

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O B I O C H E M I C Z N E

POSTĘPY BIOCHEMII

1972

tom 18

nr 4

KWARTALNIK

PSTBAH 18(4)
537-620(1972)

<http://rcin.org.pl>

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 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 zaopatrzone 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.

PODOLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 2
tom XVIII
zeszyt 4

KWARTALNIK

PSTBAH 18 (4) 537-620 (1972)

PAŃKÓWSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poz-
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

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 1971

Nakład 2150 (2026+124)	Oddano do składania 10.VIII.1972 r.
Ark. wyd. 6,25. Ark. druk. 5,25	Podpisano do druku w październiku 1972 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w listopadzie 1972 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1128/72 A-87

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

HANNA RYBICKA *

Purynowe prekursory kwasów nukleinowych w roślinach nasiennych

Purine Precursors of Ribonucleic Acids in Higher Plants

The distribution of free purines, their nucleosides and nucleotides in higher plants (*Spermatophyta*) are reviewed. Changes in nucleoside and nucleotide pattern of different plants during some physiological processes are discussed.

Badania pochodnych purynowych frakcji kwaso-rozpuszczalnej w roślinach wyższych prowadzone są ostatnio z coraz większą intensywnością. W podanym w tym przeglądzie spisie publikacji 11 pozycji ukazało się w okresie 1965—1967 r., natomiast w latach 1968—1970 dwukrotnie więcej. Autorzy tych prac zajmują się występowaniem i zawartością poszczególnych związków purynowych w różnych roślinach: w częściach nadziemnych, korzeniach, nasionach oraz w poszczególnych tkankach. W ostatnich latach zwrócono również uwagę na zmiany zawartości pochodnych purynowych podczas różnych procesów fizjologicznych, jak dojrzewanie i kiełkowanie nasion oraz wzrost i rozwój innych części roślin.

Zwrócenie większej uwagi na związki purynowe frakcji kwaso-rozpuszczalnej wiąże się z rozwojem badań nad kwasami nukleinowymi w roślinach. Pochodne purynowe są bowiem produktami pośrednimi zarówno w syntezie jak i degradacji polinukleotydów. Pula związków purynowych w roślinie i zmiany jej wielkości mogą wskazywać na intensywność i kierunek przemian w roślinie podczas procesów wzrostu i rozwoju, a także na możliwość syntezy kwasów nukleinowych na drodze reutilizacji produktów degradacji. Taka synteza w roślinie miałaby fizjologicznie duże znaczenie, zwłaszcza w niektórych okresach, jak np. kiełkowania nasion. Stanowi bowiem możliwość łatwego uruchomienia rezerw w okresie wzmożonej syntezy nowych związków, gdy młoda roślina w zasadzie nie pobiera jeszcze składników ze środowiska.

Z uwagi na to, że przegląd jest poświęcony prekursorom kwasów nukleinowych, nie są uwzględnione takie związki jak np. NAD, kininy czy alkaloidy purynowe.

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

I. Występowanie pochodnych purynowych w roślinach nasiennych

W tabelicy 1 zebrano informacje o wykrytych w roślinach wyższych prekursorach purynowych, a w tabelicy 2 ważniejsze dane o ich zawartości. W badaniach związków purynowych frakcji kwaso-rozpuszczalnej stosowano różne metody ekstrakcji z różnorodnego materiału roślinnego oraz różne sposoby oczyszczania i izolowania poszczególnych pochodnych. Z uwagi na dużą różnorodność zarówno badanego materiału jak i stosowanych metod zestawienie i porównanie wyników jest dyskusyjne. Wydawała się jednak celowa próba dokonania przeglądu danych o występowaniu i zawartości pochodnych purynowych w roślinach wyższych.

Tabelica 1

Występowanie purynowych prekursorów kwasów nukleinowych w roślinach nasiennych

Roślina	Prekursory purynowe	Pozycje literatury
Zasady purynowe		
Rodz. Trawy (<i>Graminae</i>) pszenica (<i>Triticum L.</i>)	adenina, guanina, hipoksantyna	29, 40, 41, 42, 46
kukurydza (<i>Zea mays L.</i>)	adenina, hipoksantyna Nukleozydy	10, 40
Rodz. Motylkowate (<i>Papilionaceae</i>) groch (<i>Pisum sativum L.</i>)	adenozyna, guanozyna, ksantozyna	16, 17 (patrz tabl. 4), 49
Rodz. Trawy (<i>Graminae</i>) pszenica (<i>Triticum L.</i>)	adenozyna, guanozyna, inozyna, ksantozyna	29, 40, 41, 42, 46
kukurydza (<i>Zea mays L.</i>)	adenozyna Nukleotydy	10, 40
Rodz. Sosnowate (<i>Pinaceae</i>) modrzew (<i>Larix decidua Mill.</i>)	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP	23 (patrz tabl. 2)
sosna (<i>Pinus silvestris L.</i>)	ATP	7
świerk (<i>Picea abies Karst.</i>)	ATP	7
Rodz. Brzozowate (<i>Betulaceae</i>) leszczyna (<i>Corylus avellana L.</i>)	AMP, ADP, ATP	14
Rodz. Komosowate (<i>Chenopodiaceae</i>) burak cukrowy	AMP, ADP, ATP	38 (patrz tabl. 2)
szpinak	AMP, ADP, ATP, GTP	33
Rodz. Jaskrowate (<i>Ranunculaceae</i>) ziarnopłon (<i>Ficaria verna Huds.</i>)	AMP, ADP, ATP	6
Rodz. Różowate (<i>Rosaceae</i>) truskawka	ADP, ATP, GDP, GTP	31 (patrz tabl. 2)
Rodz. Motylkowate (<i>Papilionaceae</i>)		

d.c. tablicy 1

bób (<i>Vicia faba</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GTP	1, 2
groch (<i>Pisum sativum</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, IMP	15, 17 (patrz tabl. 4), 30 (patrz tabl. 2), 45, 49
fasola (<i>Phaseolus</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP	3, 4, 18 (patrz tabl. 2), 24, 47 (patrz tabl. 2), 50, 51 (patrz tabl. 8), 52 (patrz tabl. 6)
soja	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP	28 (patrz tabl. 3), 34
Rodz. Ślazowate (<i>Malvaceae</i>)		
bawełna (<i>Gossypium arboreum</i>)	AMP, ADP, ATP	27
Rodz. Klonowate (<i>Aceraceae</i>)		
jawor (<i>Acer pseudoplatanus</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GTP	19 (patrz tabl. 7)
Rodz. Baldaszkowate (<i>Umbelliferae</i>)		
marchew	ATP	5
Rodz. Psiankowate (<i>Solanaceae</i>)		
ziemniaki (<i>Solanum tuberosum</i>)	AMP, ADP, ATP, GDP, GTP	11
pomidor (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP	20 (patrz tabl. 2), 24, 44
Rodz. Trawy (<i>Graminae</i>)		
owies	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP	9 (patrz tabl. 2), 26
pszenica (<i>Triticum</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, IMP	8 (patrz tabl. 2), 12 (patrz tabl. 2), 26, 32 (patrz tabl. 3), 40, 41, 42, 43, 46
jęczmień	AMP, ADP, ATP, GDP, GTP	9 (patrz tabl. 2)
kukurydza (<i>Zea mays</i> L.)	AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, IMP	10, 21, 22, 24, 40
ryż	AMP, ADP, ATP, GTP	37

Dane w tablicy 1 zestawiono w ujęciu systematyki botanicznej. Przy takim przedstawieniu materiału uderza bardzo mała ilość prac poświęconych zasadom purynowym: dotychczas opublikowane dane dotyczą tylko rodziny traw. Nieco więcej uwagi poświęcono nukleozydom, badanym również w rodzinie motylkowatych. Najczęściej przedmiotem badań były nukleotydy, które identyfikowano w roślinach z 11 rodzin gromad nagoi okrytonasiennych. W literaturze brak jest danych o występowaniu dezo-sypochodnych purynowych w roślinach.

Najczęściej badano rośliny zielne, znacznie rzadziej drzewiaste. Nie

zajmowano się np. drzewami owocowymi z rodziny różowatych. Nie poświęcono także uwagi roślinom zielarskim, które charakteryzują się intensywną syntezą pewnych związków np. alkaloidów, terpenów, glikozydów i innych.

Badane były głównie części nadziemne roślin. Znacznie mniej uwagi poświęcono korzeniom i nasionom. Sporadycznie tylko zajmowano się poszczególnymi tkankami, jak na przykład kambium, ksylem czy bielmo.

Z badań nad zawartością nukleotydów purynowych (tablica 2) wynika, że nukleotydy adeninowe występują w roślinach w dużo większej ilości niż guaninowe. Nukleotydy adeninowe dominują wyraźnie w każdej analizowanej roślinie, niezależnie od tego, do jakiej rodziny ona należy i jaką jej część wybrano do analiz.

Tablica 2

Zawartość nukleotydów purynowych w niektórych roślinach nasiennych

Roślina	Nukleotydy w nanomolach/1 g świeżej masy						Pozycja literatury
	AMP	ADP	ATP	GMP	GDP	GTP	
Modrzew (tkanki kambialne)	25,0	4,7	2,7	3,9	1,7	0,8	23
Modrzew (tkanki młodego ksylemu)	3,4			0,4			23
Burak cukrowy (liście)	8,8	15,3	26,5				38
Truskawka (liście)		59,0	98,0		11,0	14,4	31
Groch (korzenie)	8,7	23,7	88,1				30
Fasola (korzenie)	15,0	22,0	110,0	10,0		14,0	47
Fasola (liście)	30,0	60,0	280,0	0		40,0	47
Fasola (liście)	12,0	18,0	69,0	7,0		8,0	18
Pomidor (zielone owoce)	2,7	3,2	2,2	0,9	0,8		20
Owies (części nadziemne)	35,0	47,0	76,0		7,0	8,0	9
Jęczmień (części nadziemne)	33,0	43,0	40,0		8,0	7,0	9
Pszonica (części nadziemne)	35,0	49,0	72,0		14,0	15,0	8
Pszonica (liście)	31,0	53,0	58,0				12

Brak jest istotnych różnic w składzie nukleotydów w roślinach należących do rozmaitych, nawet odległych od siebie, grup botanicznych. Spośród roślin charakteryzujących się gromadzeniem dużych ilości różnych substancji zapasowych badano: burak cukrowy, który zawiera duże ilości sacharozy, rośliny z rodziny motylkowatych, żyjące w symbiozie z bakteriami *Rhizobium* i zawierające dużo białka w nasionach, a także rośliny z rodziny traw, odkładające w ziarnach skrobię. Nie ma jednak istotnych różnic w składzie nukleotydów purynowych tych roślin.

W częściach asymilujących roślin (liście, części nadziemne) wykrywano najwięcej ATP, znacznie mniej ADP, a najmniej AMP. Mniej badane były nukleotydy guaninowe, ale także znajdowano więcej GTP od GDP

czy GMP. Tylko zielone owoce pomidora charakteryzowały się niemal jednakową zawartością mono-, dwu- i trójfosforanów nukleozydów, przy czym zawartość tych wszystkich nukleotydydów była bardzo niska w porównaniu do innych organów asymilujących w innych roślinach.

O ile w analizach części asymilujących roślin zaobserwowano przewagę trójfosforanów nad monofosforanami nukleozydów, to zupełnie inaczej kształtują się te stosunki w tkance twórczej. Według badań C u m m i n g (23), pobrane w okresie wiosennym tkanki kambialne modrzewia zawierają 10-krotnie więcej AMP niż ATP i 5-krotnie więcej GMP niż GTP. Ta różnica między tkankami twórczymi a asymilującymi jest uderzająca.

Korzenie badano tylko u roślin z rodziny motylkowatych. Wykryto, podobnie jak w częściach asymilujących, więcej ADP niż AMP, a kilkakrotnie więcej ATP niż każdego z pozostałych nukleotydydów.

Dane dotyczące nasion podane zostaną w następnej części przeglądu.

Jak wynika z przedstawionych danych, w badanych roślinach znajdowano pochodne adeniny (zasadę, nukleozyd, a najczęściej nukleotydy). O pochodnych guaniny jest mniej informacji, a tylko sporadycznie donoszono o występowaniu pochodnych hipoksantyny.

W roślinach znajdowano także związki nukleotydydów z cukrami, mające zasadnicze znaczenie w biosyntezie węglowodanów. Wykryto je u modrzewia w tkankach kambialnych, gdzie mogą brać udział w budowie pierwotnej ściany komórkowej oraz w młodych komórkach ksylemu, w których mogłyby pełnić rolę przy budowie wtórnej ściany komórkowej (23). Ilości ich w tych tkankach są małe: w 1 gramie świeżej masy znaleziono 3—4 nanomole ADP-cukrów i 1—3 nanomole GDP-cukrów. Liście truskawki w 1 gramie świeżej masy zawierały 1,5 nanomoli GDP-cukrów. Składnik cukrowy w tych nukleotydydach stanowiły: D-ksyloza, D-mannoza, D-glukoza i D-galaktoza (31, 48), a w modrzewiu ponadto jeszcze fruktoza.

II. Zmiany zawartości pochodnych purynowych w roślinach nasiennych podczas niektórych procesów fizjologicznych

Zmiany zawartości pochodnych purynowych obserwowano podczas niektórych procesów fizjologicznych roślin: dojrzwania i kiełkowania nasion, dojrzwania i starzenia się roślin, zazielenienia etiolowanych liści.

1. Dojrzwanie i kiełkowanie nasion

Badania wykazały znaczne zmiany zawartości nukleotydydów purynowych podczas procesów tworzenia się nasion oraz ich imbibicji i kiełkowania.

Dojrzewanie ziaren pszenicy charakteryzuje podwojenie zawartości AMP, brak zmian ADP i dwukrotny spadek zawartości ATP (tablica 3). W 12 i 32 dni po kwitnieniu w ziarnach wykrywano największe ilości ATP, znacznie mniejsze ADP czy AMP. W pierwszym okresie zawartość ATP w nasionach była nawet 20-krotnie większa od zawartości AMP, w drugim tylko 4-krotnie (32).

Tablica 3

Zmiany zawartości nukleotydów purynowych podczas dojrzewania nasion

	Pszenica wg Jennera (32)		Soja wg Galitza i Howella (28)			
	Dni po kwitnieniu		Waga jednego nasiona w mg			
	12	32	31,0	70,8	143,3	155,5
	Nukleotydy w nanomolach/ g świeżej masy nasion		w nanomolach/g suchej masy nasion			
AMP	15—17	29—32	220	140	120	290
ADP	72—74	62—66	śląd	40	60	40
ATP	304—312	122—150	0	śląd	120	110
GMP			350	20	10	40
GDP			śląd	30	10	0

Dojrzewanie nasion soi charakteryzowało zwiększenie się zawartości ADP i pojawienie się ATP. W miarę zwiększania się masy nasiona zawartość AMP początkowo zmniejszała się, a następnie wzrastała znacznie powyżej początkowej ilości. Początkowo spośród nukleotydów adeninowych ilość AMP była największa, później równa ATP, a dwukrotnie wyższa od ADP. W końcowym okresie w nasionach występowało ponad dwukrotnie więcej AMP niż ATP i kilkakrotnie mniej ADP niż AMP. Zawartość nukleotydów guaninowych wykazywała podczas dojrzewania nasion soi duże zmiany: prawie dziesięciokrotny spadek ilości GMP oraz powstawanie i zanikanie GDP (28).

W zestawieniu tym uderzają duże zmiany w zawartości pochodnych purynowych podczas tworzenia się nasion. Wspólnym zjawiskiem dla obu roślin jest zwiększenie zawartości AMP. Należy tu wysunąć zastrzeżenie, że obiekty badane są mało porównywalne, gdyż analizowane były nasiona o wysokiej zawartości skrobi i nasiona o wysokiej zawartości białka i nie wiadomo czy badania rozpoczęto w okresie jednakowej dojrzałości nasion.

W dojrzałych nasionach innych roślin także przeważa AMP nad ADP i ATP. W 1 gramie suchej masy nasion leszczyny wykryto 215 nanomoli AMP, a tylko 12 nanomoli ADP i 3 nanomole ATP (14). W dojrzałych nasionach grochu znaleziono dwukrotnie więcej AMP niż ADP, a 6-krotnie więcej niż ATP (tablica 4). Sądzić więc należy, że w dojrzałych nasionach zawartość AMP znacznie przeważa nad zawartością ATP.

W dojrzałych nasionach grochu wykryto (17) także GMP i IMP jednak w ilościach znikomych w porównaniu z nukleotydami adeninowymi oraz stosunkowo dużo nukleozydów purynowych. Podczas pierwszych dwóch dni kiełkowania nasion grochu zwiększa się ilość ksantozyny i ATP, znacznie spada zawartość adenozyzny, ADP i IMP oraz siedmiokrotnie zmniejsza się zawartość AMP. Powstawanie ksantozyny świadczyłoby o zachodzących podczas kiełkowania procesach dezaminacji. Ilość guanozyzny i GMP pozostaje bez zmiany. Zwiększenie zawartości ATP, a zmniejszenie AMP obserwowano także podczas kiełkowania leszczyny (14).

Tablica 4

Zmiany zawartości nukleozydów i nukleotydów purynowych podczas kiełkowania nasion grochu wg Brown a (17)

	Nasiona grochu		
	Czas imbibicji w godz		
	0	16	40
Nukleozydy i nukleotydy w nanomolach/l g nasion*			
Adenozyzna	152	93	90
Guanozyzna	66	68	65
Ksantozyna	91	176	178
AMP	447	256	69
ADP	218	216	112
ATP	69	241	116
GMP	13	13	11
IMP	15	15	8

* Próbkę nasion ważono przed imbibicją

Zmiany ilości związków adeniny i związków guaniny we frakcji kwaso-rozpuszczalnej podczas kiełkowania ziaren pszenicy badał Keys (35) (tablica 5). Oddzielnie analizowany był zarodek (część rośliny o silnych podziałach komórkowych) oraz endosperma (tkanka zapasowa). Po 4-dniowym okresie kiełkowania wzrosła prawie 20-krotnie zawartość związków adeniny i guaniny we frakcji kwaso-rozpuszczalnej zarodka. W bielmie natomiast po okresie parokrotnego zwiększenia ilości tych związków obserwuje się spadek ich zawartości. We frakcji kwaso-rozpuszczalnej znajdowano 2—3-krotnie więcej związków adeniny niż guaniny. Na proces nagromadzania związków adeniny i guaniny we frakcji kwaso-rozpuszczalnej ma wpływ temperatura, w której kiełkuje roślina (36). Po czterech dniach kiełkowania w temp. 25°C w 1 gramie suchej masy zarodków znaleziono po hydrolizie frakcji kwaso-rozpuszczalnej 2,4 μmola adeniny i 0,7 μmola guaniny, ale w temp. 2°—5°C ilości te były dwu-trzykrotnie niższe.

Obserwowany wzrost zawartości związków adeniny i związków guaniny we frakcji kwaso-rozpuszczalnej zarodka podczas kiełkowania nasuwa pytanie czy zjawisko to jest wynikiem syntezy *de novo* pierścienia purynowego, czy degradacji kwasów nukleinowych i gromadzenia pewnej puli pochodnych purynowych do syntezy nowych kwasów nukleinowych w rosnącej młodej roślinie. Price i Murray (39) badali przemiany

Tablica 5

Zmiany zawartości związków adeniny i guaniny frakcji kwasorozpuszczalnej podczas kiełkowania pszenicy wg Keysa (35)

	Zarodek					Endosperma				
	Czas imbibicji w godz.									
	0	12	25	48	103	0	12	25	48	103
	Puryny* w nanomolach/jedno ziarno									
Adenina	1,3	3,4	6,5	14,4	25,1	1,7	4,5	4,1	5,4	4,4
Guanina	0,4	1,0	1,9	4,5	7,7	0,9	1,2	1,4	2,8	1,9

* Po hydrolizie związków frakcji kwaso-rozpuszczalnej

$8\text{-}^{14}\text{C}$ -adeniny w zarodkach pszenicy. Stwierdzili oni wzrost radioaktywności frakcji nierozpuszczalnej w kwasie z korzenia i liści w okresie inkubacji zarodków. Autorzy ci wykryli, że wzrasta kilkadziesiąt razy aktywność $3'$ -nukleotydazy, a aktywność enzymów hydrolizujących AMP i IMP nieznacznie. Parokrotnie zwiększa się aktywność fosforybozylotransferaz adeniny i hipoksantyny. Dane te wskazywałyby na możliwość reutilizacji związków purynowych, powstających z degradacji kwasów nukleinowych kiełkującego ziarna, w procesie syntezy nowych kwasów nukleinowych młodej rośliny. Przekształcenie w nasionach leszczyny $8\text{-}^{14}\text{C}$ -adeniny prawie całkowicie w adenozyne, AMP i ADP (13) również nasuwa przypuszczenie o możliwości dalszego zużywania tych związków w procesach anabolicznych.

2. Dojrzewanie i starzenie się roślin

Zmiany zawartości nukleotydów purynowych podczas procesów dojrzewania i starzenia się pierwszych liści fasoli badali Weinstein i wsp. (52) (tablica 6). Liście zawierają znacznie więcej nukleotydów adeniny niż guaniny. Zawartość nukleotydów obu puryn maleje parokrotnie w czasie dojrzewania i starzenia się liści. W badanych okresach wzrostu i rozwoju liści ilość ATP przewyższa ADP, a także parokrotnie — AMP. Podobnie wykrywano większe ilości GTP niż GDP. W liściach zawartość trójfosfonukleotydów przeważa zatem nad mono- i dwufosfonukleotydami.

Podobne zmiany zawartości nukleotydów adeninowych i guaninowych obserwowali Brown i Short (19) w hodowli zawiesiny komórek jawora (tablica 7). Nukleotydy adeninowe występują w większej ilości niż guaninowe. Zawartość ich wzrasta parokrotnie w czasie intensywnych po-

Tablica 6

Zmiany zawartości nukleotydów purynowych podczas starzenia się liści fasoli wg Weinsteina i wsp. (52)

	Liście		
	młode	dojrzałe	starzejące się
Nukleotydy w nanomolach/1 g świeżej masy			
AMP	27,2	19,9	7,6
ADP	78,4	54,2	23,9
ATP	136,3	77,5	50,0
GDP	19,1	8,8	6,4
GTP	32,0	15,8	8,4

działów komórek (od ósmego dnia hodowli), ale w dojrzałych komórkach (21-szy dzień hodowli) spada. We wszystkich okresach hodowli wykrywano większe ilości ATP niż AMP czy ADP oraz większe ilości GMP niż GTP.

Tablica 7

Zmiany zawartości nukleotydów purynowych w zawieszynie komórek jawora wg Browna i Shorta (19)

	Dni hodowli			
	0	4	8	21
Nukleotydy w μ molach/10 ⁹ komórek				
AMP	0,5	3,4	3,4	0,4
ADP	0,7	2,1	2,8	0,7
ATP	2,9	11,3	8,1	2,8
GMP	1,3	4,1	2,8	1,3
GTP	0,3	1,4	0,5	0,3

Wyraźne obniżenie zawartości nukleotydów podczas dojrzewania zawiesiny komórek jawora i liści fasoli może być wynikiem bądź procesów degradacji, bądź zużycia do syntezy kwasów nukleinowych, czy wreszcie, w przypadku liści fasoli, przemieszczenia do innych tkanek. Można się spodziewać, że w okresie intensywnych podziałów komórek i ich wzrostu prekursorsy purynowe są raczej zużywane do syntezy kwasów nukleinowych. Za takim przypuszczeniem przemawiałyby dwa fakty. Po pierwsze zawieszyna komórek jawora przekształca 8-¹⁴C-adeninę w pochodne adeninowe (25), głównie ADP i ATP, oraz pochodne hipoksantyny i guaniny,

natomiast nie zauważono wydzielania jakichkolwiek radioaktywnych produktów degradacji do środowiska. Po drugie w tkankach ksylemu modrzewia znaleziono, pomimo dokładnych badań (23), AMP i GMP oraz ADP- i GDP- cukry tylko w niewielkich ilościach. Mogłyby to być przy tym nie transportowane a własne związki młodej tkanki.

Omówione dane wskazywałyby na możliwość wykorzystania purynowych nukleotydów do syntezy kwasów nukleinowych. Ze zmniejszenia ich puli w roślinach w miarę dojrzewania tkanek możnaby wnosić, że są one syntetyzowane z coraz mniejszą intensywnością.

3. Zazielenianie etiolowanych liści

Zmiany nukleotydów podczas zazieleniania etiolowanych roślin fasoli badali Wallis i Bradbeer (51) (tablica 8). Etiolowane liście zawierają niewielkie ilości AMP i ATP i jeszcze mniejsze GMP i GDP. W czasie ciągłego oświetlenia zawartość poszczególnych nukleotydów purynowych wzrasta parokrotnie, przy czym ilość AMP przewyższa ATP, a GDP — GMP. Poza AMP i ATP w liściach występują inne związki adeniny, których zawartość podczas oświetlania wzrasta, natomiast nie ma innych pochodnych guaniny poza GMP i GDP. Świadczy o tym porównanie ilości adeniny i guaniny odpowiadających zawartości tych nukleotydów z ilościami adeniny i guaniny oznaczonymi po hydrolizie frakcji kwaso-rozpuszczalnej.

Tablica 8

Zmiany zawartości pochodnych purynowych podczas zazieleniania liści etiolowanych 14-dniowych roślin fasoli wg Wallisa i Bradbeera (51)

	Czas oświetlania w godzinach					
	0	10	15	20	25	45
Pochodne purynowe w nanomolach/liść						
AMP	3,3	4,8	5,2	6,8	10,4	9,6
ATP	2,7	4,4	2,6	5,6	8,6	5,1
GMP	0,9	0,8	0,8	1,0	0,8	1,4
GDP	0,9	0,7	1,4	2,4	1,1	2,7
Związki adeniny we frakcji kwasorozp.	11,1	17,4	14,7	20,9	31,4	32,0
Związki guaniny we frakcji kwasorozp.	1,8	1,5	2,2	3,4	1,9	4,1

W zestawieniu wyników badań pochodnych purynowych w roślinach nasiennych można zaobserwować pewne prawidłowości występowania i przemian tych związków. Jednak duże trudności w interpretacji uzyskanych danych sprawia przypadkowy dobór badanego materiału, dokonywa-

ny przez każdego z autorów według własnych kryteriów i stosowanie odmiennych metod analitycznych.

W badanych przedstawicielach roślin nasiennych, głównie z gromady okrytonasiennych, najliczniej występowały pochodne adeniny, rzadziej guaniny, a tylko sporadycznie hipoksantyny. Najczęściej znajdowano nukleotydy tych puryn. Kwas inozynowy wykryto tylko u przedstawicieli dwu rodzin. Biorąc pod uwagę fakt, że kwas inozynowy jest kluczowym związkiem w biosyntezie puryn u bakterii i zwierząt, należy sądzić, iż związek ten tworzony jest także we wszystkich roślinach, ale szybko zostaje przekształcony w inne pochodne. Dużą rolę w badaniach syntezy i przemian pochodnych purynowych odegrają prawdopodobnie w przyszłości kultury komórek i tkanek roślin oraz hodowle organów roślin. Dotychczas badano zmiany nukleotydów purynowych tylko w zawieszinie komórek jawora.

Z przedstawionych danych wynika, że młode tkanki i organy roślinne zawierają więcej nukleotydów niż starsze o zmniejszonej aktywności metabolicznej. Zawartość nukleotydów ulega zmianie podczas procesów wzrostu i rozwoju roślin. Wzrasta np. zawartość AMP podczas dojrzewania nasion, zazieleniania etiolowanych liści i w początkowym okresie hodowli komórek, a ulega spadkowi podczas kiełkowania nasion, starzenia się liści oraz w późniejszym okresie hodowli komórek. Podobnie wzrost zawartości ATP zauważono w kiełkujących nasionach, w zazieleniających się etiolowanych liściach i w początkowym okresie hodowli komórek, natomiast spadek w starzejących się liściach i późniejszym okresie hodowli komórek.

Brak jest danych o transporcie pochodnych purynowych w układach tkanek przewodzących roślin.

Niewiele także wiadomo o przemianach pochodnych purynowych w roślinach nasiennych, jakkolwiek jest to zagadnienie o znaczeniu nie tylko teoretycznym ale i praktycznym. Do tej grupy roślin należą bowiem głównie rośliny uprawne i sprawą bardzo istotną są informacje o metabolizmie prekursorów kwasów nukleinowych. Ponieważ w ostatnich latach badania prekursorów kwasów nukleinowych są nie tylko kontynuowane, ale i rozszerzane, można się spodziewać, że zagadnienie przemian pochodnych purynowych, i ich utylizacji do syntezy kwasów nukleinowych zostanie w znacznej mierze wyjaśnione.

LITERATURA

1. Abdel-Wahab M. F., El-Kinawi S. A., *Acta Chem. Scand.* **13**, 1653 (1959).
2. Abdel-Wahab M. F., El-Kinawi S. A., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1667 (1960).
3. Albaum H. G., w *Modern Methods Plant Analysis*, red. K. Peach, M. V. Tracey, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, str. 305.

4. Albaum H. G., Ogur M., Hirshfeld A., *Arch. Biochem. Biophys.* **27**, 130 (1950).
5. Atkinson M. R., Eckerman G., Grant M., Robertson R. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 560 (1966).
6. Augsten H., Felsberg I., *Flora* **160-A**, 474 (1969).
7. Bartels H., *Flora* **159-A**, 391 (1968).
8. Bergkvist R., *Acta Chem. Scand.* **10**, 1303 (1956).
9. Bergkvist R., *Acta Chem. Scand.* **11**, 1457 (1957).
10. Bergman H., *Biol. Zentralblatt* **88**, 349 (1969).
11. Bielecki R. L., Young R. E., *Anal. Biochem.* **6**, 54 (1963).
12. Bomsel J. L., Pradet A., *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 230 (1968).
13. Bradbeer J. W., Floyd F. M., *Nature* **201**, 99 (1964).
14. Bradbeer J. W., Jarvis B. C., *Biochem. J.* **104**, 39P (1967).
15. Brown E. G., *Biochem. J.* **85**, 633 (1962).
16. Brown E. G., *Biochem. J.* **88**, 498 (1963).
17. Brown E. G., *Biochem. J.* **95**, 509 (1965).
18. Brown E. G., Mangat B. G., *Phytochemistry* **9**, 1859 (1970).
19. Brown E. G., Short K. C., *Phytochemistry* **8**, 1365 (1969).
20. Brown J., Nordin P., *J. Agr. Food Chem.* **17**, 341 (1969).
21. Chang Ch. W., *Plant Physiol.* **43**, 669 (1968).
22. Cherry J. H., Hageman R. H., *Plant Physiol.* **35**, 343 (1960).
23. Cumming D. F., *Biochem. J.* **116**, 189 (1970).
24. Mc Cune D. C., Weinstein L. H., Mancini J. F., *Contr. Boyce Thompson Inst.* **24**, 213 (1970).
25. Doree M., Leguay J. J., Terrine C., *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D* **270**, 2292 (1970).
26. Elnoghy M. A., Nordin P., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 72 (1966).
27. Franz G., *Phytochemistry* **8**, 737 (1969).
28. Galitz D. S., Howell R. W., *Physiol. Plant.* **21**, 1296 (1968).
29. Grzelczak Z., Buchowicz J., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 235 (1967).
30. Hasson-Porath E., Poljakoff-Mayber A., *Plant Physiol.* **47**, 109. (1971).
31. Isherwood F. A., Selvendran R. R., *Phytochemistry* **9**, 2265 (1970).
32. Jenner C. F., *Plant Physiol.* **43**, 41 (1968).
33. Jóźwiak Z., Leyko W., *Progr. Photosynt. Res.* **1**, 345 (1969).
34. Key J. L., Hanson J. B., *Plant Physiol.* **36**, 145 (1964).
35. Keys A. J., *J. Exptl. Bot.* **14**, 14 (1963).
36. Keys A. J., Cornelius M. J., *J. Exptl. Bot.* **16**, 271 (1965).
37. Murata T., Minamikawa T., Akazawa T., Sugiyama T., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 371 (1964).
38. Pavlinowa O. P., Afanasieva T. P., *Fizjol. Rast.* **9**, 133 (1962).
39. Price C. E., Murray A. W., *Biochem. J.* **115**, 129 (1969).
40. Rammelt R., Bergman H., *J. Chromatog.* **31**, 279 (1967).
41. Rammelt R., Muller-Stoll W. R., *Flora* **159-A**, 167 (1968).
42. Robern H., Wang D., Waygood E. R., *Canadian J. Biochem.* **43**, 225 (1965).
43. Robern H., Wang D., Waygood E. R., *Canadian J. Biochem.* **43**, 245 (1965).
44. Roux L., *Biol. Abstr.* **46**, 40502 (1965).
45. Rowan K. S., *J. Exptl. Bot.* **8**, 256 (1957).
46. Rybicka H., *Acta Soc. Bot. Polon.* **41**, w druku (1972).
47. Sebesta K., Sorm F., *Coll. Czech. Chem. Comm.* **24**, 2781 (1959).

48. Selvandran R. R., Isherwood F. A., *Biochem. J.* **105**, 723 (1967).
49. Silver A. V., Gilmore V., *Phytochemistry* **8**, 2295 (1969).
50. Wallis M. E., Bradbeer J. W., *Biochem. J.* **104**, 40P (1967).
51. Wallis M. E., Bradbeer J. W., *J. Exptl. Bot.* **21**, 1039 (1970).
52. Weinstein L. H., Mc Cune D. C., Mancini J. F., van Leuken P., *Plant Physiol.* **44**, 1499 (1969).

TOMASZ GOŁASZEWSKI*, JAN W. SZARKOWSKI**

Badania nad syntezą rybosomowych kwasów rybonukleinowych

Studies on the Ribosomal Ribonucleic Acids Synthesis

The literature data on rRNA synthesis are reviewed.

Synteza rybosomowych kwasów rybonukleinowych (rRNA), stanowiących pokaźną część RNA komórki, jest początkowym etapem biogenezy rybosomów. Badania nad syntezą rRNA, rozpoczęte w latach sześćdziesiątych, doprowadziły do wyizolowania genów strukturalnych — cistronów rRNA — kierujących tym procesem (8, 15). Badania te dotyczą miejsca syntezy rRNA w komórce, a także obejmują charakterystykę kwasu deoksyrybonukleinowego stanowiącego matrycę dla rRNA i produktów jego transkrypcji — poszczególnych klas rRNA.

O ile u prokariotów występuje jedna pula rRNA, to u organizmów wyższych synteza rRNA zachodzi w poszczególnych organellach komórkowych: jądrze, plastydach i mitochondriach. W związku z tym badania prowadzone na organizmach eukariotycznych mają również na celu poznanie współzależności między genami kodującymi rRNA w poszczególnych przedziałach metabolicznych komórki.

Znanych jest kilka klas rRNA o odmiennych wartościach stałych sedymentacji (*S*). W komórkach organizmów eukariotycznych rybosomy cytoplazmatyczne (pozaorganellowe) o stałej sedymentacji 80S zawierają jedną cząsteczkę 25—28S rRNA (o masie cząsteczkowej $1,3—1,75 \times 10^6$ daltonów) i jedną — 18S rRNA ($0,7 \times 10^6$ daltonów). U prokariotów (bakterie i sinice) w rybosomach 70S występują 23S rRNA ($1,1 \times 10^6$ daltonów) i 16S rRNA ($0,56 \times 10^6$ daltonów). Plastydialne i mitochondrialne rybosomy 70S u roślin zawierają rRNA przypominające wielkością rRNA bakterii. Mitochondrialne rRNA u zwierząt charakteryzują się masą cząsteczkową $3,5 \times 10^5$ daltonów i $5,5 \times 10^5$ daltonów (70).

Znane są również niskospolimeryzowane rRNA: 5S rRNA występujący w rybosomach 70S i 80S oraz niedawno odkryty 5,8S — 7S rRNA występujący jedynie w 80S rybosomach (54, 55). Ich masa cząsteczkowa wynosi od 3×10^4 — 5×10^4 daltonów (54). Występują one w rybosomach w równocząsteczkowych ilościach z wysokospolimeryzowanymi rRNA.

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

** Prof. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Prócz wymienionych tu klas rRNA, które określa się mianem dojrzających rRNA, u eukariontów występuje wysokopolimeryzowany prekursorowy rRNA o stałych sedymentacji 38—45S u różnych organizmów (literatura — patrz 59) oraz produkty pośrednie jego rozpadu, na przykład rRNA o stałej sedymentacji 32S (87). Losy metaboliczne prekursorowego rRNA są przedmiotem intensywnych badań (51, 57, 72, 73, 86, 87, 92).

Miejsce genetyczne odpowiedzialne za syntezę rRNA

Stent i Brenner (82) ustalili, że w genomie pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) istnieje określone miejsce genetyczne (RC) kontrolujące syntezę rRNA. Późniejsze badania (1) pozwoliły na lokalizację (zmapowanie) miejsca RC na bakteryjnym chromosomie (genomie). Dzięki wprowadzeniu przez Gillespie'ego i Spiegelmana (33) techniki sztucznej hybrydyzacji łańcuchów RNA i DNA i zastosowaniu jej do badań nad rRNA stwierdzono (95, 96), że DNA komórek *E. coli* zawiera pewne odcinki komplementarne — w sensie reguły Chargaffa — dla homologicznych (pochodzących z tego samego źródła) rRNA. Choć niejasna była relacja tych odcinków nukleotydowych DNA z postulowanym przez Stenta i Brennera (82) miejscem genetycznym RC, sugerowano, że są one cistronami rRNA (95). Yankofsky i Spiegelmann (96) stwierdzili następnie, że u *Bacterium megaterium* występują dwa typy cistronów: dla 16S i dla 23S rRNA. Wynikało to z obserwacji, że 16S i 23S rRNA nie współzawodniczyły w teście hybrydyzacji o to samo miejsce na nici DNA.

W komórce eukariontów procesami syntezy rRNA kieruje chromatyna związana z jądrem, tzw. organizator jąderka czyli chromatyna jąderkotwórcza (2, 19, 36, 46, 49, 58, 79, 88), która jest odpowiedzialna zarazem za rozwój tej organelli. Jest to określony segment DNA na jednym z chromosomów (2, 79, 88). Przekonującym dowodem udziału chromatyny jąderkotwórczej w procesie transkrypcji rRNA była obserwacja Browna i Gurdona (12) ustalająca ścisłą zależność rozwoju jąderka i biogenezy rybosomów u letalnego mutantu ropuchy płata (Xenopus laevis). Wraz z zahamowaniem procesu rozwoju jąderki — skutek braku lub niewłaściwego działania organizatora jąderkowego u tego mutantu — wstrzymany jest jednocześnie rozwój rybosomów.

Już z wcześniejszych prac Edströma i Beermanna (27) oraz Edströma i Galla (28) wiadomo było, że skład nukleotydowy jąderkowego RNA ze ślinianek *Chironomus* i oocytów traszki jest odmienny od RNA syntetyzowanego w innych strukturach jądra. RNA jąderkowy, mianowicie, charakteryzuje się wysoką zawartością guaniny i cytozyny (G+C), w czym przypomina rRNA z rybosomów cytoplazmatycznych.

Potwierdzeniem tych obserwacji były wyniki uzyskane przez Liau

i wsp. (45). Autorzy ci stwierdzili, że w zależności od stężenia białek histonowych w jąderku komórek puchliny Novikoffa zmienia się skład nukleotydowy RNA syntetyzowanego w tej organelli *in vitro*. Przy fizjologicznym stężeniu histonów powstaje RNA zbliżony składem do rRNA. Niedawno stwierdzono (41), że w jąderku występuje specyficzna polimeraza rRNA.

Przyjmuje się dzisiaj, że jąderko nie tylko jest miejscem syntezy prekursorowego rRNA, lecz również aktywnie uczestniczy w procesach jego dojrzewania: metylacji cząsteczek i ich hydrolitycznego rozpadu przy udziale wysoce specyficznych rybonukleaz (por. 36, 51, 87).

Pierwotnym produktem transkrypcji genów rRNA u eukariontów jest wspomniany już prekursorowy rRNA, o stałych sedymentacji 38S—45S i masie cząsteczkowej od $2,7 \times 10^6$ daltonów (u roślin i niższych kręgowców) do około 4×10^6 daltonów (u ptaków i ssaków) (literatura — patrz 59). Pierwszą sugestią, że 45S RNA może być prekursorem rRNA w komórkach HeLa wysunęli pracownicy grupy Scherrera (72, 73) oraz Perry (57). Wiadomo obecnie, że prekursorowy rRNA rozpada się w jąderku na produkty pośrednie, z których ostatecznie powstaje jedna cząsteczka 18S rRNA i jedna — 28S rRNA. Część łańcucha prekursorowego rRNA jest w tym procesie odrzucana, a losy jej nie są poznane (59). Powiemy o tym szerzej w dalszej części artykułu.

Produktami transkrypcji genów u prokariotów są cząsteczki 16S rRNA i 23S rRNA (20). Są sugestie, że i w tym przypadku pierwotnie powstaje jeden wspólny prekursor, który ulega jednak rozpadowi jeszcze przed zakończeniem procesu transkrypcji (25, 62).

Isolowanie genów odpowiedzialnych za syntezę rRNA

W badaniach nad cistronami rRNA bardzo pomocną okazała się technika izopiknicznego wirowania DNA w gradiencie gęstości chlorku cezu (91). Pozwala ona rozdzielić cząsteczki DNA o odmiennych wartościach gęstości pozornej (ρ). Gęstość ta wzrasta wraz ze wzrostem zawartości G+C w łańcuchu polinukleotydowym (75). Schildkraut i Maio (74) stwierdzili, że jądrowy DNA nowotworowych komórek myszy rozdziela się w gradiencie gęstości chlorku cezu i obok głównej frakcji pojawia się niewielka frakcja DNA, występującego przede wszystkim w jąderku, określana jako DNA towarzyszący (satelitarny).

Birnstiel i wsp. (7) wykazali, iż w oocytach platanny — poza główną frakcją DNA o gęstości $\rho = 1,700 \text{ g/cm}^3$, występuje DNA towarzyszący o znacznie wyższej zawartości G+C i wyższej o 9°C temperaturze topnienia T_m , dla którego wartość $\rho = 1,724 \text{ g/cm}^3$. Z badań nad sztuczną hybrydyzacją DNA towarzyszącego i rRNA wynikało, że DNA ten jest heterogenny w swym składzie, a pewna liczba sekwencji nukleotydowych w nim

zawartych wykazuje komplementarność w stosunku do rRNA (7, 13, 32, 48, 50, 90). Sekwencje te określono mianem rybosomowego DNA (rDNA) (7, 11, 23, 30, 67, 93, 94). Tak więc, rDNA jest zespołem cistronów odpowiedzialnych za syntezę rRNA. Jak się później okazało (94), pewne sekwencje rRNA nie uczestniczą w aktywnej transkrypcji rRNA (patrz niżej).

Rozmieszczenie cistronów rRNA w rDNA u *Xenopus laevis* szeroko badali Birnstiel i wsp. (7). Autorzy ci śledzili zmiany intensywności hybrydyzacji 18S i 28S rRNA z fragmentami rDNA uzyskiwanymi z cząsteczek natywnych przy pomocy ultradźwięków. Dysponując fragmentami DNA o masie cząsteczkowej około $0,3 \times 10^6$ daltonów uzyskali drogą wirowania izopiknicznego rozdział sekwencji komplementarnych w stosunku do obu rRNA; gęstość pozorna sekwencji dla 18S rRNA wynosiła 1,713, a sekwencji dla 28S rRNA — 1,721 g/cm³ (7). Skład nukleotydowy tak rozdzielonych odcinków DNA, obliczony z gęstości, odpowiadał składowi 18S i 28S rRNA, zaś ich aktywność hybrydyzacyjna była różna w stosunku do obu produktów transkrypcji.

W analogicznych doświadczeniach z DNA o znacznie wyższej masie cząsteczkowej ($1,6 \times 10^6$ daltonów), nie uzyskiwano rozdziału obu rodzajów sekwencji, ani nie obserwowano różnic w zdolności hybrydyzacyjnej w stosunku do obu rRNA. Z doświadczeń tych wypływał wniosek, że cistrony rRNA (18S i 28S) ułożone są na niewielkich odcinkach rDNA.

Podobny typ doświadczeń prowadzili Brown i Weber (13, 14). Stwierdzili oni, że wysokopolimeryzowany rDNA ma wyższą gęstość pozorną niż jego odcinki komplementarne z obu klasami wysokopolimeryzowanych rRNA. Świadczyłoby to, że w rDNA — obok sekwencji komplementarnych z rRNA — występują odcinki niekomplementarne o wyższej zawartości G+C. Zdaniem Birnstiela i wsp. (7), cistrony rRNA są przedzielone odcinkami o wyższej zawartości G+C, niekomplementarnymi z rRNA, co równoważy różnicę pomiędzy gęstością stwierdzaną dla odcinków komplementarnych i dla całej cząsteczki rDNA.

Przypuszczenia te potwierdzili David i wsp. (23). Autorzy ci zaobserwowali dwie fazy topnienia rDNA z erytrocytów *Xenopus laevis*. Pierwsza faza dotyczyła, ich zdaniem, odcinków komplementarnych dla rRNA, charakteryzujących się niższą zawartością G+C, druga zaś — sekwencji niekomplementarnych. Te ostatnie określono mianem DNA przedzielającego (ang. *spacer DNA*) (7, 14, 63, 90, 93, 94).

O obecności DNA przedzielającego w rDNA świadczyły też wyniki Davida i wsp. (23) uzyskane w doświadczeniach hybrydyzacyjnych. Okazało się, że współzawodnictwo nadmiaru nieznakowanych dojrzałych rRNA o miejsce na nici rDNA uprzednio zhybrydyzowanej ze znakowanym ³H-40S prekursorowym rRNA, ³²P-18S rRNA i ³²P-28S rRNA jest intensywniejsze w przypadku dojrzałych rRNA. Oznacza to, że 40S prekursorowy rRNA zawiera pewne sekwencje nieobecne ani w 18S rRNA, ani w 28S rRNA. Obecne w rDNA sekwencje niekomplementarne dla

rRNA a odpowiadające przedzielającemu DNA, kodują zatem być może, pewne odcinki prekursorowego rRNA.

Rozmieszczenie cistronów na nici rDNA badano również przez porównanie gęstości pozornej hybrydów rRNA-rDNA (7). Gęstość pozorna hybrydu zależy bowiem od stosunku ilościowego RNA/DNA w hybrydzie i może być miernikiem komplementacji RNA z określonym odcinkiem DNA. Do hybrydyzacji z DNA używano ^{32}P -18S rRNA i ^{14}C -28S rRNA. Gdy hybrydyzowano do nasycenia jednoniciowe cząsteczki DNA o masie $0,18 \times 10^6$ daltonów z 18S rRNA hybrydy wykazywały wysoki stosunek RNA/DNA. Dodanie 28S rRNA do hybrydu nie wpływało na zmianę gęstości tego ostatniego, a zatem nie zwiększała się w nim zawartość RNA. Odmienny wynik uzyskiwano z DNA o masie cząsteczkowej 3×10^6 daltonów. W tak dużej cząsteczce należało się spodziewać obecności jednej sekwencji kodującej 28S rRNA ($1,6 \times 10^6$ daltonów) i jednej — kodującej 18S rRNA ($0,7 \times 10^6$ daltonów). Po dodaniu 18S rRNA w ilości nasycającej, DNA istotnie nie wykazywał już komplementacji z następną porcją 18S rRNA, natomiast dodanie 28S rRNA powodowało podwyższenie gęstości hybrydu. Doświadczenie to przemawia za ścisłym zespoleniem cistronów dla obu rRNA na nici rDNA.

Teoretycznie można rozważać przynajmniej trzy modele ułożenia cistronów dla 18S i 28S rRNA (7). Zgodnie z jednym z nich, wszystkie cistrony dla jednej klasy rRNA tworzyłyby blok policistronowy, zawierający pewną liczbę sekwencji DNA rozdzielającego, sąsiadujący z blokiem cistronów drugiej klasy rRNA. Łatwość pęknięcia dużych bloków policistronowych w czasie izolowania DNA byłaby przyczyną niezwykle łatwego rozdziału rDNA podczas wirowania izopiknicznego na frakcje różniące się składem nukleotydomowym i odpowiadające odcinkom komplementarnym dla każdej z klas rRNA. Jednakże Birnstiel i wsp. (7) wykazali, że cząsteczka rDNA o masie 3×10^6 daltonów posiada zdolność do hybrydyzacji zarówno z 18S rRNA jak i 28S rRNA. Jeśli zatem stosunkowo krótki łańcuch DNA wykazuje komplementarność z obu klasami rRNA, należy przyjąć, że cistrony obu rodzajów rozmieszczone są naprzemiennie. Z tych względów omówiony wyżej model bloków cistronowych został odrzucony (7).

Dwa inne modele zakładają, że cistrony 18S rRNA i 28S rRNA leżą naprzemiennie na nici rDNA. Różnica między tymi modelami sprowadza się w zasadzie do topografii DNA przedzielającego. Cistrony 18S rRNA i 28S rRNA mogłyby leżeć parami przylegając ściśle do siebie, a odcinki niekomplementarnego DNA przedzielałyby sąsiednie pary cistronów lub cistrony każdej pary.

Wensink i Brown (94) zaproponowali niedawno model jednostki transkrypcyjnej rRNA na podstawie badań nad denaturacją rDNA *Xenopus laevis* połączonych z obserwacjami w mikroskopie elektronowym. Zdaniem tych autorów, cistrony 18S rRNA i 28S rRNA przedzielone są

krótkimi sekwencjami rDNA niekomplementarnego, o wysokiej zawartości G+C, biorącymi udział w syntezie prekursorowego rRNA. Znacznie dłuższe odcinki przedzielającego rDNA ($3,7 \times 10^6$ daltonów), sąsiadujące z cistronami rRNA, nie biorą udziału w transkrypcji 40S rRNA. Krótkie sekwencje rDNA przedzielającego kodują, zdaniem Wensinka i Brown (94), tę część łańcucha prekursorowego rRNA, która nie wchodzi w skład dojrzałych rRNA 18S i 28S.

Cząsteczka rDNA jest dwuniciowa. Reeder i Brown (65) opisali metodę oddzielania obu nici i zbadali, która z nich koduje rRNA. Metoda ta polega na wstępnej hybrydyzacji (tzw. prohybrydyzacja) rDNA z nieznakowanym rRNA. Jedna z nici — zdolna do hybrydyzacji staje się wówczas „gęstsza” i można ją oddzielić od nici niehybrydującej na drodze wirowania izopiknicznego. Po usunięciu zhybrydowanego rRNA z oddzielonej uprzednio nici, prowadzono hybrydyzację ze znakowanymi rRNA. Okazało się, że jedynie tzw. nić ciężka (nić H) rDNA — w przeciwieństwie do nici lekkiej (nić L) — wykazuje wysoką aktywność hybrydyzacyjną z rRNA. A zatem, tylko nić H odgrywa aktywną rolę w transkrypcji rDNA (65). Również w mitochondrialnym DNA u *Xenopus laevis* pojedyncze sekwencje kodujące obie klasy rRNA są zlokalizowane na nici H (22).

Cistrony kodujące 5S rRNA były przedmiotem mniej intensywnych badań. Bleyman i wsp. (9) wykazali, że u bakterii aktynomycyna D hamuje jednocześnie syntezę 5S rRNA i 23S rRNA, co wskazywałoby, że cistrony dla obu tych rRNA położone są blisko siebie. Doollittle i Pace (25) sugerowali, że u *E. coli* cistrony 5S rRNA 16S rRNA i 23S rRNA ulegają transkrypcji jako pojedyncza jednostka cistronowa. Zdaniem tych autorów (24), jednostka transkrypcyjna 5S rRNA zawiera więcej informacji genetycznej niż wymaga tego pojedyncza cząsteczka produktu transkrypcji; znaczyłoby to, że 5S rRNA powstaje z bliżej nieokreślonej cząsteczki prekursorowego RNA.

Colli i wsp. (20) stwierdzili, że geny 5S rRNA u *Bacillus subtilis* są związane z zespołem genów kodujących 16S rRNA i 23S rRNA, przy czym cistrony 23S rRNA i 5S rRNA leżą w bezpośrednim sąsiedztwie. Wniosek ten wynikał z obserwacji, że w jednoniciowym fragmencie rDNA (o masie $2-4 \times 10^6$ daltonów) występują sekwencje komplementarne dla wszystkich trzech cząsteczek rRNA (5S, 16S i 23S rRNA), natomiast we fragmencie mniejszym (o masie 1×10^6 daltonów) wykrywane są jedynie sekwencje komplementarne z 5S rRNA i 23S rRNA. Dopiero dalsze obniżenie masy cząsteczkowej rDNA (do $3-5 \times 10^5$ daltonów) pozwoliło rozdzielić cistrony dla 5S rRNA i 23S rRNA.

Prowadzono również badania nad cistronami 5S rRNA u organizmów wyższych. Brown i Weber (13) oraz Wallace i Birnstiel (91) stwierdzili, że u letalnego mutantu platanny, nie wytwarzającego rybosomów, wykazującego delecję 99% rDNA, występuje fizjologiczna liczba

cystronów 5S rRNA. Ponadto wykazali, że rDNA komplementarny dla 5S rRNA wykazuje niższą gęstość pozorną niż rDNA komplementarny dla wysokopolimeryzowanych rRNA. U muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) cistrony 5S rRNA nie występują na chromosomie płciowym, gdzie zlokalizowane są geny dla wysokopolimeryzowanych rRNA (84).

Brown i wsp. (15) donieśli niedawno o wyizolowaniu cystronów 5S rRNA z rDNA platanny. Stwierdzili oni, że jednostka transkrypcyjna 5S rRNA, o masie 5×10^5 daltonów, zawiera dwa rodzaje sekwencji nukleotydowych: odcinki o niskiej zawartości G+C i inne — o wysokiej. Te ostatnie, stanowiące jedynie 7% materiału jednostki transkrypcyjnej, są cistronami kodującymi 5S rRNA. Pozostałe odcinki rDNA, stanowiłyby DNA przedzielający. Być może, cząsteczka 5S rRNA jest transkrybowana w postaci większego łańcucha polinukleotydowego ulegającego później rozpadowi. Wniosek taki jest zgodny ze wspomnianą już sugestią Doolittle'a i Pace'a (24) na temat syntezy 5S rRNA u bakterii. Brown i wsp. (13) podkreślają, że liczba genów kodujących 5S rRNA u *Xenopus laevis* przewyższa liczbę genów kierujących syntezą wysokopolimeryzowanych rRNA. Nie wiadomo jednak, czy cistrony 5S rRNA zlokalizowane są na jednym chromosomie, jak to ma miejsce w przypadku cystronów 18S i 28S rRNA.

Istnieje więc, jak się wydaje, zasadnicza różnica ułożenia cystronów 5S rRNA u pro- i eukariontów. U bakterii cistrony dla 5S, 16S i 23S rRNA tworzą zespół, natomiast u organizmów eukariotycznych cistrony 5S rRNA są odgraniczone przestrzennie od cystronów 18S i 28S rRNA. Tartof i Perry (84) są zdania, że w toku ewolucji eukarionty wykształciły mechanizm niezależnej kontroli syntezy nisko- i wysokopolimeryzowanych rRNA, podczas gdy bakterie zachowały skoordynowaną regulację syntezy trzech klas rRNA. Znaczenie tego zjawiska nie zostało wyjaśnione. Brown i Weber (13) sądzą, że pomimo przestrzennego rozdzielenia cystronów 5S rRNA od cystronów 18S i 28S rRNA u eukariontów, synteza wysokopolimeryzowanych rRNA wpływa jednak na syntezę 5S rRNA. Autorzy ci zaobserwowali, że bezjąderkowe mutanty platanny, zawierające cistrony dla 5S rRNA, ale nie posiadające cystronów dla pozostałych rRNA, nie są zdolne do syntezy 5S rRNA. Mechanizm tej współzależności nie jest zrozumiały. Dodajmy, że synteza 5S rRNA zachodzi podczas metafazy, gdy 18S i 28S rRNA nie powstają (99).

Kolejność odczytywania cystronów rRNA

Jednostka transkrypcyjna rDNA musi zawierać pojedyncze miejsce przyłączania polimerazy rRNA, tzw. promotor oraz miejsce uwalniania enzymu — terminator (25). Zdaniem Pettijohna (61), polimeraza rRNA jest upakowana na genach w taki sposób, że informacja genetyczna

zawarta w rDNA jest transkrybowana *in vivo* z najwyższą, fizjologicznie możliwą, szybkością. Autor ten, badając syntezę rRNA *in vitro* na wyizolowanym rDNA *E. coli*, stwierdził, że po 2—3 minutach od rozpoczęcia syntezy pojawia się rRNA komplementarny z sekwencją 16S rDNA. Parę minut później rozpoczyna się synteza 23S rRNA, którego ilość, początkowo mała, dorównuje później ilości syntetyzowanego 16S rRNA. Prowadząc syntezę *in vitro* przy udziale całkowitego DNA komórki *E. coli* Pettijohn (61) stwierdził, że rRNA stanowi 5% powstającego RNA, mimo że rDNA stanowi jedynie 0,3% całkowitego DNA komórki organizmu. Przy założeniu, że prędkość wydłużania się łańcuchów wszystkich klas kwasów rybonukleinowych jest jednakowa, wynik taki sugeruje, iż zachodziła wówczas preferencyjna synteza rybosomowego RNA wynikająca z większej częstotliwości inicjacji syntezy rRNA w porównaniu do innych klas RNA. Kolejność procesów inicjacji syntezy 16S rRNA i 23S rRNA wskazuje, że u *E. coli* miejsce promotera w operonie rRNA leży w pobliżu cistronu 16S rRNA, a dystalnie względem cistronu 23S rRNA. Podobny wniosek wynika z pracy Doolittle'a i Pace'a (25). Zdaniem tych autorów transkrypcja rRNA kończy się odczytywaniem cistronu 5S rRNA.

Kolejność odczytywania poszczególnych segmentów rDNA płatanny *in vitro* przy udziale polimerazy RNA pochodzącej z komórek *E. coli* badali szczegółowo Reeder i Brown (65). Stwierdzili oni, że 18S rRNA i 28S rRNA różnią się składem nukleotydowym, przy czym stosunek ilościowy cytozyny do uracylu dla obu rRNA jest niższy niż wartość obliczona dla rRNA syntetyzowanego na sekwencjach przedzielającego rDNA. Przez określenie stosunku C/U w poszczególnych klasach rRNA rozdzielonych w gradiencie gęstości sacharozy możliwe było oznaczenie ilości 18S rRNA, 28S rRNA i RNA syntetyzowanego na przedzielającym rDNA w różnych momentach po rozpoczęciu syntezy. Okazało się, że po 15 minutach transkrypcji stosunek ilościowy 18S rRNA do 28S rRNA w produkcie transkrypcji wynosił 5, po godzinie spadał do 2. A zatem, 18S rRNA był syntetyzowany w pierwszej kolejności, później rozpoczynała się synteza 28S rRNA. Około 15% powstającego rRNA zawierało sekwencje komplementarne dla przedzielającego rDNA. Materiał ten, obecny w cząsteczce prekursorowego rRNA, nie wchodzi w skład dojrzałych rRNA.

Liczba cistronów rRNA w komórce

Ilość DNA komplementarnego w stosunku do rRNA stanowi niewielką część genomu u różnych organizmów (7, 18, 40, 52, 53, 61, 63, 69, 71, 76, 96, 97). Znając wielkość puli DNA komórki i przyjmując, że sekwencje DNA kodujące rRNA mają masę cząsteczkową zbliżoną do masy cząsteczkowej produktów transkrypcji, można na podstawie doświadczeń hybry-

dyszacyjnych określić liczbę cistronów rRNA w genomie. Pamiętać przy tym należy, iż tylko nić H rDNA bierze udział w transkrypcji rRNA (65).

Cistrony rRNA nie występują w genomie pojedynczo. Wyjątkiem okazał się drobnoustrój *Mycoplasma sp.*, u którego ilość DNA komplementarnego w stosunku do rRNA wystarcza zaledwie dla pojedynczych genów 16S i 23S rRNA (71). W genomie u *E. coli* (97) występuje 5 kopii cistronów dla obu rRNA, u *Bacillus subtilis* — około 10 kopii (52). Cistrony dla wysokopolimeryzowanych rRNA występują w równoważnych ilościach (58, 64, 80), cistrony 5S rRNA mogą być liczniejsze (13, 80).

Cistrony rRNA występują na niewielkich odcinkach chromosomów tworząc zespoły (tandemy) (26, 52, 97). Zdaniem Purdoma i wsp. (63), u niektórych drobnoustrójów (np. *Proteus mirabilis*, *Serratia marescens*) zespoły cistronów rRNA mogą być bardziej rozproszone w genomie, co jest wynikiem obecności wielu odcinków DNA przedzielającego.

W haploidalnym genomie jądrowym u eukariontów liczba cistronów rRNA jest znacznie wyższa niż u bakterii (58). U różnych organizmów wyższych liczba ta może wahać się od blisko stu do wielu tysięcy kopii w genomie (38). O dużej liczbie powtarzających się identycznych sekwencji nukleotydowych świadczą wyniki badań nad renaturacją satelitarnego DNA z jąder dyni (48), jeżowca *Lytechinus variegatus* (53) i muszki owocowej (10). Szybka renaturacja tego DNA sugeruje, że występują w nim duże zespoły identycznych sekwencji — „rodziny” cistronów rRNA (53). W związku z tym pisze się o nadmiarowości (ang. *redundancy*) liczby genów rRNA (10, 13, 58, 67, 68, 69) w genomie u różnych gatunków.

Mitochondria i plastydy, zawierające w pewnych stadiach rozwojowych organizmu pokazną część puli DNA komórkowego (3), syntetyzują rRNA — przynajmniej częściowo — na własnej matrycy (16, 21, 42, 44, 77, 78, 83, 85). Każda cząsteczka DNA mitochondriów płatanny zawiera pojedynczy cistron dla obu rRNA (22). Każdy chloroplast w komórce klejnotki (*Euglena gracilis*) zawiera 20—45 cistronów rRNA (77, 78). Cistrony rRNA chloroplastów aktywują się na świetle — w etioplastach stwierdzono brak rRNA (16). Większość cistronów odpowiedzialnych za syntezę rRNA chloroplastów liści tytoniu znajduje się jednak w genomie jądrowym, gdzie są one zlokalizowane w innych odcinkach DNA niż cistrony kodujące rRNA dla rybosomów cytoplazmatycznych (85). Być może istnieją ponadorganellowe mechanizmy koordynujące aktywność obu typów cistronów w komórce.

Zdaniem Davida (22), cistrony jądrowe charakteryzują się wyższą aktywnością niż cistrony mitochondrialne. Dodajmy, że aktywność cistronów rRNA nie jest jednakowa w czasie rozwoju ontogenetycznego organizmów. U różnych zwierząt aktywność tych genów ujawnia się bądź w okresie bruzdkowania, bądź dopiero we wczesnym stadium gastruli (literatura — patrz 58).

Prócz aktywacji cistronów rRNA w określonych stadiach rozwojowych

komórki, u pewnych organizmów znane są mechanizmy doprowadzające do zwiększenia puli tych cistronów. Mamy tu na myśli tzw. magnifikację genów i ich amplifikację (zwielokrotnienie, powielenie). Pierwszy z tych mechanizmów opisał *Ritossa* (66) u pewnego mutantu *Drosophila melanogaster*. Dzikie szczepy tego owada zawierają — w zależności od liczby jąderek w jądrze — od 130 do 300 cistronów rRNA, mutant zaś wykazuje niedobór tych cistronów. Mutacja spowodowana nieprawidłowym przemieszczeniem odcinków chromosomalnych w czasie podziału komórkowego prowadzi do utraty pewnych odcinków DNA położonych na chromosomie płciowym, na którym zlokalizowany jest organizator jąderka (69). Mutant taki traci zdolność do prowadzenia syntezy rRNA z normalną wydajnością (68). Rewersja mutacji jest możliwa, gdy nastąpi duplikacja cistronów rRNA. Cistrony te nie zostają jednak ściśle wbudowane do genomu i mogą być łatwo ponownie utracone (66).

Zjawisko amplifikacji cistronów rRNA zaobserwował *Gall* (31) w genomie komórek jajowych płatanny. Najintensywniej zwielokrotnienie genów zachodzi podczas profazy mejotycznej — w pachytenie — w procesie oogenezy u płazów i pewnych innych organizmów (11, 31, patrz też 89). Istotą tego zjawiska jest specyficzna replikacja chromatyny jąderkotwórczej, a cytologicznym jego odzwierciedleniem jest zwiększenie liczby jąderek w jądrze komórkowym (29, 31). Pojedyncze jądro oocytu może wówczas zawierać około 1500 jąderek (31, 56). Zawartość DNA w jądrze oocytu (17 pikogramów) przewyższa wtedy tysiącrotnie ilość DNA w jądrze komórki somatycznej płatanny (0,012 pikograma) (29). Zdaniem *Perkowskiej* i wsp. (56), podczas amplifikacji genów rRNA może występować tzw. efekt kaskadowy — produkty endoreduplikacji chromatyny jąderkotwórczej mogą stawać się kolejnymi matrycami w syntezie rRNA. Być może w procesie tym odgrywa rolę polimeraza DNA zależna od RNA (30).

David i wsp. (23) porównywali własności fizyko-chemiczne chromosomowego rDNA występującego zazwyczaj w jądrze oocytu płatanny i rDNA powstającego w procesie amplifikacji. Stwierdzili oni, że obie pule rDNA wykazują podobną zdolność do hybrydyzacji z rRNA i charakteryzują się dwufazowymi krzywymi termicznymi, co świadczy, że obok sekwencji komplementarnych z rRNA zawierają zapewne odcinki rDNA przedzielającego. Amplifikowany rDNA — w przeciwieństwie do chromosomowego rDNA — nie zawiera 5-metylocytozyny. Wskazuje to, że oba rDNA są podobne, lecz nie identyczne.

Zwielokrotnienie genów rRNA — zachodzące w czasie mejozy — odbiega od powszechnego schematu replikacji DNA, która u eukariontów odbywa się jedynie w fazie S podczas okresu międzypodziałowego (por. 36, 98). Amplifikacja cistronów rRNA, podobnie jak inne procesy replikacji DNA, wymaga syntezy białek (5).

Znaczenie procesu zwielokrotnienia cistronów rRNA nie jest w pełni

wyjaśnione. Najprawdopodobniej, dzięki zwiększeniu puli rDNA, staje się możliwa intensywna synteza rRNA w czasie oogenezy (31). Chen i Osborne (17) wysunęli przypuszczenie, że również w procesie dojrzewania nasienia roślinnego ma miejsce amplifikacja cistronów rRNA, które w okresie kiełkowania ulegają delecji. W dojrzewającym nasieniu dochodziłoby zatem do syntezy dodatkowych kopii cistronów rRNA, których produkty byłyby następnie wykorzystywane w czasie kiełkowania (34). Zjawisko amplifikacji genów rRNA można więc uważać za proces korzystny dla organizmu, zapewniający mu prawidłowy rozwój (56).

rRNA i ewolucja organizmów

Zwróciliśmy uwagę na różnicę między wielkością cząsteczek pierwotnego produktu transkrypcji rDNA u bakterii i organizmów eukariotycznych. Jak się wydaje, pewnym zmianom ewolucyjnym podlega również wielkość prekursorowego rRNA syntetyzowanego u różnych grup eukariotów. Jak już wspomniano policistronowy rRNA prekursorowy rozpada się na cząsteczki dojrzałych rRNA, przy czym część sekwencji nukleotydowych prekursora jest wówczas odrzucana. Odrzucane odcinki są prawdopodobnie kodowane przez sekwencje przedzielającego rDNA (65, 94).

Perry i wsp. (59), wykorzystując wyniki własne i dane innych autorów, porównali wielkość odrzucanych fragmentów prekursorowego rRNA u organizmów różnych stanowisk systematycznych i doszli do wniosku, że istnieje pewna zależność między pozycją ewolucyjną organizmu i ekonomią wykorzystywania prekursorowego rRNA. Najbardziej ekonomiczna jest synteza indywidualnych cząsteczek rRNA na matrycowym rDNA u bakterii. U roślin i niższych ewolucyjnie zwierząt, łącznie z gadami, dojrzewanie rRNA wiąże się z utratą około 25% łańcucha prekursora. U ptaków i niektórych ssaków: torbaczy (*Marsupialia*) oraz łożyskowców (*Placentalia*), masa cząsteczkowa prekursorowego rRNA jest większa od sumy mas cząsteczkowych 18S rRNA i 28S rRNA o blisko 80%. Jest zatem mało ekonomiczny. Nie wiadomo jednak, czy zmiany ewolucyjne polegają na zwiększaniu ilości genów kodujących dodatkowe sekwencje w prekursorowym rRNA, czy też na uaktywnianiu się segmentów przedzielającego rDNA jako matryc. Znaczenie takich zmian nie jest łatwe do wytłumaczenia.

RNA rybosomowe u organizmów odległych taksonomicznie wykazują duże podobieństwo składu nukleotydowego. Bendich i McCarthy (4) porównywali temperaturę topnienia (T_m) rRNA z różnych źródeł biologicznych i stwierdzili, że różnice między wartościami T_m są tym większe, im dalsze jest pokrewieństwo filogenetyczne organizmów. Sugerują też, że cząsteczki wyżej spolimeryzowanych rRNA ulegają zmianom strukturalnym szybciej — w aspekcie ewolucyjnym — niż krótsze cząsteczki, na

przykład 16S rRNA. Badania nad termostabilnością heterologicznych (pochodzących z odległych gatunków) hybrydów rRNA-DNA (4) wskazują na zachowawczy, nie podlegający poważnym zmianom ewolucyjnym, charakter rRNA. Na przykład DNA *E. coli* wykazuje w stosunku do 25S rRNA grochu 40% aktywności hybrydyzacyjnej stwierdzanej dla układu DNA — 25S RNA z komórek tej rośliny. Podobieństwo struktury 1-rzędowej rRNA u odległych taksonomicznie organizmów jest, zdaniem B e n d i c h a i M c C a r t h y ' e g o (4), dowodem ich filogenetycznej więzi.

Przyłączanie białek do rRNA

Synteza rRNA biegnie równolegle z syntezą białek rybosomowych. Końcowym etapem biogenezy rybosomów jest przyłączanie cząsteczek białka do nici rRNA i uformowanie funkcjonalnie dojrzałych cząstek nukleoproteidowych. Tworzenie polisomów jest już tylko procesem programowania uformowanych rybosomów.

Lokalizacja genów odpowiedzialnych za syntezę garnituru 20—35 białek rybosomowych (58, 60, 81) nie została jeszcze poznana (39). Wiadomo, że geny te nie leżą w bezpośrednim sąsiedztwie cistronów rRNA* (97). Istnieją sugestie, że białka rybosomowe są syntetyzowane w jąderku (58). Wiadomo bowiem, że jąderko jest najaktywniejszym w syntezie białek przedziałem metabolicznym jądra komórkowego (6, por. też 36). Zdaniem K u m a r a i W a r n e r a (43), w komórkach HeLa prekursorowy rRNA wiąże się z białkami natychmiast po powstaniu, już na terenie jąderka. Rozpad prekursorowego rRNA następowałby więc po utworzeniu nukleoproteidu. Autorzy ci stwierdzili, że piętno znakowanych białek wykrywanych w jąderkowych cząstkach nukleoproteidowych o stałej sedymentacji 55S wykrywane jest później w 50S podjednostkach rybosomów cytoplazmatycznych. Część białek nukleoproteidów jąderkowych nie wchodzi jednak w skład rybosomów dojrzałych (43). P e r r y (58) nie wyklucza możliwości, że w jąderku następuje łączenie pewnych białek cytoplazmatycznych z rRNA. Możliwe jest, że część białek rybosomów cytoplazmatycznych pochodzi z chloroplastów (por. 35), a pewne białka rybosomów mitochondrialnych — z jądra (37).

Powszechnie przyjmowany model stadialnego rozwoju rybosomów, poprzez stopniowe przyłączanie białek do rRNA (35, 47), nie wyklucza żadnej z tych możliwości. Do wyjaśnienia pozostają mechanizmy koordynujące i regulujące syntezę białek i rRNA w poszczególnych organelach komórkowych.

LITERATURA

1. Alföldi L., Stent G. S., Clowes R. C., *J. Mol. Biol.* **5**, 348 (1962).
2. Barr H. J., Esper H., *Exptl. Cell Res.* **31**, 211 (1963).
3. Bell B., Mühletaller K., *J. Mol. Biol.* **8**, 853 (1964).
4. Bendich A. J., McCarthy B. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **65**, 349 (1970).
5. Bird A. P., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 157 (1971).
6. Birnstiel M. L., Hyde B. B., *J. Cell Biol.* **18**, 41 (1963).
7. Birnstiel M. L., Speirs J., Purdom I., Jones K., Loening U. E., *Nature* **219**, 454 (1968).
8. Birnstiel M. L., Wallace H., Sirlin J., Fishberg M., *Nat. Cancer Inst. Monograph* **23**, 431 (1966), cyt. wg 7.
9. Bleyman M., Kondo M., Hecht N., Woese C. R., *J. Bacteriol.* **99**, 535 (1965).
10. Botchan M., Kram R., Schmid C. W., Hearst J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1125 (1971).
11. Brown D. D., David I. B., *Science* **160**, 272 (1968).
12. Brown D. D., Gurdon J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 139 (1964).
13. Brown D. D., Weber C. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 661 (1968).
14. Brown D. D., Weber C. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 681 (1968).
15. Brown D. D., Wensink P., Jordan E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 3175 (1971).
16. Brown R. D., Haselkorn R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 2536 (1971).
17. Chen D., Osborne D. J., *Nature* **225**, 336 (1970).
18. Chen H. R., *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 195 (1971).
19. Chipchase M. J. H., Birnstiel M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 1101 (1964).
20. Colli W., Smith J., Oishi M., *J. Mol. Biol.* **56**, 117 (1971).
21. David I. B., w *The Control of Organelle Development*, red. P. L. Miller, Cambridge University Press, 1970, str. 227.
22. David I. B., *J. Mol. Biol.* **63**, 201 (1972).
23. David I. B., Brown D. D., Reeder R. H., *J. Mol. Biol.* **51**, 341 (1970).
24. Doolittle W. F., Pace N. R., *Nature* **228**, 125 (1970).
25. Doolittle W. F., Pace N. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1786 (1971).
26. Dubnau D., Smith I., Marmur J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 224 (1965).
27. Edström J.-E., Beermann W., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **14**, 371 (1962).
28. Edström J.-E., Gall J. G., *J. Cell Biol.* **19**, 279 (1963).
29. Evans D., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 274 (1968).
30. Ficq A., Brachet J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 2774 (1972).
31. Gall J. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 553 (1968).
32. Gall J. G., Macgregor H. C., Kidston M. E., *Chromosoma* **26**, 169 (1969).
33. Gillespie D., Spiegelman S., *J. Mol. Biol.* **12**, 829 (1965).
34. Gołaszewski T., Siwecka A., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **18**, 125 (1972).
35. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **12**, 413 (1966).
36. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **17**, 163 (1971).
37. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., Rytel M., *Post. Biochem.* **15**, 323 (1969).
38. Grierson D., Loening U. E., *Nature, New Biol.* **325**, 80 (1972).
39. Hallberg R. L., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **46**, 393 (1969).
40. Hurlbert R. B., Miller E. G., Vaughan C. L., *Advan. Enzyme Reg.* **7**, 219 (1969).

41. Jacob S. T., Sajdel E. M., Munro H. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 765 (1970).
42. Kirk J. T. O., *Annual Rev. Biochem.* **40**, 161 (1971).
43. Kumar A., Warner J. R., *J. Mol. Biol.* **63**, 233 (1972).
44. Küntzel H., *J. Mol. Biol.* **40**, 315 (1969).
45. Liau M. C., Hnilica L. S., Hurlbert R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 626 (1965).
46. MacConkey E. H., Hopkins J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1197 (1964).
47. Mangiarotti G., Apirion D., Schlessinger D., Silengo L., *Biochemistry* **7**, 456 (1968).
48. Matsuda K., Siegel A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 673 (1967).
49. Miller L., Brown D. D., *Chromosoma* **28**, 430 (1969).
50. Miller O. L., Beatty B. R., *Science* **164**, 955 (1969).
51. Muramatsu M., Hodnett J. L., Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 116 (1966).
52. Oishi M., Sueoka N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 483 (1965).
53. Patterson J. B., Stafford D. W., *Biochemistry* **10**, 2775 (1971).
54. Payne P. I., Dyer T. A., *Biochem. J.* **124**, 83 (1971).
55. Payne P. I., Dyer T. A., *Nature, New Biol.* **235**, 145 (1972).
56. Perkowska E., Macgregor H. C., Birnstiel M. L., *Nature* **217**, 649 (1968).
57. Perry R. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 2179 (1962).
58. Perry R. P., *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **6**, 219 (1967).
59. Perry R. P., Cheng T., Freed J. J., Greenberg J. R., Kelley D. E., Tartof K. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **65**, 609 (1970).
60. Peterman M. L., w The Physical and Chemical Properties of Ribosomes, Elsevier Publ. Co., 1964, str. 77.
61. Pettijohn D. E., *Nature, New Biol.* **235**, 204 (1972).
62. Pettijohn D. E., Stonington G. O., Kosman C. R. *Nature* **228**, 235 (1970).
63. Purdom J., Bishop J. O., Birnstiel M. L., *Nature* **227**, 239 (1970).
64. Quagliarotti G., Ritossa F. M., *J. Mol. Biol.* **36**, 57 (1968).
65. Reeder R. H., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **51**, 361 (1970).
66. Ritossa F. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 509 (1968).
67. Ritossa F. M., Atwood K. C., Spiegelman S., *Genetics* **54**, 819 (1966).
68. Ritossa F. M., Malva C., Boncinelli E., Graziani F., Polito L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1580 (1971).
69. Ritossa F. M., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 737 (1965).
70. Robberson D. L., Aloni Y., Attardi G., Davidson N., *J. Mol. Biol.* **60**, 473 (1971).
71. Ryan J. L., Morowitz H. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 1282 (1969).
72. Scherrer K., Darnell J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 451 (1962).
73. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 240 (1963).
74. Schildkraut C. L., Maio J. J., *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 76 (1968).
75. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **4**, 430 (1962).
76. Schweizer E., MacKechnie C., Halvorson H. Q., *J. Mol. Biol.* **40**, 261 (1969).
77. Scott N. S., *Proc. Austr. Biochem. Soc.* **43** (1969), cyt. wg 42.
78. Scott N. S., Smillie R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 598 (1967).
79. Sirlin J. L., *Internat. Rev. Cytol.* **15**, 35 (1963).

80. Smith I., Dubnau D., Morell P., Marmur J., *J. Mol. Biol.* **33**, 123 (1968).
81. Spirin A. S., Gavrilova L. P., w *The Ribosomes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, str. 56.
82. Stent G. S., Brenner S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 2005 (1961).
83. Stutz E., Rawson J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 16 (1970).
84. Tartof K. D., Perry R. P., *J. Mol. Biol.* **51**, 171 (1970).
85. Tewari K. K., Wildman S. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 569 (1968).
86. Tiollais P., Galibert F., Boiron M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1117 (1971).
87. Vasco C., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 188 (1969).
88. Vincent W. S., *Internat. Rev. Cytol.* **4**, 269 (1955).
89. Vincent W. S., Halvorson H. O., Chen H. R., Shin D., *Exptl. Cell Res.* **57**, 240 (1969).
90. Walker P. M. B., *Nature* **229**, 306 (1971).
91. Wallace H., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 296 (1966).
92. Weinberg R. A., Loening U., Willems M. W., Penman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1088 (1967).
93. Wensink P., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **60**, 235 (1971).
94. Wensink P. C., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **60**, 235 (1970).
95. Yankofsky S. A., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1069 (1962).
96. Yankofsky S. A., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 538 (1963).
97. Yu M. T., Vermeulen C. W., Atwood K. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 26 (1970).
98. Zellweger A., Ryser U., Brown R., *J. Mol. Biol.* **64**, 681 (1972).
99. Zylber E. A., Penman S., *Science* **172**, 947 (1971).

ALEKSANDRA WODNAR-FILIPOWICZ *, JADWIGA PASSENT **,
ANDRZEJ LEONOWICZ ***

Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy

I. Replikacja RNA

Bacterial RNA Viruses

I. RNA Replication

The review of present knowledge of phage RNA replication is given.

I. Wstęp

Pierwszy wirus bakteryjny, którego materiałem genetycznym jest kwas rybonukleinowy, wyizolowany został ze ścieków miejskich w Filadelfii w 1960 roku przez Loeba (96). W 1961 roku Loeb i Zinder (97) podali dokładną charakterystykę tego wirusa nazwanego bakteriofagiem f2. Prace ich zapoczątkowały serię badań podjętych przez liczne pracownice na świecie i do chwili obecnej wyizolowano i opisano około 50 wirusów bakteryjnych zawierających RNA.

Są to najmniejsze znane wirusy. Ich genom niesie ze sobą informację odpowiadającą mniej więcej połowie informacji genomu wirusa polio, 1% informacji zawartej w genomie DNA fagów T2 i T4 i 0,1% informacji niesionej przez genom bakterii *Escherichia coli*. Prosta budowa tych wirusów, ich krótki cykl życiowy, łatwość otrzymania dużej ilości oczyszczonych cząstek wirusowych oraz możliwość śledzenia zarówno procesów zachodzących po zakażeniu komórki bakteryjnej, jak i procesów zachodzących w układach bezkomórkowych sprawiły, że wirusy bakteryjne zawierające RNA stały się ogromnie popularnym obiektem badań genetycznych oraz modelem w pracach nad wyjaśnieniem kodu genetycznego, biosyntezy białka i kwasów nukleinowych.

Choć nie został jeszcze całkowicie poznany sam przebieg i charakter procesu infekcji komórki bakteryjnej przez wirusa oraz mechanizm organizowania się potomnych cząstek wirusowych, to ogromnie zaawansowane są obecnie badania nad biosyntezą specyficznego RNA i białek wiruso-

* Mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

*** Dr, Instytut Mikrobiologii i Biochemii, Uniwersytet im. Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

wych oraz nad towarzyszącymi tym procesom mechanizmami regulacyjnymi. Ostatnie lata przyniosły również postęp w badaniach zmierzających do ustalenia pierwszo- a nawet drugorzędowej struktury RNA i białek wirusa. Można więc z dużym prawdopodobieństwem powiedzieć, że małe wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy będą pierwszymi całkowicie poznanymi — w kategoriach biologii molekularnej — organizmami.

Materiałem genetycznym wirusów jest jednoniciowy kwas rybonukleinowy. Spełnia on dwojaką funkcję: służy zarówno jako matryca w procesie samopowieliania się, czyli syntezy potomnego wirusowego RNA, jak i jako messenger RNA w procesie syntezy białek wirusowych. Takie łączenie obydwu funkcji przez tę samą cząsteczkę kwasu rybonukleinowego oraz brak DNA w wirionie, to cechy stanowiące o specyfice małych wirusów bakteryjnych.

Na temat replikacji wirusów bakteryjnych zawierających RNA ukazało się szereg prac przeglądowych (39, 42, 91, 130, 152, 159). W artykule niniejszym przedstawiamy kompendium współczesnych poglądów dotyczących replikacji wirusowego RNA. Procesy związane z translacją RNA omówione są w artykule sąsiednim (49).

II. Ogólna charakterystyka małych wirusów bakteryjnych

Znane są trzy gatunki bakterii atakowane przez małe wirusy zawierające RNA; są to: pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*) (58, 97), pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) (17, 43) i *Caulobacter* (122). Najlepiej poznane są bakteriofagi *Escherichia coli*.

Pojedynczy wirus zbudowany jest z łańcucha RNA chronionego przez otoczkę białkową (164). Otoczką tą składa się ze 180 podjednostek tzw. białka kapsydu (35), zebranych w grupy po 5 lub 6 (162) oraz jednej cząsteczki tzw. białka dojrzewania, inaczej zwanego białkiem A (131). Według Valentine'a i wsp. (159) białko A pełni rolę zaworu zamykającego otoczkę wirusa. Zawór ten odpada z chwilą infekcji komórki bakteryjnej.

RNA stanowi około 30% masy wirusa, a otoczką białkową około 70%, w czym niewielki tylko udział ma białko A (36, 133). Średnica całej cząsteczki wirionu mieści się w granicach od 200Å do 270Å (67, 98). Stała sedimentacji tych wirusów wynosi 75—84S (107, 138), gęstość 1,42—1,47g/ml (107, 140), masa cząsteczkowa $3,6\text{--}4,5 \times 10^6$ daltonów (56, 107), punkt izoelektryczny 3,9—5,3 (107).

Podobieństwo budowy i własności fizyko-chemicznych wirusów zawierających RNA sprawiły, że podstawą ich klasyfikacji stały się testy serologiczne. Wyróżnia się 3—5 grup serologicznych bakteriofagów *E. coli* (61, 123, 140). Najczęstszym i najlepiej poznanym obiektem badań są wirusy należące według tej klasyfikacji do grupy I — są to bakteriofagi: f2,

MS2, R17, R23, M12, fr oraz należący do grupy II — bakteriofag Q β . Surowica zawierająca przeciwciała przeciwko np. wirusowi f2 nie inaktywuje faga Q β i na odwrót (108). Fagi z grupy I charakteryzują się nieco mniejszą masą cząsteczkową i stałą sedymentacji niż wirus Q β (patrz tablica 1). Fag Q β odbiega od fagów tej grupy również pod względem składu aminokwasowego białka kapsydu i składu nukleotydowego RNA (72, 75, 107). Natomiast poszczególne fagi tej grupy różnią się od siebie bardzo nieznacznie, często jednym aminokwasem w białku ich kapsydu (35, 90, 142) lub kilkoma nukleotydami RNA (56, 101, 133).

Tablica 1

Właściwości wirusów bakteryjnych zawierających kwas rybonukleinowy

Wirus	Masa cząsteczkowa $\times 10^6$	Stała sedymentacji $S_{20,w}$	Gęstość g/ml	Średnica Å	% RNA	Literatura
f2				200		97
MS2	3,6	79	1,422	260	31,5	107, 133
fr	4,1	79	1,46	200—220	28,4	98, 107
M12				270		67
R17	3,6	79			31,0	56
R23		75				138
Q β	4,2	84	1,44	240—250		107

W skład cząstki wirusa wchodzi jedna jednoniciowa cząsteczka RNA o strukturze liniowej, z wolnymi końcami 5' i 3' (134). Stała sedymentacji RNA w 0,2M chlorku sodu wynosi około 27 jednostek Svedberga (56), a masa cząsteczkowa około $1,1 \times 10^6$ daltonów (56, 101, 107, 133, 138). Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykazują, że długość RNA wynosi około 10 000Å (59) i dlatego, biorąc pod uwagę cały promień wirusa = 200—270Å, można przypuszczać istnienie silnie ukształtowanej struktury drugorzędowej RNA.

RNA wirusa składa się z 3300—3500 nukleotydów (56) i zawierać może informację dla polipeptydów o łącznej długości około 1100 aminokwasów. Obecnie wiadomo, że RNA wirusowe zawiera trzy cistrony i kieruje powstawaniem trzech specyficznych białek wirusowych (60, 70). Są to: dwa białka strukturalne — białko kapsydu i białko dojrzewania, oraz nie występująca w dojrzłym wirusie — polimeraza RNA.

Białko kapsydu jest przeważającym ilościowo, najwcześniej i najlepiej poznany składnikiem wirusa. Masa cząsteczkowa białka kapsydu oznaczona dla faga R17 wynosi 14 200 (35), a dla faga Q β — 15 500 (108). Składa się ono ze 129 aminokwasów o znanej sekwencji (86, 87, 142, 143). Białko dojrzewania występujące w niewielkiej ilości ma najprawdopodobniej zasadniczy udział w procesie infekcji komórki bakteryjnej, a być może także w procesie organizowania się potomnych fagów (119). Jego masa cząsteczkowa wynosi 35 000—45 000 daltonów (131), a skład aminokwasowy

oznaczony został w 1968 roku przez Steitz (132). W odróżnieniu od białka kapsydu, które nie zawiera histydyny, w skład białka A wchodzi 5 reszt histydynowych. Trzecie białko syntetyzowane na matrycy RNA fagowego ma ciężar cząsteczkowy = 65 000 (79, 84) i niezbędne jest dla replikacji RNA wirusa. Jest to polimeraza RNA.

Replikacja RNA wirusa następuje we wnętrzu komórki bakteryjnej i jest następstwem infekcji komórki wirusem.

III. Infekcja

Infekcja wirusem komórki bakteryjnej polega na wprowadzeniu materiału genetycznego wirusa do komórki. W przypadku wirusów bakteryjnych zawierających RNA proces ten można podzielić na trzy etapy: 1. adsorpcja, 2. uwolnienie RNA, 3. penetracja RNA.

1. Adsorpcja

Opisywane bakteriofagi RNA zakażają wyłącznie męskie szczepy *Escherichia coli*, tzn. takie, które w procesie koniugacji są donorami materiału genetycznego. Bakterie takie zawierają episom, będący nośnikiem czynnika płciowego F (ang. *fertility* — płodność). Fenotypowym objawem obecności fatora F w anatomii komórki są tzw. pili F. Są to włókienkowate wypustki ściany komórki bakteryjnej o średnicy 85Å (18) i długości do 2 mikronów (159). Każda komórka męska *E. coli* posiada jeden lub dwa takie pili (19). Nawet oddzielone od komórki lub pofragmentowane pili F adsorbują cząsteczki bakteriofagów na swojej powierzchni (158). Z drugiej strony, komórki męskie pozbawione pili F (np. wskutek wytrząsania) nie są zakażane bakteriofagiem (160).

Adsorpcja wirusa na powierzchni pili F jest procesem specyficznym. Ani defektywne cząstki fagowe, ani inne rodzaje wirusów nie przyłączają się do pili F (158). Jest to proces odwracalny, po adsorpcji wirusa na powierzchni fragmentów pili F można odzyskać infekcyjne cząstki (18).

Proces ten w niewielkim stopniu zależy od temperatury. Adsorpcja jest tylko dwukrotnie mniejsza w temperaturze 0° niż w 37°. Natomiast infekcja, czyli wprowadzenie RNA fagowego do wnętrza komórki, zachodzi jedynie w temp. powyżej 34° (18).

Gdy po adsorpcji wirusa na powierzchni pili F odwirowano komórki z zaadsorbowanym fagiem, w supernatancie znaleziono duże ilości pustych kapsydów wirusa oraz nie połączone z nimi białko dojrzewania (132). Przypuszcza się, że wirus przyczepia się do pili F miejscem, gdzie otoczka wirusa zamknięta jest białkiem dojrzewania. Białko dojrzewania odpada, pozwalając na uwolnienie kwasu rybonukleinowego (119).

Jak ważną dla infekcyjności wirusa RNA jest obecność białka dojrzewania w jego cząsteczce, wskazują doświadczenia mające na celu rekonstrukcję cząstek faga *in vitro*. Gdy zmieszano białko kapsydu faga fr lub MS2 z homologicznym RNA fagowym, otrzymano cząsteczki przypominające normalnego wirusa z punktu widzenia własności fizyko-chemicznych (68, 136), lecz infekcyjność takiego preparatu była bardzo niska. Dopiero dodatek białka dojrzewania do mieszaniny inkubacyjnej powodował gwałtowny wzrost infekcyjności (119).

Loeb i Zinder (97) stwierdzili, że każdy preparat fagów RNA wysoce oczyszczony na drodze wirowania w gradiencie gęstości, zawiera 80—95% nieinfekcyjnych cząstek. Cząstki takie są jednorodnie z punktu widzenia wielkości i gęstości. Różnią się natomiast zdolnością adsorpcji na pili F. Paranchych i wsp. (115) wykazali, że 50% cząstek faga w takim preparacie nie jest w stanie zaadsorbować się na pili F. Pozostałe 50% przyłącza się do pili F, ale tylko 1/5 tej ilości uwalnia swoje RNA do wnętrza komórki bakteryjnej.

2. Uwolnienie RNA

Jest to etap wymagający dostarczenia energii, nie zachodzi w temp. 0° i nie wymaga obecności jonów dwuwartościowych (113). Po adsorpcji faga na pili F następuje uwolnienie RNA z otoczki białkowej, przez co staje się on dostępny dla RNazy. Dzięki temu, inkubując męskie komórki *E. coli* z bakteriofagiem f2 w obecności rybonukleazy z trzustki obserwuje się obniżenie infekcyjności mieszaniny, a także nikiłe zakażenie *E. coli* bakteriofagiem (97).

3. Penetracja RNA

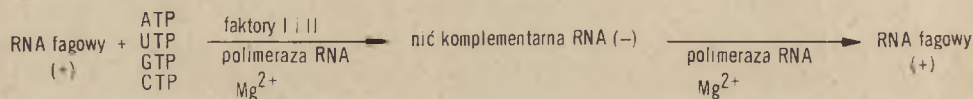
Etap ten wymaga obecności jonów dwuwartościowych (magnez, wapń, stront, bar), w stężeniu ponad 0,7 mM (113). Brak tych jonów lub dodanie wersenianu powoduje gromadzenie się wrażliwego na RNazę kwasu rybonukleinowego faga na zewnątrz komórki bakteryjnej (125).

RNA wnika do komórki bakteryjnej swoim końcem 3' (103). Nie wiadomo, ile cząsteczek RNA fagowego może się znaleźć wewnątrz komórki gospodarza. Na powierzchni jednej pili F może być zaadsorbowanych nawet kilkaset wirionów (114), jednakże obliczenia oparte na aktywności właściwej faga (PFU/imp/min) wskazują, że do jednej komórki penetruje jedna cząsteczka RNA fagowego (18). W niektórych przypadkach ilość penetrujących cząsteczek RNA fagowego musi być większa niż 1, ponieważ wykazano komplementację *in vivo* między mutantami amber faga f2 (157).

IV. Replikacja RNA

RNA wirusowy, który wnika do komórki bakteryjnej, czyli RNA infekcyjny, został symbolicznie oznaczony jako nić „plus”. Proces jego replikacji prowadzący do utworzenia potomnego RNA, obejmuje dwa etapy (10, 146, 147, 150) (schemat 1):

- 1) utworzenie na matrycy kwasu rybonukleinowego nici komplementarnej do niego, określanej jako nić „minus”,
- 2) utworzenie nici „plus” RNA potomnego na matrycy nici komplementarnej „minus”.



Schemat 1. Replikacja RNA wirusowego podana przez Augusta i wsp. (4) dla RNA faga Q β

Oba etapy prowadzące do utworzenia potomnego RNA katalizowane są przez enzym, polimerazę RNA, zwany również replikazą lub syntetazą.

1. Polimeraza RNA

Enzym ten syntetyzowany jest na matrycy wirusowego RNA po zakażeniu komórki wirusem. Izolowanie enzymu jest utrudnione ze względu na obecność w komórce różnych enzymów, które dołączają rybonukleotydy do istniejącego łańcucha RNA (126), a także innych enzymów, które biorą udział w syntezie RNA (fosforylaza RNA, syntetaza poliadenylowa itd.). Cechą szczególną polimerazy fagowego RNA jest jej wysoka specyficzność względem matrycy, co pozwala odróżnić ją od enzymów komórkowych.

W 1963 roku trzy pracownice niezależnie doniosły o wykryciu enzymu, indukowanego w komórce bakteryjnej przez faga zawierającego RNA. Preparaty enzymatyczne różniły się jednak między sobą.

A. Weissmann i wsp. (154) z komórek *E. coli* Hfr 3000 zakażonych fagiem MS2 wyizolowali enzym, który nazwali syntetazą RNA. Preparat oczyszczono około 20-krotnie. Dodatek RNA fagowego lub innego nie wzmagał aktywności enzymu, ponieważ preparat zawierał endogenną matrycę. Dowodem tego była utrata aktywności enzymu po potraktowaniu preparatu rybonukleazą. Syntetaza RNA produkowała *in vitro* dwuniciowy kwas rybonukleinowy, którego jedno pasmo składało się w 90% z nici „plus” RNA faga, a drugie — w 80% z nici „minus”.

B. August i wsp. (6) wyizolowali enzym (polimeraza RNA zależna od RNA) z niepermissywnego szczepu *E. coli* K38 zakażonego mutantem

amber faga f2 (sus 11) (6). Szczep taki nie wytwarza dojrzałych cząstek fagowych, ale aktywność polimerazy w zakażonych komórkach i ilość wytworzonego RNA fagowego jest 5—10 razy większa niż w przypadku dzikiego szczepu faga. Enzym oczyszczono 100-krotnie. W przeciwieństwie do preparatu opisywanego przez Weissmanna i wsp. (154) wymagał on dodatku RNA z zewnątrz. Specyficzność jego wobec matrycy była niska — dodatek RNA faga f2, wirusa mozaiki tytoniowej, RNA rybosomalnego lub rozpuszczalnego miał taki sam wpływ na aktywność enzymu. Sekwencja nukleotydoma produktu zależała od RNA użytego jako matrycy.

C. W pracowni Spiegelmana (62) wyizolowano enzym z komórek *E. coli* zakażonych fagiem MS2. Preparat, nazwany replikazą RNA, wymagał jako matrycy RNA faga MS2. Dodanie innych naturalnych kwasów rybonukleinowych nie wpływało na aktywność enzymu. Podobnie było z replikazą RNA, wyizolowaną przez ten sam zespół badaczy z komórek *E. coli* zakażonych fagiem Q β (63). Preparat ten wykazywał dużą specyficzność wobec matrycy oraz wysoką aktywność syntetyczną w układzie *in vitro*. Produkt otrzymany *in vitro* był infekcyjny wobec sferoplastów *E. coli* (127).

Lodish i Zinder (93, 95), opierając się na badaniach nad syntezą RNA *in vivo* u wrażliwych na temperaturę mutantów faga f2, przypuszczali, że w procesie replikacji RNA fagowego biorą udział dwie różne polimerazy: jedna specyficzna w stosunku do nici „plus”, druga do komplementarnej nici „minus”. Prace innych autorów nie potwierdziły jednak tej możliwości.

Nietrwałość opisanych wyżej preparatów nie pozwala na dokładniejsze zbadanie struktury enzymu. Dopiero preparaty otrzymane z komórek zakażonych fagiem Q β zachowywały aktywność podczas wielomiesięcznego przechowywania w niskich temperaturach, co umożliwiło dalszy postęp prac nad właściwościami i strukturą enzymu. Oczyszczony około 5 000 razy enzym wykazywał w czasie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym ruchliwość odpowiadającą ciężarowi cząsteczkowemu 150 000 daltów (37).

Wysoka wartość ciężaru cząsteczkowego enzymu wzbudzała pewne wątpliwości. Przypuszczano, że cząsteczka enzymu składa się z podjednostek, ponieważ genom faga nie może kodować polipeptydu, którego ciężar cząsteczkowy znacznie przekracza 60 000, jeżeli uwzględni się ciężary cząsteczkowe pozostałych dwóch białek faga. Pod koniec 1970 roku Kondoi i wsp. (84) zbadali preparat replikazy Q β oczyszczony około 7 000 razy i stwierdzili, że enzym składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych, z których tylko jeden, o ciężarze 69 000, kodowany jest przez genom faga. Czynny enzym dysocjowano siarczanem dodecyłu w obecności merkaptetanolu i analizowano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym. Otrzymano cztery prążki, z których tylko prążek β ulegał znakowaniu po zakażeniu komórek *E. coli* bakteriofagiem. Równolegle identyczne wyniki

uzyskał Kamen (79). Pozostałe trzy podjednostki, które pochodzą z organizmu gospodarza, mają ciężar cząsteczkowy 75 000, 45 000, 35 000. Dwie mniejsze podjednostki stymulują w bakteryjnym układzie *in vitro* syntezę rybosomalnego RNA. Nie są one częściami składowymi bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA, lecz stanowią tzw. faktor Ψ , opisany przez Traversa i wsp. (137). Wyjaśnia to do pewnego stopnia dlaczego infekcja fagiem hamuje syntezę rybosomalnego RNA gospodarza. Można przypuszczać, że układ replikujący RNA fagowy i układ syntetyzujący RNA komórkowy współzawodniczą o faktor Ψ . Ostatnio ukazały się prace donoszące o próbach izolowania podjednostki polimerazy RNA kodowanej przez genom faga z hodowli zakażonych fagami f2 (44) i R17 (73).

Wirusowa polimeraza RNA jest enzymem wysoce specyficznym. Najlepszymi matrycami dla polimerazy RNA faga Q β jest jego własna nić RNA (2, 63) oraz komplementarna do niego nić „minus” (2, 45). Matrycami mogą być również: RNA opisany przez Millsa i wsp. (100) jako „wariant” Q β RNA (jest to cząsteczka RNA o stałej sedymentacji 12S, nieinfekcyjna, o zredukowanym o 83% genomie), oraz RNA o stałej sedymentacji 6S (mała cząsteczka składająca się z około 130 nukleotydów) wyizolowany przez Banerjee i wsp. (9) z zakażonych fagiem Q β komórek *E. coli*. Syntetyczny poli C oraz kopolimery rybonukleinowe, zawierające w swym składzie kwas cytydylowy, mogą być również wykorzystywane przez ten enzym jako matryce do syntezy nici komplementarnej (32, 69). Polimeraza RNA faga Q β nie jest natomiast aktywna w stosunku do RNA innych fagów (63). Specyficzność enzymu może być nawet podstawą do klasyfikacji wirusów zawierających RNA i podział taki zaproponowali Miyake i wsp. (102).

2. Replikacja RNA *in vivo*

Od momentu zakażenia komórki bakteryjnej wirusem RNA, następuje szereg procesów, prowadzących do namnożenia się cząstek wirusa. Cały proces trwa kilkadziesiąt minut, po upływie których zachodzi zazwyczaj liza komórki bakteryjnej i uwalniają się potomne cząstki wirusa (57).

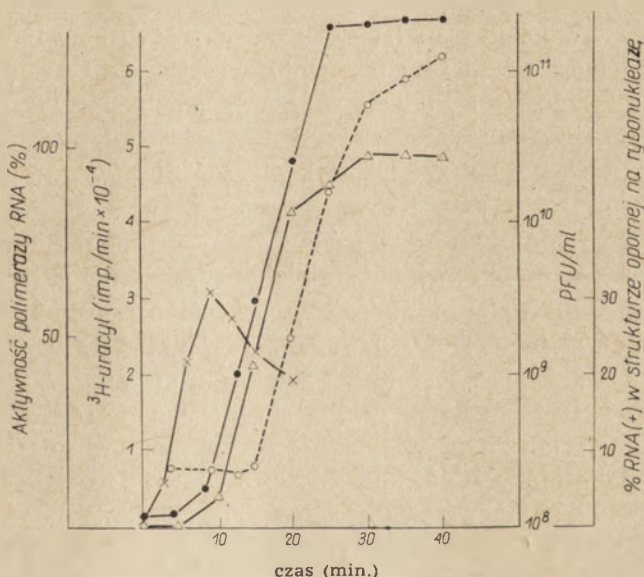
Zakażenie wywiera różny wpływ na metabolizm komórki bakteryjnej w zależności od rodzaju atakującego ją wirusa. Różnice te są znaczne nawet w odniesieniu do bardzo zbliżonych do siebie fagów z grupy f2. Zinder (164) stwierdził, że po infekcji komórek *E. coli* fagiem f2, jedynie 5—10% całkowitej ilości RNA, powstającego w komórce, jest RNA fagowym, pozostała ilość to RNA rybosomalny i mRNA *E. coli*. Ellis i Paranchych (34) stwierdzili, że w ciągu 15 minut po infekcji komórek *E. coli* fagiem R17 synteza rybosomalnego RNA jest zahamowana w 80%. Watanabe i wsp. (141) podają, że około 25% RNA syntetyzującego się w komórce po infekcji fagiem Q β jest RNA fagowym, natomiast zakażenie fagiem R23 powoduje znaczniejsze zahamowanie meta-

bolizmu komórki bakteryjnej: 60—70% nowopowstającego RNA jest w tym przypadku włączane do fagów potomnych.

Cramer i Sinsheimer (22) wyróżniają w procesie replikacji RNA *in vivo* dwa etapy: wczesny, trwający do 10 minut i późny rozpoczynający się od około 20 minuty. We wczesnym etapie w ciągu pierwszych kilku minut po infekcji, RNA wirusowy służy jako matryca dla syntezy specyficznej wirusowej polimerazy RNA (3, 62, 153, 154). Już 3 minuty po zakażeniu przeważająca ilość RNA faga R17 odnajdywana jest w kompleksie z polimerazą, jako rybonukleoproteidowa cząstka o stałej sedymentacji 40S (22, 71). Podobne, wcześniej powstające kompleksy polimerazy RNA opisano dla RNA fagów MS2 (153) i Q β (46).

W warunkach lizy przeprowadzonej przy 1mM stężeniu jonów magnezu Cramer i Sinsheimer (22) odnaleźli około 30% RNA w kompleksie z mniejszą podjednostką rybosomalną (30S), który podobnie jak kompleks z polimerazą RNA sedymentuje jako 40S. Także inni autorzy odnajdują, we wczesnym okresie po infekcji, RNA wirusowy w kompleksach z rybosomami i polisomami bakteryjnymi (41, 57, 58).

Kilka minut po infekcji coraz większa ilość RNA wirusa, który wniknął do bakterii, jest odnajdywana w strukturach dwuniciowych (41, 80, 95,



Rys. 1. Kinetyka syntezy RNA, polimerazy RNA i potomnych fagów w zainfekowanej komórce bakteryjnej (według Cramera i Sinsheimera (22))

- x-x-x ilość ojcowskiego RNA w strukturze odpornej na działanie rybonukleazy
- o-o-o ilość potomnego RNA wirusowego (znakowanego $^3\text{H-uracylem}$)
- $\Delta-\Delta-\Delta$ aktywność wirusowej polimerazy RNA (% aktywności maksymalnej)
- o-o-o ilość potomnego wewnątrz- i pozakomórkowego faga w PFU/ml

146), powstałych z połączenia się nici „plus” z nowopowstałą nicią komplementarną „minus” (11). Nici komplementarne tworzą się między 5-tą a 8-mą minutą po infekcji jako jedyny powstający w tym czasie RNA (10, 104). Powstawanie dwuniciowych struktur śledzi się badając oporność RNA na działanie rybonukleazy. Po około 10 minutach ilość ojcowskiego RNA odnajdywana w dwuniciowej formie, odpornej na działanie enzymu, osiąga swoje maksimum (22, 91) (rysunek 1). W miarę upływu czasu około połowa tego RNA jest uwalniana ze struktury dwuniciowej (22, 41, 146). Większość dwuniciowego RNA znajduje się w komórce w połączeniu z polisomami (58, 71). Według *Godsona* (57) jednoniciowy RNA odnajdywany jest w krótkich polisomach (2—5 rybosomów), a RNA dwuniciowy w polisomach dłuższych. Według niego rybosomy wpełzają na tworzący się RNA potomny, zanim jeszcze synteza jego zostanie ukończona; tak więc synteza białek wirusowych rozpoczyna się na powstającym, nieukończonym RNA.

Między 10 a 20 minutą po infekcji następuje w komórce bardzo gwałtowny wzrost ilości wirusowej polimerazy RNA; po 20—30 minutach synteza enzymu ustaje niemal całkowicie (rysunek 1). Zahamowanie produkcji polimerazy tłumaczyć można nagromadzeniem się w komórce nowopowstałego białka kapsydu, które jest specyficznym inhibitorem syntezy polimerazy fagowej (31). Białko kapsydu syntetyzuje się na kilka minut przed pojawieniem się dojrzałego faga (106, 163). Opierając się na kolejności pojawiania się specyficznych białek wirusowych *Watanabe* i wsp. (141) oraz *Oeschger* i *Nathans* (106) określają polimerazę jako białko „wczesne”, a białko kapsydu jako białko „późne”. W tym samym czasie, gdy obserwuje się gwałtowny wzrost aktywności polimerazy RNA, następuje synteza RNA potomnego (22, 24), którego ilość po 20 minutach przewyższa już około 10-krotnie ilość nici komplementarnej „minus” (10).

Lodish i wsp. (92) oraz *Horiuchi* i wsp. (70) tłumaczą wspomnianą wyżej kolejność pojawiania się białek tym, że nic RNA wnikającego do komórki kieruje syntezą polimerazy, a nici potomne RNA — syntezą białka kapsydu. Natomiast *Oeschger* i *Nathans* (106) donoszą, że synteza potomnego RNA jest niezbędna dla normalnej syntezy zarówno polimerazy, jak i białka kapsydu. Podobnie *Watanabe* i wsp. (141) podają, że przynajmniej niewielka ilość RNA potomnego jest potrzebna dla syntezy polimerazy RNA faga R23. Potwierdza to *Kaerner* (77) w przypadku komórek zakażonych fagiem fr.

Synteza RNA potomnego oraz białek wirusowych bezpośrednio poprzedza kolejny etap, jakim jest powstawanie dojrzałego bakteriofaga. Etap ten, przez *Cramera* i *Sinsheimera* (22) zwany „późnym”, rozpoczyna się około 20 minut po infekcji, co jest zgodne z obserwacjami większości autorów (51, 57, 146). *Cramer* i *Sinsheimer* (22) obserwują pojawianie się w tym czasie cząstek rybonukleoproteidowych o stałej sedymentacji 45S, które według nich są prekursorami dojrzałego

wirusa i składają się z RNA fagowego, białka dojrzwania i białka kapsydu. Godson (57) także stwierdza istnienie prekursorów dojrzałego faga, ale składających się jedynie z RNA i 1 lub 2 podjednostek białka kapsydu, nie zawierających białka dojrzwania.

RNA wirusa, który zakaził komórkę nie jest wbudowywany do potomnych cząstek (25, 30). Także nić komplementarna „minus” nie jest nigdy odnajdywana w strukturze dojrzałych wirusów (91).

3. Replikacja RNA *in vitro*

Badania nad replikacją RNA fagowego zostały ogromnie ułatwione przez prowadzenie doświadczeń w układach bezkomórkowych i wydaje się, że procesy obserwowane *in vitro* dobrze odzwierciedlają przemiany zachodzące w żywej komórce bakteryjnej. RNA powstały w wyniku replikacji *in vitro* jest infekcyjny (112, 127).

A. *Przyłączanie RNA do polimerazy RNA*. Jest to pierwsza reakcja procesu replikacji RNA (2). Kompleks enzym-RNA wykryto zarówno drogą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy jak i sączenia przez sączki miliporowe (2). Połączenie enzymu z RNA nie wymaga obecności trójfosfonukleotydów, jonów magnezu, ani czynników (schemat 1). Stała asocjacji tego kompleksu wynosi 10^{-8} l/mol. Badania nad wysyceniem enzymu substratem wskazują, że każda cząsteczka enzymu przyłącza jedną cząsteczkę RNA (2), a nadmiar RNA w stosunku do polimerazy (powyżej stosunku molowego = 1,5) powoduje zahamowanie reakcji katalizowanej przez enzym (85). Reakcja ta jest specyficzna w stosunku do matrycy. Badania nad powinowactwem enzymu faga Q β do innych RNA fagowych i RNA *E. coli* wykazują, że jest ono średnio 10 razy mniejsze od powinowactwa do naturalnej matrycy (2). Przypuszcza się, że enzym specyficznie reaguje z określonym miejscem RNA Q β , prawdopodobnie w pobliżu jego końca 3' OH (2, 23). Rozpoznawanie matrycy opierać się musi na czymś więcej, niż na powinowactwie enzymu do struktury pierwszorzędowej określonego obszaru RNA — odgrywać tu musi rolę także struktura drugorzędowa. Wiadomo, że RNA służący jako matryca musi być niezdegradowany, gdyż fragmenty RNA faga Q β nie mają właściwości matrycy (64).

Połączenie enzym-RNA jest odwracalne, jednak w momencie rozpoczęcia syntezy nici komplementarnej, enzym jest przyłączony nieodwracalnie do replikującej struktury (2).

B. *Niść komplementarna*. Niść komplementarna „minus” jest pierwszym produktem reakcji polimerazy z RNA fagowym (46) i wykrywana jest przed pojawieniem się RNA potomnego (26, 46, 149). Synteza jej połączona jest z zanikiem infekcyjności nici „plus” RNA wirusa (99) oraz pojawie-

niem się dwuniciowej struktury, odpornej na działanie rybonukleazy. Strukturę taką wyizolowano po odbiałczeniu mieszaniny reakcyjnej fenolem (46, 105, 146, 147, 149). Nić komplementarna jest nieinfekcyjna (45).

Synteza nici komplementarnej na matrycy RNA fagowego z udziałem polimerazy RNA wymaga obecności trójfosfonukleotydów, jonów Mg^{2+} (7) oraz dwóch wielkocząsteczkowych czynników (schemat 1) opisanych początkowo jako frakcja czynnikowa (7, 32, 33, 55, 65). Zostały one wyizolowane i oczyszczone przez Shapiro i wsp. (124) podczas wyodrębniania polimerazy RNA faga Q β . Nie biorą one udziału w reakcjach, w których jako matryce służą: nici komplementarne „minus” RNA Q β (2, 55), a także RNA o stałej sedymentacji 6S (9) oraz syntetyczne polimery zawierające kwas cytydylowy (69). Obecność czynników nie wpływa na kinetykę powstawania kompleksu enzym-substrat, ale brak ich zahamowuje syntezę RNA wirusa (2). Oba te czynniki obecne są w komórce gospodarza przed infekcją wirusem (55, 124).

Z hodowli *E. coli* (szczep Q 13) wyizolowano dwa takie czynniki (124): czynnik I — odporny na grzanie i działanie enzymów proteolitycznych ma stałą sedymentacji 3S i ciężar cząsteczkowy 12—13 tys. daltonów oraz gęstość pozorną charakterystyczną dla białek.

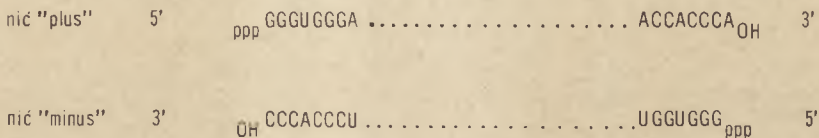
Czynnik II — wrażliwy na temperaturę i działanie pepsyny, ma stałą sedymentacji 1,5S.

Rozpoczęcie syntezy nici komplementarnej śledzić można badając inkorporację GTP do materiału nierozpuszczalnego w zimnym kwasie trójchlorooctowym. Stwierdzono, że wszystkie cząsteczki RNA fagowego, to znaczy zarówno nić „plus” RNA fagów: Q β (7, 8, 14), f2 (23, 120), R17 (121), R23 (139), MS2 (28), jak i nici komplementarne „minus” faga Q β (8, 14), „warianty” RNA (13) i RNA Q β 6S (9, 76) posiadają trójfosfoguanozynę (pppG) na swoim końcu 5'. Kierunek narastania łańcucha nici komplementarnej jest od 5' do 3', czyli z rosnącym końcem 3' (2, 8, 14, 48, 161) (schemat 2). Przyjmując antyrównoległą orientację łańcucha nici komplementarnej do RNA „plus”, służącego jako matryca (14, 88), należy spodziewać się cytydyny na końcu 3' nici „plus” RNA. Tymczasem w 1965 roku Sugiyama (135) wykazała, że na końcu 3' RNA faga MS2 znajduje się adenozyne, a przedostatnim jest nukleotyd pirymidynowy. Taki sam rezultat uzyskali Lee i Gilham (89) w badaniach nad kwasem rybonukleinowym faga f2, a Weith i wsp. (155) nad RNA faga Q β . W 1967 roku De Wachter i Fiers (27) oznaczyli sekwencję kilkunastu nukleotydów końca 3' RNA faga MS2 wykazując, że końcową trójką nukleotydową jest CCA_{OH}. Identyczną sekwencję końca 3' mają kwasy rybonukleinowe fagów f2 (156), R17 (23) i Q β (23).

Jeśli więc 5'-końcowym nukleotydem nici komplementarnej jest nie trójfosforydina, która parowałaby się normalnie z adenozyne na końcu 3', ale trójfosfoguanozyna, która jest komplementarna do przedostatniego

nukleotydu na końcu 3', to świadczy to o tym, że synteza nici komplementarnej rozpoczyna się z pominięciem adenozyiny na końcu 3' nici „plus”.

Istnienie takiego mechanizmu potwierdzili Rensing i August (118) w badaniach nad wpływem chemicznych modyfikacji końca 3' OH na własności RNA faga Q β . Z badań tych wynika, że utlenienie adenozyiny na końcu 3' kwasem nadjodowym, lub usunięcie jej za pomocą aniliny, nie



Schemat 2. Sekwencje nukleotydowe końców 3' i 5' nici „plus” i komplementarnej nici „minus” RNA faga R17 (wg Cory i wsp. (21))
Strzałką oznaczony jest kierunek narastania łańcucha nici „minus”

znoszą ani aktywności matrycowej, ani infekcyjności RNA. Wskazuje to zatem, że albo RNA może być po tych modyfikacjach reperowany w warunkach trwania reakcji z polimerazą RNA, albo że enzym nie wymaga

Tablica 2

Wpływ chemicznych modyfikacji końca 3'_{OH} RNA faga Q β na właściwości RNA (wg Rensinga i Augusta (118))

Odczynnik	Koniec 3' _{OH} po modyfikacji	Aktywność RNA jako matrycy (%)	Infekcyjność RNA (%)
—	—C—C—C—A _{OH}	100	100
Nadjodan	—C—C—C—A=O	82	68
Nadjodan, anilina	—C—C—C—	82	14
Nadjodan, anilina, fosfataza	—C—C—C _{OH}	85	107
Nadjodan, anilina, fosfataza nadjodan, anilina	—C—C—	25	6
Nadjodan, anilina, fosfataza, nadjodan, anilina, fosfataza	—C—C _{OH}	33	39

obecności końcowej adenozyiny. Interesujące jest, że jeśli usunąć tę adenozyinę z pozostawieniem reszty fosforanowej na rybozbie cytydyny poprzedzającej adenozyinę, to infekcyjność takiego RNA znacznie spada, podczas gdy jego matrycowa aktywność obniża się w mniejszym stopniu; świadczy to o roli 3' końcowej grupy -OH w jakimś innym procesie niż replikacja RNA, być może przy penetracji komórki bakteryjnej. Można stwierdzić, że wszelkie modyfikacje końca 3' odbijają się silniej na infekcyjności

RNA niż na jego aktywności jako matrycy w procesie replikacji (tablica 2). Obie te aktywności zostają jednak utracone, gdy usunięta zostanie przedostatnia cytydyna. Potwierdził to również K a m e n (78) w badaniach nad RNA faga R17.

August i wsp. (4, 5) wysunęli hipotezę, że rola faktorów I i II, które są niezbędne w procesie tworzenia nici komplementarnej „minus” na matrycy infekcyjnej nici „plus” polega na regulowaniu inicjacji tego procesu. Jeśli RNA po preinkubacji z faktorem I wyizoluje się z mieszaniny reakcyjnej i bada jego właściwości matrycowe, to okazuje się, że dla syntezy nici „minus” niezbędne jest dodanie nie tylko fatora II, ale ponownie fatora I. Jeśli jednak podobnie postąpi się z faktorem II, to preinkubowany RNA wymaga już tylko dodatku fatora I. Wydaje się więc, że faktor I jest niezbędny dla samego przebiegu reakcji, zaś faktor II powoduje jakąś trwałą modyfikację w strukturze RNA. August i wsp. postulują, że modyfikacja ta dotyczy końca 3'_{OH} RNA i być może polega na usunięciu końcowej adenozyiny.

C. Forma replikacyjna i pośrednia forma replikacyjna. Powstająca na matrycy nici „plus” nić komplementarna „minus” łączy się z matrycą wiązaniami wodorowymi (88). W ten sposób powstaje dwuniciowa struktura zwana „formą replikacyjną” (ang. *replicative form*, RF) (51, 52). Powstawanie dwuniciowych struktur RNA stwierdzono zarówno w warunkach replikacji RNA *in vivo* (1, 41, 51, 52, 80, 95, 146) jak i *in vitro* (99, 110, 111, 144, 145, 146, 149). W zakażonej komórce bakteryjnej wykrywa się je przed pojawieniem się RNA potomnego (47, 51). Podobne rezultaty uzyskano w warunkach *in vitro* (99, 110, 149). Dwuniciowy RNA jest nieinfekcyjny (110, 161) i odporny na działanie rybonukleazy (1, 11, 38, 40, 47, 80, 99, 145). Po denaturacji cieplnej można go rozdzielić na nić komplementarną „minus” oraz infekcyjną nić „plus” (1, 40, 45, 52, 99). Obie nici otrzymane po denaturacji są wrażliwe na działanie rybonukleazy (1).

Fracjonowanie na żelu poliakrylamidowym otrzymanych *in vitro*, odpornych na działanie rybonukleazy struktur RNA wykazało istnienie frakcji szybciej migrującej — odpowiadającej formie replikacyjnej (RF) oraz frakcji przesuwałcej się wolniej (12, 109, 128), określonej jako pośrednia forma replikacyjna (ang. *replicative intermediate*, RI). Pośrednie formy replikacyjne opisał po raz pierwszy F r a n k l i n (54). Ukazują się one w późniejszym okresie replikacji RNA, poprzedzane przez formy replikacyjne, co wykazano zarówno w reakcji *in vivo* (82), jak i *in vitro* (12, 110).

Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykazują, że pośrednie formy replikacyjne zbudowane są z dwuniciowego rdzenia (którym jest forma replikacyjna RNA) i przyczepionych do niego jednoniciowych łańcuchów RNA (59). Taką budowę RI potwierdziły badania nad jej opornością na działanie rybonukleazy (40, 54). Jest ona częściowo podatna na działanie

enzymu, a w wyniku trawienia uzyskuje się całkowicie oporną na działanie enzymu frakcję o stałej sedymentacji 14S oraz jednoniciowe, niekompletne łańcuchy RNA potomnego. Stała sedymentacji 14S jest charakterystyczna dla formy replikacyjnej (95, 149). Pośrednie formy replikacyjne sedymentują szybciej; ich stałe sedymentacji wg różnych autorów wynoszą: 16—20S (38), 17—31S (40) a nawet do 40S (161).

Heterogenność frakcji RI ma swoje uzasadnienie. Wykazano, że im większą stałą sedymentacji ma pośrednia forma replikacyjna, tym mniejsza jest jej oporność na działanie rybonukleazy (40) (tablica 3). Im dłuższy jest fragment, lub im więcej jest fragmentów RNA potomnego, przyczepionego do dwuniciowego RNA, tym większa jest stała sedymentacji pośredniej formy replikacyjnej. Granboulan i Franklin (59) wykazali, że na jedną cząsteczkę RI przypada jedna nieukończona nić RNA potomnego. Fiers i wsp. (48) twierdzą natomiast, że łańcuchów tych może być kilka i obliczyli, że przeciętna wartość stałej sedymentacji takich nieukończonych odcinków RNA potomnego wynosi 2,5S. Według Vandenberghe'a i wsp. (161) ilość rosnących łańcuchów RNA na jednej cząsteczce RI wynosi około 2,5.

Tablica 3

Oporność na działanie rybonukleazy specyficznych fagowych struktur RNA (wg Eriksona i wsp. (40))

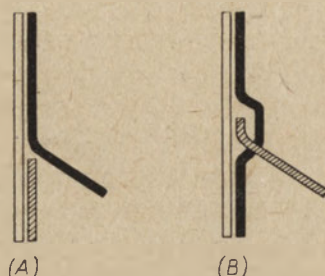
RNA	Stała sedymentacji $S_{20,w}$	% oporności na rybonukleazę
Jednoniciowy RNA fagowy	27	< 1
Forma replikacyjna	14	> 95
Pośrednie formy replikacyjne	17	72
	23	57
	31	43

Wielu autorów dyskutowało problem mechanizmu powstawania RNA potomnego. Jeśli byłby to mechanizm konserwatywny, to podczas syntezy RNA potomnego RNA matrycowy „plus” pozostawałby przez cały czas w dupleksie z nicią „minus”. W przypadku replikacji semikonserwatywnej nowopowstający RNA potomny wchodziłby w kompleks z nicią komplementarną wypierając z niego starą nić „plus” (rysunek 2).

Zdaniem większości autorów replikacja RNA wirusowego jest procesem semikonserwatywnym (47, 81, 94, 95, 105, 146), jednakże Kelly i Sinsheimer (83) badając oporność na rybonukleazę ojcowskich i rosnących potomnych łańcuchów RNA faga MS2 stwierdzili, że zarówno jedne jak i drugie mogą być z równym prawdopodobieństwem uwalniane z pośredniej formy replikacyjnej (RI), czyli że równie dobrze występować może mechanizm replikacji konserwatywnej, co semikonser-

watywnej. Billeter i wsp. (10) badając replikację *in vivo* RNA faga MS2 stwierdzają równoczesne występowanie obu mechanizmów.

W celu wyjaśnienia tego problemu interesujące doświadczenia wykonali Francke i Hofschneider (53). Wiadomo, że nić komplementarna, wchodząca w skład zarówno RF jak i RI, nie jest infekcyjna (74, 116). Potomne nici „plus” w trakcie syntezy na dwuniciowym RNA są także nieinfekcyjne, gdyż są jeszcze nieukończone. Zatem jedyną infekcyjną nicią pośredniej formy replikacyjnej jest pierwotna nić „plus”.



Rys. 2. Schemat semikonserwatywnego i konserwatywnego mechanizmu replikacji RNA wirusowego według Francke i Hofschneidera (53)
 ■ — nić „plus” RNA, □ — komplementarna nić „minus” RNA, ▨ — potomna nić „plus” RNA
 (A) — semikonserwatywny, (B) — konserwatywny mechanizm replikacji

Infekcyjność nici „plus” może być utracona pod wpływem formaldehydu (129), reagującego z grupami aminowymi niesparowanych zasad RNA (50). Bishop i Koch (15) wykazali, że dwuniciowa struktura infekcyjnego RNA z nicią „minus” zabezpiecza go w reakcji z formaldehydem przed utratą infekcyjności. Jeśli więc replikacja RNA odbywać się będzie według mechanizmu semikonserwatywnego, to uwalniany z kompleksu RNA „plus” tracić będzie swą infekcyjność pod wpływem formaldehydu. Jeśli replikacja zachodzi na drodze konserwatywnej, to reagować z formaldehydem będą jedynie niesparowane, nowopowstające nici RNA, a pierwotna nić „plus” po rozpleceniu kompleksu będzie nadal infekcyjna. Francke i Hofschneider wykazali, że formaldehyd znosi w 80% infekcyjność struktur replikacyjnych RNA, co wskazuje na przewagę mechanizmu semikonserwatywnego nad konserwatywnym.

Duże znaczenie dla prac nad mechanizmem replikacji RNA fagowego miało wyizolowanie nici komplementarnej RNA faga R17 przez Iglewskiego i Franklina (74) oraz RNA faga Q β przez Polleta i wsp. (116) i wykazanie, że taki jednoniciowy RNA „minus” służy jako matryca dla syntezy infekcyjnego RNA „plus” (45, 150). Szybkość syntezy oraz ilość RNA utworzonego *in vitro* na matrycy nici komplementarnej odpowiada ilości RNA potomnego powstałego w warunkach *in vivo* (10, 150).

Już w 1965 roku Borst i Weissmann (16), badając *in vitro* reakcję RNA faga MS2 z polimerazą zwrócili uwagę, że być może w normal-

nych warunkach nic „plus” RNA nie jest połączona z nicią „minus” wiązaniami wodorowymi w dwuniciową strukturę. Twierdzili oni, że obie nici są ze sobą połączone tylko miejscowo, za pośrednictwem polimerazy RNA. Enzym miałby zapobiegać jednocześnie komplementacji obu nici na dużej przestrzeni i dopiero usunięcie go fenolem prowadziłoby do powstania dwuniciowego kompleksu, opornego na działanie rybonukleazy. Feix i wsp. (46) oraz Weissmann i wsp. (151) również przedstawili dowody na to, że dwuniciowe struktury nie są niezbędne dla procesu replikacji RNA i że odporne na działanie rybonukleazy dwuniciowe formy RNA są artefaktami powstałymi podczas izolacji. Co więcej, nie udało się zrekonstruować aktywnego kompleksu polimerazy RNA z wyizolowanymi formami dwuniciowymi (45, 99, 151). Enzym ten ani nie inicjował syntezy potomnego RNA w obecności RNA dwuniciowego, ani nie katalizował wydłużania nieukończonego potomnego RNA w obecności pośredniej formy replikacyjnej. Dopiero rozplecione nici tworzyły z polimerazą aktywny kompleks. Sugestie, że dwuniciowe struktury nie są funkcjonalne w procesie replikacji RNA, przedstawiło szereg badaczy (16, 22, 149, 150).

Prace te wskazują, że w procesie replikacji RNA wirusowego nie biorą udziału dwuniciowe formy pośrednie, ale wolna komplementarna nic „minus”, z którą na niewielkim odcinku paruje się nowopowstający RNA (10, 150, 151). W takiej sytuacji nie istniałby też problem konserwatywnego czy semikonserwatywnego mechanizmu replikacji.

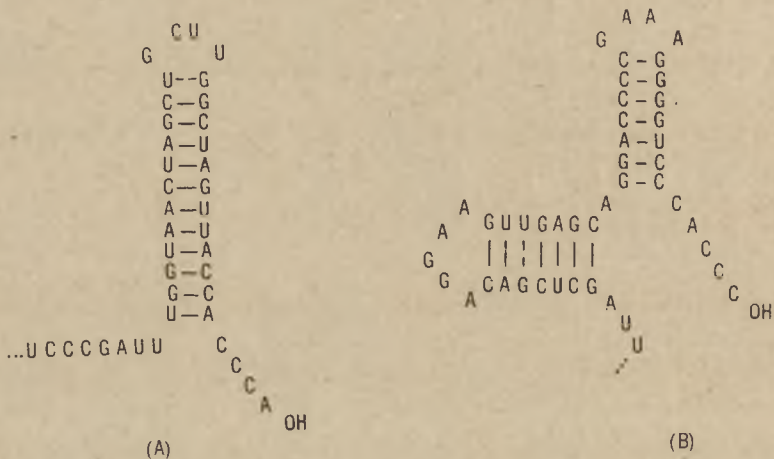
Z powyższymi rozważaniami wiąże się jeszcze jedno interesujące zagadnienie, a mianowicie problem relacji tych struktur RNA do katalizującej syntezy RNA enzymu — polimerazy RNA. Wiadomo, że od momentu, gdy na matrycy nici „plus” rozpocznie się synteza komplementarnej nici „minus”, enzym pozostaje trwale związany z replikującą strukturą (2). Co jednak dzieje się z enzymem, gdy synteza nici komplementarnej zostanie ukończona?

Jeśli założymy, że enzym pozostaje nadal związany z replikującą strukturą, to nasuwa się interesująca hipoteza kołowej struktury RNA, dość długo rozważana przez różnych autorów (29, 45, 66, 74). Jako pierwsi podali ją Brown i Martin (20), którzy zaproponowali kołowy model dla nici komplementarnej RNA małych wirusów zwierzęcych. Obserwowali oni nawet łańcuchy RNA dłuższe od normalnych, powstające w przypadku, gdy zakłócona zostanie prawidłowa terminacja syntezy RNA. Oznacza to, że enzym przesuwając się po nici komplementarnej od jej końca 3' do 5' syntetyzując RNA potomne, po którego ukończeniu znajduje się znów w pobliżu końca 3' nici komplementarnej i nie oddysocjując może rozpocząć syntezę nowego łańcucha RNA. Hipoteza ta w przypadku RNA bakteriofagów jest tym bardziej prawdopodobna, że fragmenty sekwencji nukleotydów końców 3' i 5' nici „minus” są wobec siebie komplementarne, podobnie jak komplementarne są sekwencje nukleotydowe końców 3' (z wyjątkiem ostatniej adenozyiny) i 5' nici „plus”.

De Wachter i wsp. (29) przypuszczają ponadto, że miejscem rozpoznawanym przez fagową polimerazę RNA są leżące blisko siebie końce 3' i 5' jednej nici; tłumaczy to jednocześnie specyficzność enzymu zarówno wobec nici „plus”, jak i nici „minus”, bowiem końcowe sekwencje nukleotydydowe obu nici są do siebie bardzo podobne.

Obecnie przyjmowana teoria odrzuca jednak hipotezę kołowej struktury RNA. Zakłada ona, że po ukończeniu syntezy nici komplementarnej na matrycy nici „plus” następuje dysocjacja kompleksu to znaczy zarówno rozdział obu nici jak i oddysocjowanie od nich polimerazy, która przyłącza się następnie do pojedynczej nici i rozpoczyna syntezę nowej cząsteczki RNA.

D. *Synteza potomnego RNA.* Synteza potomnej nici „plus” RNA wirusowego na matrycy nici komplementarnej „minus” zachodzi również w kierunku od 5' do 3' (2, 7, 8, 128, 161). Przebiega ona antyrównolegle w stosunku do nici komplementarnej, a zatem rozpocząć się może dopiero w momencie, gdy całkowicie ukończona zostanie synteza nici „minus” (8,



Schemat 3. Hipotetyczna struktura drugorzędowa sekwencji nukleotydydowych końców 3' nici „plus” i nici „minus” RNA faga R17 podana przez Cory i wsp. (21) (A) — 3'końcowy fragment nici „plus”, (B) — 3'końcowy fragment nici „minus” RNA faga R17

48). Istotne jest, że w odróżnieniu od syntezy nici komplementarnej, synteza RNA potomnego nie wymaga obecności czynników I i II (2, 21). Być może tym tłumaczy się fakt, że ilość RNA „plus” powstającego zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, jest około 10-krotnie większa od ilości powstającej nici komplementarnej (10, 148, 151). Konieczność obecności czynników byłaby czynnikiem ograniczającym syntezę nici „minus”. Tym wyjaśnić też można obserwację, że szybkość syntezy RNA jest większa gdy nić komplementarna, a nie np. RNA Q β , służy jako matryca w re-

akcji (45, 151). Interesujące tłumaczenie roli jednego z wyżej wspomnianych czynników podają C o r y i wsp. (21). Autorzy ci oznaczyli sekwencję pierwszorzędową końca 3' RNA faga R17 i na podstawie oznaczonej również sekwencji końca 5' RNA tego faga wydedukowali sekwencję 3' końcową nici komplementarnej. Dla fragmentów 3' końcowych obu nici (a do nich właśnie przyłączać się ma polimeraza RNA inicjująca syntezę łańcuchów komplementarnych) autorzy podają hipotetyczną strukturę drugorzędową (schemat 3). Jeden z czynników potrzebnych, jak wiadomo, tylko wtedy gdy matrycą jest nić „plus” mógłby służyć do rozplecenia dwóch dodatkowych par zasad, które różnią terminalną pętlę nukleotydową nici „plus” od nici „minus”.

F e i x i wsp. (45) wykazali, że powstały *in vitro* RNA jest infekcyjny. Ponieważ nić komplementarna jest nieinfekcyjna, to oznaczając samą infekcyjność można określić szybkość syntezy RNA wirusowego. Wynosi ona około 30 nukleotydów/sek. w temp. 37°C.

5'-końcowym nukleotydem RNA potomnego jest trójfosfoguanozyna (7, 8). Na 3'-końcu tego RNA powinna znaleźć się cytydyna komplementarna do pppG znajdującego się na końcu 5' nici „minus”. Okazało się jednak, że na 3'-końcu RNA faga Q β zsyntetyzowanego *in vitro* można odnaleźć cytydynę lub adenozyne (118). Podobnie L e e i G i l h a m (89) odnajdują bądź jeden nukleozyd bądź drugi na końcu 3' RNA faga f2 i MS2. Mechanizm, dzięki któremu do zsyntetyzowanego łańcucha RNA dodawana jest adenozyne nie jest wyjaśniony. Przyjąć można, że w procesie tym nie biorą udziału czynniki, gdyż jak stwierdzili R e n s i n g i A u g u s t (118) powstały *in vitro* RNA Q β 6S może mieć na swym końcu 3' bądź adenozyne bądź cytydynę, a replikacja jego odbywa się bez udziału czynników (9). R e n s i n g i A u g u s t (118) poszukując enzymu, który mógłby katalizować omawianą reakcję stwierdzili, że nie spełnia tej roli ani polimeraza poliA, ani pyrofosforylaza adenylowa. Nie katalizuje tej reakcji również nukleotydylotransferaza, która zdolna jest dołączyć zarówno cytydynę jak i adenozyne do tRNA (117). Przypuszczają oni, że proces dodawania ostatniej adenozyne do nici „plus” RNA katalizowany jest przez samą polimerazę RNA faga.

LITERATURA

1. Ammann J., Delius H., Hofschneider P. H., *J. Mol. Biol.* **10**, 557 (1964).
2. August J. T., Banerjee A. K., Eoyang L., Franze de Fernandez M. T., Hori K., Kuo C. H., Rensing U., Shapiro L., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 73 (1968).
3. August J. T., Cooper S., Shapiro L., Zinder N. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 95 (1963).

4. August J. T., Eoyang L., Franze de Fernandez M. T., Hasegawa S., Kuo C. H., Rensing U., Shapiro L., *J. Cell Physiol.* **74**, 187 (1969).
5. August J. T., Eoyang L., Franze de Fernandez M. T., Hasegawa S., Kuo C. H., Rensing U., Shapiro L., *Federation Proc.* **29**, 1170 (1970).
6. August J. T., Shapiro L., Eoyang L., *J. Mol. Biol.* **11**, 257 (1965).
7. Banerjee A. K., Eoyang L., Hori K., August J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 986 (1967).
8. Banerjee A. K., Kuo C. H., August J. T., *J. Mol. Biol.* **40**, 445 (1969).
9. Banerjee A. K., Rensing U., August J. T., *J. Mol. Biol.* **45**, 181 (1969).
10. Billeter M. A., Libonati M., Vinuela E., Weissmann Ch., *J. Biol. Chem.* **241**, 4750 (1966).
11. Billeter M. A., Weissmann Ch., Warner R. C., *J. Mol. Biol.* **17**, 145 (1966).
12. Bishop D. H. L., Claybrook J. R., Pace N. R., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1475 (1967).
13. Bishop D. H. L., Mills D. R., Spiegelman S., *Biochemistry* **7**, 3744 (1968).
14. Bishop D. H. L., Pace N. R., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1790 (1967).
15. Bishop J. M., Koch G., *J. Biol. Chem.* **242**, 1736 (1967).
16. Borst P., Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 982 (1965).
17. Bradley D. Jr., *Micr. Soc.* **84**, 257 (1965).
18. Brinton C. C., Jr., Beer H., *Molecular Biology of Viruses*, red. J. C. Colter, W. Paranchych, Academic Press, N. Y., Londyn 1967, str. 251.
19. Brinton C. C., Jr., Gemski P., Jr., Carnahan J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 776 (1964).
20. Brown F., Martin S. J., *Nature* **208**, 861 (1965).
21. Cory S., Spahr P. F., Adams J. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 1 (1970).
22. Cramer J. H., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **62**, 189 (1971).
23. Dahlberg J. E., *Nature* **220**, 548 (1968).
24. Davis J. E., Pfeifer D., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **10**, 1 (1964).
25. Davis J. E., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **6**, 203 (1963).
26. Delius H., Hofschneider P. H., *J. Mol. Biol.* **10**, 554 (1964).
27. De Wachter R., Fiers W., *J. Mol. Biol.* **30**, 507 (1967).
28. De Wachter R., Verhassel J. P., Fiers W., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 195 (1968).
29. De Wachter R., Verhassel J. P., Fiers W., *FEBS Letters* **1**, 93 (1968).
30. Doi R. H., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 353 (1963).
31. Eggen K., Nathans D., *J. Mol. Biol.* **39**, 293 (1969).
32. Eikhom T. S., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1833 (1967).
33. Eikhom T. S., Stockley D. L., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 506 (1968).
34. Ellis D. B., Paranchych W., *J. Cell. Comp. Physiol.* **62**, 207 (1963).
35. Enger M. D., Kaesberg P., *J. Mol. Biol.* **13**, 260 (1965).
36. Enger M. D., Stubbs E. A., Mitra S., Kaesberg P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 857 (1963).
37. Eoyang L., August J. T., *Methods in Enzymology*, t. 12B, red. L. Grossman, K. Moldave, Academic Press, New York, 1968, str. 530.
38. Erikson R. L., *J. Mol. Biol.* **18**, 372 (1966).
39. Erikson R. L., *Annual Rev. Microbiol.* **22**, 305 (1968).
40. Erikson R. L., Erikson E., Gordon J. A., *J. Mol. Biol.* **22**, 257 (1966).

41. Erikson R. L., Fenwick M. L., Franklin R. M., *J. Mol. Biol.* **10**, 519 (1964).
42. Erikson R. L., Franklin R. H., *Bacteriol. Rev.* **30**, 267 (1966).
43. Feary T. W., Fisher E., Jr., Fisher T. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 359 (1963).
44. Fedoroff N. V., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1838 (1971).
45. Feix G., Pollet R., Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 145 (1968).
46. Feix G., Slor H., Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1401 (1967).
47. Fenwick M. L., Erikson R. L., Franklin R. M., *Science* **146**, 527 (1964).
48. Fiers W., Van Montagu M., De Wachter R., Haegeman G., Min Jou W., Messens E., Remant E., Vandenberghe A., Van Stuyvendaele B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 697 (1969).
49. Filipowicz W., Zagórski W., *Post. Biochem.* **18**, 595 (1972).
50. Fraenkel-Conrat H., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 307 (1954).
51. Francke B., Hofschneider P. H., *J. Mol. Biol.* **16**, 544 (1966).
52. Francke B., Hofschneider P. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1883 (1966).
53. Francke B., Hofschneider P. H., *J. Mol. Biol.* **40**, 45 (1969).
54. Franklin R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1504 (1966).
55. Franze de Fernandez M. T., Eoyang L., August J. T., *Nature* **219**, 588 (1968).
56. Gesteland R. F., Boedtker H., *J. Mol. Biol.* **8**, 496 (1964).
57. Godson G. N., *J. Mol. Biol.* **34**, 149 (1968).
58. Godson G. N., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **23**, 495 (1967).
59. Granboulan N., Franklin R. M., *J. Mol. Biol.* **22**, 173 (1966).
60. Gussin G. N., *J. Mol. Biol.* **21**, 435 (1966).
61. Haruna I., Nishihara T., Watanabe I., *Proc. Jap. Acad.* **43**, 375 (1967).
62. Haruna I., Nozu K., Ohtaka Y., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 905 (1963).
63. Haruna I., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 579 (1965).
64. Haruna I., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1189 (1965).
65. Haruna I., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1256 (1966).
66. Haruna I., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1333 (1966).
67. Hofschneider von P. H., *Z. Naturforsch.* **18B**, 203 (1963).
68. Hohn T., *European J. Biochem.* **2**, 152 (1967).
69. Hori K., Eoyang L., Banerjee A. K., August J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1790 (1967).
70. Horiuchi K., Lodish H. F., Zinder N. D., *Virology* **28**, 438 (1966).
71. Hotham-Iglewski B., Franklin R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 743, (1967).
72. Hung P. P., Ling C. M., Overby L. R., *Science* **166**, 1638 (1969).
73. Igarashi S. J., Bissonnette R. P., *J. Biochem.* **70**, 845 (1971).
74. Iglewski W. J., Franklin R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1019 (1967).
75. Jockush H., Balt L. A., Kaesberg P., *Virology* **42**, 401 (1970).
76. Kacian D. L., Mills D. R., Spiegelman S., *Biochim. Biophys. Acta* **238**, 212 (1971).
77. Kaerner H. C., *J. Mol. Biol.* **42**, 259 (1969).
78. Kamen R., *Nature* **221**, 321 (1969).
79. Kamen R., *Nature* **228**, 527 (1970).

80. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **8**, 602 (1964).
81. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **26**, 169 (1967).
82. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **29**, 229 (1967).
83. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **29**, 237 (1967).
84. Kondo M., Gallerani R., Weissmann C., *Nature* **228**, 525 (1970).
85. Kondo M., Weissmann C., *European J. Biochem.* **24**, 530 (1972).
86. Konigsberg W., *J. Biol. Chem.* **241**, 4534 (1966).
87. Konigsberg W., Weber K., Notani G., Zinder N. D., *J. Biol. Chem.* **241**, 2579 (1966).
88. Langridge R., Billeter M. A., Borst P., Burdon R. H., Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 114 (1964).
89. Lee J. C., Gilham P. T., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4000 (1965).
90. Lin J. Y., Tsung C. M., Fraenkel-Conrat H., *J. Mol. Biol.* **24**, 1 (1967).
91. Lodish H. F., *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **8**, 287 (1968).
92. Lodish H. F., Cooper S., Zinder N. D., *Virology* **24**, 438 (1964).
93. Lodish H. F., Zinder N. D., *J. Mol. Biol.* **19**, 333 (1966).
94. Lodish H. F., Zinder N. D., *J. Mol. Biol.* **21**, 207 (1966).
95. Lodish H. F., Zinder N. D., *Science* **152**, 372 (1966).
96. Loeb T., *Science* **131**, 932 (1960).
97. Loeb T., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 282 (1961).
98. Marvin D. A., Hoffmann-Berling H., *Nature* **197**, 517 (1963).
99. Mills D. R., Pace N. R., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1778 (1966).
100. Mills D. R., Peterson R. L., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 217 (1967).
101. Mitra S., Enger M., Kaesberg P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 68 (1963).
102. Miyake T., Haruna I., Shiba T., Itoh Y. H., Yamane K., Watanabe I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 2022 (1971).
103. Nathans D., Oeschger M. P., Polmar S. K., Eggen K., *J. Mol. Biol.* **39**, 279 (1969).
104. Nonomaya M., Ikeda Y., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 548 (1966).
105. Ochoa S., Weissmann Ch., Borst P., Burdon R., Billeter M. A., *Federation Proc.* **23**, 1285 (1964).
106. Oeschger M. P., Nathans D., *J. Mol. Biol.* **22**, 235 (1966).
107. Overby L. R., Barlow G. H., Doi R. H., Jacob M., Spiegelman S., *J. Bacteriol.* **91**, 442 (1966).
108. Overby L. R., Barlow G. H., Doi R. H., Jacob M., Spiegelman S., *J. Bacteriol.* **92**, 739 (1966).
109. Pace N. R., Bishop D. H. L., Spiegelman S., *J. Virol* **1**, 771 (1967).
110. Pace N. R., Bishop D. H. L., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 711 (1967).
111. Pace N. R., Bishop D. H. L., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 139 (1968).
112. Pace N. R., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1608 (1966).
113. Paranchych W., *Virology* **28**, 90 (1966).
114. Paranchych W., Ainsworth S. K., Dick A. J., Krahn P. M., *Virology* **45**, 615 (1971).
115. Paranchych W., Krahn P. M., Bradley R. D., *Virology* **41**, 465 (1970).
116. Pollet R., Knolle P., Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 766 (1967).
117. Preiss J., Dieckmann M., Berg P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1748 (1961).
118. Rensing U., August J. T., *Nature* **224**, 853 (1969).

119. Roberts J. W., Steitz J. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1416 (1967).
120. Robertson H. D., Zinder N. D., *Nature* **220**, 69 (1968).
121. Roblin R., *J. Mol. Biol.* **31**, 51 (1968).
122. Schmidt R. J., Stanier R. J., *J. Gen. Microbiol.* **39**, 95 (1965).
123. Scott D., *Virology* **26**, 85 (1965).
124. Shapiro L., Franze de Fernandez M. T., August J. T., *Nature* **220**, 478 (1968).
125. Silverman P. M., Valentine R. C., *J. Gen. Virol.* **4**, 111 (1969).
126. Smellie R. M. S., Davidson W. J. N., Cohn W. E., *Progr. Nucl. Acid Res.* **1**, 27 (1963).
127. Spiegelman S., Haruna I., Holland I. B., Beaudreau G., Mills D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 919 (1965).
128. Spiegelman S., Pace N. R., Mills D. R., Levisohn R., Eiksom Z. S., Taylor M. M., Peterson R. L., Bishop D. H. L., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 101 (1968).
129. Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 410 (1958).
130. Stavis R. L., August J. T., *Annual Rev. Biochem.* **39**, 527 (1970).
131. Steitz J. A., *J. Mol. Biol.* **33**, 923 (1968).
132. Steitz J. A., *J. Mol. Biol.* **33**, 937 (1968).
133. Strauss J. B., Jr., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **7**, 43 (1963).
134. Strauss J. H., Jr., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **34**, 453 (1968).
135. Sugiyama T., *J. Mol. Biol.* **11**, 856 (1965).
136. Sugiyama T., Herbert R. R., Hartman K. A., *J. Mol. Biol.* **25**, 455 (1967).
137. Travers A. A., Kamen R., Schleif R. F., *Nature* **228**, 748 (1970).
138. Watanabe M., August J. T., *Methods Virol.* **3**, 337 (1967).
139. Watanabe M., August J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 513 (1968).
140. Watanabe I., Miyake T., Sakurai T., Shiba T., Ohno T., *Proc. Jap. Acad.* **43**, 204 (1967).
141. Watanabe M., Watanabe H., August J. T., *J. Mol. Biol.* **33**, 1 (1968).
142. Weber K., *Biochemistry* **6**, 3144 (1967).
143. Weber K., Konigsberg W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3563 (1967).
144. Weissmann Ch., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 202 (1965).
145. Weissmann Ch., Borst P., *Science* **142**, 1188 (1963).
146. Weissmann Ch., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 682 (1964).
147. Weissmann Ch., Borst P., Burdon R., Billeter M., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 890 (1964).
148. Weissmann Ch., Colthart L., Libonati M., *Biochemistry* **7**, 865 (1968).
149. Weissmann Ch., Feix G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1264 (1966).
150. Weissmann Ch., Feix G., Slor H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 83 (1968).
151. Weissmann Ch., Feix G., Slor H., Pollet R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1870 (1967).
152. Weissmann Ch., Ochoa S., *Progr. Nucl. Acid Res. Moll. Biol.* **6**, 353 (1967).
153. Weissmann Ch., Simon L., Borst P., Ochoa S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 99 (1963).
154. Weissmann Ch., Simon L., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 407 (1963).
155. Weith H. L., Asteriadis G. T., Gilham P. T., *Science* **160**, 1459 (1968).

156. Weith H. L., Gilham P. T., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5473 (1967).
157. Valentine R. C., Engelhardt D. L., Zinder N. D., *Virology* **23**, 159 (1964).
158. Valentine R. C., Strand M., *Science* **148**, 511 (1965).
159. Valentine R. C., Ward R., Strand M., *Advan. Virus Res.* **15**, 1 (1969).
160. Valentine R. C., Wedel H., Ippen K. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 277 (1965).
161. Vandenberghe A., Van Stuyvendaele B., Fiers W., *European J. Biochem.* **7**, 174 (1969).
162. Vasquez C., Granboulan N., Franklin R., *J. Bacteriol.* **92**, 1779 (1966).
163. Vinuela E., Algranati I. D., Ochoa S., *European J. Biochem.* **1**, 3 (1967).
164. Zinder N. D., *Annual Rev. Microbiol.* **19**, 455 (1965).

WITOLD FILIPOWICZ *, WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI **

Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy II. RNA i jego translacja

Bacterial RNA Viruses II. RNA and its Translation

The recent data concerning the primary and secondary structure of RNA from small bacteriophages are reviewed. The regulatory mechanisms involved in the translation of phage RNA are discussed.

Grupa małych bakteriofagów *Escherichia coli* zawierających jako materiał genetyczny RNA oraz proces replikacji RNA tych wirusów zostały omówione w innym artykule (136). W tej pracy przedstawiono poglądy dotyczące sekwencji pierwszorzędowej RNA małych bakteriofagów oraz funkcji tego RNA w procesie biosyntezy białka. Od kilku lat w wielu pracowniach intensywnie bada się mechanizm translacji fagowego RNA, ponieważ jest to jedyny w tej chwili, dość łatwy do wyizolowania, mRNA aktywny w układzie bezkomórkowym z *E. coli*. W wyniku tych badań poznano dość dobrze procesy związane z inicjacją, elongacją i terminacją syntezy trzech specyficznych polipeptydów fagowych. Niektóre z tych zagadnień zostały obszernie omówione w artykułach przeglądowych (66, 105, 117).

Ze względu na duże podobieństwo fagów z tej grupy, jak i ich cząstek RNA, dane dotyczące jednego z fagów można w większości przypadków odnosić również i do innych. Jedynie fag Q β różni się nieznacznie wielkością oraz ciężarem cząsteczkowym zawartego w nim RNA od pozostałych fagów (MS 2, R 17, f2, M 12, fr).

I. RNA małych bakteriofagów i kodowane przez niego białka

1. Własności RNA

Kwas rybonukleinowy stanowi około 30% masy cząsteczkowej małych bakteriofagów (37, 109).

* Lek. med., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

W skład dojrzałego wiriona wchodzi jedna liniowa cząsteczka RNA (z wolnymi końcami 5'p i 3'-OH) o stałej sedymentacji około 27S (37, 81) i masie cząsteczkowej około 1,1 mln daltonów, zawierająca 3300—3400 nukleotydów. RNA faga Q β jest nieco większy i posiada stałą sedymentacji około 29S (90). Ostatnio doniesiono nawet, że jego ciężar cząsteczkowy wynosi około 1,5 mln (9). W skład RNA małych bakteriofagów nie wchodzi żadne nietypowe zasady; dla przykładu, skład nukleotydowy RNA faga f2, pierwszego wyizolowanego faga z tej grupy przedstawia się następująco: A — 21,8%, U — 26,4%, G — 25,5%, C — 26,4% (75).

Z badań Straussa i Sinsheimera (109), Mitry i wsp. (81) oraz Boedtker (8) wynika, że wyizolowany bakteriofagowy RNA ma rozbudowaną strukturę drugorzędową. W oparciu o przyrost absorpcji w ultrafiolecie podczas reakcji RNA z formaldehydem stwierdzono, że około 70% jego zasad występuje w obrębie struktur dwuniciowych. Isenberg i wsp. (51) analizując widmo w podczerwieni zarówno RNA wyizolowanego z faga μ 2 jak również RNA znajdującego się w cząstce fagowej stwierdzili, że w obu przypadkach $63 \pm 5\%$ zasad znajduje się w strukturze dwuniciowej. Wyniki badań nad sekwencją pierwszorzędową RNA bakteriofagowego wskazują również na możliwość istnienia w jego obrębie licznych dwuniciowych pętli (18, 31, 52). Rola struktury drugorzędowej w regulacji translacji fagowego RNA zostanie omówiona w dalszej części artykułu.

2. Kolejność cistronów w RNA fagowym

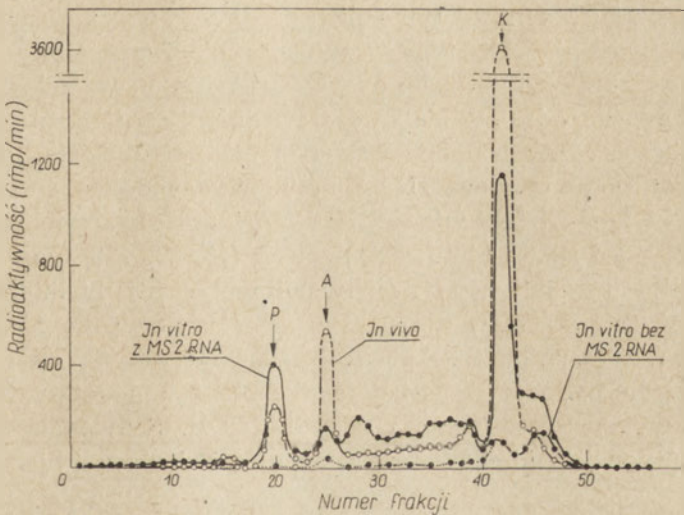
Analizując mutanty amber i UGA fagów f2 (129, 138), R 17 (41, 115), MS 2 (118) oraz Q β (47) stwierdzono występowanie u tych bakteriofagów trzech grup mutantów odpowiadających mutacjom w genach dla: białka kapsydu (białka płaszczka), białka dojrzewania (zwanego również białkiem A) oraz polimerazy fagowego RNA (zwaney również replikazą RNA lub syntetazą RNA). Dowody genetyczne, że RNA fagowe zawiera informację tylko dla trzech polipeptydów potwierdzono za pomocą syntezy trzech specyficznych białek fagowych zarówno *in vivo* w zakażonych fagiem komórkach *Escherichia coli* (34, 85, 121) jak i *in vitro* w układzie bezkomórkowym z *E. coli* w obecności fagowego RNA jako matrycy (16, 26, 72, 122).

Kolejność cistronów dla polipeptydów fagowych jest następująca: najbliżej końca 5' cząsteczki RNA znajduje się cistron białka dojrzewania, w środku jest cistron białka kapsydu, przy końcu 3' cząsteczki znajduje się cistron kodujący polimerazę RNA. Dowody, że kolejność cistronów jest właśnie taka pochodzą z eksperymentów biochemicznych (53, 60, 99), ponieważ nie można było posłużyć się w przypadku nierekombinujących RNA — bakteriofagów klasyczną metodyką genetyczną. Najbardziej przekonujących dowodów dostarczyły badania sekwencji pierwszorzędowej RNA fagów R 17, MS 2 i Q β . W przypadku RNA fagów R 17 (87) i MS 2

(31) wyizolowano i oznaczono sekwencje nukleotydów fragmentów zawierających jednocześnie koniec cistronu białka kapsydu oraz początek cistronu polipeptydu polimerazy. W RNA MS 2 (22), R 17 (92, 108) oraz Q β (7, 104) oznaczono sekwencje nukleotydowe długich fragmentów od końców 5' RNA i stwierdzono, że zawierają one miejsca, w których inicjowana jest synteza białek dojrzewania.

3. Charakterystyka polipeptydów kodowanych przez fagowy RNA

Zarówno *in vivo*, jak *in vitro* RNA fagowe stymuluje syntezę trzech specyficznych polipeptydów: białka kapsydu, białka dojrzewania oraz polipeptydu polimerazy RNA. Dzięki różnicom w ciężarze cząsteczkowym polipeptydów można je rozdzielić na kolumnach z żelu poliakrylamidowego w obecności 0,1% siarczanu dodecyłu. Rysunek 1 przedstawia taki rozdział polipeptydów zsyntetyzowanych pod wpływem RNA faga MS 2 *in vitro* i *in vivo* w zainfekowanych sferoplastach z *E. coli*.



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym specyficznych polipeptydów zsyntetyzowanych pod wpływem MS2 RNA w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Polipeptydy w doświadczeniach *in vitro* znakowane są ^{14}C -leucyną, a w doświadczeniu *in vivo* — ^3H -leucyną.

(P) — polipeptyd RNA-polimerazy, (A) — białko dojrzewania, (K) — białko kapsydu (wg 119).

Głównym składnikiem białkowym omawianych bakteriofagów jest białko płaszczka — polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 14 000. Jeden wirion zawiera 180 cząsteczek tego białka (29). Poznana jest sekwencja aminokwasowa białek kapsydu fagów f2 (127), R 17 (126) oraz Q β (59). Sekwencje białek kapsydu fagów R 17, M 12, f2 i MS 2 różnią się między sobą tylko jednym aminokwasem (29, 62) na ogólną liczbę 129. Wskazuje to na bliskie pokrewieństwo tych bakteriofagów. Białka kapsydu tych

fagów, jak również faga Q β nie zawierają histydyny (28, 90). Białko kapsydu faga Q β nie zawiera ponadto tryptofanu i metioniny (59). Ponieważ dwa pozostałe polipeptydy fagowe zawierają wszystkie aminokwasy można je łatwo odróżnić od białka kapsydu. Zarówno *in vivo* jak i *in vitro* białko kapsydu tworzy się w znacznie większych ilościach od pozostałych białek (16, 26, 34, 85, 122) (rysunek 1).

Białko dojrzewania (4, 71) jest drugim obok białka kapsydu strukturalnym białkiem cząstki fagowej (106, 120); według Steitz (107) każdy wirion zawiera tylko jedną jego cząsteczkę. Rolę tego białka omówiono szerzej w innym artykule (136). Ciężar cząsteczkowy białka dojrzewania faga R 17 określany jest na około 35—40 tys. (107), a faga Q β na 44 tys. (82). Weiner i Weber (133) oznaczyli sekwencję N-końcową białka dojrzewania faga Q β jako NH₂Pro-Liz-Leu-Pro. *In vivo* w zakażonych fagiem komórkach polipeptyd ten tworzy się w niewielkich ilościach (85, 121) (rysunek 1). Białko dojrzewania powstaje również w niewielkich ilościach *in vitro* w układzie z *E. coli* w obecności RNA faga f2 (72, 73). W układzie otrzymanym z komórek *Bacillus stearothermophilus* rybosomy inicjują na RNA f2 syntezę tylko białka dojrzewania; pozostałe dwa fagowe polipeptydy nie są w tych warunkach inicjowane (68).

Garwes i wsp. (36) sugerowali występowanie w izolowanych wirionach Q β dwóch rodzajów białka dojrzewania. Potwierdzono to również syntezą czterech różnych polipeptydów *in vitro* w układzie bezkomórkowym z *E. coli* pod wpływem RNA Q β (48). Wydawało się, że tłumaczy to dlaczego RNA faga Q β jest większy od RNA innych bakteriofagów. Ostatnio wykazano jednak w kilku pracowniach (48, 82, 132), że znajdujący wśród białek Q β dodatkowy, czwarty polipeptyd jest białkiem kapsydu, którego synteza nie zostaje zakończona na właściwym dla niego kodonie terminalnym. W wyniku tego powstaje znacznie dłuższy od normalnego białka kapsydu polipeptyd posiadający około 200 dodatkowych aminokwasów przy końcu cząsteczki z grupą -COOH. Sekwencja N-końcowa tego polipeptydu jest identyczna z sekwencją N-końcową białka kapsydu (82, 132).

Polimeraza RNA (16, 26, 34, 85, 121) jest polipeptydem kodowanym przez największy cistron RNA małych bakteriofagów (85, 120, 121). Według Kamena (55) ciężar cząsteczkowy tego polipeptydu w przypadku faga Q β wynosi około 65 000. Garwes i wsp. (36) podają c.c. około 49 000. Najlepiej poznaną fagową polimerazą RNA jest polimeraza Q β (55, 58). Polipeptyd ten nie jest odnajdywany w strukturze dojrzałych cząstek fagowych. Zarówno *in vivo* jak i *in vitro* tworzy się on w ilościach znacznie mniejszych od białka kapsydu (121, 122) (rysunek 1). Czynny enzym jest kompleksem powstającym z połączenia się polipeptydu kodowanego przez RNA fagowe z trzema innymi polipeptydami bakteryjnymi (55, 58). Działanie fagowej polimerazy RNA zostało omówione w innym artykule (136).

II. Badania nad strukturą pierwszorzędową RNA małych bakteriofagów

1. Fragmenty 3'- i 5'-końcowe

Z powodu trudności metodycznych oraz dużej wielkości cząsteczki RNA fagowego, badania jego sekwencji nukleotydowej ograniczały się przez wiele lat tylko do krótkich fragmentów 5' i 3'-końcowych. Tablica 1 przedstawia sekwencje nukleotydowe obu końców cząsteczek RNA różnych bakteriofagów.

Tablica 1

Sekwencje nukleotydowe końców 5' i 3' RNA różnych bakteriofagów

Fag	Koniec 5'	Pozycja literatury	Koniec 3'	Pozycja literatury
MS 2	pppGGGUGGGACC.. ¹	(22)	..GUUACCACCCA-OH.. ¹	(31)
f2	pppGGGUGGGACC.. ¹	(63)	..GUUACCACCCA-OH	(19,134)
R 17	pppGGGUGGGACC.. ¹	(18)	..GUUACCACCCA-OH.. ¹	(18)
R 17			..GGUCCACCCC-OH ²	(18)
a	pppGGG(G)ACCCCC.. ^{1,3}	(7)	..GCCUCUCUCCUCCCA-OH	(135)
b	pppGGGGACC...	(21)		
Q β c	pppGGGGGAAC...	(21)	..GCCUCUCUCUCCCA-OH	(20)
d	pppGGGAC...	(137)		

¹ sekwencje te są fragmentami dłuższych sekwencji końcowych oznaczonych przez cytowanych autorów,

² sekwencja podana w oparciu o znaną kolejność nukleotydów komplementarnego końca 5' nici (+) RNA R17

³ nie wiadomo czy w pozycji w nawiasie znajduje się G czy też GG.

Jak widać z tablicy 1, koniec 5' RNA wszystkich fagów rozpoczyna się trójnukleotydem pppGGG; najczęściej spotykaną sekwencją końca 3' jest -CCCA-OH. Znaczny jednak procent RNA wyizolowanego z bakteriofagów zawiera na końcu 3' sekwencję -CCC-OH (61, 91, 135). RNA fagów MS2, R 17 i f2 mają jednakową strukturę pierwszorzędową dłuższych fragmentów końcowych; potwierdza to dane o ich bliskim pokrewieństwie. Istnieją znaczne rozbieżności co do sekwencji końca 5' RNA Q β . De Wachter i Fiers (21) stwierdzili w wyizolowanym RNA istnienie prawie równoważnych ilości dwóch różnych sekwencji (tablica 1 b i c). Odmienne wyniki uzyskali Billeter i wsp. (7) oraz Young i Fraenkel-Contract (137) (tablica 1 a i d). Na podstawie znanej sekwencji końca 5' RNA fagowego można wydedukować kolejność nukleotydów końca 3'-OH komplementarnej nici (—) RNA. Porównanie sekwencji nukleotydowej końca 3' nici (+) i nici (—) jest interesujące ze względu na to, że na obu łańcuchach do tego regionu musi przyłączać się polimeraza RNA rozpoczynająca syntezę nici komplementarnych. Wspólną sekwencją dla obu jest heksanukleotyd CCACCC, który może być fragmentem rozpoznawanym przez enzym (18).

Należy również zwrócić uwagę, że koniec 5' RNA wszystkich bakteriofagów nie zawiera kodonów inicjacyjnych AUG dla N-formylo-metylo-tylo-tRNA, podobnie jak na końcach 3' nie występują kodony kończące syntezę łańcucha polipeptydowego (UAA, UAG, UGA). Świadczy to, że inicjacja syntezy łańcucha polipeptydowego przez rybosom odbywa się wewnątrz łańcucha mRNA, a ponadto potwierdza przypuszczenia, że w RNA fagowym istnieją fragmenty, które nie są odczytywane przez rybosomy. Istnienie takich fragmentów sugerowano głównie na tej podstawie, że ilość nukleotydów w RNA fagowym jest znacznie większa niż potrzebna do kodowania trzech specyficznych, fagowych polipeptydów. Część cząsteczki RNA bakteriofagów R 17 i MS 2 zawiera bowiem około 3300 nukleotydów (37, 109) a trzy geny dla białek tych fagów wymagają nie więcej niż 3000 nukleotydów. Dość długie nietłumaczone sekwencje na końcach cząsteczki RNA, jak również w obszarach międzycistronowych mogą spełniać rozmaite funkcje regulacyjne w syntezie RNA i białek fagowych.

2. Sekwencje nukleotydowe dłuższych fragmentów RNA

Grupa Sangera (14, 15, 98) opracowała w latach 1965—1969 mikrometody rozdziału i oznaczania sekwencji znakowanych ^{32}P oligonukleotydów. Dzięki temu powstały warunki do oznaczania sekwencji nukleotydowej długich fragmentów RNA fagowego. Do preparatywnego rozdziału oligonukleotydów otrzymanych przez łagodne trawienie cząsteczki RNA nukleazami zastosowano elektroforezę na żelach poliakrylamidowych (3, 31, 39, 80).

Przełomowym momentem w badaniach nad strukturą pierwszorzędową RNA fagowego było oznaczenie przez Steitz (108) sekwencji trzech fragmentów RNA, do których przyłączają się rybosomy inicjujące syntezę poszczególnych białek kodowanych przez RNA faga R 17. Autorka inkubowała wysokoznakowane ^{32}P -RNA faga R 17 z rybosomami w obecności N-formylometionylo-tRNA i czynników inicjacyjnych. W tych warunkach, z powodu nieobecności czynników elongacyjnych (T i G) rybosomy po przyłączeniu się do miejsc inicjacyjnych zawierających kodony AUG dla N-formylometioniny nie mogą przesuwać się dalej po łańcuchu mRNA. Gdy na takie kompleksy RNA z rybosomami podziała się rybonukleazą trzustkową, to strawiony zostaje cały łańcuch RNA z wyjątkiem fragmentów RNA o długości około 30 nukleotydów, chronionych przez strukturę rybosomów przed atakiem nukleazy. Steitz izolowała te krótkie fragmenty i oznaczała ich sekwencje według metody opracowanej przez grupę Sangera (14, 15, 98). Wykorzystując do reakcji z rybosomami niezdegradowany RNA R 17 autorka oznaczyła sekwencję nukleotydową miejsca inicjacyjnego dla białka kapsydu (na niezdegradowanym natywnym RNA rybosomy przyłączają się głównie do miejsca inicjacyjnego dla białka kapsydu). Gdy jako materiał wyjściowy autorka stosowała częściowo rozfrag-

	Pozycja literatury
CISTRON BIAŁKA KAPSYDU Q β	(46)
.....py AAU UUG AUC <u>AUG</u> GCA AAA UUA GAG AC	Met Ala Liz Leu Glu Trp
CISTRON BIAŁKA KAPSYDU R17	(108)
..pyAG ACC CUA ACC GGG GUU UGA AGC <u>AUG</u> GCU UCU AAC UUU.....	Met Ala Ser NH ₂ Fen Asp NH ₂ Glu NH ₂
CISTRON BIAŁKA KAPSYDU f2	(40)
..... ACC GGA GUU GGA AGC <u>AUG</u> GCU UCC AAC UUU ACU CAG.....	Met Ala Ser NH ₂ Fen Trp
CISTRON BIAŁKA DOJRZEWANIA R17	(108)
..... pyCC UAG GAG GUU UGA CCU <u>AUG</u> CGA GCU UUU AGU G	Met Arg Ala Fen Ser
CISTRON BIAŁKA DOJRZEWANIA Q β	(103)
..... G AGU AUA AGA GGA CAU <u>AUG</u> CCU AAA UUA CCG CGU G	Met Pro Liz Leu Pro Arg
CISTRON RNA-POLIMERAZY Q β	(102)
(AAC,U)A AGG AUG AAA UGC <u>AUG</u> UCU AAG ACA GC.....	Met Ser Liz Trp Ala
CISTRON RNA-POLIMERAZY R17	(108)
.....pyAA ACA UGA GGA UUA CCC <u>AUG</u> UCG AAG ACA ACA AAG	Met Ser Liz Trp Trp Liz
Ala Ser Glu Ileu Tyr	
GCA AAC UCC GGU AUC UAC UAA <u>UAG</u> AUG CCG GCC AUU UG.....	KONCOWY FRAGMENT CISTRONU BIAŁKA KAPSYDU R17
124	129

Schemat 1. Sekwencje nukleotydowe fragmentów inicjacyjnych oraz końcowego odcinka cistronu białka kapsydu R 17.

Podkreślone są kodony terminalne (—) oraz kodony inicjacyjne (---). Fragment wyizolowany przez Gupta i wsp. (40) zawiera 62 nukleotydy — autorzy oznaczyli ich kolejność. Powyżej podana jest tylko część tego fragmentu.

mentowany RNA, rybosomy przyłączały się również w większym stopniu do miejsc inicjacyjnych pozostałych dwóch cistronów; ułatwiło to izolowanie i oznaczanie sekwencji tych fragmentów. Sekwencję nukleotydową miejsca inicjacyjnego dla białka dojrzewania Steitz określiła ostatecznie stosując rybosomy z *Bacillus stearothermophilus*, które w warunkach *in vitro* inicjują w obecności fagowego RNA syntezę tylko białka dojrzewania (68).

W podobny sposób oznaczono sekwencję inicjacyjną dla cistronu białka kapsydu faga Q β (46) i faga f2 (40). Ostatnio w RNA faga Q β zlokalizowano miejsce przyczepu rybosomu do cistronu białka dojrzewania (104) oraz oznaczono sekwencję inicjacyjną cistronu polimerazy RNA (103). Poznane dotychczas sekwencje fragmentów inicjacyjnych dla poszczególnych cistronów przedstawione są na schemacie 1.

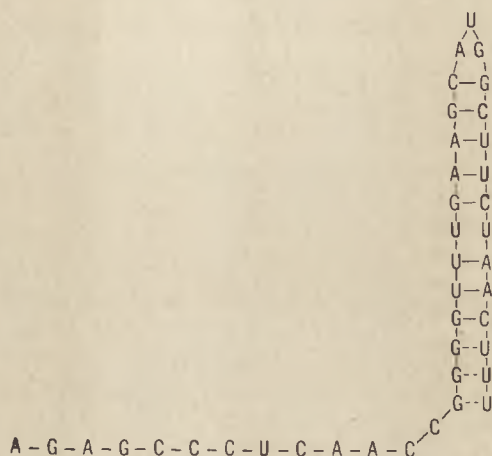
Ponadto na rysunku tym podano sekwencję fragmentu cistronu białka kapsydu RNA R 17 oznaczoną przez Nicholisa (77). Fragment ten zachodzi na początek sekwencji inicjacyjnej polimerazy RNA, dzięki czemu poznana została całkowicie sekwencja nukleotydowa nietłumaczonego fragmentu znajdującego się między końcem cistronu białka kapsydu a początkiem cistronu polimerazy faga R 17. Powyżej każdej sekwencji nukleotydowej podano sekwencje aminokwasowe N-końcowych fragmentów poszczególnych polipeptydów fagowych. W przypadku białek kapsydu fagów Q β , f2 i R 17, których sekwencja aminokwasowa jest znana (59, 126, 127), wyniki badań struktury pierwszorzędowej RNA potwierdzają słuszność ustaleń sekwencji aminokwasów a zatem bezpośrednio potwierdzają prawdziwość kodu genetycznego. Podobną zgodność sekwencji aminokwasowych i nukleotydowych stwierdzono w przypadku N-końcowego tetrapeptydu Pro-Liz-Leu-Pro- dla białka dojrzewania Q β (104) oraz pierwszych dwupeptydów pozostałych białek (103); kolejność dalszych aminokwasów wydedukowano w oparciu o oznaczoną sekwencję nukleotydów.

Jak widać na schemacie 1, inicjacyjny kodon AUG znajduje się mniej więcej w środku każdego ochranianego przez rybosom fragmentu. Od N-formylometioniny rozpoczyna się też synteza każdego z omawianych białek. Żaden z kodonów AUG dla N-formylometioniny nie jest bezpośrednio poprzedzony kodonem terminalnym.

Podane na schemacie 1 sekwencje nukleotydowe potwierdzają ostatecznie, że między poszczególnymi cistronami istnieją fragmenty nietłumaczone przez rybosomy. Być może, fragmenty te decydują o tym, że określona trójka AUG jest rozpoznawana przez rybosomy jako kodon inicjacyjny; o dołączeniu się rybosomu mogłaby decydować struktura pierwszo- lub drugorzędowa tych fragmentów (108). Ze schematu 1 wynika, że wspólną sekwencją dla miejsc inicjacyjnych białek kapsydu fagów Q β , R 17 i f2 oraz polimerazy faga R 17 jest UUUGA. Miejsca inicjacyjne dla białek dojrzewania R 17 i Q β oraz dla polimerazy Q β nie zawierają jednak tego pięcionukleotydu. Staples i wsp. (103, 104) zwrócili uwagę,

że wspólną sekwencją dla miejsc inicjacyjnych obu polimeraz (R 17 i Q β) jest AGGAU, a w miejscu inicjacyjnym dla białka dojrzewania faga Q β znajduje się sekwencja UAAGAGG bardzo zbliżona do sekwencji UAGGAGG w RNA R 17.

Z powyższych rozważań wynika, że dla wszystkich fragmentów inicjacyjnych nie ma wspólnej sekwencji poprzedzającej trójkę AUG, odpowiedzialnej za przyłączenie rybosomu. Odmienność tych sekwencji byłaby uzasadniona w świetle ostatnich doniesień o heterogenności fatora F₃, odpowiedzialnego bezpośrednio za przyłączanie podjednostki rybosomalnej 30S do naturalnego mRNA (6).



Schemat. 2. Proponowana struktura drugorzędowa dla fragmentu inicjacyjnego cistronu białka kapsydu faga R 17 (wg 108).

Gupta i wsp. (40) zwrócili uwagę, że występująca w miejscach inicjacyjnych dla białek kapsydów fagów f2 i R 17 sekwencja GUUUGAA jest komplementarna do fragmentu UAAAC Ψ T znajdującego się w tRNA_F^{met} z *Escherichia coli* (23). Trudno w tej chwili powiedzieć, czy ma to rzeczywiście jakieś znaczenie w powstawaniu kompleksu inicjującego syntezę łańcucha polipeptydowego, czy też jest to zbieżność zupełnie przypadkowa.

Steitz stwierdziła (108), że fragment inicjacyjny cistronu białka kapsydu faga R 17 można przedstawić w formie pętli, w której większość nukleotydów jest sparowana (schemat 2). Kodon AUG znajdowałby się na szczycie tej pętli, co mogłoby tłumaczyć fakt tak łatwego rozpoznawania go przez rybosom.

Interesującą metodę oznaczania sekwencji nukleotydowych RNA faga Q β stosują badacze z grupy Weissmanna (7, 38). Wykorzystują oni do badań wysokoznakowane ³²P fragmenty RNA Q β syntetyzowane *in vitro* na matrycy nici komplementarnej (—) przy użyciu oczyszczonego preparatu

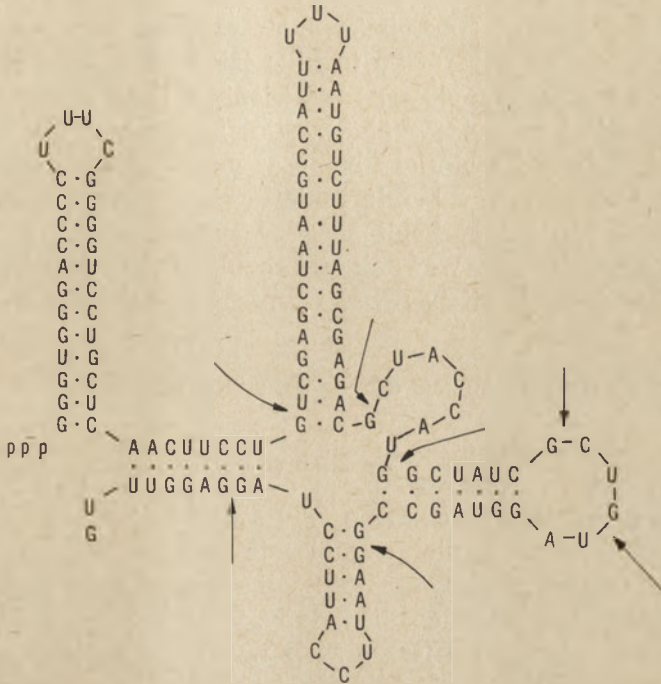
polimerazy RNA faga Q β . W warunkach zapewniających synchroniczną syntezę nici (+) można w miarę przedłużania czasu działania enzymu otrzymywać coraz to dłuższe znakowane fragmenty fagowego RNA. Posługując się tą metodą grupa Weissmanna (7, 38, 104) przeprowadziła oznaczenie sekwencji ponad 300 kolejnych nukleotydów końca 5' RNA faga Q β . Fragment ten zawiera 10 potencjalnych kodonów inicjacyjnych: 6 kodonów AUG (rozpoczynających się w pozycjach 62, 102, 114, 212, 227, 318) oraz 4 kodony GUG (w pozycjach 78, 172, 192, 194). Jeden z nich powinien być kodonem inicjacyjnym dla białka dojrzewania. Staples i wsp. (104) stwierdzili, że jest nim pierwszy kodon AUG rozpoczynający się od 62 nukleotydu i że rybosom inicjujący syntezę białka dojrzewania ochrania swoją strukturą nukleotydy od 52 do 77 licząc od końca 5' cząsteczki RNA. Rola poprzedzających 61 nukleotydów nie jest w tej chwili wyjaśniona. Dalsze wspomniane kodony AUG oraz GUG są najprawdopodobniej zwykłymi strukturalnymi kodonami cistronu białka dojrzewania.

W pracowni Sangera w Cambridge bardzo zaawansowane są badania nad strukturą pierwszorzędową RNA faga R 17 (97). Do chwili obecnej, poza sekwencjami przedstawionymi na schemacie 1 oznaczono kolejność nukleotydów fragmentów cistronu białka kapsydu odpowiadających aminokwasom: od 33 do 52 (52), od 57 do 85 (52) oraz od 81 do 99 (3). Interesujące jest, że wszystkie te poznane dotychczas sekwencje dają się przedstawić w formie pętli o znacznym stopniu struktury drugorzędowej. Dla RNA faga R 17 (2) oraz f2 (63) oznaczono również kolejność 74 nukleotydów od końca 5' RNA. Cory i wsp. (18) określili natomiast 3'-końcową sekwencję RNA R 17 o długości 51 nukleotydów.

Grupa Fiersa (17, 22, 31, 32, 78, 79) bada sekwencje nukleotydowe w RNA faga MS 2, który jest bardzo blisko spokrewniony z fagami R 17 i f2. Najbardziej interesującym z poznanych przez nich fragmentów, jest 5'-końcowy odcinek RNA o długości 125 nukleotydów (22). Sześć ostatnich nukleotydów leżących na końcu 3' tego fragmentu ma taką samą sekwencję co początek miejsca inicjacyjnego dla białka dojrzewania faga R 17 zbadanego przez Steitz (108). Dzięki temu ustalono, że w RNA fagów R 17 i MS 2 pierwszym kodonem AUG odczytywanym przez rybosomy jest kodon rozpoczynający się od 130-go nukleotydu mimo, że bliżej końca 5' RNA znajdują się jeszcze trzy inne kodony AUG i jeden GUG (97). Schemat 3 przedstawia proponowaną strukturę drugorzędową 5'-końcowego fragmentu RNA faga MS 2.

Badacze z tej samej grupy oznaczyli również (17) sekwencję 104 nukleotydów znajdujących się na końcu 3' RNA faga MS 2. Sekwencja ta zawiera cztery potencjalne kodony terminalne: dwa UAA oraz dwa UAG. Ponieważ jednak nie znana jest sekwencja aminokwasowa polimerazy, nie wiadomo czy fragment ten odpowiada rzeczywiście końcowemu odcinkowi cistronu dla tego enzymu.

Na VII Zjeździe FEBS w Warnie Haegeman i wsp. (43) zakomunikowali o oznaczeniu sekwencji całego cistronu białka kapsydu MS 2 wraz z przylegającymi do niego z obu końców fragmentami (w sumie około 550 nukleotydów). Dla cistronu tego zaproponowali oni model struktury drugorzędowej wyjaśniający między innymi zjawisko polarności oraz tłumaczący dlaczego mutanty terminalne amber w cistronie kapsydu powstają tylko w określonych pozycjach. W modelu tym około 75% nukleotydów połączonych jest wiązaniami wodorowymi w struktury dwuniciowe.



Schemat. 3. Proponowana struktura drugorzędowa dla 5'-końcowego fragmentu RNA faga MS2.

Strzałki wskazują miejsca wrażliwe na działanie rybonukleazy T₁ (wg 22).

Interesujące jest porównanie sekwencji nukleotydowych odpowiadających sobie fragmentów RNA pochodzących z różnych bakteriofagów (31, 88, 97). Ogólnie można powiedzieć, że różnice we fragmentach nieczytanych przez rybosomy (sekwencje 5'- i 3'-końcowe oraz międzycistronowe) są znacznie mniejsze niż we fragmentach kodujących aminokwasy. Zachowanie tego samego układu nukleotydów we fragmentach nietłumaczonych świadczy, że odgrywają one z pewnością jakąś rolę w biosyntezie fagowych białek i RNA. Różnice we fragmentach tłumaczonych przez rybosomy dotyczą zwykle ostatniego, trzeciego miejsca w poszczególnych kodonach, co nie wpływa zazwyczaj na sekwencję aminokwasów kodowanych przez nie białek.

Przegląd trypletów wykorzystywanych do kodowania polipeptydów przez RNA małych bakteriofagów (31, 97) prowadzi do wniosku, że pewne kodony występują w obrębie poszczególnych cistronów znacznie częściej od innych. Nie wiadomo jednak, czy zjawisko to odgrywa jakąś rolę w regulacji translacji fagowego mRNA.

III. Mechanizmy regulacji syntezy białek fagowych

Jak już wspomniano trzy białka syntetyzowane pod wpływem fagowego RNA tworzone są zarówno *in vivo* jak i *in vitro* w różnych ilościach. Białko kapsydu odnajdywane w wirionie w ilości 180 moli/mol RNA, syntetyzowane jest najintensywniej, zaś białko dojrzewania, występujące w kapsydzie w ilości 1 mol/mol RNA oraz polimeraza RNA nie wcielana do kapsydu powstają w znacznie mniejszych ilościach. Ponieważ RNA fagowe zawiera po jednej kopii każdego spośród trzech genów muszą zatem istnieć mechanizmy wewnętrznej regulacji translacji tego RNA decydujące o różnicach w intensywności syntezy poszczególnych białek.

1. Polarność translacji jako funkcja dostępności miejsc inicjacyjnych w obrębie RNA

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za zróżnicowany poziom syntezy białek fagowych ma być mechanizm polarności translacji. W 1963 roku Othaka i Spiegelman (89) stwierdzili, że *in vitro*, synteza białek fagowych przebiega nierównomiernie w czasie. W ciągu pierwszych trzech minut inkubacji ekstraktu z *E. coli* wzbogaconego fagowym RNA, powstają białka nie zawierające histydyny. Od syntezy tych białek zależy włączanie histydyny, które jest przede wszystkim miarą syntezy polimerazy fagowego RNA. Wykazano bowiem, że po wycofaniu histydyny z pożywki w ekstraktach z bakterii zakażonych fagiem nie pojawia się aktywność fagowej polimerazy RNA (70).

Na zależność syntezy polimerazy RNA od syntezy białka płaszczka wskazują też badania produktów powstających *in vitro* w obecności RNA ze zmutowanych fagów. RNA takie zawierało w różnych pozycjach cistronu białka płaszczka terminalne kodony amber. Fagowe RNA mające mutację amber w siódmym kodonie kapsydu (mutant sus 3) stymuluje syntezę sześćiopeptydu rozpoczynającego się N-końcowym aminokwasem białka kapsydu (128). Tak zmutowane RNA nie stymuluje syntezy polimerazy RNA, podczas gdy RNA z mutacją amber w siedemdziesiątym kodonie tego samego cistronu, wywołuje syntezę fagowej polimerazy (28, 42, 139). Wyniki te potwierdzili Tooze i Weber (115) stosując mutanty amber w obrębie cistronu białka kapsydu otrzymane działaniem kwasu azotawego i 5'-fluorouracylu. Fagi z mutacją amber w siódmym kodonie cis-

tronu białka kapsydu zakażają komórki bakterii niesupresorowych wywołując syntezę tylko nikłych ilości fagowej polimerazy RNA, zaś fagi z mutacją amber w kodonach 50, 54 i 70 syntetyzują aktywnie fagową polimerazę RNA.

Zjawiska polarności polegające na wpływie syntezy białka kapsydu na syntezę polimerazy RNA, można tłumaczyć w klasyczny sposób zakładając, że rybosom przesuując się po nici policistronowego mRNA bierze udział w translacji kolejnych cistronów. Obniżona stabilność kompleksu pomiędzy nieodeczytywanym międzycistronowym fragmentem mRNA a rybosomem może być przyczyną zmniejszenia ilości rybosomów zbliżających się do następnego sygnału inicjacyjnego i powodować obniżenie intensywności translacji kolejnego cistronu (77). Przeciwnie takiemu tłumaczeniu przemawia jednak ustalona ostatecznie kolejność genów w obrębie RNA fagowego oraz mechanizmy towarzyszące odczytywaniu kodonu terminalnego. Oprócz bowiem odpadnięcia od rybosomu uformowanego polipeptydu (11) również i sam rybosom odpada od nici mRNA po odczytaniu trypletu terminalnego (130, 131).

Inne tłumaczenie różnic w intensywności syntezy poszczególnych białek fagowych i zjawiska polarności translacji zakłada istnienie w fagowym RNA trzech odrębnych miejsc inicjacyjnych w różnym stopniu dostępnych dla rybosomów ze względu na rozbudowaną strukturę II-gorzędową fagowego RNA. Rozfałdowanie RNA przez rybosomy przesuujące się w procesie translacji wzdłuż cistronu białka kapsydu powoduje odsłonięcie miejsca inicjacyjnego następnego cistronu (41, 42, 139).

Za taką możliwością przemawia spostrzeżenie, że synteza białka dojrzewania i białka kapsydu zachodzą niezależnie od siebie. Tak więc synteza białka kapsydu wywierałaby polarny wpływ wyłącznie na syntezę polimerazy RNA. Bliższe wniknięcie w mechanizm regulacji syntezy poszczególnych białek faga stało się możliwe dzięki zastosowaniu do znakowania tych białek N-formylo (^{35}S) metionylo-tRNA. W tych warunkach, zgodnie z danymi dotyczącymi mechanizmu inicjacji (1, 76, 84, 122, 128) powinny znakować się wyłącznie N-końcowe fragmenty powstających białek. Po trawieniu produktów syntezy trypsyną i chymotrypsyną otrzymuje się znakowane N-końcowe oligopeptydy, które rozdziela się elektroforetycznie. Oznaczenie ich sekwencji pozwala przypisać określony peptyd właściwemu białku fagowemu a oznaczenie wzajemnych stosunków ilościowych wskazują na poziom inicjacji syntezy poszczególnych białek fagowych. Tą metodą *Lodish* (64, 65) ustalił, że inicjacja syntezy białka dojrzewania i białka kapsydu następuje w tym samym momencie, zaś inicjacja polipeptydu polimerazy RNA opóźniona jest o około 2—3 minuty. Omówione doświadczenia dowodzą też, że zainicjowanie translacji może nastąpić w partiach wewnętrznych nici mRNA a niekoniecznie w pobliżu końca 5', co zgadza się z wcześniejszymi sugestiami *Bretschera* (11, 12, 13).

Zależność między syntezą białka kapsydu i polipeptydu polimerazy

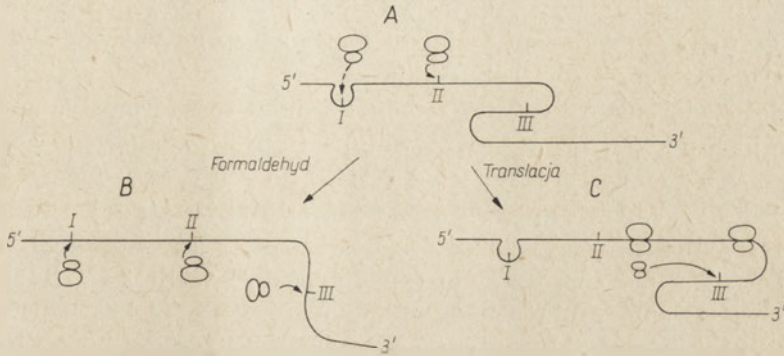
RNA zanika po fragmentacji cząsteczek fagowego RNA. Wykazał to Lodish (64, 65) izolując RNA z mutantów fagowych, niezdolnych do syntezy białka dojrzewania. W tych warunkach RNA wiriona jest częściowo nieosłonięty i ulega ograniczonej hydrolizie przez nukleazy komórkowe (4). Po odbiałczeniu takich fagów fenolem, otrzymuje się rozfragmentowany RNA, przy czym z mieszaniny można wyizolować fragment o stałej sedymentacji 14S, zawierający koniec 3' (66). Fragment ten nie wywołuje *in vitro* syntezy białka kapsydu, stymulując jednocześnie włączanie histydyny obecnej w polimerazie RNA. Synteza polipeptydu polimerazy w obecności tego fragmentu nie wykazuje cech polarności (65, 72, 73). Tak więc na nienaruszonej cząsteczce RNA inicjacja translacji cistronu polimerazy RNA utrudniana jest zawadą przestrzenną wywołaną obecnością cistronu białka kapsydu.

Jeśli teza o wpływie struktury II-gorzędowej RNA na intensywność translacji poszczególnych genów jest słuszna, to zastosowanie czynników rozplatających dwuniciowe fragmenty kwasu nukleinowego (podwyższona temperatura, dializa do buforów o niskiej sile jonowej) powinno w wyraźny sposób odbić się na poziomie syntezy poszczególnych białek. I rzeczywiście, jeśli inkubację ekstraktów bezkomórkowych wzbogaconych w fagowe RNA prowadzono w temperaturze 49°, to choć ogólny poziom syntezy białek spadał, jednakże inicjacja polipeptydu polimerazy RNA w stosunku do inicjacji białka kapsydu była wyższa niż podczas inkubacji w temperaturze 37°. Również w wypadku RNA mutantu fagowego sus 3 zawierającego mutację amber w siódmym kodonie cistronu białka płaszcza efekt polarny osłabiający syntezę polipeptydu polimerazy RNA obserwowany w 37° zanikał w 49° (72, 73).

Ze względu na znaczną tendencję RNA fagowego do renaturacji, trwałe zmiany jego II-gorzędowej struktury uzyskuje się dopiero w wyniku reakcji z formaldehydem (8, 37, 109). Fagowe RNA, w którym 5% struktury II-gorzędowej zostało zniszczone działaniem formaldehydu stymulowało *in vitro* w dalszym ciągu inicjację translacji trzech białek fagowych lecz w zmienionych proporcjach. Inicjacja polipeptydu polimerazy RNA wzrosła pięciokrotnie, białka dojrzewania — dwukrotnie, zaś białka kapsydu pozostawała taka sama jak w przypadku natywnego mRNA (69, 72). Na podstawie omówionych doświadczeń Lodish i Robertson (72) zaproponowali przedstawiony na schemacie 4 model tłumaczący wpływ struktury II-gorzędowej fagowego RNA na wydajność translacji poszczególnych cistronów. Model ten znajduje poparcie w pracy Fukami i Imahori (35) gdzie RNA o zmienionej strukturze II-gorzędowej, wskutek długotrwałej dializy do roztworów wersenianu, stymulowało syntezę podwyższonych ilości polimerazy RNA.

Omówiony schemat może tłumaczyć wyłącznie procesy obserwowane przy translacji fagowego RNA *in vitro*, bowiem *in vivo*, w początkowym okresie po infekcji i zahamowaniu syntezy białek bakteryjnych, nie obser-

wuje się opóźnienia we włączaniu histydyny w stosunku do innych aminokwasów, przy czym pierwszym powstającym białkiem fagowym jest polimeraza RNA. Kompletne białko kapsydu pojawia się w komórkach gospodarza w późniejszym okresie (26, 34, 119, 120, 121). Kolejność syn-



Schemat 4. Wpływ struktury II-gorzędowej RNA na inicjację translacji poszczególnych białek fagowych (wg 72 z modyfikacjami)

Fragmenty inicjacyjne cistronów oznaczono: I — białka dojrzewania, II — białka kapsydu, III — polimerazy RNA

A. RNA natywne wykazuje wysoki stopień uporządkowania. Fragment RNA odpowiedzialny za inicjację syntezy białka kapsydu jest łatwo dostępny i łatwo dołącza rybosomy. Fragment inicjujący translację białka dojrzewania jest ukryty w strukturze II-gorzędowej. Fragment inicjujący syntezę polipeptydu polimerazy RNA zakryty jest przez część cistronu białka płaszczka

B. Po potraktowaniu RNA formaldehydem i zniszczeniu struktury II-gorzędowej, wszystkie miejsca inicjacyjne dostępne są w równym stopniu

C. W procesie translacji, niewielka ilość rybosomów może dołączać się do miejsca inicjującego syntezę białka dojrzewania. Znaczna ilość rybosomów może inicjować syntezę białka kapsydu, natomiast miejsce inicjacji polipeptydu polimerazy RNA ujawnia się dopiero podczas translacji genu płaszczka

tezy białek fagowych *in vivo* jest identyczna z kolejnością wnikania poszczególnych cistronów RNA do komórki gospodarza w procesie infekcji (86) i nie wydaje się być wyłącznie określona własnościami struktury II-gorzędowej. Skłania to do wniosku, że obok struktury II-gorzędowej istnieją jeszcze inne czynniki modulujące syntezę białek fagowych.

2. Białko kapsydu jako modulator poziomu translacji cistronu polimerazy RNA

Infekcja bakterii szczepami fagowymi posiadającymi mutację amber w dalszych pozycjach cistronu białka kapsydu nie tylko nie obniża syntezy fagowej polimerazy RNA jak to ma miejsce przy infekcji szczepem sus 3, ale wprost przeciwnie podnosi jego syntezę (70, 71). Na tej podstawie Lodish i Zinder (74) wysnuli wniosek, że ukończone białko kapsydu jest inhibitorem syntezy polimerazy RNA. Podobny pogląd wyrazili Vinuela i wsp. (119, 121) oraz Nathans i wsp. (86), na pod-

stawie śledzenia syntezy białek fagowych po zakażeniu komórek różnymi zmutowanymi szczepami faga. Vinuela i wsp. wykazali, że po zakażeniu bakterii niesupresorowych szczepem faga mu 9 (mutacja amber w siedemdziesiątym kodonie cistronu białka kapsydu) ilość zsyntetyzowanego polipeptydu polimerazy jest większa niż przy zakażeniu szczepem dzikim (119). Można to tłumaczyć represją translacji cistronu polimerazy RNA przez w pełni uformowane białko kapsydu, syntetyzowane wyłącznie w przypadku infekcji szczepem dzikim (120).

Te doświadczenia o charakterze genetycznym zasugerowały, że również *in vitro* białko kapsydu może wpływać na translację fagowego RNA. Jak wykazali Sugiyama i Nakada (112) po zmieszaniu fagowego RNA z białkiem kapsydu w stosunku molowym 1:10 powstaje tak zwany kompleks I sedymentujący podobnie jak natywne RNA. Stosunek molowy między RNA a białkiem kapsydu w kompleksie I wynosi 1:6 (111). Kompleks I *in vitro* stymuluje wyłącznie powstawanie białka kapsydu (24, 113). Jeśli fagowe RNA kompleksować z dużymi ilościami białka kapsydu, to tworzy się tak zwany kompleks II sedymentujący podobnie jak wirion. Kompleks ten nie stymuluje włączania aminokwasów (111, 113). Specyfika blokowania matrycowych własności fagowego RNA przez niskie stężenia białka kapsydu jest dość wysoka; białko kapsydu bowiem nie wpływa na translację poli U i RNA wirusa mozaiki tytoniowej (110, 111, 112). Jednocześnie białko kapsydu w tworzeniu kompleksu I nie jest zastępowane przez inne białka zasadowe (124), a nawet przez białko kapsydu odmiennych serologicznie fagów RNA (94). Hamowanie syntezy polimerazy RNA przez niskie stężenie białka fagowego związane jest z osłonięciem przez dodane białko fragmentu mRNA. Po ekstrakcji fenolem uformowanego *in vitro* kompleksu I uzyskuje się nienaruszone RNA fagowe aktywnie stymulujące syntezę wszystkich trzech białek fagowych (25).

Dalsze fakty dotyczące mechanizmu hamowania syntezy polimerazy RNA przez białko kapsydu przedstawili Ward i wsp. (123). Wykazali oni, że na początku inkubacji *in vitro* w okresie najintensywniejszej syntezy białka kapsydu, fagowe RNA odnajdywane jest w rejonie monosomów lub disomów. Później, gdy następuje aktywna synteza polimerazy RNA, pojawiają się cięższe polisomy, znakujące się radioaktywną histydyną. Kompleks I dodany do układu, stymulujący wyłącznie syntezę białka kapsydu, bierze udział w tworzeniu jedynie lżejszych polisomów, zawierających 1—2 rybosomy.

Zdaniem Sugiyamy również *in vivo* syntetyzowane w komórce białko kapsydu jest modulatorem translacji fagowego RNA i bierze udział w tworzeniu struktur zbliżonych do kompleksu I (110).

Według Eggen i Nathansa (25), o wiązaniu białka kapsydu w kompleksie I może decydować specyficzna sekwencja fragmentu RNA leżącego w okolicy istotnej dla inicjacji syntezy polimerazy RNA lub też własności struktury II-gorzędowej RNA. Za pierwszą możliwością przema-

wiają wyniki L o d i s h a (65, 67, 72) wskazujące, że białko płaszczu wiąże się najprawdopodobniej z tym samym fragmentem cistronu polimerazy RNA co rybosom inicjujący translację tego cistronu. Co więcej, białko kapsydu hamuje inicjację polipeptydu polimerazy RNA obserwowaną w obecności fragmentu RNA o stałej sedymentacji 14S (patrz str. 606), którego struktura II-gorzędowa powinna być inna niż nienaruszonej cząsteczki RNA. Próby wyizolowania fragmentu RNA wiążącego białko kapsydu nie zostały jednak uwieńczone powodzeniem (125).

Inny pogląd reprezentują S p a h r i wsp. (101, 102), którzy po rozbiściu RNazą IV fagowego RNA na dwie części badali kinetykę wiązania białka kapsydu przez nieuszkodzone RNA i oba fragmenty cząsteczki. Wykazali oni, że krzywa przedstawiająca zależność między ilością dodanego białka kapsydu a ilością tego białka wiążanego w postaci kompleksu z natywnym fagowym RNA jest dwuskładnikowa. Pierwsze porcje białka wiązane są intensywnie przez RNA co odpowiada tworzeniu się kompleksu I. Następne porcje wiązane są wolniej; odpowiada to powstaniu kompleksu II.

Analiza krzywych wykazuje, że w obecności w mieszaninie soli magnezu stosunek molowy białka do RNA w kompleksie I wynosi 1. Przebieg krzywych i stechiometria w obrębie kompleksu I są identyczne w przypadku użycia natywnego RNA i większego z opisanych fragmentów cząsteczki, zawierającego cistron polimerazy RNA. Jednakże zdaniem S p a h r a i wsp. (101) o możliwości tworzenia kompleksu decyduje nie tylko specyficzna sekwencja fragmentu RNA ale i określona konformacja cząsteczki kwasu nukleinowego.

3. Rola dwuniciowych form fagowego RNA w procesie translacji; białko kapsydu jako represor replikacji RNA

Synteza białek w komórkach bakteryjnych zachodzi na niciach mRNA związanych z DNA w kompleksie transkrypcyjnym (83). Podobny mechanizm proponowany jest w przypadku syntezy białek fagowych gdzie *in vivo* funkcje mRNA miałyby pełnić niesparowane fragmenty nici (+) związane z kompleksami replikującymi fagowe RNA (33, 136).

Pogląd ten sugerują H o t h a m - I g l e w s k i i F r a n k l i n (50), którzy dowodzą, że w polisomach izolowanych z komórek bakteryjnych zakażonych fagiem występuje znaczna ilość opornego na RNazę dwuniciowego RNA pochodzenia fagowego. Kolejne badania wykazały, że w 25 minut po infekcji gdy trwa jeszcze intensywne synteza fagowego RNA, prawie całość dwuniciowego RNA występuje w postaci pośrednich form replikacyjnych odnajdywanych przede wszystkim w obrębie polisomów (49).

Analiza występowania poszczególnych form RNA w podfrakcjach komórkowych wskazuje (tablica 2), że w 25 minut po infekcji, w komórkach

przeważają krótkie polisomy, co jest charakterystyczne dla syntezy białek fagowych. Istotnym jest spostrzeżenie, że jednoniciowy RNA fagowy nie występuje we frakcji polisomalnej i zlokalizowany jest przede wszystkim w okolicy, w której sedimentują cząstki wirusowe. Sugeruje to, że formy jednoniciowe powstające w komórce gospodarza, przynajmniej w późniejszym okresie po zakażeniu, nie biorą udziału w syntezie białek fagowych. Są one obudowywane białkiem kapsydu z utworzeniem form zbliżonych do kompleksu II opisanego przez Sugiyamę i wsp. (111) lub do dojrzałych wirionów.

Tablica 2

Występowanie form jednoniciowych i dwuniciowych fagowego RNA we frakcjach ekstraktu bezkomórkowego z zakażonych bakterii *E. coli* (wg 49)*

Frakcja	RNA we frakcji			
	całkowita zawartość	Fagowe RNA		
		RI	RF	nić (+)
I. Najcięższe polisomy (12 rybosomów)	7,6	3,0	0,0	0,0
II. Polisomy (8—11 rybosomów)	10,6	4,0	0,0	0,0
III. Polisomy (6—7 rybosomów)	9,0	2,0	0,0	0,0
IV. Polisomy (4—5 rybosomów)	8,0	0,9	0,0	0,0
V. Polisomy (2—3 rybosomy)	15,5	1,1	0,0	0,0
VI. 84S (wirus)	4,0	0,0	0,0	0,8
VII. 70S (rybosomy)	4,7	0,2	0,0	0,4
VIII. 50, 30S (podjednostki rybosomowe)	14,7	1,3	0,0	0,9
IX. Supernatant (27S)	25,0	0,0	0,0	0,0

RI — pośrednia forma replikacyjna RNA fagowego — forma dwuniciowa z wolnymi niesparowanymi fragmentami.

RF — forma replikacyjna RNA fagowego — forma dwuniciowa, w której nić (+) sparowana jest na całej długości z nicią (—).

* — wartości podane w rubrykach wyrażone są w % ogólnego RNA komórkowego.

W pracowni Zindera przeprowadzono badania nad udziałem dwuniciowych form replikacyjnych fagowego RNA w biosyntezie białka. Formy takie, izolowane z komórek bakteryjnych zakażonych fagiem f2, po dodaniu do ekstraktu bezkomórkowego stymulowały syntezę wyłącznie białka kapsydu (27). Można to tłumaczyć tym, że w omawianych formach dwuniciowych istnieją rozległe odcinki niesparowane z nicią (—) odpowiadające leżącym od końca 5' częściom nici (+) zawierającym cistron białka kapsydu. I rzeczywiście, na końcu 5' niesparowanej nici stwierdzono występowanie tetrafosforanu guanozyny (pppGp), charakterystycznego dla tego końca wolnej nici (+) fagowego RNA (63, 95).

W kontekście omówionych wyników zaproponowano odmienne niż dotychczas pojmowanie mechanizmu hamowania syntezy polimerazy RNA przez białko kapsydu. Robertson, Webster i Zinder (94) wy-

kazali, że białko płaszczka tworzy kompleks nie tylko z jednoniciową formą fagowego RNA, ale też i z dwuniciowymi pośrednimi formami replikacyjnymi (RI). Ten ostatni kompleks jest zapewne bardziej specyficzny, bowiem dwuniciowy RNA nawet w obecności nadmiaru jednoniciowego wiążąc białko kapsydu. Autorzy ci postulują, że białko płaszczka wiążąc się z kompleksem replikacyjnym, pełni funkcje już nie modulatora translacji lecz represora hamując w procesie replikacji RNA tworzenie się na matrycy nici (—) fragmentu nici (+) odpowiadającego cistronowi polimerazy RNA. Kompleksy replikacyjne, w obrębie których synteza tego cistronu jest zahamowana, będą posiadać fragmenty nici (+) niosące informację dotyczącą przede wszystkim syntezy białka płaszczka. Dalszym rozwinięciem tych poglądów jest praca Robertsona i Lodisha (93), w której zbadano rodzaj peptydów syntetyzowanych *in vitro* w obecności pośrednich form replikacyjnych. Okazało się, że w obecności tych form, inicjowana jest synteza wszystkich trzech białek fagowych, ale jedynym ukończonym produktem jest białko kapsydu. W przeliczeniu na ilość RNA, formy replikacyjne aktywniej inicjują syntezę białka dojrzewania i polipeptydu polimerazy RNA niż normalne jednoniciowe fagowe RNA. Można to tłumaczyć przyjmując, że tworzące się w kompleksie replikacyjnym fragmenty nici (+) mają nie w pełni uformowaną strukturę II-gorzędową, co ułatwia inicjację obu polipeptydów. Ponieważ poziom inicjacji syntezy białka dojrzewania w tych doświadczeniach był identyczny z poziomem jego syntezy *in vivo* i około dziesięciokrotnie wyższy niż w warunkach *in vitro* w obecności w pełni uformowanych nici (+), autorzy sugerują, że pośrednie formy replikacyjne RNA są strukturami odpowiedzialnymi *in vivo* za syntezę białka dojrzewania i białka kapsydu.

Istnienie kompleksów między pośrednimi formami replikacyjnymi i białkiem kapsydu potwierdzili Knolle i Hohn (56). Wykazali oni, że w wiązaniu białka kapsydu biorą udział wyłącznie fragmenty nici (+) niesparowane z nicią (—).

Ciekawym uzupełnieniem omawianego hipotetycznego mechanizmu łączącego proces translacji z procesem replikacji fagowego RNA jest wniosek Kaertera (54), że synteza białek fagowych w komórce gospodarza zależy od procesu transkrypcji fagowego RNA.

Warto też wspomnieć o doniesieniu z pracowni Franklina (116), gdzie po zakażeniu komórek bakteryjnych fagiem, w obecności rifampicyny hamującej syntezę białek gospodarza (44) badano rodzaj białek występujących w poszczególnych frakcjach polisomowych. Okazało się, że w każdej z klas polisomów występowało zarówno białko kapsydu jak i polipeptyd polimerazy RNA. Autorzy omawianej pracy uważają, że polisomy biorące udział w syntezie białek fagowych powstają poprzez doczepianie się rybosomów do fragmentów nici (+) tworzących w kompleksie replikacyjnym. Kompleks taki zawierałby aktywną enzymatycznie polimerazę RNA, tworzone w jej obecności pośrednie formy replikacyjne (RI) oraz białko kap-

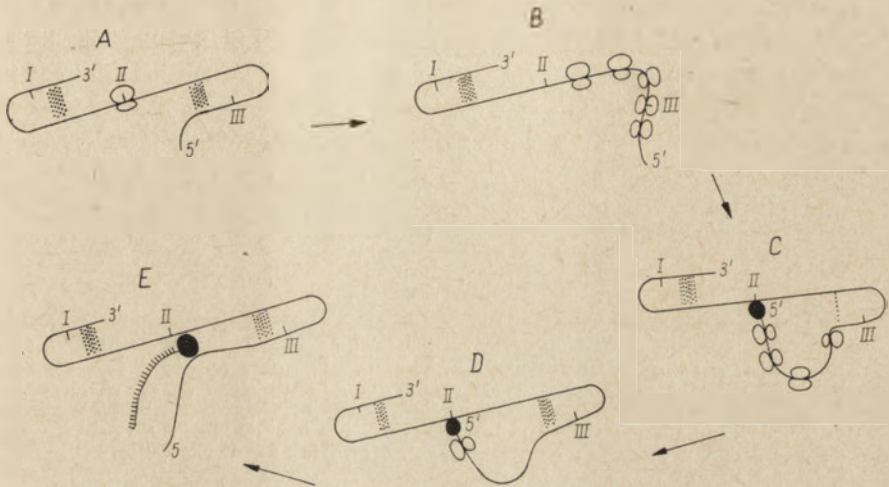
sydu, pełniące w obrębie kompleksu funkcje represorowe. Nie są to jednak wnioski jednoznaczne. Na przykład, w pracowni Weissmanna (30) wykazano, że dwuniciowe formy replikacyjne izolowane z zakażonych fagiem komórek nie są matrycami *in vitro* dla fagowej polimerazy RNA, a więc nie uczestniczą bezpośrednio w replikacji RNA. Co więcej formy te pojawiają się po ekstrakcji zakażonych komórek fenolem, nie występują zaś w nieodbielonych preparatach bezkomórkowych. Sugeruje to, że nici (+) i (—) podczas replikacji nie są ze sobą ściśle sparowane lecz oddzielone białkiem, najprawdopodobniej polimerazą RNA (10). Tak więc, choć wiele faktów doświadczalnych sugeruje udział form replikacyjnych w regulacji syntezy białek fagowych, to jednak zastrzeżenia metodyczne dotyczące rzeczywistego istnienia w komórce omawianych form RNA, nakazują ostrożność w interpretacji omawianych wyników.

4. Współzależność między transkrypcją i translacją fagowego RNA

Rozwój faga w komórce gospodarza związany jest z syntezą białek i fagowego RNA w określonych wzajemnych proporcjach. Mechanizm regulacji obu tych procesów omówionych w niniejszym i poprzedzającym artykule (136) został ostatnio zaproponowany przez Kolakofsky'ego i Weissmanna (57). Autorzy ci zwracają uwagę, że nić (+) fagowego RNA będąca matrycą w syntezie nici (—) pełnić może jednocześnie funkcję mRNA w procesie translacji. Zakłada to istnienie mechanizmów wzajemnej kontroli między procesem transkrypcji i translacji fagowego RNA. Podczas gdy polimeraza RNA syntetyzując nić (—) posuwa się po matrycy od końca 3' w kierunku końca 5' (5), to rybosomy biorące udział w syntezie białka, posuwają się po nici (+) w kierunku odwrotnym. Tak więc przesuwająca się po nici (+) polimeraza RNA może natknąć się na przeszkodę w postaci rybosomu i nie dokończyć syntezy nici (—) potrzebnej z kolei do syntezy potomnych nici (+) RNA. I rzeczywiście, w doświadczeniach, w których do syntezy fagowego RNA użyto jako matrycy kompleks utworzony z N-formylometionylo-tRNA, nici (+) i rybosomów, nie obserwowano syntezy fagowego RNA. Bakteryjne rybosomy w obecności N-formylometionylo-tRNA preferencyjnie tworzą kompleks z fragmentami cistronu odpowiedzialnymi za syntezę białka kapsydu (72, 96, 100). Ponieważ osłonięcie tego fragmentu RNA przez rybosom uniemożliwia transkrypcję, muszą istnieć mechanizmy zapobiegające temu zjawisku. Kolakofsky i Weissmann wykazali dalej, że nić (+) po inkubacji z wyizolowaną polimerazą RNA nie tworzy kompleksu inicjacyjnego z rybosomami. Znaczący to, że polimeraza RNA nie tylko wiąże się z końcem 3' nici (+), gdzie rozpoczyna się synteza nici komplementarnej, ale i jednocześnie osłania w środku nici (+) fragment inicjacyjny cistronu białka kapsydu. Poglądy te przedstawia schemat 5.

Zależność między translacją i transkrypcją fagowego RNA można za-

tem przedstawić następująco: synteza białek i RNA fagowego pozostają w stanie równowagi przy „nadmiernej” syntezie białek, powstająca w znacznych ilościach fagowa polimeraza RNA, blokuje doczepianie się rybosomów do nici (+), wycofuje ją z układu syntezy białka i rozpoczyna aktywną syntezę fagowego RNA. Przy „nadmiernej” syntezie RNA rybosomy ponownie doczepiają się do utworzonych nici (+), następuje synteza białek fagowych, przy czym powstające białko kapsydu blokuje cistron odpowiedzialny za syntezę polimerazy RNA obniżając w ten sposób poziom syntezy fagowego RNA.



Schemat 5. Wychwytywanie fagowego RNA przez polimerazę RNA (wg 57).

Fragmety inicjacyjne cistronów oznaczono: I — białka dojrzewiania, II — białka kapsydu, III — polimerazy RNA. Ciemne kółko oznacza uformowaną polimerazę RNA

A. Nici (+) fagowego RNA o rozbudowanej strukturze II-gorzędowej. Miejsca inicjujące translację białka A i polipeptydu polimerazy są niedostępne. Tworzenie kompleksu inicjującego translację polega na dołączeniu się rybosomu do jedynego eksponowanego miejsca inicjacji — początku genu białka kapsydu

B. Rybosomy przesuując się po nici RNA w kierunku od końca 5' do 3' syntetyzują białka kapsydu, czemu towarzyszy rozplecenie struktury II-gorzędowej i ujawnienie następnego miejsca inicjacyjnego oraz synteza polipeptydu polimerazy RNA.

C. Zsyntetyzowana polimeraza wiąże się z końcem 3' nici (+) jednocześnie blokując inicjacyjny fragment genu białka kapsydu. Następnym rybosomy nie mogą już inicjować syntezy białka kapsydu, struktura II-gorzędowa RNA częściowo się odtwarza.

D. Kolejno przesuujące się rybosomy dochodząc do kodonu terminalnego odpadają od nici RNA

E. Na uwolnionej od rybosomów nici RNA aktywna polimeraza zaczyna syntetyzować nić (-) przesuując się od końca 3' do końca 5'

Proponowany mechanizm pozwala zrozumieć pewne zjawiska uprzednio opisane w literaturze, lecz nie znajdujące odpowiedniego wytłumaczenia. I tak z prac nad syntezą *in vitro* infekcyjnego RNA fagowego wynikało, że polimeraza RNA wybiera jako matryce do syntezy nici (-) wyłącznie nieuszkodzone nici (+) (45). Jest to możliwe tylko wtedy, jeśli rzeczywiście miejsce przyczepu polimerazy do RNA nie ogranicza się tylko do fragmentu znajdującego się przy końcu 3' nici (+). Z kolei Sugiy-

a ma i wsp. (114) ustalili, że fag z mutacją amber w 70 kodonie cistronu białka kapsydu, nie syntetyzuje *in vivo* 70-cio aminokwasowego fragmentu białka kapsydu, choć RNA ekstrahowane z tego mutantu, w układzie *in vitro* stymuluje powstawanie takiego polipeptydu. Prawdopodobnie tworzony fragment białka kapsydu nie jest inhibitorem syntezy polimerazy RNA i powstająca w nadmiarze aktywna *in vivo* fagowa polimeraza RNA uniemożliwia inicjację syntezy fragmentu białka kapsydu.

Badania nad translacją i transkrypcją RNA fagowego wykazały wyraźnie, że ekspresja informacji genetycznej zawartej w kwasie nukleinowym faga jest funkcją nie tylko sekwencji nukleotydowej tego kwasu, ale i jego struktury II-gorzędowej. Wzajemne oddziaływanie między RNA i białkami fagowymi, zależne też, jak się wydaje, od struktury II-gorzędowej kwasu nukleinowego stwarza mechanizmy regulacyjne decydujące o prawidłowym przebiegu cyklu życiowego faga w komórce. Jest oczywiście dyskusyjne, czy dostrzeżone zależności między funkcją mRNA a jego strukturą II-gorzędową mają charakter ogólny, czy też dotyczą wyłącznie translacji RNA pochodzącego z omawianej grupy bakteriofagów.

LITERATURA

1. Adams J., Capecchi M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 147 (1966).
2. Adams J. M., Cory S., *Nature* **227**, 570 (1970).
3. Adams J. M., Jeppesen P. G. N., Sanger F., Barrell B. G., *Nature* **223**, 1009 (1969).
4. Argetsinger J. E., Gussin G. N., *J. Mol. Biol.* **21**, 421 (1966).
5. August J. T., *Nature* **222**, 121 (1969).
6. Berissi H., Groner Y., Revel M., *Nature (N. B.)* **234**, 44 (1971).
7. Billeter M. A., Dahlberg J. E., Goodman H. M., Hindley J., Weissmann C., *Nature* **224**, 1083 (1969).
8. Boedtke H., *Biochemistry* **6**, 2718 (1967).
9. Boedtke H., *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 448 (1971).
10. Borst P., Weissmann C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 982 (1965).
11. Bretscher M. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 131 (1968).
12. Bretscher M. S., *Nature* **220**, 1088 (1968).
13. Bretscher M. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 651 (1969).
14. Brownlee G. G., Sanger F., *J. Mol. Biol.* **23**, 337 (1967).
15. Brownlee G. G., Sanger F., *Eur. J. Biochem.* **11**, 395 (1969).
16. Capecchi M., *J. Mol. Biol.* **21**, 173 (1966).
17. Contreras R., Vandenberghe A., Min Jou W., De Wachter R., Fiers W., *FEBS Letters* **18**, 141 (1971).
18. Cory S., Spahr P. F., Adams J. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 1 (1970).
19. Dahlberg J. E., *Nature* **220**, 548 (1968).
20. Dahlberg J. E., cyt. wg (105).
21. De Wachter R., Fiers W., *Nature* **221**, 233 (1969).
22. De Wachter R., Marregaert J., Vandenberghe A., Contreras R., Fiers W., *Eur. J. Biochem.* **22**, 400 (1971).
23. Dube S. K., Marcker K. A., *Eur. J. Biochem.* **8**, 256 (1969).
24. Eggen K., Nathans D., *Federation Proc.* **26**, 449 (1967).

25. Eggen K., Nathans D., *J. Mol. Biol.* **39**, 293 (1969).
26. Eggen K., Oeschger M. P., Nathans D., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **28**, 587 (1967).
27. Engelhardt D. L., Robertson H. D., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 927 (1968).
28. Engelhardt D. L., Webster R. E., Zinder N. D., *J. Mol. Biol.* **29**, 45 (1967).
29. Enger M. D., Kaesberg P., *J. Mol. Biol.* **13**, 260 (1965).
30. Feix G., Slor H., Weissmann C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1401 (1967).
31. Fiers W., Contreras R., De Wachter R., Haegeman G., Merregaert J., Min Jou W., Vandenberghe A., *Biochimie* **53**, 495 (1971).
32. Fiers W., Lepoutre L., Vandenriessche L., *J. Mol. Biol.* **13**, 432 (1965).
33. Francke B., Hofschneider P. H., *J. Mol. Biol.* **40**, 45 (1969).
34. Fromageot H. P. M., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 184 (1968).
35. Fukami H., Imahori K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 570 (1971).
36. Garwes D., Sillero A., Ochoa S., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 166 (1969).
37. Gesteland R. F., Boedtker H., *J. Mol. Biol.* **8**, 496 (1964).
38. Goodman H. M., Billeter M. A., Hindley J., Weissmann C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 921 (1970).
39. Gould J. H., *J. Mol. Biol.* **29**, 307 (1967).
40. Gupta S. L., Chen J., Schaefer L., Lengyel P., Weissmann S. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **39**, 883 (1970).
41. Gussin G. N., *J. Mol. Biol.* **21**, 435 (1966).
42. Gussin G. N., Capecchi M. R., Adams M. J., Argetsinger J. E., Tooze J., Weber K., Watson J. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 257 (1966).
43. Haegeman G., Min Jou W., Contreras R., Fiers W., Abstr. VII FEBS Meeting p. 140, Varna 1971.
44. Hartmann G., Honikel K. O., Knusel F., Nuesch J., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 843 (1967).
45. Haruna I., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1189 (1965).
46. Hindley J., Staples D. H., *Nature* **224**, 964 (1969).
47. Horiuchi K., Matsuhashi S., *Virology* **42**, 49 (1970).
48. Horiuchi K., Webster R. E., Matsuhashi S., *Virology* **45**, 429 (1971).
49. Hotham-Iglewski B., *Nature* **219**, 700 (1968).
50. Hotham-Iglewski B., Franklin R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 743 (1967).
51. Isenberg H., Cotter R. I., Gratzer W. B., *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 184 (1971).
52. Jeppesen P. G. N., Nichols J. L., Sanger F., Barrell B. G., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 13 (1970).
53. Jeppesen P. G. N., Steitz J. A., Gesteland R. F., Spahr P. F., *Nature* **226**, 230 (1970).
54. Kaerner H. C., *J. Mol. Biol.* **42**, 259 (1969).
55. Kamen R., *Nature* **228**, 527 (1970).
56. Knolle P., Hohn T., *Eur. J. Biochem.* **16**, 19 (1970).
57. Kolakofsky D., Weissmann C., *Nature N. B.* **231**, 42 (1971).
58. Kondo M., Gallerani R., Weissmann C., *Nature* **228**, 525 (1970).
59. Konigsberg W., Maita T., Katze J., Weber K., *Nature* **227**, 271 (1970).

60. Konings R. N. H., Ward R., Francke B., Hofschneider P. H., *Nature* **226**, 604 (1970).
61. Lee J. C., Gilham P. T., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4000 (1965).
62. Lin J. Y., Tsung C. M., Fraenkel-Conrat H., *J. Mol. Biol.* **24**, 1 (1967).
63. Ling V., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 82 (1971).
64. Lodish H. F., *J. Mol. Biol.* **32**, 681 (1968).
65. Lodish H. F., *Nature* **220**, 345 (1968).
66. Lodish H. F., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 285 (1968).
67. Lodish H. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 127 (1969).
68. Lodish H. F., *Nature* **224**, 867 (1969).
69. Lodish H. F., *J. Mol. Biol.* **50**, 689 (1970).
70. Lodish H. F., Cooper S., Zinder N. D., *Virology* **24**, 60 (1964).
71. Lodish H. F., Horiuchi K., Zinder N. D., *Virology* **27**, 139 (1965).
72. Lodish H. F., Robertson H. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 655 (1969).
73. Lodish H. F., Robertson H. D., *J. Mol. Biol.* **45**, 9 (1969).
74. Lodish H. F., Zinder N. D., *J. Mol. Biol.* **19**, 333 (1966).
75. Loeb T., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 282 (1961).
76. Lucas-Lenard J., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1050 (1967).
77. Malamy M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 189 (1966).
78. Min Jou W., Fiers W., *J. Mol. Biol.* **40**, 187 (1969).
79. Min Jou W., Fiers W., Goodmann N., Spahr P., *J. Mol. Biol.* **42**, 143 (1969).
80. Min Jou W., Hindley J., Fiers W., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **76**, 194 (1968).
81. Mitra S., Enger M. D., Kaesberg P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 68 (1963).
82. Moore C. H., Farron F., Bohnert D., Weissmann C., *Nature N. B.* **234**, 204 (1971).
83. Morse D., Mosteller R., Baker R. F., Yanofsky Ch., *Nature* **223**, 40 (1969).
84. Nakamoto T., Kolakofsky D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 607 (1966).
85. Nathans D., Oeschger M. P., Eggen K., Shimura Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1844 (1966).
86. Nathans D., Oeschger M. P., Polmar S. K., Eggen K., *J. Mol. Biol.* **39**, 279 (1969).
87. Nichols J. L., *Nature* **225**, 147 (1970).
88. Nichols J. L., Robertson H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 676 (1971).
89. Othaka Y., Spiegelman S., *Science* **42**, 493 (1963).
90. Overby L. R., Barlow G. H., Doi R. H., Jacob M., Spiegelman S., *J. Bacteriol.* **91**, 442 (1966).
91. Rensing U., August J. T., *Nature* **225**, 853 (1969).
92. Rensing U., Barrell B. G., cyt. wg (97).
93. Robertson H. D., Lodish H. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 710 (1970).
94. Robertson H. D., Webster R. E., Zinder N. D., *Nature* **218**, 533 (1968).
95. Robertson H. D., Zinder N. D., *Nature* **220**, 69 (1968).
96. Roufa D. J., Skogerson L. E., Leder P., *Nature* **227**, 567 (1970).
97. Sanger F., *Biochem. J.* **124**, 833 (1971).
98. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G., *J. Mol. Biol.* **13**, 373 (1965).
99. Shimura Y., Kaizer H., Nathans D., *J. Mol. Biol.* **38**, 453 (1968).

100. Skogerson L., Roufa D., Leder P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 68, 276 (1971).
101. Spahr P. F., Faber M., Gesteland R. F., *Nature* 222, 455 (1969).
102. Spahr P. F., Gesteland R. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 876 (1968).
103. Staples D. H., Hindley J., *Nature N. B.* 234, 211 (1971).
104. Staples D. H., Hindley J., Billeter M. A., Weissmann C., *Nature N. B.* 234, 202 (1971).
105. Stavis R. L., August J. T., *Ann. Rev. Biochem.* 38, 527 (1969).
106. Steitz J. A., *J. Mol. Biol.* 33, 923 (1968).
107. Steitz J. A., *J. Mol. Biol.* 33, 937 (1968).
108. Steitz J. A., *Nature* 224, 957 (1969).
109. Strauss J. H., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* 7, 43 (1963).
110. Sugiyama T., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 687 (1969).
111. Sugiyama T., Hebert R. R., Hartman K. A., *J. Mol. Biol.* 25, 455 (1967).
112. Sugiyama T., Nakada D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 1744 (1967).
113. Sugiyama T., Nakada D., *J. Mol. Biol.* 31, 431 (1968).
114. Sugiyama T., Stone H. O., Nakada D., *J. Mol. Biol.* 42, 97 (1969).
115. Tooze J., Weber K., *J. Mol. Biol.* 28, 311 (1967).
116. Truden J. L., Franklin R. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 649 (1969).
117. Valentine R. C., Ward R., Strand M., *Advan. Virus Res.* 15, 1 (1970).
118. Van Montegu M., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 76, 393 (1968).
119. Vinuela E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 2303 (1968).
120. Vinuela E., Algranati I. D., Feix G., Garwes D., Weissmann C., Ochoa S., *Biochim. Biophys. Acta* 155, 558 (1968).
121. Vinuela E., Algranati I., Ochoa S., *Eur. J. Biochem.* 1, 3 (1967).
122. Vinuela E., Salas M., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 729 (1967).
123. Ward R., Konings R., Hofschneider P. H., *Eur. J. Biochem.* 17, 106 (1970).
124. Ward R., Shive K., Valentine R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 29, 8 (1967).
125. Ward R., Strand M., Valentine R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 39, 310 (1968).
126. Weber K., *Biochemistry* 6, 3144 (1967).
127. Weber K., Konigsberg W., *J. Biol. Chem.* 242, 3562 (1967).
128. Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 55, 155 (1966).
129. Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder N. D., Konigsberg W., *J. Mol. Biol.* 29, 27 (1967).
130. Webster R. E., Robertson H. D., Zinder N. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 675 (1969).
131. Webster R. E., Zinder N. D., *J. Mol. Biol.* 42, 425 (1969).
132. Weiner A. M., Weber K., *Nature New Biol.* 234, 206 (1971).
133. Weiner A. M., Weber K., cyt. wg (103).
134. Weith H. L., Gilham P. T., *J. Am. Soc. Chem.* 89, 5473 (1967).
135. Weith H. L., Gilham P. T., *Science* 166, 1004 (1969).
136. Wodnar-Filipowicz A., Passent J., Leonowicz A., *Post. Biochem.* 18, 569 (1972).
137. Young R. J., Fraenkel-Conrat H., *Biochim. Biophys. Acta* 228, 446 (1971).
138. Zinder N. D., Cooper S., *Virology* 23, 152 (1964).
139. Zinder N. D., Engelhardt D. L., Webster R. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 251 (1966).

KOMUNIKAT

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego komunikuje uprzejmie że powołana została Rada Redakcyjna Postępów Biochemii w następującym składzie:
Przewodniczący — prof. dr Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie — doc. dr Michał Bagdasarian (Warszawa)
prof. dr Mieczysław Choraży (Gliwice)
doc. dr Janusz Gregorczyk (Szczecin)
doc. dr Stanisław Lewak (Warszawa)
prof. dr Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław)
doc. dr Andrzej Morawiecki (Wrocław)
prof. dr Jerzy Pawelkiewicz (Poznań)
prof. dr Tadeusz Szczepkowski (Kraków)
prof. dr Zofia Zielińska (Warszawa)

Sekretarz
Dr Janina Malec

Prezes
Prof. dr Tomasz Borkowski

SPIS TREŚCI

H. Rybicka—Purynowe prekursory kwasów nukleinowych w roślinach nasiennych	539
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski—Badania nad syntezą rybosomowych kwasów rybonukleinowych	553
A. Wodnar-Filipowicz, J. Passent, A. Leonowicz— Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy, cz. I. Replikacja RNA	569
W. Filipowicz, W. Zagórski—Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy, cz. II. RNA i jego translacja	593

POSTĘPY BIOCHEMII

November 1972

ARTICLES IN POLISH

Volume 18

Number 4

- | | |
|---|-----|
| H. Rybicka—Purine Precursors of Ribonucleic Acids in Higher Plants (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 539 |
| T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski—Studies on the Ribosomal Ribonucleic Acids Synthesis (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 553 |
| A. Wodnar-Filipowicz, J. Passent, A. Leonowicz—Bacterial RNA Viruses I. RNA Replication (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa; Inst. Microbiol. Biochem. Maria Curie-Skłodowska Univ., Lublin) | 569 |
| W. Filipowicz, W. Zagórski—Bacterial RNA Viruses II. RNA and Its Translation (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa). . . | 593 |

Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). 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 nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np.: Schneider W.C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

SPIS TREŚCI

H. Rybicka—Purynowe prekursory kwasów nukleinowych w roślinach nasiennych	539
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski—Badania nad syntezą rybosomowych kwasów rybonukleinowych	553
A. Wodnar-Filipowicz, J. Passent, A. Leonowicz—Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy, cz. I. Replikacja RNA	569
W. Filipowicz, W. Zagórski—Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy, cz. II. RNA i jego translacja	593

KOMUNIKAT

Zawiadamiamy uprzejmie o zmianie adresu Redakcji Postępów Biochemii.
Korespondencję należy obecnie kierować na adres:

Redakcja Postępów Biochemii
WARSZAWA
ul. Freta 16

Biuro Redakcji mieści się w siedzibie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Redakcja