **12**, 596 (1960).

57. Ito Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 1897 (1961).
58. Kammen H., Wojnar R., Canellakis E., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 56 (1966).
59. Kleinschmidt A. K., VI Int. Congress of Biochem. New York 1964.
60. Lacks S., *J. Mol. Biol.* **5**, 119 (1962).
61. Lacks S., *Genetics* **53**, 207 (1966).
62. Lacks S., Greenberg B., Carlson K., *J. Mol. Biol.* **29**, 327 (1967).
63. Lacks S., Greenberg B., *J. Biol. Chem.* **242**, 3108 (1967).
64. Lacks S., Hotchkiss R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 508 (1960).
65. Leidy G., Jaffee J., Alexander H. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **111**, 725 (1962).
66. Leonard C. G., Mattheis D. K., Mattheis M. J., Housewright R. D., *J. Bacteriol.* **83**, 200 (1964).
67. Lerman L. S., Tolmach L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 68 (1957).
68. Levine J. S., Strauss N., *J. Bacteriol.* **89**, 281 (1965).
69. Litt M., Marmur J., Ephrussi-Taylor J., Doty P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 144 (1958).
70. MacHattie L. A., Berns K. I., Thomas C. A. Jr., *J. Mol. Biol.* **11**, 648 (1965).
71. McCarty M., Avery O. T., *J. Exp. Med.* **83**, 89 (1946).
72. Marmur J., Falkow S., Mandel H., *Ann. Rev. Microbiol.* **17**, 329 (1963).
73. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C. L., w Progress in Nucleic Acid Res, tom 1, red. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, New York 1963, str. 232.
74. Meek E. S., Hower T. F., *Brit. J. Cancer* **13**, 121 (1959).
75. Meselson M., Stahl F., Vinograd J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 581 (1957).
76. Moriguchi E., Suzuki K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 195 (1966).
77. Nava G. C., Galis A., Beiser S. M., *Nature* **197**, 903 (1963).
78. Nester E. W., *J. Bacteriol.* **87**, 867 (1964).
79. Nester E. W., Stocker B. A., *J. Bacteriol.* **86**, 785 (1963).
80. Notani H., Goodgal S. H., *J. Gen. Physiol.* **49**, 197 (1966).
81. Olivera B. M., Lehman I. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1700 (1967).
82. Osowiecki H., Łancow W. A., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **13**, 339 (1965).
83. Ottolenghi E., Hotchkiss R. D., *Science* **132**, 1257 (1960).
84. Ottolenghi E., MacLeod C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 417 (1963).
85. Pakuła R., *J. Bacteriol.* **90**, 1501 (1965).
86. Pakuła R., *J. Bacteriol.* **94**, 75 (1967).
87. Pakuła R., Piechowska M., Bańkowska E., Walczak W., *Acta Microbiol. Polon.* **11**, 205 (1962).
88. Pakuła R., Walczak W., *J. Gen. Microbiol.* **31**, 125 (1963).
89. Pène J. J., Romig W. R., *J. Mol. Biol.* **9**, 236 (1964).
90. Perry D., Slade H. D., *J. Bacteriol.* **91**, 2216 (1966).
91. Piechowska M., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 277 (1967).
92. Piechowska M., Shugar D., *Bull. Acad. Sci. Cl. II*, **15**, 595 (1967).
93. Piechowska M., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 347 (1967).
94. Ravin A. W., Iyer V. N., *J. Gen. Microbiol.* **26**, 277 (1961).
95. Roger M., Beckmann C. O., Hotchkiss R. D., *J. Mol. Biol.* **18**, 174 (1966).
96. Rownd R., Praca doktorska, Harvard University, Cambridge, Mass (1963).

97. Rownd R., *British Med. Bull.* **21**, 187 (1965).
98. Rownd R., Green D. M., Doty P., *Abstr. Biophys. Soc.* TB7 (1963).
99. Schaeffer P., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **245**, 375 (1957).
100. Schaeffer P., *The Bacteria*, red. I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York 1964, str. 87.
101. Schaeffer P., Edgar R. S., Rolfe R., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **154**, 1978 (1960).
102. Setlow R. B., *Science* **153**, 379 (1966).
103. Spenser T. H., Herriott R. M., *J. Bacteriol.* **90**, 911 (1965).
104. Spizizen J., Reilly B. E., Evans A. H., *Ann. Rev. Microbiol.* **20**, 371 (1966).
105. Strauss N., *J. Bacteriol.* **91**, 702 (1966).
106. Strauss B., Searashi T., Robbins M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 932 (1966).
107. Stuy J. H., *J. Mol. Biol.* **13**, 554 (1965).
108. Stuy J. H., Stern D., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 391 (1964).
109. Takahashi J., Gibbons N. E., *Can. J. Microbiol.* **3**, 687 (1957).
110. Talmadge M. B., Herriott R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 203 (1960).
111. Tomasz A., Beiser S. M., *J. Bacteriol.* **90**, 1226 (1965).
112. Tomasz A., Hotchkiss R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 480 (1964).
113. Tomasz A., Mosser J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 58 (1966).
114. Vestri R., Felicetti L., Lostia O., *Nature* **209**, 1154 (1966).
115. Voll M. J., Goodgal S. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 505 (1961).
116. Voll M. J., Goodgal S. H., *J. Bacteriol.* **90**, 873 (1965).
117. Voll M. J., Goodgal S. H., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 65 (1966).
118. Zimmerman S. B., Little J. W., Oshinsky C. K., Gellert M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1841 (1967).
119. Young F. E., *Nature* **213**, 773 (1967).
120. Young F. E., Spizizen J., *J. Bacteriol.* **36**, 392 (1963).

DODATEK

I Ostatnie autoradiograficzne badania Yavora i Tomasza (Yavor, G. T., Tomasz A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **60**, 1216 (1968), potwierdziły wyniki Younga dotyczące układu transformacji *B. subtilis* a ponadto dowiodły, że w niektórych kompetentnych populacjach *D. pneumoniae* wszystkie komórki pobierają DNA podczas gdy obserwuje się tylko około 10% transformacji.

II Według późniejszych badań Gurneya i Foxa (*J. Mol. Biol.* **32**, 83 (1968)) ciężar cząsteczkowy fragmentów DNA dawcy, integrowanych do chromosomu biorcy, może być zróżnicowany i waha się od mniejszego niż 1×10^6 daltonów do wyższego niż 5×10^6 przy czym średnia wartość jest określona na 1,5 do 3×10^6 daltonów.

III Po oddaniu niniejszego artykułu do druku ukazała się szczegółowa publikacja zawierająca opis cytowanych doświadczeń: F. Guerrin, M. S. Fox, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 429 (1968).

IV Ostatnie badania zespołu prof. Doty (R. Rownd, D. M. Green, R. Sternglanz, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **32**, 369 (1968); C. Mulder, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **32**, 423 (1968)) oraz Chevallier i Bernardi (M. R. Chevallier G. Bernardi, *J. Mol. Biol.* **32**, 437 (1968)) oparte na frakcjonowaniu DNA poddanego denaturacji cieplnej, świadczą o tym, że zarówno w przypadku *B. subtilis* jak i *H. influenzae*, DNA w formie pojedynczych łańcuchów jest pozba-

wione aktywności biologicznej. W przypadku *B. subtilis* udowodniono nawet, że brak aktywności wywołany jest niezdolnością komórek bakteryjnych do pobrania pojedynczych łańcuchów DNA (R. Rownd i wsp. 1968). Nie wyklucza to możliwości zachowania biologicznej aktywności DNA w przypadku przekształcenia dwułańcuchowych cząsteczek w pojedyncze łańcuchy polidezoksynukleotydowe, które nastąpiłoby już po pobraniu DNA przez bakterie.

V Sprawa ta została ostatnio wyjaśniona w jednym z badanych układów a mianowicie w przypadku komórek *B. subtilis* wydzielanie DNA do podłoża jest uzależnione od wzrostu populacji i może być zahamowane przez dodatek chloramfenikolu, a zatem jest jedną z funkcji żywych komórek (E. Ephrati-Elizur, *Genet. Res. Camb.* 11, 83 (1968)).

SPIS TREŚCI

E. Gąsior—Niekóre problemy translacji kodu genetycznego	485
B. Grzelakowska-Sztaber t— <i>N</i> -formylometionnylo-tRNA jako inicjator syntezy łańcucha polipeptydowego	509
J. Malec—Białka jądra komórkowego a mechanizm kontroli genetycznej	523
L. Zagórska—Informacja genetyczna w rozwoju zarodkowym	537
M. Rytel, J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski—Przemiany kwasów nukleinowych w komórce i organellach u glonu <i>Acetabularia sp.</i>	551
M. Piechowska—Transformacja bakterii	561

Z przyczyn technicznych zapowiedziany artykuł M. Rajchert-Trzpil p.t. „Episom F u *Escherichia coli*” ukaże się w następnym zeszycie (zeszyt 1 tomu 15, 1969 rok).

W 1-szym zeszycie 15 tomu ukażą się:

1. Biosynteza zwierzęcych glikoproteidów, *M. Sarnecka-Keller, J. Noworytko*
2. Składnik cukrowy zwierzęcych glikoproteidów, *J. Noworytko, M. Sarnecka-Keller*
3. Metabolizm nukleozydodwufosfocukrów, *T. Sawicka*
4. Enzymy amylolityczne, *J. Andrzejczuk-Hybel*
5. Biologiczne funkcje chinonów, *R. Drabikowska*
6. Biosynteza i funkcja fosfolipidów bakteryjnych, *M. Erecińska, T. Chojnacki*
7. Episom F u *Escherichia coli*, *M. Rajchert-Trzpil*
8. Chemiczne i fizyczne zmiany DNA pod wpływem promieniowania jonizującego *in vitro*, *B. Lubas*

POSTĘPY BIOCHEMII

November 1963

ARTICLES IN POLISH

Volume 14

Number 4

E. Gąsior—Some Problems of the Genetic Code Translation (Dep. Gen. Microbiol. Univ. Lublin)	485
B. Grzelakowska-Sztabert— <i>N</i> -formylmethionyl-tRNA as Initiator of Polypeptide Chain Synthesis (Dep. Biochem. Inst. Exp. Biol. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	509
J. Malec—Nuclear Proteins and the Mechanism of Gene Control (Dep. Biochem. Inst. Haematol. Warszawa)	523
L. Zagórska—Expression of Gene Action during Embryogenesis (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	537
M. Rytel, J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski—Metabolism of Nucleic Acids in the Cell and Organellae of Alga <i>Acetabularia</i> sp. (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	551
M. Piechowska—Bacterial Transformation (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	561

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601, (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., *Podręcznik Biochemii*, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

E. Gąsior—Niektóre problemy translacji kodu genetycznego	485
B. Grzelakowska-Sztabert— <i>N</i> -formylometionyl-tRNA jako inicjator syntezy łańcucha polipeptydowego	509
J. Malec—Białka jądra komórkowego a mechanizm kontroli genetycznej	523
L. Zagórska—Informacja genetyczna w rozwoju zarodkowym	537
M. Rytel, J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski—Przemiany kwasów nukleinowych w komórce i organellach u glonu <i>Acetabularia sp.</i>	551
M. Piechowska—Transformacja bakterii	561