

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 1 · NR 2
1974 (99–276)

Postępy Biologii Komórki

PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMANN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocław 1974

Wydanie I. Nakład 290 + 130 egz. Ark. wyd. 15,75. Ark. druk. 11,125 + wkładki kredowe. Papier druk. sat. IV kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 20 III 1974. Podpisano do druku w sierpniu 1974. Druk ukończono w sierpniu 1974. Zam. 623/74 — P-14. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

MITOCHONDRIALNY DNA I ZAKRES JEGO DZIAŁANIA

Jan W. MICHEJDA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Adama Mickiewicza, Poznań

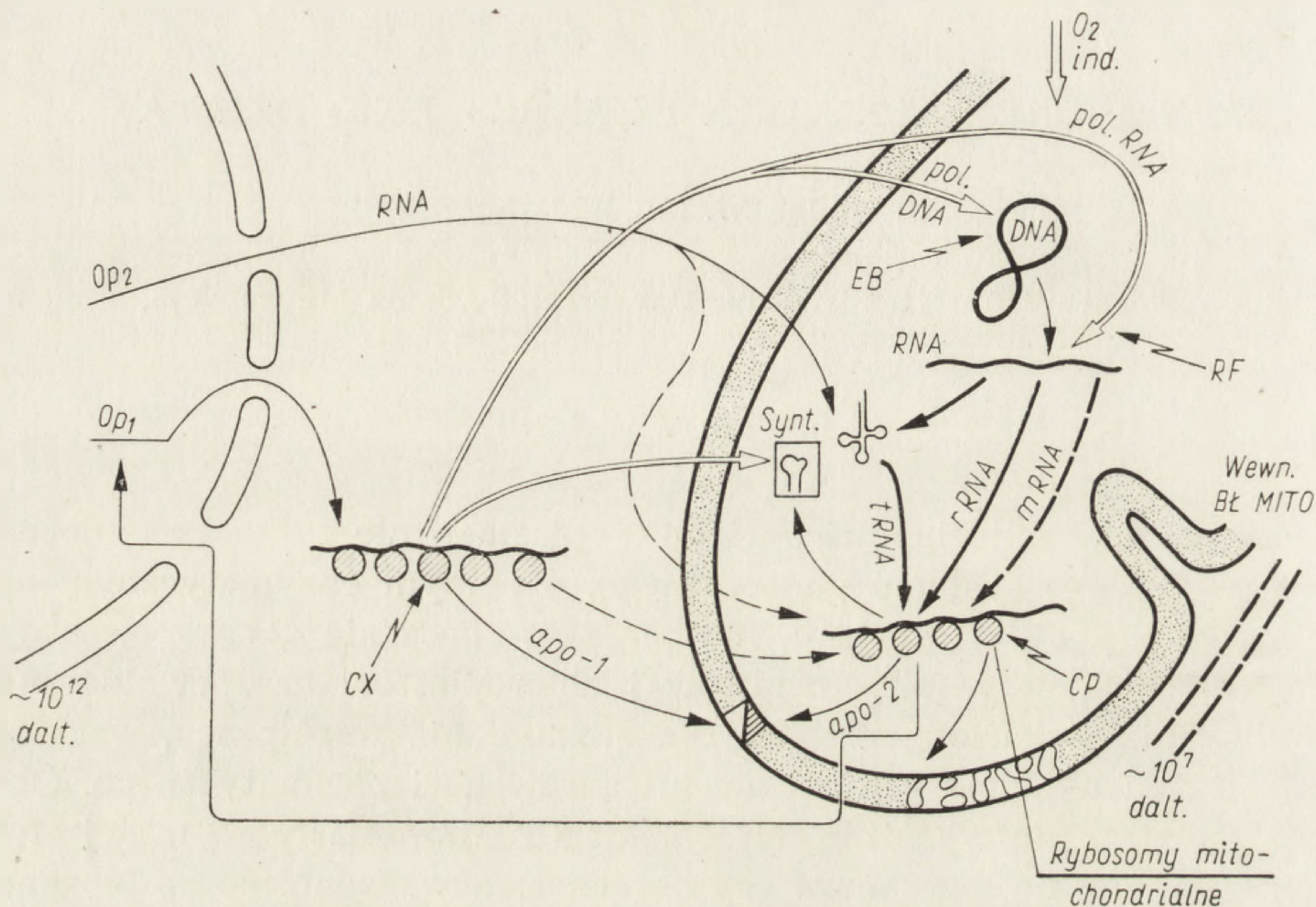
1. WPROWADZENIE

Odkrycie w mitochondriach i chloroplastach nie tylko specyficznego DNA, ale całego systemu genetycznego, o pełnym enzymatycznym aparacie transkrypcji i translacji, ma ogromne znaczenie dla współczesnych koncepcji biogenezy mitochondriów i chloroplastów oraz ewolucyjnego powstawania Eukariota, a także dla zrozumienia współpracy, względnie kontroli obu układów genetycznych: jądrowego i plazmatycznego. Obecność tego systemu wyróżnia mitochondria i chloroplasty od mniej złożonych organelli, np. lizosomów czy peroksysomów. Odnośnie do biogenezy mitochondriów nasuwają się trzy zasadnicze pytania:

- 1) jakie składniki są kodowane przez mitochondrialny DNA (mt-DNA)?
- 2) jaki jest udział jądrowego i mitochondrialnego DNA w tworzeniu organelli?
- 3) czy istnienie dwóch odrębnych systemów genetycznych jest dla komórki korzystne?

Odpowiedź na te pytania wymaga przede wszystkim poznania zakresu informacji genetycznej zawartej w mt-DNA. Całość informacji zawartej w podstawowej jednostce mt-DNA, jaką jest 5- μ m odcinek, zawiera 15 000 par zasad. Po odliczeniu około 40% DNA stanowiącego zespoły cistronów dla mitochondrialnego mt-rRNA i tRNA, pozostałe 60% odpowiada 3000 aminokwasów i umożliwia kodowanie około 20 niewielkich polipeptydów. Liczne białka, wchodzące w skład matriks i błon mitochondrialnych są wielokrotnie większe. Rozważania nad zakresem działania mt-DNA wiążą się więc ściśle z problemem przenikania makrocząsteczek z cytoplazmy do mitochondriów, wysyłania induktora z mitochondriów do genomu jądrowego lub odwrotnie oraz z problemem biogenezy, struktury i zdolności do energizacji błon, powstających w efekcie współdziałania obu genomów.

Literatura dotycząca mt-DNA i biogenezy mitochondriów jest bardzo obszerna [19, 26, 29, 32, 33, 51, 81, 82, 117, 123, 126, 129, 130, 149, 160, 162, 166, 171, 187, 196, 213] i dlatego celowe wydaje się, tylko krótkie podsumowanie zagadnienia i skoncentrowanie się na aktualnych kierunkach badań.



Rys. 1. Schemat hipotetycznego zakresu autnomii mitochondriów. CX — cykloheksimid; CP — chloramfenikol; EB — etidium (ethidium bromide); RF — rifampicyna; apo-1 — cytoplazmatyczna składowa enzymów, np. cyt. α_3 ; apo-2 — mitochondrialna składowa enzymów; Op₁ — jądrowe geny dla mRNA; Op₂ — jądrowe geny dla mt-tRNA i mt-mRNA

2. OGÓLNE WŁASNOŚCI mt-DNA

2.1. KSZTAŁT I WIELKOŚĆ

Badane dotąd formy mt-DNA są dwuniciowe, a heterogenność jego stwierdzono tylko u *Neurospora* i u cytoplazmatycznych mutantów drożdży (*petite*). W gradiencie CsCl gęstość mt-DNA pokrewnych gatunków jest podobna. Nagromadzone ostatnio informacje o gęstości, profilu topnienia i składzie zasad mt-DNA różnych typów Eukariota (ssaki [124, 125]), ptaki (cyt. wg [30]), płazy [55], owady [39], robaki [42], grzyby i pierwotniaki — pełna literatura jest podana w poz. [30, 31]) — wskazują na odmienność składu zasad mitochondrialnego i jądrowego DNA w różnych komórkach. Zawartość G+C w mt-DNA jest zawsze poniżej 50%,

a często nawet poniżej 30%. Według Rabinowitza i Swifta [145] otrzymane dla mt-DNA i DNA jądrowego wartości tworzą układ, jakiego należałoby oczekiwać od dwóch odrębnych systemów genetycznych, z których każdy ulega w ewolucji niezależnym zmianom składu. Z nietypowych zasad w mt-DNA stwierdzono tylko 5-metylo-cytozynę, która u *Physarum polycephalum* sięga 2% ogólnej zawartości mt-DNA [67].

Kształt mt-DNA jest kolisty, a długość jego wynosi około 5 μm u wszystkich zbadanych zwierząt [33] (tab. 1), przy czym trudności w oznaczeniu realnej długości konturu omówili ostatnio Wellauer i wsp. [201]. Różnice gatunkowe, od 4,45 (jeżowce) do 5,85 μm (płazy), są istotne

TABELA 1. Kształt i wielkość mt-DNA

Organizm	Kształt	Wielkość w μm	Pozycja literatury
Kręgowce	kolisty	4,7–5,8	31
Szkarłupnie	kolisty	4,6–4,9	31
Owady	kolisty	5,2–5,3	31, 141
Pierścienice	kolisty	5,9	31
<i>Ascaris lumbricoides</i>	kolisty	4,8	42
<i>Hymenolepis diminuta</i>	kolisty	4,8	42
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	liniowy	15	9, 31
<i>Saccharomyces</i>	kolisty	25	23, 88
<i>Neurospora crassa</i> :			
szczep 1118A, 5256	kolisty	19–20	3, 49
szczep 5297	kolisty	0,5–19	3
szczep Em 5256	liniowy	26	169
Groch	kolisty	30	101

i znaczące, ale nie wykazują wyraźnego powiązania filogenetycznego. Przeważającą formą jest skręcona (supercoiled) cząsteczka kolisty, którą od form pierścieniowych otwartych odróżnia charakterystyczny obraz w mikroskopie elektronowym, wyższy współczynnik sedimentacji, niższa lepkość i większa ruchliwość elektroforetyczna w żelu agarozowym.

DNA wykryto również w mitochondriach *Ascaris lumbricoides* i *Hymenolepis diminuta*, w których brak normalnie wykształconego toru transportu elektronów: również i tu długość pierścieni cząsteczki wynosiła 4,8 μm [42].

W materiale roślinnym mt-DNA ma cząsteczkę długą, np. 25 μm u drożdży, 30 μm u grochu [101]. Z mitochondriów drożdży, poddanych szokowi osmotycznemu uzyskuje się formy skręcone, złączone po dwa pierścienie (duplex) mt-DNA, o długości 25 μm każda (88). Często obserwowano również drobne pierścienie 1–10 μm obwodu, których liczba za-

leży od stadium hodowli drożdży [133], a które mogłyby być formami pośrednimi w procesie rekombinacji.

U *Neurospora*, z którego dawniej otrzymywano tylko heterogenne, liniowe mt-DNA, uzyskano ostatnio [169] homogeną populację 25–26 μm cząsteczek liniowych, lub też [3, 49] skręcone pierścienie o obwodzie 20 μm , a nawet zbiór kół o obwodzie 0,5–0,7 μm pochodzących ewentualnie z innych organelli komórkowych [47]. U glonu *Euglena* sp. mt-DNA, uwolniony wskutek szoku osmotycznego, ma długość tylko 1,7 μm (Shori 1970, cyt. wg [30]). Podważa to akceptowane dotąd sugestie, że odcinek 5 μm stanowi minimalną wielkość rodzimej cząsteczki DNA.

U różnych szczepów *Tetrahymena* stwierdzono występowanie wyłącznie liniowego mt-DNA, o długości 15–18 μm [31, 46]. Pomimo pozornie odmiennej struktury mt-DNA u *Tetrahymena* (tab. 1) istnieje możliwość, że i w tym przypadku mt-DNA in situ jest koliste, a izolowanie cząsteczek liniowych wynika z obecności specyficznej nukleazy lub też z rozerwania w miejscu przyczepu mt-DNA do błony mitochondrialnej [31]. Stwierdzono na przykład [100], że w przypadku komórek HeLa in vivo i in vitro łatwo można spowodować pęknięcie kolistego mt-DNA na formę liniową w obecności etidium*. Po usunięciu etidium mt-DNA zamyka się znowu, prawdopodobnie na wewnętrznej powierzchni błony mitochondrialnej. Pęknięcie takie zachodzi w miejscach nieprzypadkowych (trzy miejsca pękają pod działaniem alkaliów, a jedno miejsce jest wrażliwe na RNAazę). Zakłada się możliwość istnienia fizjologicznego cyklu pęknięcia i łączenia się mt-DNA w formy koliste [100].

Należy zaznaczyć, że u drożdży występuje w cytoplazmie tzw. omikron DNA [48] o długości 1,9 μm , tworzący dimery i trimery o formie kolistej. Może on pochodzić z peroksysomów, albo z jądra. Sugerowano występowanie podobnego DNA w komórkach HeLa [99] i *Euglena* [127]. Znane są cytoplazmatyczne, ale nie mitochondrialne geny, nie eliminowane przez etidium, np. determinanty ure-3 u drożdży (cyt. wg [48]) oraz „k” i „n” u pantofelka (Bevan 1969, cyt. wg [47]).

2.2. RÓŻNORODNOŚĆ FORM, ILOŚĆ I ROZMIESZCZENIE

Wszystkie badane populacje mt-DNA zawierają formy pośrednie replikacji (lub rekombinacji czy naprawy), (tab. 2). Duży odsetek przypada na D-pętlowe formy replikacyjne (patrz niżej), a 10–20% stanowią „spięte” (catenated) pierścieniowe oligomery. Te ostatnie formy wykryto u drożdży, trypanosom, bakterii i bakteriofagów. U kręgowców uznano je początkowo za charakterystyczne dla komórek nowotworowych, złasz-

* Bromek 2,7-dwuamino-10-etylo-9-fenylofenantrydynowy (ethidium bromide).

cza transformowanych przez adenowirusa [157]; ostatnio jednak stwierdzono je również w komórkach nienowotworowych [211], także u ludzi [133].

TABELA 2. Przybliżony skład całkowitego mt-DNA w wątrobie gryzoni i kurczęcia [31]

Rodzaj DNA	Procent wagowy
DNA zamknięty, kolisty	48
DNA zamknięty, kolisty, z pętlami D	30
Spięte (catenated) oligomery DNA	10
DNA otwarty, kolisty	10
Otwarte koła z pętlami D i końcówkami ss	1-2
Cząsteczki nietypowe (np. koła rozwidłone, typu Cairnsa)	1

W alkalicznym CsCl mt-DNA rozdziela się na dwa pasma o odmiennej gęstości, przy czym różnica sięga od 5 mg/cm³ u jeźowców do 40 mg/cm³ u kurczęcia [30] i wywołana jest odmienną zawartością tymidyny w dwóch komplementarnych niciach DNA. Mitochondrialny DNA jest dotychczas jedynym znanym DNA, który przepisuje się na RNA przy dużej różnicy zasad w niciach komplementarnych.

W pojedynczym mitochondrium występuje 2-4 cząsteczek DNA. Masa cząsteczkowa mt-DNA jest około 100 razy mniejsza niż masa cząsteczkowa DNA bakterii. Łącznie ilość mt-DNA nie przekracza zazwyczaj 1% DNA jądrowego [30], z wyjątkiem np. grzyba *Agaricus* — 2% [194] i drożdży nie poddanych represji — 11,5% [24]. Ogólnie zawartość mt-DNA na 1 mg białka mitochondrialnego jest niższa w wolno rosnących komórkach wyspecjalizowanych, niż w komórkach zarodkowych i hodowanych in vitro, a najwyższa w komórkach nowotworowych. Szczególnie duże zmiany zawartości DNA w mitochondriach obserwuje się podczas morfogenezy owadów [183].

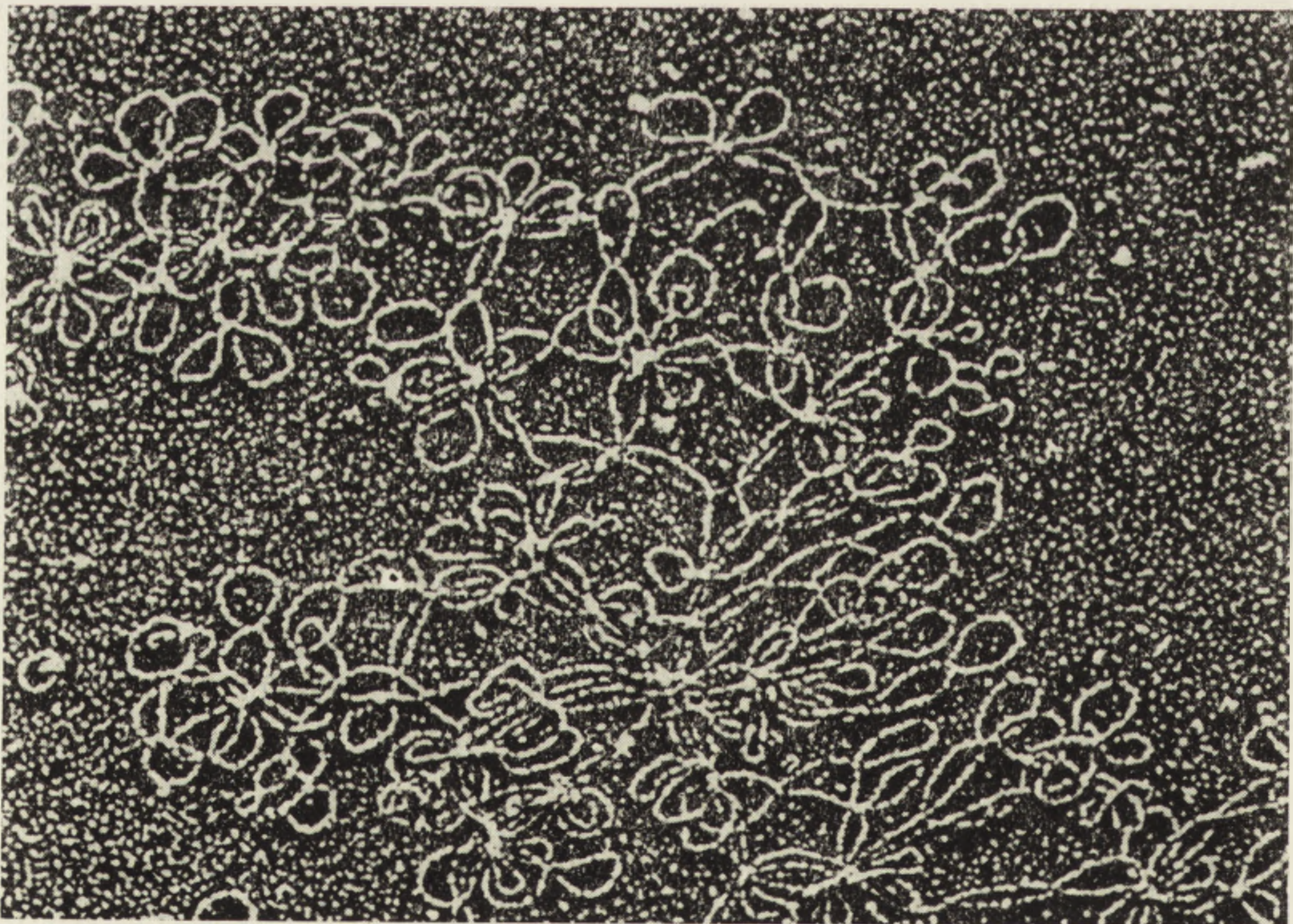
Rozmieszczenie cząsteczek mt-DNA, badane w mikroskopie elektronowym, wskazuje na istnienie, zwłaszcza w mitochondriach rozgałęzionych, kilku (aż do 6) obszarów nukleinowych w matriks pomiędzy grzebieniami z prawdopodobieństwem obecności kilku pierścieni DNA w „nukleoidzie” [123].

W mikroskopie elektronowym mt-DNA, oglądany w skrawkach jak i w preparatach otrzymanych w wyniku szoku osmotycznego, jest często przyczepiony do błony mitochondrialnej. Nie jest to artefakt, bowiem DNA dodany do mitochondriów przed ich lizą nie przyczepia się do fragmentów błon. Czy przyczepienie cząsteczki mt-DNA do błony ma funkcjonalne znaczenie przy jego replikacji i transkrypcji, jest zagadnieniem otwartym [123].

2.3. KINETOPLAST

Swoistym tworem jest kinetoplast, występujący u pierwotniaków *Trypanosomidae*. Twór ten, o dużej gęstości elektronowej, zawarty jest zawsze w olbrzymim mitochondrium, którego kształt i wielkość ulegają zmianom [197], zwłaszcza pod wpływem aktynomycyny D, puromycyny i mitomycyny C. DNA kinetoplastu (k-DNA) można zniszczyć lub uszkodzić akryflawiną i podobnymi substancjami, co pociąga za sobą redukcję pewnych reakcji transportu elektronów, a w obrębie kinetoplastu zmniejszenie powierzchni błon lub ich układanie się w nieregularne zwoje (diskinetoplasty). Zjawisko równoległej redukcji k-DNA i struktury mitochondrium oraz przejście z metabolizmu tlenowego na glikolityczny upodobnia *Trypanosomidae* do drożdży (*petite*). Obszerny przegląd badań nad DNA kinetoplastu podał Simpson [176], a później Cosgrove [53].

Zawartość DNA w kinetoplastie jest wielokrotnie wyższa niż w mitochondrium i wykrywalna cytochemicznie reakcją Feulgena. U *Critidum luciliae* k-DNA sięga 25% całkowitej zawartości DNA w komórce, różniąc się od DNA jądrowego większą zawartością A + T [106]. W gradiencie CsCl k-DNA stabilizuje się bardzo szybko w wąskim pasmie wskazującym na bardzo dużą masę cząsteczkową. Morfologicznie składa się z pęczków zamkniętych pierścieni o obwodzie 0,3-0,8 μm , wzajemnie pospinanych lub połączonych odcinkami prostymi. U *C. acanthocephali* wykryto przeciętnie 27 000 takich pierścieni o łącznej masie 4×10^{10}



Rys. 2. Ultrastruktura oczyszczonego k-DNA z *Leishmania tarentolae*. Kontrast odwrócony [176]

daltonów [154] (rys. 2) a każdy pierścień ($1,5 \times 10^6$ daltonów) mógłby kodować 4 polipetydy o masie 20 000. Struktury rozetkowe są *in vivo* bardzo odporne mechanicznie, a dopiero działanie DNAazy uwalnia pojedyncze pierścienie [154].

Badania autoradiograficzne wykazały, że radioaktywna tymidyna łączy się jednocześnie do k-DNA i do jądra. W matriks kinetoplastu urydyna- ^3H wbudowuje się również w RNA odporne na RNA-azę (podobnie jak RNA chromosomalny lub jądrowy u *Metazoa*) [137]. Wykazano, że na niciach k-DNA występują białka, co sugeruje istnienie struktur podobnych do chromonemy. Synteza k-DNA wymaga prawdopodobnie obecności błonowej osłonki kinetoplastu [137].

Nie wiadomo czy k-DNA zbudowane jest z powtarzających się kopii niektórych genów; wykazano, że u *T. cruzi* w obecności berenilu tysiące pierścieni k-DNA replikują niezależnie od siebie [35]. Pierścienie te, badane metodą ilościowej renaturacji, okazały się identyczne. Są one za małe, aby kodować rRNA i ich funkcja jest zagadkowa [31].

Ważnych informacji dostarczyły badania nad modyfikacjami ultrastruktury wywołanymi w k-DNA u *T. cruzi* lekami antytrypanosomowymi. Z nich, akryflawiny i etidium drogą interkalacji z DNA zmieniają jego superspiralizację, a berenil i stilbamidyny wywołują powstawanie wydłużonych pętli podobnych do chromosomów szczoteczkowych [36, 60]. Efekty te wynikają z zagęszczenia A-T w k-DNA. Diskinetoplasty przypominają δ cytomutację u drożdży (*petite*). Część wymienionych leków działających na polimerazę k-DNA ma również u drożdży wpływ na mt-DNA, mitochondrialny RNA i tRNA, prowadząc zarazem do spadku aktywności enzymów oddechowych i wzrostu aktywności enzymów glikolitycznych. Wydaje się więc, że obserwacje strukturalnych zmian k-DNA mogą wyjaśnić, co stanowi pierwotny cel w blokadzie biogenezy mitochondriów.

W kinetoplastie, zarówno DNA, jak i RNA mają prawdopodobnie konformację parakrystaliczną, stanowiąc dobry model dla wykazania płynno-krystalicznych właściwości kwasów nukleinowych [60].

K-DNA nadaje się do hybrydyzacji cytologicznej, ponieważ znaczna część jego cząsteczek składa się z odcinków powtarzających się (cyt. wg [180]). Znaczne różnice w gęstości k-DNA, izolowanego z różnych gatunków *Hemoflagellata* wskazują na różnice w zawartości zasad (cyt. wg [180]).

Steinert i wsp. [180] opisali ostatnio metodę, pozwalającą na specyficzną, cytologiczną hybrydyzację radioaktywnego, komplementarnego RNA z k-DNA dwóch gatunków trypanosom w ich rozmazach. Nie stwierdzono hybrydyzacji krzyżowej między k-DNA obu gatunków, co wskazuje, że ewolucja większej części k-DNA nie jest ograniczona, a zarazem

sugeruje użyteczność hybrydyzacji cytologicznej do rozróżniania spokrewnionych gatunków patogennych.

3. ZAWARTOŚĆ INFORMACJI

Informacyjną zawartość mt-DNA badano głównie techniką renaturacji. Uzyskane wyniki są zgodne z ciężarem cząsteczkowym wyznaczonym długością cząsteczki, zmierzonej w mikroskopie elektronowym. Wskazywałoby to na brak heterogenności lub repetycji genów. Clayton i wsp. [50] badając mt-DNA z komórek HeLa metodą denaturacji i renaturacji, w połączeniu z obserwacjami w mikroskopie elektronowym pozwalającym wykryć tzw. regiony „ss” w odcinkach zawierających 100 nukleotydów, regionów takich nie znaleźli. Ewentualna mikroheterogenność musi więc istnieć poniżej tego poziomu.

3.1. LICZBA GENÓW (CISTRONÓW)

Wszystkie badane mt-DNA hybrydują z mitochondrialnym rRNA i tRNA. Jak widać z tabeli 3, w tkankach kręgowców (a prawdopodobnie i pierwotniaków) każda cząsteczka mt-DNA zawiera pojedynczy cistron dla obu rRNA. W przypadku komórek HeLa, posługując się mikroskopią elektronową hybrydów między ciężką nicią mt-DNA a mt-rRNA, wykazano, że pojedyncze geny dla obu typów tego rRNA (tj. 16S i 12S) są umieszczone blisko siebie w odstępnie mniejszym niż 500 nukleotydów

TABELA 3. Liczba genów zawarta w mt-DNA dla rRNA i tRNA

Organizm	Geny		Ciężar cząsteczkowy ($\times 10^{-6}$ daltonów)			Pozycja literatury
	rRNA	tRNA	rRNA	tRNA	mt-DNA	
<i>Xenopus</i>	1,0	15	0,30+0,5	0,028	12	57
Komórki HeLa	1,0	11	0,36+0,6	0,025	11	5, 158
Drożdże	0,64	20	0,6 +1,2	0,025	49	151, 152
<i>Neurospora</i>	0,71		0,6 +1,2		51	170
<i>Tetrahymena</i>	1,36		0,52+0,8		29	31
Szczur					10	31
Groch					74	101

[158]. Tak więc genom mitochondrialny nie ma powtarzających się cistronów rRNA. Fakt ten zwiększa częstotliwość mutacji mitochondriów przy braku zmian w ich białkowej komponentce u mutantów drożdży odpornych na antybiotyki (Grivell 1970, cyt. wg [31]). Borst i jego szkła tłumaczą odporność rybosomów tych mutantów mutacją ich komponent

nukleinowych (rozd. 74), pociągającą za sobą odmienną substrukturę rybosomów mitochondrialnych.

Liczba cistronów dla tRNA jest mniejsza niż 33, co stanowiłoby minimum dla odczytania 64 kodonów. Borst i Flavell [31] uważają za mało prawdopodobne, aby system genetyczny, używający tylko część możliwych kodonów, mógł przetrwać i sugerują, że pozostałe tRNA pochodzą z genomu jądrowego, albo powstają przez wtórne modyfikacje skróconego zestawu pierwotnych produktów genów mitochondrialnych. Nie można również wykluczyć heterogenności cistronów tRNA na mt-DNA.

Wyniki, uzyskane metodami innymi niż renaturacja, wskazują, że mt-DNA koduje białka o charakterze wybitnie hydrofobowym (rozd. 8). Zdolność przeżywania wyizolowanych mitochondriów grzyba *Agaricus*, które wbudowują prekursorów do mt-DNA, mt-RNA i białek mitochondrialnych przez kilkanaście dni [194], sugeruje nietypowo szeroki zakres kodowania białek przez mt-DNA tego organizmu.

Dotąd nie wiadomo jaki jest charakter nadmiaru informacji zawartej w 3–5 razy większej ilości mt-DNA pierwotniaków w porównaniu z mt-DNA *Metazoa* i dlatego z najwyższą ostrożnością należy ekstrapolować na wyższe organizmy wyniki uzyskane w badaniach nad pierwotniakami [30].

3.2. GENOM MITOCHONDRIALNY U MUTANTÓW DROZDZY

Pewne mutanty drożdży wykazują zdolność do rozmnażania się w stanie represji glukozowej, kiedy nie wykształciły się typowe mitochondria. Również mutanty drożdży, które utraciły prawie cały mt-DNA (*petite*) np. w wyniku działania akrydyny czy etidium [120, 136], są zdolne do życia i rozmnażania się, aczkolwiek nie wytwarzają funkcjonalnego łańcucha enzymów oddechowych (stan ro^-). Pozostały mt-DNA o nietypowej ultrastrukturze [88] jest heterogeny [21, 89], co jest wynikiem delekcji oraz kompensacyjnej amplifikacji pozostałych (resztkowych) sekwencji do normalnego poziomu mt-DNA w komórce. Utratę genów mitochondrialnych można odwrócić przez krzyżowanie genetyczne [178]. Choć u mutantów tych brak jest zazwyczaj genów mitochondrialnych dla rRNA i tRNA, niekiedy właśnie te geny ulegają kompensacyjnej amplifikacji.

Niska zawartość G + C w mt-DNA u drożdży (17%) jest powodem wielu cech mt-DNA, jak np. mała gęstość w gradiencie CsCl, szeroki profil termiczny topienia i takie widma CD oraz ORD, które sugerują istnienie dużych odcinków poli-d(A-T). Heterogenność G + C obserwować można dopiero we fragmentach (uzyskanych działaniem DNAazy) mniejszych niż 2 miliony daltonów. Nadal jednak nie ma dowodów, że są to odcinki „przedzielające” (DNA przedzielający — spacer regions).

Odcinki d(A-T) są krótkie i wchodzą w skład genów, tak że całość DNA może być informatywna [30].

Uważano do niedawna, że mt-DNA mutantu *petite* o zmniejszonej gęstości zawiera głównie sekwencje poli-d(A-T) [212] lub DNA nonsensowne. Tego rodzaju repetycje powinny wpływać na kinetykę renaturacji, która jednak pozostaje w większości przypadków II-rzędową przy 300-krotnym przyspieszeniu reakcji w porównaniu z mt-DNA szczepu dzikiego [31]. Sugeruje to, że mt-DNA mutantu *petite* zawierający np. w szczepie RD₁A tylko 5 moli % G + C, składa się z powtarzalnych odcinków 100–300 nukleotydowych [89]. Wynika to również z analizy traktu pirymidynowego [191]. Te powtarzające się odcinki w całości hybrydują z mt-DNA szczepu dzikiego [87, 89], co wskazuje na brak jakichkolwiek nowych sekwencji w mt-DNA mutantu *petite* [168]. To z kolei sugeruje, że mt-DNA dzikiego szczepu zawiera sekwencje o niezwykle małej zawartości G + C.

Powstaje pytanie w jaki sposób zmutowany mt-DNA replikuje, umożliwiając komórkom szczepu RT₁A przeżycie przez okres 300 generacji? [168]. Zgodnie z teorią replikonu, każdy DNA musi zawierać element zwany replikatorem, w którym zachodzi zapoczątkowanie replikacji. O ile mt-DNA mutantów *petite* zawiera taki sam replikator jak mt-DNA szczepu dzikiego, to różne mutanty *petite* powinny mieć odpowiednią, wspólną sekwencję nukleotydową. Doświadczalnie stwierdzono brak takiej homologii sekwencyjnej u 3 mutantów *petite*, o małej gęstości mt-DNA. Wynikałoby stąd, że chodzi tu o model 25 μm pierścienia, w którym 300 powtarzających się jednostek spiętych będzie krótką sekwencją replikatora, stanowiącego mniej niż 1% DNA [168].

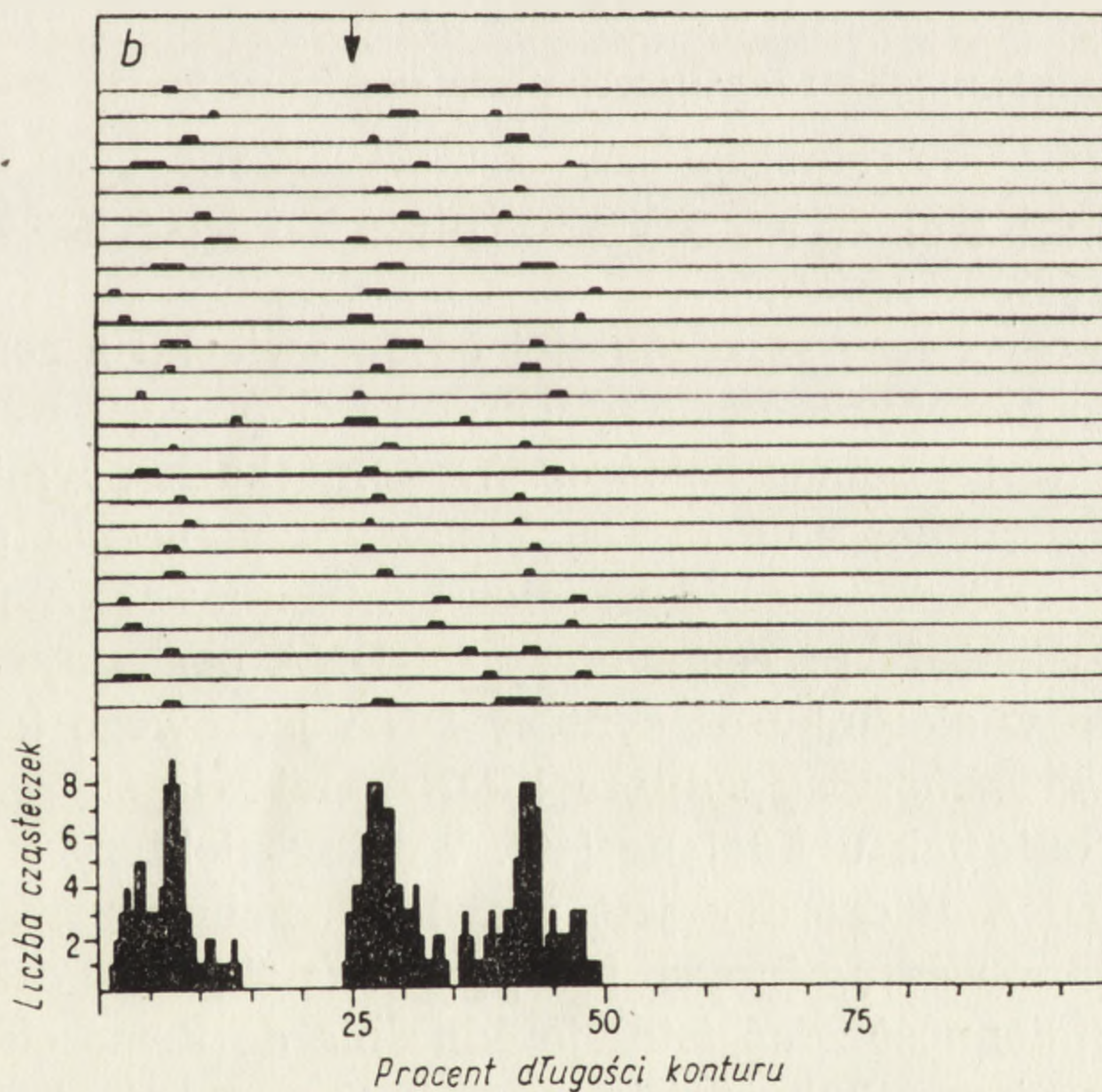
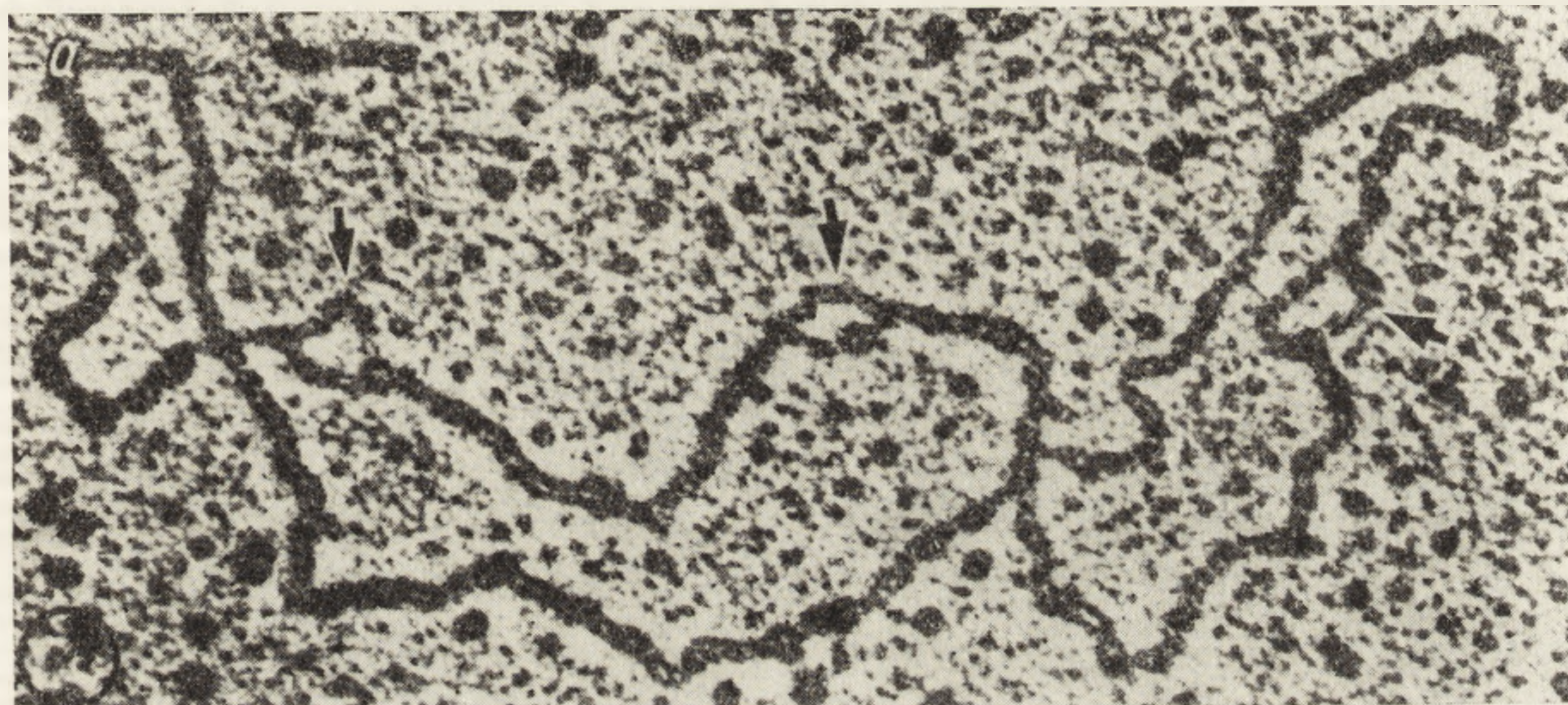
Sanders i wsp. [168] zwracają też uwagę na podobieństwo między mt-DNA szczepu RD₁A, a wielokrotnie powtarzającą się prostą sekwencją satelitarnych DNA jądrowych w tkankach zwierzęcych [168].

U spontanicznych małych mutantów drożdży, wykazujących 30-procentowy brak homologii w stosunku do drożdży dzikich, stwierdzono ostatnio delecję mt-DNA normalnego — co wydaje się być typowe dla wszystkich mutantów drożdżowych — oraz utworzenie lokalnych odcinków, o nowych, niehomologicznych sekwencjach zasad [83].

3.3. MIKROHETEROGENNOŚĆ

Ostatnio opracowano [21, 62, 140] nową technikę szybkiego, ilościowego preparowania mt-DNA drożdży w dużych ilościach. Umożliwiła ona wykrycie mikroheterogenności mt-DNA i rozfrakcjonowanie na hydroksypatycie drobnych fragmentów DNA dzięki różnicom w zawartości G + C [21]. Doświadczenia udowodniły, że genom mitochondrialny drożdży zawiera długie odcinki rzędu 10⁵–10⁶ daltonów, z których jedne są bogate w G + C, a drugie w A + T. Pierwszym z nich przypisują autorzy funkcje kodujące np. rRNA, natomiast biologiczne znaczenie odcinków A + T jest

nadal niejasne. Te ostatnie stanowią 50% mt-DNA, a ich zawartość G+C jest mniejsza niż 10%. Wykazują one częstotliwość składu izostychowych T₁, T₂, T₃ (tzw. trakt pirymidynowy) i prawdopodobnie zbudowane są z przemieszanych, krótkich sekwencji naprzemiennych i nienaprzemiennych d(A-T) [62]. U mutantu wywołanego akryflawiną, charakteryzującego się niewydolnością oddechową (DM₁ *petite*), mt-DNA o gęstości 1,671 gcm⁻³ zawiera 96% A+T [41]. Po działaniu ultradźwiękami wykazuje on wewnątrzcząsteczkową heterogenność. Świadczyć to może o tym, iż odcinki bogate w G+C są prawdopodobnie zlokalizowane w pewnej tylko okolicy cząsteczki, która nadal zawiera informację genetyczną, np. kodującą tRNA.



Rys. 3. Mapowanie sekwencji C + G techniką renaturacji formaldehydowej [209].
 a) — strzałkami oznaczono rozłączone (49°C) nici mt-DNA z wątroby szczura (105 000 ×);
 b) — Mapa denaturacyjna 25 cząsteczek (jak w a), wyprostowanych i standaryzowanych według rozszczepienia środkowego (strzałka)

W mt-DNA u *Tetrahymena* stwierdzono [72] 25% G+C, a u drożdży jedynie 17%. Metodą termicznej chromatografii na hydroksypatycie, w rozbitym ultradźwiękami mt-DNA nie wykryto [72] odcinków o zawartości G+C poniżej 19%, jednakże dzięki wiązaniu poli-U (poli-A nie było wiązane) uzyskano silne przesunięcie gęstości z 1,702 na pasma 1,735 i 1,746 gcm⁻³. Wskazuje to na istnienie obszarów bogatych w sekwencje dA:dT, które muszą być jednak krótsze niż 300 nukleotydów [71].

Do badania heterogenności mt-DNA Wolstenholme i wsp. [209] zastosowali tzw. technikę mapowania denaturacyjnego, wykorzystującą fakt, że odcinki bogate w AT wykazują niższą temperaturę topnienia. Dodanie formaldehydu zapobiega powtórzonemu połączeniu się rozdzielonych zasad, co powinno nastąpić po ochłodzeniu. Obserwując tak potraktowane cząsteczki w mikroskopie elektronowym można wykryć obszary, w których następuje rozdział nici i zarazem, zlokalizować pojedyncze ugrupowania różnych par zasad. Obecność formaldehydu zmienia zarazem III-rzędową strukturę super-spiralizowanej, kowalentnie zamkniętej formy cząsteczki.

Na rysunku 3 widać miejsca rozejścia się nici mt-DNA w temperaturze 49°C w reprodukcyjnych obszarach cząsteczki kolistej. W temperaturze 51°C nici DNA rozchodzą się całkowicie. W cząsteczce mt-DNA wątroby szczura stwierdzono regularne występowanie trzech pierwotnych odcinków rozszczepienia, oddalonych od siebie o określoną odległość [209] i zajmujących tylko jedną połowę cząsteczki.

Mikroheterogenność udaje się też wykazać działając na mt-DNA jonami Ag⁺, które wiążą się specyficznie z parami G+C. Uzyskane przesunięcie gęstości w gradiencie Cs₂SO₄ jest miarą zawartości tych par [192].

4. REPLIKACJA DNA

4.1. CZAS I CHARAKTER REPLIKACJI IN VIVO

Doświadczenia autoradiograficzne i metaboliczne oraz morfologiczne dowody replikacji [95] wykazały, że synteza mt-DNA przebiega in situ [45]. Nie ma jednak zgodności co do chronologii tego procesu podczas cyklu komórkowego, a w szczególności co do związku z replikacją DNA jądrowego, jego periodyczności i synchronizacji procesu wśród populacji mitochondriów w tej samej komórce. W komórkach prymitywniejszych Eukariota (*Tetrahymena pyriformis*, *Physarum polycephalum*) obserwowano autoradiograficznie ciągły przebieg syntezy mt-DNA podczas cyklu komórkowego. Niekiedy proces syntezy mt-DNA następuje z widocznym przyspieszeniem w stosunku do syntezy DNA jądrowego (cyt. wg [138]). Tymczasem u *Trypanosoma* synteza k-DNA pojawia się w fazie S (cyt. wg [138]) podobnie jak u *Euglena* [40]. Według niektórych autorów [54] replikacja mt-DNA u drożdży jest prawie zsynchronizowana z syntezą DNA jądrowego, a według innych [206] jest ona ciągła w całym cyklu.

Podobna odmienność zdań istnieje odnośnie do komórek zwierzęcych, hodowanych in vitro [139]. Może to wynikać z pomijania równoległych zmian w puli prekursorów mt-DNA. W komórkach HeLa, synchronizowanych różnymi metodami, znakowanie mt-DNA oraz całkowitej puli tymidynowej i jej fosforylowanych pochodnych tymidyną-³H świadczy

również o braku synchronizacji syntezy DNA jądrowego i mt-DNA. W komórkach synchronizowanych techniką selektywnego odłączania synteza mt-DNA rozpoczyna się w fazie *S* i osiąga maksimum w fazie G_2 ; natomiast w komórkach synchronizowanych podwójną blokadą tymidynową synteza mt-DNA przebiega z równą szybkością przez cały cykl [138]. Ostatnio, w hodowlach komórek linii S_3 HeLa, synchronizowanych tymidyną, stwierdzono [195] dwa szczyty syntezy mt-DNA: jeden we wczesnej fazie *S* (dla mt-DNA o gęstości $1,701 \text{ gcm}^{-3}$), drugi w fazie G_2 (dla mt-DNA o gęstości $1,688 \text{ gcm}^{-3}$). Kinetyka tej syntezy jest asymptotyczna, wobec wykładniczej kinetyki syntezy DNA jądrowego; autorzy widzą w tej dwufazowości wyraz genetycznej różnicy między dwoma typami mitochondriów, obecnymi obok siebie w badanych komórkach. Włączanie znakowanych prekursorów do mt-DNA badano też w komórkach fibroblastów kurcząt *in vitro* [80]. Stwierdzono odmienny przebieg znakowania mt-DNA i DNA jądrowego, zaznaczony zwłaszcza zmianą aktywności właściwej mt-DNA, wywołaną zmianami pożywki.

Wbudowywanie znakowanych prekursorów do mt-DNA stwierdzono również w wyizolowanych mitochondriach wątroby szczura [134, 119]. W izolowanych mega-mitochondriach, powstałych pod wpływem cuprisonu, wbudowywanie tymidyny- ^3H do DNA zachodzi ze zwiększoną intensywnością w porównaniu do mitochondriów normalnych [4].

Synteza mt-DNA w wyizolowanych mitochondriach wątroby szczura jest hamowana przez rifampicynę [163], znany inhibitor polimerazy mt-DNA. Fakt ten interpretuje się jako analogiczny do bakteryjnego synergizmu między polimerazą DNA i RNA, z punktem zbieżności na poziomie transkrypcji genomu mitochondrialnego [163]. Kinaza tymidynowa jest enzymem, którego aktywność wzrasta przed uruchomieniem syntezy DNA w regenerującej wątrobie szczura lub wskutek stymulacji ekdysonem nabłonka owadów. Enzym ten został wykryty również w mitochondriach komórek nadnerczy chomika (cyt. wg [20]) i komórek L myszy, i to w formie odmiennej od kinazy tymidynowej, wbudowującej tymidynę do jądrowego DNA [20]. W jądrowym mutancie tych komórek, mitochondrialna kinaza, związana z błonami mitochondrialnymi, przeprowadza nadal wbudowywanie tymidyny- ^3H do mt-DNA.

Szczególnie dużo mt-DNA, więcej niż DNA jądrowego, występuje w jajach jeżowców i płazów. Wbudowywanie tymidyny- ^3H w mt-DNA zarodków jeżowca *Psamechinus* stwierdzono już w stadium 64 komórek [37]. O ile nie jest to naprawa (wymiana), a rzeczywista replikacja, należy zrewidować dotychczasowy pogląd, według którego mitochondria byłyby aż do stadium pluteusa jedynie przekazywane do komórek potomnych [116].

Syntezę mt-DNA obserwowano do 5 godzin po zablokowaniu cyklo-

heksimidem cytoplazmatycznej syntezy białka i syntezy DNA jądrowego. Podczas represji glukozowej u drożdży ilość mt-DNA pozostaje nie zmieniona [24], wbrew poprzednim doniesieniom; w czasie tlenowej depresji obserwuje się jedynie dodatkową syntezę mt-DNA, której nie można zahamować ani cykloheksimidem, ani chloramfenikolem. Również u glonu *Euglena* stwierdzono zdolność do kontynuacji syntezy mt-DNA przez przynajmniej 6 pokoleń, przy zahamowanej cykloheksimidem syntezie DNA jądrowego [40, 155]. W warunkach naturalnych, replikacja mt-DNA u *Euglena* przebiega równolegle z replikacją DNA jądrowego, przy końcu interfazy; w tym samym czasie mitochondria przyjmują charakterystyczne formy olbrzymie, a po ukończeniu replikacji dają początek drobnym, pojedynczym mitochondriom [40].

Polimeraza mt-DNA jest wybiórczo wrażliwa na etidium, gdy jest porównywana z polimerazą jądrową, działającą na tej samej matrycy DNA [114]. Po kilku dniach działania etidium, różne hodowane linie komórek ssaków nie tracą — w odróżnieniu od drożdży — mt-DNA, ale odwracalnie zmniejszona zostaje intensywność jego syntezy [99, 107, 122]. Zwiększa się też spiralizacja i pękają koliste cząsteczki DNA [98, 99, 107, 122].

W wyniku zakażenia wirusowego (RSV), które wywołuje spadek ogólnej syntezy DNA w komórce, wbudowywanie tymidyny-³H w superspiralizowane mt-DNA komórek HeLa wzrasta prawie dwukrotnie w ciągu pierwszych kilku godzin [147]. Wyniki te wskazują na niezależność syntezy mt-DNA od DNA jądrowego. Część obserwowanej stymulacji może wynikać ze zwiększenia puli dostępnych nukleotydów w efekcie zahamowania syntezy DNA jądrowego, wobec ograniczonego tylko współzawodnictwa wirusowego jako matrycy. Sugestię tę potwierdzają ostatnie wyniki wskazujące, że w mitochondriach wyizolowanych z komórek zakażonych wirusem nie stwierdza się ani stymulacji, ani inhibicji syntezy mt-DNA [146].

W efekcie uszkodzenia mt-DNA u *Tetrahymena*, np. przez promienie nadfioletowe, etidium lub brak tymidyny występuje gwałtowny (do 40 razy) wzrost aktywności polimerazy mt-DNA [202]. Proces ten jest wrażliwy na cykloheksimid, a nie wrażliwy na chloramfenikol. Indukcja polimerazy kończy się w momencie przywrócenia pierwotnej ilości mt-DNA w komórce. Jest to dowodem wzajemnej kontroli syntezy DNA w jądrze i w mitochondriach.

Podobną stymulację obserwowano w komórkach *Neurospora* [17], w których chloramfenikol lub etidium wywołują zwiększoną syntezę niektórych składników mitochondrialnych, kodowanych przez genom jądrowy, np. polimerazy RNA, rybosomów i czynnika G.

Obraz zależności czasowej i synchronizacji syntezy mt-DNA w cyklu komórkowym daleki jest od wyjaśnienia. Logiczną koncepcję wzajem-

nych powiązań i czujników między obu typami informacji w komórce podali Barath i Küntzel [17].

O regulacji typu wyższych piętrowi wiemy jeszcze mało. Na przykład u ssaków synteza mt-DNA *in vivo* jest mało wrażliwa na kortyzon, który bardzo silnie hamuje syntezę DNA jądrowego [94].

Z dużym zainteresowaniem przyjęto stwierdzenie zbieżności onkogennej aktywności wirosomów, czyli cząstek rybonukleoproteidowych, wyizolowanych z mitochondriów mięsaka Rousa, a aktywnością „odwrotnej transkryptazy” czyli polimerazy DNA, kierowanej przez RNA tego wirusa [90]. Wirosomy te wyizolowano ostatnio z frakcji zawierającej tylko błony wewnętrzne mitochondriów, oczyszczone metodą digitoninową [123]. Onkogenną aktywność wirusową stwierdzono już przed rokiem w mitochondriach z guzów ptaków i ssaków [90], a samą polimerazę DNA, kierowaną przez RNA, wykryto w całych komórkach zarodków kurcząt [88] oraz w mitochondriach wątroby i kory mózgowej szczura [34]. Wspomniana transkryptaza z wirosomów hamowana jest specyficznym przeciwciałem królika, a wykazuje aktywację na syntetycznych matrycach poli(rA)oligo(dT) [90].

4.2. FORMY REPLIKACJI

Przy replikacji mt-DNA pojawiają się dwa typy morfologiczne cząsteczek pośrednich: rozgałęzione pierścienie typu Cairnsa, stwierdzone przez Kirschnera i wsp. [95, 210] w wątrobie szczura oraz niedawno odkryte w szczepach komórek wątroby ssaków rozgałęzione pierścienie, zawierające krótką, pojedynczą nić, tzw. nić E, związaną wiązaniami wodorowymi, a odpychającą jedną z dwóch nici głównych w formie pętli przemieszczeniowej (pętla D) [91].

Nić E można łatwo oddzielić bez rozerwania pierścienia; jej długość stanowi 3% z 5- μ m obwodu mt-DNA. Ponieważ nić E hybrydyzuje tylko z nicią lekką (L), więc sama przedstawia fragment nici ciężkiej (H).

Poza tym, pętlę D mt-DNA kurczenia można użyć jako matrycę dla układu polimerazy DNA z *E. coli*, której działaniem powstaje cząsteczka pierścieniowa. Ten układ może w przyszłości służyć do mapowania sekwencji nukleotydów dla mitochondrialnego rRNA i tRNA na ciężkiej (H) nici mt-DNA.

Borst i Flavell [31] uważają, że synteza pętli D przebiega w matriks mitochondrium i ustaje po osiągnięciu 3,5% długości. Kolejny etap replikacji wymaga przyczepienia pętli do błony mitochondrialnej [31] i rozerwania pierścienia. Właśnie przyczepienie mt-DNA do błony mitochondrialnej byłoby kontrolowane zarówno przez jądro, jak i cytoplazmę, a zależałoby również od fazy wzrostowej mitochondrium.

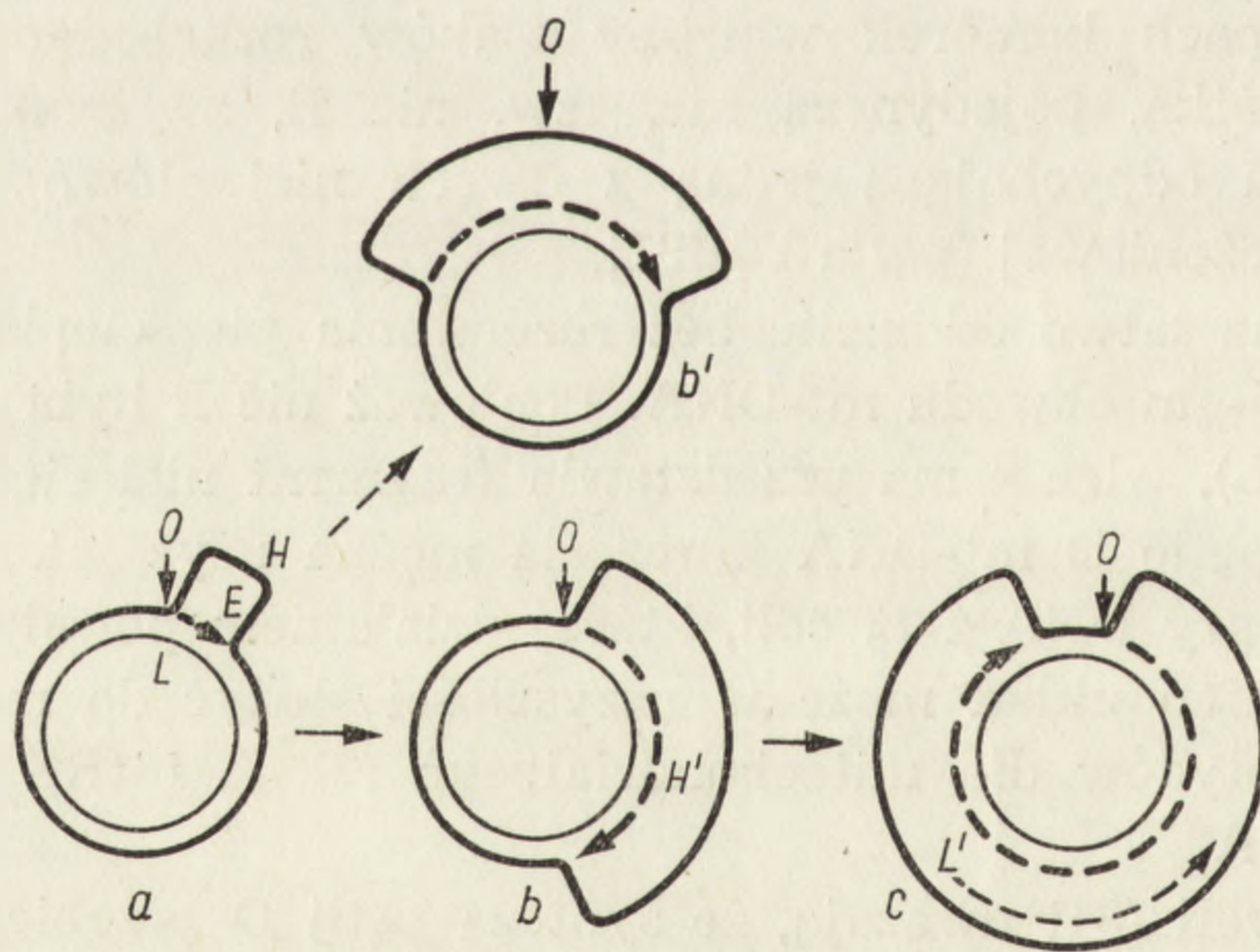
Borst i Flavell [31] zauważyli, że odmiennie niż w szczepach komórek

ssaków *in vitro* [159], w wątrobie myszy i kurczęcia obserwuje się więcej cząsteczek typu Cairnsa niż cząsteczek z długą pętlą D. Cząsteczki Cairnsa są częściej widoczne w tkankach wolniej rosnących, gdzie procesy naprawy przeważają nad replikacją. Ostatnio jednak stwierdzono dużą częstość występowania długich pętli D także w mitochondriach wątrobowych [78].

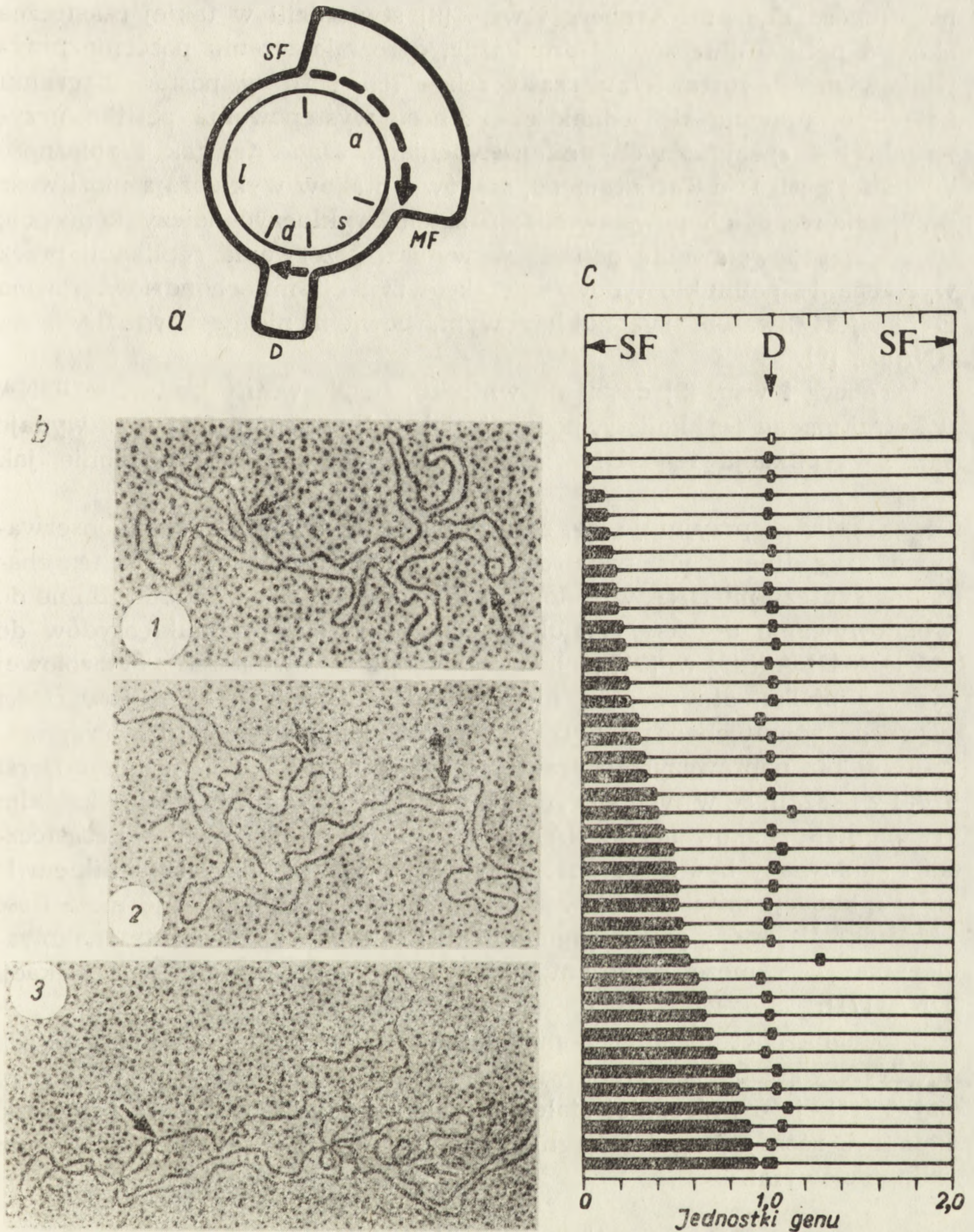
Wolstenholme i wsp. [210] stwierdzili, że zarówno w normalnej, jak i nowotworowej wątrobie szczura oraz w zarodku kurczęcia powszechnie występuje mt-DNA w postaci dwóch typów cząsteczek rozwidlonych, z których jeden typ zawiera wszystkie trzy segmenty dwuniciowe, a drugi typ — jedynie nić pojedynczą, stanowiącą do 80% długości całej cząsteczki.

Robberson i wsp. [159] opisali etapy pośrednie replikacji pierścieniowej. Powstają one podczas syntezy przemieszczeniowej, kiedy na odsuniętej, głównej nici H rozpoczyna się synteza nowej nici L; przesunięcie wynosi wtedy 3 μm (czyli 8 000 nukleotydów). W powstałych widełkach jeden biegun jest nieruchomy, a drugi rozwija się. Sprawdzone to ostatnio na mt-DNA komórek szczepu LD myszy; zawierają one dwa monomero-we genomy i mają często po dwie pętli D, z których jedna pozostaje krótka (i dlatego została użyta za wyznacznik), a druga, umieszczona na połowie obwodu, rozszerza się zawsze jednokierunkowo (rys. 4, 5) [92].

Pętlę D badano również na liniowym mt-DNA, który u *Tetrahymena*



Rys. 4. Schemat replikacji w pętli D (wg Kasamatsu i Vinogradowa [92], zmodyfikowane). *a* — Na nici lekkiej L pojawia się odcinek E, nić H („pętla zamknięta”) odsuwa się; *b* — Odcinek E wydłuża się w komplement nici H („pętla rozszerzona”); *c* — Po 0,6 jednostki genomu rozpoczyna się synteza komplementarnej nici L' 0 — początek rozwidlenia. Tor *a* → *b* → *c* ilustruje przemieszczanie jednokierunkowe; tor *a* → *b'* ilustruje ewentualne przemieszczanie obukierunkowe



Rys. 5. Jednokierunkowy rozwój pętli D w dwugenomowym mt-DNA komórek LD myszy [92]. a: D — mała, nierozwijająca się pętla; SF — nieruchomy początek rozwidlenia; MF — postępujące zakończenie rozwidlenia; a, d — „duplex” w obrębie pętli; s, l — „duplex” poza pętlą; 1 — ma długość niezmienną, b: mikrofotografia elektronowa cząsteczek mtDNA, zawierających: 1 — dwie pętłe małe (strzałki); 2 — jedna pętla mała, nierozwijająca się (strzałka z kulką); 3 — jak 2 — stadium zaawansowane (24 000 \times). c: diagram pętli powiększającej się z punktu rozwidlenia nieruchomego (SF); D — pętla nierozwijająca się

ma długość 17,6 μm . Arnberg i wsp. [9] stwierdzili w takiej cząsteczce około 6 pętli o długości 0,2 μm każda, o rozmieszczeniu pozornie przypadkowym. Po ustawieniu cząsteczek i ich pętli w postać diagramu kołowego, ujawnia się jednak cykliczność występowania pętli o przynajmniej 8 specyficznych umiejscowieniach. Dane te, jak i zbieżność wielkości pętli D u *Tetrahymena*, ssaków i ptaków wykluczają możliwość przypadkowego ich powstawania; a zatem wykluczyć należy koncepcję tłumaczącą powstawanie pętli D w wyniku przerwania replikacji przez wyczerpanie polinukleotydów w efekcie izolacji mitochondriów. Pasm E nie jest kwasem rybonukleinowym, bowiem nie jest wrażliwe na RNAazę [9].

Arnberg i wsp. [9] doszli do wniosku, że pierwotny kształt mt-DNA u *Tetrahymena* jest kolisty, podobnie jak u *Neurospora* [49] oraz wydaje się, że replikacja tego DNA przebiega wielopunktowo, podobnie jak u faga T₄.

Aczkolwiek przyjmuje się, że replikacja mt-DNA jest semikonserwatywna, zagadnienie jest nadal dyskusyjne [30]. Dyskusyjny jest też charakter syntezy mt-DNA w izolowanych mitochondriach. Są one zdolne do wbudowywania dezoksyrybonukleozydów i dezoksyrybonukleotydów do swojego DNA (lit. w [31]), nawet przy braku równoległej, cytozolowej syntezy białka, ale produkt nie przekracza ilościowo 0,5% zawartości obecnego w mitochondriach DNA. Przeważa pogląd o bardziej replikacyjnym niż naprawczym charakterze tej syntezy. Ter Schegget i Borst [185] wykazali, że w tych warunkach powstaje składnik I* będący krótkim fragmentem znakowanego DNA (nić E) związany z pierścieniową cząsteczką i stanowiący być może analog natywnej pętli D. Poza składnikiem I* przy inkubacji mitochondriów z prekursorami DNA powstaje mała ilość składnika II*, który prócz fragmentu nici H zawiera fragmenty znakowanej nici L i może reprezentować dalszy etap pośredni w replikacji DNA [71].

Podobnie heterogenną populację znakowanych *in vitro* cząsteczek mt-DNA wątroby szczura stwierdzili ostatnio Gause i wsp. [78], przy czym frakcja o pośredniej stałej sedymentacji (35-38S) zawiera cząsteczki koliste z różnej długości fragmentami liniowymi i pewnymi odcinkami jednoniciowymi.

4.3. POLIMERAZA MT-DNA

Polimerazę mt-DNA wykrył Wintersberger u drożdży już w 1966 r. (cyt. wg [208]). Później enzym ten oczyszczono z mitochondriów drożdży (cyt. wg [30]) oraz z wątroby ([114], cyt. wg [31]) i śluzówki jelita szczura [142]. Brak było niezbitych dowodów na wyłącznie mitochondrialne jej pochodzenie [31].

Dopiero zastosowanie równoległej analizy znaczników enzymatycznych typowych dla mitochondriów, a nawet dla ich przedziałów metabolicznych pozwoliło na wykazanie mitochondrialnego pochodzenia polimerazy mt-DNA w wątrobie szczura. Wykazano też, że jest ona zlokalizowana na wewnętrznej powierzchni błony mitochondrialnej, skąd enzym ten może być częściowo uwolniony działaniem roztworów soli [198].

Odmienne od pozostałych polimeraz DNA, aktywność polimerazy mt-DNA jest stymulowana w warunkach wysokiej siły jonowej (ale hamowana w przypadku mt-polimeraz DNA ze śluzówki [142]). Polimeraza ta wykazuje preferencję w stosunku do matrycy mt-DNA, Wspomniana, indukowana polimeraza z *Tetrahymena* (oczyszczona 6 tys. razy, o masie cząsteczkowej 80 000), może wykorzystywać DNA natywne i zdenaturowany cieplnie.

Ostatnio oczyszczono [75, 188, 189] polimerazę mt-DNA z komórek HeLa, która zachowuje zdolność kopiowania natywnego, kolistego mt-DNA. Prawdopodobnie preparat ten zawiera endonukleazę, zdolną do rozrywania kolistego, dwuniciowego DNA. Aktywność endonukleolityczna zdaje się warunkować replikację mt-DNA zgodnie z interpretacją pętli D, jako początkowego etapu syntezy (tj. syntezy fragmentu zawierającego 450 nukleotydów); w następnym stadium niezbędne jest pęknięcie kolistego DNA. Powstająca komplementarnie nici H odsuwa nici dawną jako fragment liniowy [188] w sposób odmienny niż to zakładał Kasamatsu *in vivo* (rys. 4).

5. EWOLUCJA

Poznanie budowy, mikroheterogenności i typu replikacji umożliwia wgląd w ewolucję mt-DNA. Ewolucja ta jest interesująca z kilku powodów [31]: 1) mt-DNA jest jedynym małym DNA, obecnym u wszystkich Eukariota i jego ewolucję można śledzić od ponad 400 milionów lat; 2) cząsteczka DNA dostatecznie jest mała, dzięki czemu można badać homologie sekwencji zasad, delecje, wbudowywanie i zmiany indywidualnych par zasad; 3) w jednej cząsteczce tego DNA zawarte są geny dla rRNA, tRNA i mRNA, dzięki czemu możliwe jest badanie ograniczeń w zmianach ewolucyjnych; 4) badania homologii w sekwencji zasad w mt-DNA u spokrewnionych gatunków mogą dostarczyć informacji o ewentualnej obecności szybko ewoluujących „odcinków przedzielających” w mt-DNA.

Dawid [55], porównując dwa gatunki ropuchy *Xenopus* techniką przywierania (coannealing) fragmentów zdenaturowanego mt-DNA, różniącego się gęstością w CsCl, stwierdził, że tylko 20% mt-DNA, odpowiadającego cistronom dla rRNA i tRNA zachowało dużą homologię, podczas gdy

80% DNA ewoluowało szybko, jak należałoby oczekiwać w przypadku cdcinków przedzielających DNA.

Inne porównywane pary gatunków wykazują dużą homologię między mt-DNA. Heterokompleks nici H i L szympansa i człowieka (Brown i Hallberg 1972, cyt. wg [31]) oraz hybrydy krzyżowe mt-DNA myszy i szczura wykazują większą homologię, niż DNA jądrowe tych gatunków (cyt. wg [3]). Podczas gdy homologia sekwencji okazała się identyczna dla mt-DNA wątroby i nerki szczura (cyt. wg [30]), maleje ona w miarę zwiększania dystansu filogenetycznego gatunków.

Metodą przywierania nie wykryto żadnej homologii między mt-DNA płazów i drożdży, a nawet pomiędzy mt-DNA *Paramecium* i *Tetrahymena* [72]. Nie uzyskano także krzyżowej hybrydyzacji pomiędzy mt-DNA kurcząt, drożdży i *Tetrahymena* (Flavell i Sanders 1973, cyt. wg [31]). Ten brak homologii obejmowałby również geny dla mt-rRNA, co jest zastanawiające wobec wybitnego konserwatyzmu jądrowych genów dla rRNA (cyt. wg [31]).

Borst i Flavell [31], uważają, że powodem dużej zmienności (dywergencji sekwencyjnej) mt-DNA, łącznie z jego genami dla tRNA i rRNA, jest szybka wymiana mt-DNA, o tyle częstsza od wymian DNA jądrowego, o ile dłuższy jest czas generacji komórek. Ta dywergencja wynosi np. 6% dla mt-DNA dwóch gatunków *Xenopus*, przy dywergencji zerowej dla ich rRNA cytoplazmatycznego (Brown i wsp. 1972, cyt. wg [3]).

Niezupełnie wyjaśniony jest mechanizm zapobiegający heterogenności populacji mt-DNA w jednym gatunku, a nawet u pojedynczego osobnika. Można go wytłumaczyć zarówno istnieniem układu „mistrz-uczniowie”, czyli obecności cząsteczki mt-DNA podporządkowującej sobie inne cząsteczki mt-DNA, lub też obecności w jądrze kopii sterującej (master copy), jak również redukcją mt-DNA do jednej tylko cząsteczki w komórkach rozrodczych. Borst i Flavell [31] uważają, że możliwość neutralnych mutacji w mt-DNA ograniczona jest przez trzy czynniki:

1) kompleksowe interakcje w obrębie mitochondrium, np. rRNA z białkami rybosomalnymi, mito- i cyto- podjednostek cyt α_3 z ATPazą przy wbudowywaniu w wewnętrzną błonę mitochondrialną,

2) zmiany w sekwencjach kodujących białko mitochondrialne ograniczone na poziomie tRNA, ponieważ nie można wykluczyć, że pewne kodony nie są wcale odczytywane przez mitochondrialny system syntezy białka,

3) ponieważ genom mitochondrialny jest podporządkowany systemowi jądrowo-cytoplazmatycznemu, a ścisła współpraca obu genomów niezbędna jest dla wszystkich faz biogenezy mitochondriów, szansę utrwalenia mają tylko te zmiany w mt-DNA, którym towarzyszyć będą odpowiednie zmiany w DNA jądrowym.

I tak w kilku liniach hybryd komórkowych człowiek-mysz wykrywano jedynie mysie mt-DNA, chociaż w hybrydach pozostawało około 23 chromosomów ludzkich [14]. Widoczna represja genomu mitochondrialnego ludzkiego w tych krzyżówkach może być wynikiem eliminacji niektórych chromosomów ludzkich, podczas gdy produkty dominującego genomu myszy nie mogą zastąpić odpowiednich produktów genomu ludzkiego przy biogenezie mitochondriów, jeśli zaś powstają swego rodzaju mitochondria hybrydowe, to są one usuwane z populacji mitochondrialnej.

Zarówno mt-DNA, jak i DNA chloroplastowy są odpowiedzialne za dziedziczenie cytoplazmatyczne, w którym allele nie segregują się w potomstwie w sposób mendlowski. Uważa się, że u organizmów, u których tylko jedna z gamet rodzicielskich stanowi większość cytoplazmy w momencie zapłodnienia zwierzęcia, rośliny wyższe i pewne grzyby, że genom cytoplazmatyczny samca (plemnik, pyłku, konidiospory) nie wchodzi w skład gamety męskiej. Tymczasem u *Chlamydomonas* gamety męskie i żeńskie są jednakowej wielkości, co daje pełną możliwość dziedziczenia ze strony męskiej. W systemie takim stwierdzono nawet istnienie swoistego „chromosomu” chloroplastowego [143]. Gdy jednak DNA gamety męskiej oznakowano ^{14}N , a gamety żeńskie ^{15}N i dokonano nimi obustronnych krzyżówek, stwierdzono, że w zygocie pozostaje DNA chloroplastowy ze strony żeńskiej, podczas gdy znika ze strony męskiej [167]. Również u płazów udowodniono, że hybrydy dwóch gatunków *Xenopus* mają w komórkach somatycznych tylko żeński mt-DNA [58].

6. POCHODZENIE

Celem wyjaśnienia pochodzenia mitochondrialnego systemu genetycznego o charakterze zbliżonym do układu prokariotycznego proponuje się obecnie dwie hipotezy [126, 148, 149]:

1) Endosymbiotyczną, według której mitochondria wywodzą się z symbiotycznych probakterii, które w początkowej fazie ewolucji wniknęły do komórki gospodarza i przekazały część swej informacji do genomu jądrowego;

2) Episomalną, według której mt-DNA wykształcił się jako episom i otoczył się błoną zawierającą enzymy oddechowe (typu mezosomy) jeszcze w czasie, gdy prakomórki eukariotyczne miały charakter prokariotyczny.

Chociaż większość faktów przemawia za hipotezą symbiotyczną, są pewne cechy popierające hipotezę episomalną: na przykład zdolność do replikacji mt-DNA przy braku syntezy białka oraz jej wrażliwość na akrydyny. W poszukiwaniu dowodów potwierdzających te hipotezy, (które omawiane są gdzie indziej [215, 216]), badania rozwijają się obecnie

w dwóch kierunkach: poszukiwania kopii wzorcowej w jądrze oraz dokonywanie tzw. analizy najbliższego sąsiedztwa.

Problem istnienia w DNA jądrowym sekwencji zasad, odpowiadających mt-DNA, dyskutowano już w 1963 r. i został on omówiony w przeglądzie Whittakera i wsp. [204]. Tabak [181] prowadził badania hybrydizacyjne na DNA kurcząt, który okazał się jednak niekorzystny, bowiem jedna kopia mt-DNA stanowi tylko 5×10^{-4} ‰ haploidalnego genomu jądrowego. Flavell i Trampe [73] powtórzyli ten typ doświadczeń na pierwotniaku *Tetrahymena*, u którego jedna kopia mt-DNA stanowi już 0,08 ‰ haploidalnego genomu jądrowego. Stwierdzili oni, że w haploidalnym genomie jądrowym można wykryć hybrydizacyjnie mniej niż 0,04 ‰ zintegrowanej matrycy mt-DNA. Ponieważ makronukleus jest tu poliploidalny (około $100n$), w jądrze tym należy oczekiwać najwyżej 4 kopii dla mt-DNA. Można więc wykluczyć istnienie zintegrowanej chromosomalnej kopii dla mt-DNA u *Tetrahymena*. Do podobnych wniosków w odniesieniu do *Xenopus laevis* doszli David i Blacker [58].

Jest jednak możliwość istnienia kopii mt-DNA typu plazmidowego, która w jądrze nie byłaby związana z DNA chromosomalnym. Doświadczalnie wykrywa się dwie takie kopie w genomie haploidalnym i z tego powodu zarówno potwierdzenie, jak i zaprzeczenie tej możliwości jest technicznie bardzo trudne. U drożdży *S. cerevisiae* Cohen [52] stwierdził tylko pół kopii mt-DNA, ale ostatnio Storti i Sinclair cyt. za [152]) wykryli dwie lub dwie i pół kopii mt-DNA. Stosowany jednak przez nich sposób podejścia budzi wiele zastrzeżeń, przedyskutowanych przez Reijndersa i wsp. [152]. Wprawdzie Tabak i wsp. [182] stwierdzili maksymalną ilość 1–3 kopii mt-DNA w haploidalnym jądrze kurczęcia, ale ilość tę tłumaczą wyłącznie zanieczyszczeniem DNA jądrowego przez mt-DNA.

Doświadczenia nad dziedziczeniem mt-DNA w hybrydach płazów [58] wykazały, że 14–16 kopii mt-DNA wykrywanych w pełnych jądrowych preparatach DNA pochodzi wyłącznie od matki, co interpretuje się jako dowód na zanieczyszczenie mitochondriami.

Analiza najbliższego sąsiedztwa i porównanie jej wyników uzyskanych dla mt-DNA i DNA bakteryjnego i jądrowego może udzielić informacji o jedno- lub wielokierunkowym pochodzeniu mitochondriów oraz podobieństwie par wspólnych dla wszystkich jądrowych DNA u Eukariota. Niestety, trudności interpretacyjne są bardzo duże [31].

W klasycznej analizie dubletów zasad, prowadzonej za pomocą polimerazy DNA, stwierdzono duże podobieństwa układu bogatego w GpG i ubogiego w GpC (między mt-DNA myszy, świnki i *Tetrahymena* [161]). Układ ten jest wyraźnie różny od DNA jądrowego u Eukariota, DNA wirusów i bakterii. Wyniki przemawiają za wspólnym pochodzeniem

mt-DNA u *Metazoa* i pierwotniaka *Tetrahymena*, ale nie są dostatecznie przekonującym dowodem, wykluczającym teorię episomalną (por. dyskusja Borsta i Flavella [31]).

7. MITOCHONDRIALNY RNA

7.1. TRANSKRYPCJA mt-DNA IN VIVO I IN VITRO

Mitochondria zawierają RNA odmienny od RNA cytoplazmatycznego [11, 30, 145, 208]. O podobieństwie RNA mitochondrialnego (mt-RNA) do RNA bakteryjnego świadczy mała zawartość G+C, niski stopień metylowania i odporność na aktynomycynę D, podaną w niskich stężeniach. Od RNA mykoplazmy mt-RNA różni się ruchliwością elektroforetyczną i większą wrażliwością na etidium [86].

Syntezę RNA w mitochondriach wykazano już dawno; np. w mitochondriach hepatocytów kurczęcia, urydyna-³H jest najsilniej wbudowywana do obwodowych części tych organelli, na co wskazują badania autoradiograficzne. W badaniach Attardiego [5, 6, 7, 12, 13] znakowany urydyną mt-RNA z komórek HeLa hybrydyzowano z niciami H i L mt-DNA, rozdzielonymi uprzednio w alkalicznym gradiencie CsCl. Wyniki krótkotrwałej inkorporacji urydyny-³H wskazywały, że zachodzi transkrypcja obu nici DNA [7]. Wyniki długotrwałego znakowania wskazują, iż mt-DNA hybrydyzuje w sposób całkowity z nicią H, a jedynie w niewielkim stopniu z nicią L mt-DNA [5]. Dane te mogą jednak świadczyć, że możliwa jest pełna symetryczna transkrypcja obu nici mt-DNA [5]; po pewnym czasie następuje bowiem usunięcie lub degradacja 98% RNA przepisane go z nici L. Przypuszczalnie podobnie przebiega proces transkrypcji w mitochondriach szczura [2] i w mitochondriach *Tetrahymena* [174].

W układzie izolowanym polimeraza mt-RNA płazów prowadzi prawie wyłącznie transkrypcję nici H homologicznego mt-DNA [214]. W dawniejszych badaniach wykazano, że polimeraza RNA z *Entamoeba coli* może wykorzystywać jako matrycę mt-DNA wątroby szczura. Stwierdzono, że zachodzi wówczas częściowo transkrypcja symetryczna a częściowo transkrypcja tylko nici L mt-DNA. (Tabak i Borst 1970, cyt. za [208]).

Intensywność wbudowywania znakowanej urydyny w mt-RNA w komórkach HeLa wzrasta począwszy od fazy S i osiąga szczyt w fazie G₂ cyklu komórkowego [137], zbiegając się z maksimum replikacji mt-DNA. W wątrobie ssaka można wyróżnić dwie populacje mitochondriów o równej zawartości DNA, ale różniące się zawartością RNA w przeliczeniu na

mg białka [69]. Wynik ten sugeruje, że nie istnieje synchronizacja syntezy DNA we wszystkich mitochondriach w komórce.

Półokres trwania, mierzony w obecności etidium lub kordycypiny, w komórkach zwierzęcych hodowanych *in vitro* wynosi 3 godziny dla mt-rRNA, podczas gdy mt-tRNA jest stabilny. Półokres trwania dla szybko znakującego się mt-RNA, mierzony na podstawie wygaszania syntezy białka odpornej na cykloheksimid, wynosi w komórkach HeLa 1–3 godzin a u drożdży mniej niż 10 minut. Półokres trwania mt-RNA, oznaczony przy zastosowaniu rifampicyny, okazał się znacznie krótszy [30]; np. dla *Physarum* wynosi on 2–3 minuty [84].

W poszukiwaniu miejsc promotorowych na mt-DNA *in vitro* stwierdzono, że bakteryjna polimeraza RNA rozpoznaje na nici mt-DNA kilka sekwencji przypominających punkty inicjacyjne u bakteriofaga. Stwierdzono też, że polimeraza ta może asymetrycznie przepisywać cistrony kodujące mt-RNA u *Neurospora* [169], oraz cistrona dla rRNA u drożdży [115]; jądrowa polimeraza RNA drożdży prawie w ogóle nie odczytuje tych cistronów. Co więcej, polimeraza mt-RNA drożdży może prowadzić syntezę specyficznych enzymów i odczytywać informację fagów T₃ i T₇ *E. coli*. Może to świadczyć, że sygnały dla rozpoczęcia transkrypcji i translacji u bakterii, fagów i w mitochondriach są podobne [156]. Jednakże o ile możliwa jest transkrypcja mt-DNA z *N. crassa* przy udziale polimerazy RNA *E. coli*, nie jest możliwa translacja mt-DNA w układzie wyizolowanym z bakterii [25].

Być może istnieje specyficzna bariera na poziomie tRNA; u bakterii i w mitochondriach występują bowiem odmienne tRNA, gdy rybosomy mitochondrialne i rybosomy *E. coli* są podobne i mogą być wzajemnie zastąpione.

Regulację syntezy mt-DNA na poziomie komórki próbowali wyjaśnić Barath i Künzel [17] (patrz rozdz. 8). Aktywność polimerazy RNA zwiększa się przez związanie mt-DNA z błoną mitochondrialną przy hamującym wpływie białek matriksowych, rozpuszczalnych w dużym stężeniu NaCl [93]. Są też sugestie o regulacyjnym wpływie metabolicznych stanów mitochondriów na aktywność polimerazy mt-RNA [93]. Synteza mt-RNA aktywowana jest podawaniem ACTH *in vivo* [131] oraz hormonów tarczycy zarówno *in vivo* (cyt. wg [30]), jak i *in vitro* w mitochondriach wątroby [164].

Dotychczas niewiele wiadomo o pochodzeniu mt-RNA informacyjnego [5, 76, 152, 170]. Istnieją sugestie, że mt-RNA informacyjny pochodzi z jądra ([76], Dawid 1970, cyt. wg [194] lub powstaje w mitochondriach ([5], Aaiji i Borst 1970, cyt. wg [76], Gaitshoki i wsp. 1972, cyt. wg [76]) a nawet nie wyklucza się możliwości przekazywania mt-RNA informacyjnego do cytoplazmy (Attardi i Attardi 1967, cyt. wg [109]).

Hipotezę samowystarczalności genomu mitochondrialnego poparli ostatnio Mahler i Dawidowicz [109]. Stwierdzili oni, że u wrażliwego na wysoką temperaturę T_s — 136 mutanta *S. cerevisiae* można selektywnie hamować syntezę mt-RNA i RNA jądrowego działaniem odpowiednio etidium lub podwyższonej temperatury (36°C). Specyficzna wrażliwość wyłącznie na etidium syntezy tzw. białek nowo powstających (nascent protein) na polisomach mitochondrialnych wskazuje, że import mRNA z jądra nie jest niezbędny dla przebiegu syntezy białka w mitochondriach [152].

Stwierdzono jednak (Swanson 1971, cyt. wg [17]), że syntetyczne polinukleotydy pobierane są przez mitochondria i wykorzystywane jako matryca w syntezie polipeptydów, a Georgatsos [79] wykazał, że wielkocząsteczkowe RNA z jąder może wnikać do izolowanych mitochondriów wątroby myszy. Na jądrowe pochodzenie mt-mRNA wskazywał fakt, że część wysokocząsteczkowego RNA, stwierdzana w preparatach mitochondrialnych, nie hybrydyzowała z mt-DNA, a znakowanie tego RNA nie było hamowane przez etidium [13]. Wykazano jednak później [111, 112], że ten RNA jest zanieczyszczeniem z rybosomów cytoplazmatycznych, będąc produktem degradacji 28S RNA.

Z drugiej strony w plemnikach mających nieczynny genom jądrowy obserwuje się syntezę pozarybosomalnego 16S RNA, który być może jest informacyjnym mt-RNA, zdolnym do kodowania pewnych białek mitochondrialnych plemnika [144].

Stwierdzono, że w mitochondriach ssaka występuje polidispersyjny RNA, wykazujący własności mRNA, którego synteza jest hamowana przez etidium. W cząsteczce tego RNA występują kowalencyjnie związane sekwencje poli-A zawierające 50–80 nukleotydów i charakteryzujące się stałą sedymentacji 4–5S [135]. Informacyjny mt-RNA jest uwalniany z rybosomów mitochondrialnych za pomocą puromycyny [135]. Zdaniem Perlmana RNA ten jest syntetyzowany i wykorzystywany w mitochondriach. Wobec braku sekwencji poli-A w RNA u Prokariota, wykrycie takich sekwencji w mt-RNA świadczy o istnieniu dużych różnic między genomem bakteryjnym i mitochondrialnym.

7.2. POLIMERAZA mt-RNA

Omówione fakty wskazują, że mitochondria zawierają polimerazę RNA zależną od DNA. Niestety izolacja tego enzymu okazała się trudna, ponieważ jest on ściśle zespolony z błonami mitochondrialnymi, względnie z mt-DNA. Drastyczne metody, stosowane z powodzeniem w celu izolacji enzymu z komórek bakteryjnych, uszkadzają enzym mitochondrialny, a metody łagodne nie uwalniają go ze struktur. Jego prawdziwej aktywności natywnej nie można mierzyć nawet w spęczniałych mitochondriach

z uwagi na ograniczone wnikanie rybonukleotydów oraz na działalność trójfosfataz. W badaniach nad wydzieloną polimerazą RNA używa się zwykle jako matrycę DNA jądrowy grasicy albo kopolimer d(A-T), które mogą mieć różną od natywnego mt-DNA aktywność matrycową.

Dyskusja na temat wrażliwości mitochondrialnej polimerazy RNA na rifampicynę toczy się już od kilku lat. Antybiotyk ten już w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ hamuje bakteryjną polimerazę RNA w momencie inicjacji syntezy RNA, a dopiero w bardzo dużych stężeniach hamuje polimerazę jądrową u ssaków. Zagadnienie to szczegółowo przedstawiają Borst [30] i Wintersberger [208]. Ostatecznie przeważa pogląd, że polimeraza mt-RNA jest wrażliwa na rifampicynę. Polimeraza ta jest również silnie hamowana akrydynami i etidium, ale efekty są skomplikowane mutagennym działaniem tych związków. Na razie jedynie polimerazę z mitochondriów *Neurospora* otrzymano w stanie homogennej czystości [105]. Przypomina ona strukturalnie polimerazę tRNA bakteriofaga T7. Jest wrażliwa na rifampicynę, a odporna na α -amanitynę [165], podobnie jak polimeraza jąderkowa Eukariota. Najlepszą matrycą okazały się dla niej natywne DNA i kopolimery d(A-T). Jądrowy DNA nie wykazuje własności matrycowych dla tego enzymu. Enzym stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy o c. cz. 64 000 daltonów, a więc jest 4 razy mniejszy niż enzym bakteryjny. Jest najmniejszą i najprostszą znaną polimerazą; dla regulacji jej aktywności mogłoby wystarczyć pojedyncze białko represorowe. Polimerazą w mt-RNA o podobnym ciężarze cząsteczkowym wyizolowano też z wątroby szczura [150].

Poziom tego enzymu drastycznie wzrasta w cytozolu komórek *Neurospora*, potraktowanych chloramfenikolem lub etidium [104a], co może świadczyć o powiązaniu obu systemów genetycznych w procesach regulacji syntezy składników mitochondrialnych. Istotny jest fakt, że po zablokowaniu syntezy białek mitochondrialnych kontrola jądrowa ustaje [17]. Podobną sytuację opisano u *Tetrahymena* (Lloyd 1971, cyt. wg [208]). Popiera to wcześniejsze sugestie dotyczące drożdży (cyt. wg [208]) o cytozolowym pochodzeniu i jądrowym kodowaniu mt-polimerazy RNA (rys. 1). Teoria bakteryjnego pochodzenia mitochondriów przyjmuje możliwość, że w toku ewolucji do genomu jądrowego wniknęły pewne cistrony probakteryjnego genomu; dotyczyłoby to właśnie polimerazy, która nadal zachowuje charakter bakteryjny.

Ostatnie wyniki badań nad drożdżami [207, 208] oraz *Xenopus* [214] wykazały charakterystyczne właściwości oczyszczonej polimerazy mt-RNA, odmienne od właściwości polimerazy jądrowej. Sugestia, w myśl której mitochondria zawierają dwa typy tej polimerazy [208], z których jeden jest odporny na rifampicynę [207], jest mało prawdopodobna wobec

minimalnej wielkości genomu mitochondrialnego. Możliwe natomiast, że niskocząsteczkowa polimeraza, wrażliwa na rifampicynę [105], stanowi tylko część bardziej złożonej cząsteczki odpornej na rifampicynę, a typ otrzymanego enzymu zależy od czystości preparatu i od metody rozbicia mitochondriów [208]. Niszczenie struktury mitochondriów dezoksychołanem lub naddźwiękami uwalnia polimerazę wrażliwą na rifampicynę.

7.3. RYBOSOMALNY RNA MITOCHONDRIÓW

Przyjmuje się powszechnie, że w mt-DNA u wszystkich badanych organizmów występuje tylko pojedynczy cistron dla mitochondrialnego rRNA [31, 32a, 152, 170] (patrzy rozdz. 3.1.). W hybrydach komórkowych chomik-mysz cistrony dla rRNA obu mitochondrialnych genomów działają niezależnie od rzeczywistej przewagi chromosomowej, aczkolwiek w odmiennych proporcjach w różnych typach hybrydów [63]. Nasuwa się pytanie, czy transkrypcja mt-DNA odbywa się wtedy w różnych populacjach mitochondriów, czy też tworzą się swoiste mitochondria „hybrydowe”, a jeśli tak, to czy ich genomy zostają zintegrowane [63]. Na podstawie badań nad drożdżami, hodowanymi w warunkach niedoboru kwasów tłuszczowych [74] wysunięto sugestię, że synteza mt-rRNA kontrolowana jest przez skład i budowę błony mitochondrialnej.

Porównanie mt-rRNA z różnych komórek ssaków przeprowadzili Mitra i wsp. [118]. Zaobserwowali oni znaczną zależność struktury II-rzędowej tego RNA od warunków jonowych środowiska. II-rzędowa struktura mt-RNA jest mniej stabilna od struktury rRNA bakteryjnych i rRNA cytozolowych [28, 59]. Badanie za pomocą mikroskopu elektronowego i metody równowagi sedymentacyjnej pozwoliły ustalić, że ciężar cząsteczkowy mt-rRNA wynosi: dla drożdży $1,30$ i $0,70 \times 10^6$ [153], dla *Metazoa* $0,55$ i $0,33 \times 10^6$ a dla *Tetrahymena* $0,91$ i $0,47 \times 10^6$ [174]. Masa cząsteczkowa mt-rRNA jest większa od masy cząsteczkowej rRNA *Escherichia coli*. Reijnders i wsp. [153] uważają, że może to być wskazówką na istnienie różnych linii rozwojowych rybosomów mitochondrialnych u drożdży i u zwierząt, jako wyniku dywergencji wspólnej linii ewolucyjnej, wywodzącej się od endosymbiontów typu *E. coli*.

Występowanie pojedynczego cistronu dla rRNA w mt-DNA może być przyczyną wyższej częstotliwości mutacji mitochondrialnych. Przejawia się to na przykład w odporności rybosomów mitochondrialnych [56, 205] (patrz rozdz. 3.1.). Z drugiej zaś strony, mutacje rRNA u bakterii odpornych na antybiotyki są rzadkie, prawdopodobnie z powodu nadmierności (redundancji) tych cistronów [172]. Bezpośrednim mechanizmem tych mutacji mogłaby jednak być również modyfikacja cząsteczki mitochondrial-

nej metylazy, chociaż stopień metylacji mt-rRNA nie przekracza 1% [61]. Stwierdzono na przykład zmiany w metylacji rRNA u wykrytego niedawno mutantu bakteryjnego, równoległej do jego odporności na erytromycynę.

W rybosomach mitochondrialnych nie stwierdzono obecności 5S rRNA [108]. Zawartość G+C w mt-rRNA jest bardzo niska; na przykład u drożdży wynosi 23% [152], a jedynie u ropuchy *Xenopus* osiąga wyjątkowo dużą wartość 40% [59]. Podobnie małą zawartością G+C charakteryzuje się 32S rRNA (o masie cząsteczkowej $2,4 \times 10^6$ daltonów), wykryty niedawno w mitochondriach *Neurospora crassa*. Uważany jest on za prekursorową formę dla obu mitochondrialnych rRNA.

7.4. MITOCHONDRIALNY tRNA

Mitochondria zawierają tRNA [11, 145] różniący się od cytoplazmatycznego rozdziałem chromatograficznym [2, 38, 64, 65, 66], własnościami acylacyjnymi [128], brakiem zasady fluoryzującej [180], a przede wszystkim obecnością f-Met-tRNA [22, 43, 85]. Wobec niebezpieczeństwa zanieczyszczenia preparatów mitochondrialnych obecnością tRNA cytoplazmatycznego, do identyfikacji jego odrębności stosuje się kilka testów: 1) specyficzność acylacji izoakceptorowych tRNA przez mitochondrialne aminoacylo-tRNA syntetazy [18]; 2) hybrydyzację z mt-DNA tak powstałych, znakowanych promieniotwórczym aminokwasem kompleksów aminoacylo-tRNA; 3) hybrydyzację między mt-DNA a 4S RNA znakowanym urydyną ^{14}C lub ^3H .

Testem 1 i 2 wykazano, że mitochondria wątroby szczura zawierają przynajmniej sześć tRNA różnych od cytoplazmatycznych tRNA i taką samą liczbę syntetaz wobec nich specyficznych [38]; cztery z nich hybrydują specyficznie z mt-DNA, co świadczy o ich mitochondrialnym pochodzeniu [128]. Dwa rodzaje mt-DNA hybrydują z nicią H, a pozostałe dwa — z nicią L, co sugeruje, że obie nici zwierzęcego mt-DNA przekazują informację. U drożdży dwa mt-tRNA hybrydują w ten sam sposób z mt-DNA [43].

Piętnaście specyficznie mitochondrialnych tRNA wykazano u *N. crassa*. Metodą trzecią uzyskano specyficzną hybrydyzację grupową 4S RNA z mt-DNA dla 11 tRNA w komórkach HeLa [6], a dla 15 — u *Xenopus* [57]. Dane te świadczą, że odmienność mt-tRNA od izoakceptorowych tRNA cytoplazmatycznych nie polega tylko na wtórnych zmianach w strukturze przestrzennej, jakie przypisuje się np. syntetazom mitochondrialnym.

Najwyższą wydajność hybrydyzacji między 4S i mt-DNA uzyskano w przypadku drożdży w obecności nadmiaru nieznakowanego, wysoko-

cząsteczkowego mt-tRNA. Reijnders i Borst (cyt. wg [31]) uzyskali „plateau” hybrydyzacyjne przy 0,9 μg mt-4S-RNA na 100 μg DNA. Wynik taki wskazuje, że mt-DNA drożdży o c. cz. $5+10^6$ daltonów zawiera przynajmniej 20 genów dla tRNA, (którego średni c. cz. u drożdży określono na 25 000 daltonów, a u *Xenopus* na 28 000 daltonów [59]). Jeśli użyty w doświadczeniach Reijndersa i Borsta [151] wysokocząsteczkowy mt-RNA zawierałby sekwencje tRNA, co jest mało prawdopodobne, to wynik będzie jeszcze wyższy, sugerując aż 26 genów dla tRNA. Pomimo tak dużej wartości, autorzy nie wykluczają możliwości transportu cytozolowego tRNA do mitochondriów.

Cohen i Rabinowitz [52] porównywali hybrydyzację mt-tRNA w różnych klonach (w tym *petitach*) drożdży i stwierdzili związek mutacji mt-DNA z heterogenicznym ich zachowaniem się podczas hybrydyzacji z mt-tRNA, przy czym wszystkie klony zachowywały jednak cistron dla leucylo-tRNA.

Brak fluoryzującej zasady, zwanej „zasadą Y” charakteryzuje zarówno prokariotowe jak i organellowe tRNA [68]. Zasada ta jest charakterystyczna dla cytozolu Eukariota i jest szczególnie interesująca, ponieważ usytuowana tuż przy 3'adenozynie antykodonu dla tRNA fenyloalaninowych, jest niezbędna dla normalnego rozpoznania kodonu (cyt. wg [68]).

Wykryto również różnice w aktywności enzymów metylujących tRNA; na przykład aktywność metylazy 2-metyladenino-tRNA, występującą u Prokariota [97], stwierdzono wyłącznie w preparatach mitochondrialnych, a nie stwierdzono w cytoplazmie komórek u Eukariota [96]. To samo dotyczy metylacji rRNA, która jest podobna w mitochondriach u Prokariota w odróżnieniu od cytoplazmy Eukariota [97].

Na specjalną uwagę zasługuje powszechna obecność w mitochondriach N-formylo-metionylo-tRNA [56, 66], który u bakterii jest inicjatorem syntezy białka. Tymczasem w cytozolu Eukariota inicjatorem jest metionylo-tRNA [100a]. O podobnej jak u bakterii roli mitochondrialnego N-formylo-metionylo-tRNA (który np. u drożdży hybrydyzuje specyficznie z mt-DNA, [85]), świadczy powstawanie N-formylo-metionylo-puromycyny w izolowanych mitochondriach drożdży [22] i w preparatach oczyszczonych rybosomów mitochondrialnych z *Neurospora* (Sala i Künzel 1970, cyt. wg [56]).

Ilość znanych mt-tRNA jest na razie zbyt mała, aby zapewnić odczytywanie całego, zdegenerowanego kodu. Przyjmuje się więc, że część tRNA jest przekazywana z cytoplazmy do mitochondriów. Izolowane mitochondria z niezapłodnionych jaj żaby nie zawierają żadnego cytoplazmatycznego tRNA [55], być może z uwagi na bardzo niski metabolizm białkowy w tych komórkach.

8. UWAGI KOŃCOWE

Z zakresem działania mt-DNA wiążą się ściśle takie zagadnienia jak rybosomy mitochondrialne [32], mitochondrialna synteza białka [56], kooperacje cytoplazmatycznej i mitochondrialnej syntezy białka przy formowaniu błony mitochondrialnej [110, 113] i zakres wzajemnej kontroli, według zależności obu genomów, jądrowego i cytoplazmatycznego [17, 102].

Mitochondrialne białka powstają w wyniku współdziałania dwóch różnych przedziałów metabolicznych komórki, przy czym większość z nich syntetyzowana jest na rybosomach cytoplazmatycznych, a tylko niewielka ilość na rybosomach mitochondrialnych. Rybosomy mitochondrialne są odmienne od rybosomów cytoplazmatycznych u wszystkich *Metazoa*, przy czym u wyższych form ewolucyjnych obserwuje się redukcję wielkości rybosomów mitochondrialnych (od 80S u *Tetrahymena* do 55S u ssaków). Wrażliwość syntezy białka, prowadzonej przez rybosomy mitochondrialne, na chloramfenikol i niewrażliwość na cykloheksimid sugeruje ich bakteryjne pochodzenie. Jednak pewna istotna różnica w ich właściwościach [193] i w ich RNA [1] w stosunku do rybosomów bakteryjnych pozwala uznać rybosomy mitochondrialne za specjalną klasę organelli [56]. Natomiast większość białek, budujących rybosomy mitochondrialne, powstaje najprawdopodobniej na rybosomach cytoplazmatycznych. Zagadnienie rybosomów mitochondrialnych omawiają dokładnie Borst i Grivell [32] oraz David [56].

Charakterystycznym produktem rybosomów mitochondrialnych jest hydrofobowy, bardzo trudno rozpuszczalny polipeptyd, prawdopodobnie glikoproteid lub lipoproteid [203]. Poza tym, mitochondrialnego pochodzenia jest kilka komponent peptydowych, tworzących w błonie mitochondrialnej funkcjonalne kompleksy cytochromów: c_1 , b [199], a_3 [200] oraz ATPazy [143, 190], których pełne wykształcenie zahamować można, na przykład na poziomie translacji chloramfenikolem, a na poziomie transkrypcji — etidium lub rifampicyną [113].

Wzajemną regulację i zależność genomu mitochondrialnego i jądrowego próbowali wyjaśnić Barath i Küntzel na przykładzie *Neurospora* [17].

Chociaż chloramfenikol hamuje syntezę białek na rybosomach mitochondrialnych, przez co uniemożliwia prawidłowe wykształcenie czynnych kompleksów cytochromów a , a_3 i b oraz ATPazy, nadal obserwuje się w tych warunkach wbudowywanie znakowanych aminokwasów do białek mitochondrialnych. Świadczy to, że białka mitochondrialnego aparatu translacji, przynajmniej u drożdży, powstają na rybosomach cytoplazmatycznych. Chloramfenikol nie hamuje syntezy mt-RNA rybosomów mitochondrialnych i takich enzymów jak polimeraza mt-RNA, translokaza rybosomowa i transformylaza-metionylo-tRNA, a prawdopodobnie rów-

niez polimeraza mt-DNA (rys. 1) i aminoacylo-tRNA syntetazy. Co więcej, zablokowanie transkrypcji i translacji mt-DNA powoduje wzrost biosyntezy omówionych enzymów, co sugeruje że kodujące je cistrony jądrowe kontrolowane są przez produkt translacji mt-DNA, powstający na rybosomach mitochondrialnych. Wspomniane cistrony jądrowe miałyby charakter zachowawczy, zastępując w toku filogenezy Eukariota pewne geny, utracone przez probakterię przekształconą w mitochondrium.

Niezależnie od pochodzenia genomu mitochondrialnego, zadziwia fakt przetrwania takiego szczątkowego systemu przez kilkaset milionów lat nacisku ewolucyjnego. Możliwe wydają się tu następujące motywacje:

1) mt-DNA stanowi efektywną formę powielania genu, umożliwiającą syntezę rybosomów w miejscu ich zapotrzebowania, tj. we wnętrzu mitochondrium;

2) końcową funkcją genomu mitochondrialnego jest synteza pewnych, hydrofobowych białek, stanowiących trzon błony mitochondrialnej, które nie mogłyby przeniknąć z zewnątrz;

3) sytuacja obserwowana obecnie, jest końcowym etapem stopniowej redukcji genomu endosymbionta, który stopniowo przekazywał funkcję ze swego DNA na DNA jądrowy pod presją Eukariota, usiłującego wyeliminować DNA organelli, przy zachowaniu jej pełnej struktury i funkcji.

Autor pragnie wyrazić wdzięczność mgr L. KASPRZAKOWEJ i mgr J. TYCZEWSKIEJ za Ich wartościową pomoc w skompletowaniu najnowszej literatury, a mgr L. HRYNIEWIECKIEJ za koncepcję i wykonanie rysunku 1 oraz za przedyskutowanie wielu zagadnień omówionych w tym artykule.

LITERATURA

- [1] AAIJI C., NANNINGA N., BORST P., 1972 — The structure of ribosome-like particles from rat-liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 140–148.
- [2] ACCOCEBERRY B., SCHNELLER J. M., STAHL A. J. C., 1973 — Comparative study of cytoplasmic and mitochondrial valyl-tRNA from yeast, *Biochimie*, **55**: 291–296.
- [3] AGSTENRIBBE E., KROON A. M., VAN BRUGGEN E. F. J., 1972 — Circular DNA from mitochondria of *Neurospora crassa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **269**: 299–303.
- [4] ALBRING M., RADSAK K., THOENES W., 1973 — Enhanced DNA synthesis in isolated megamitochondria, *FEBS Lettr.*, **35**: 4–6.
- [5] ALONI V., ATTARDI G., 1971 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. II. Evidence for complete transcription of mitochondrial DNA, *J. Molec. Biol.*, **55**: 251–270.
- [5] ALONI V., ATTARDI G., 1971 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. IV. Titration of mitochondrial genes for 16S, 12S and 4S RNA, *J. Molec. Biol.*, **55**: 271.
- [7] ALONI Y., ATTARDI G., 1971 — Symmetrical in vivo transcription of mito-

- chondrial DNA in HeLa cells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**: 1757-1761.
- [8] ARNBERG A. C., VAN BRUGGEN E. F. J., FLAVELL R. A., BORST P., 1973 — DNA synthesis by isolated mitochondria. V. Electron microscopy of replicative intermediates, Biochim. Biophys. Acta, **308**: 276-284.
- [9] ARNBERG A. C., VAN BRUGGEN E. F. J., SCHUTGENS R. B. H., FLAVELL R. A., BORST P., 1972 — Multiple D-loops in *Tetrahymena* mitochondrial DNA, Biochim. Biophys. Acta, **272**: 487-493.
- [10] ARNBERG A., VAN BRUGGEN E. F. J., TER SCHEGGET J., BORST P., 1971 — The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations, Biochim. Biophys. Acta, **246**: 353-357.
- [11] ASHWELL M., WORK T. S., 1970 — The biogenesis of mitochondria, Ann. Rev. Biochem., **39**: 251-290.
- [12] ATTARDI G., ALONI Y., ATTARDI B., OJALA D., PICA-MATTOCIA L., ROBBERSON L., STORRIE B., 1970 — Transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **35**: 599.
- [13] ATTARDI A., ATTARDI G., 1971 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. I. Properties of the discrete RNA components from the mitochondrial fraction, J. Molec. Biol., **55**: 231-250.
- [14] ATTARDI B., ATTARDI G., 1972 — Fate of mitochondrial DNA in human-mouse somatic cell hybrids, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 129-133.
- [15] AVADHANI N. G., KUAN M., VAN DER LIGN P., RUTMAN R. J., 1973 — Poly adenylic acid sequences in mitochondrial RNA, Biochem. Biophys. Res. Comm., **51**: 1090-1096.
- [17] BARATH Z., KÜNTZEL H., 1972 — Cooperation of mitochondrial and nuclear genes specifying the mitochondrial genetic apparatus in *Neurospora crassa*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 1371-1374.
- [18] BARNETT W. E., BROWN D. H., EPLER J. L., 1967 — Mitochondrial-specific aminoacyl-RNA synthetases, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**: 1775-1781.
- [19] BAXTER R., 1971 — Origin and continuity of mitochondria, [w]. Cell Differentiation, 46-64.
- [20] BERK A. J., CLAYTON D. A., 1973 — A genetically distinct thymidine kinase in mammalian mitochondria. Exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid., J. Biol. Chem., **248**: 2722-2729.
- [21] BERNARDI G., PIPERNO G., FONTY G., 1972 — The mitochondrial genome of wildtype yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA, J. Mol. Biol., **65**: 173-189.
- [22] BIANCHETTI R., LUCCHINI G., SARTIRANS M. L., 1971 — Endogenous synthesis of formyl-methionine peptides in isolated mitochondria and chloroplasts, Biochem. Biophys. Res. Comm., **42**: 97.
- [23] BLAMIRE J., CRYER D. R., FINKELSTEIN D. B., MARMUR J., 1972 — Sedimentation properties of yeast nuclear and mitochondrial DNA, J. Mol. Biol., **67**: 11-24.
- [24] BLEGG H. S., BAK A. L., CHRISTIANSEN C., SMITH K. E., STENDERUP A., 1972 — Mitochondrial DNA and glucose repression in yeast, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**: 524-530.
- [25] BLOSSEY H. C., KÜNTZEL H., 1971 — In vitro translation of mitochondrial DNA from *Neurospora crassa*, 8 FEBS Meet Amsterdam, Comm. 617.
- [26] BOARDMAN N. K., LINNANE A. W., SMILLIE R. M., (eds.) 1971 — Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts, North Holland Publ. Comp. Amsterdam.

- [27] CHIU A. O. S., SUYAMA Y., 1973 — Immunologic studies on intracellular isoenzymes, the mitochondrial and cytoplasmic leucyl-tRNA synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* **299**: 557.
- [27a] BORKOWSKI T., CHAREŹIŃSKI M. 1971 — Activity of aminoacyl-transfer RNA synthetases in brain mitochondria, *J. Neurochem.*, **18**: 851–857.
- [28] BORKOWSKI T., PASZKOWSKA A., 1973 — Nucleic acids distribution in submitochondrial fractions of calf brains, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **21**: 249–254.
- [29] BORST P., 1971 — Size structural and information content of mitochondrial DNA, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, North-Holland., 260–266.
- [30] BORST P., 1972 — Mitochondrial nucleic acids, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**: 333–376.
- [31] BORST P., FLAVELL R. A., 1972 — Mitochondrial DNA: structures, genes, replication, [w] *Mitochondria (Biomembranes)*, North Holland, 1–19.
- [32] BORST P., GRIVELL L. A., 1971 — Mitochondrial ribosomes, *FEBS Lettr.*, **13**: 73.
- [32a] BORST P., GRIVELL L.A., 1973 — Mitochondrial nucleic acids, *Biochimie*, **55**: 801–804.
- [33] BORST P., KROON A. M., 1969 — Physicochemical properties, replication and genetic function, *Intern. Rev. Cytol.*, **26**: 108.
- [34] BOSMAN H. B., 1971 — Mitochondrial autonomy: synthesis of DNA from RNA templates in isolated mammalian mitochondria, *FEBS Lettr.*, **19**: 27–29.
- [35] BRACK Ch., DELSIN E., RIOU G., 1972 — Replicating, covalently closed, circular DNA from kinetoplasts of *Trypanosoma cruzi*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1642–1646.
- [36] BRACK Ch., DELAIN E., RIOU G., FESTY B., 1972 — Molecular organization of the kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* treated with berenil, a DNA interacting drug, *J. Ultrastr. Res.*, **39**: 568–579.
- [37] BRESCH H., 1973 — Mitochondrial DNA metabolism in young *Psammochinus miliaris* embryos, *FEBS Lettr.*, **31**: 233–236.
- [38] BUCK C. A., NASS N. M. K., 1969 — Studies on mitochondrial tRNA from animal cells. I. A. comparison of mitochondrial and cytoplasmic tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases, *J. Mol. Biol.*, **41**: 67–82.
- [39] BULTMAN H., LAIRD C. D., 1973 — Mitochondrial DNA from *Drosophila melanogaster*, *Biochim. Biophys. Acta*, **299**: 196–209.
- [40] CALVAYRAC R., BUTOW R. A., LEFORT-TRAN M., 1972 — Cyclic replication of DNA and changes in mitochondrial morphology during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z.), *Exptl. Cell Res.*, **71**: 422–432.
- [41] CARNEVALI F., LEONI L., 1972 — Intramolecular heterogeneity of yeast mitochondrial DNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**: 1322–1331.
- [42] CARTER C. E., WELLS J. R., MACINNIS A. J., 1972 — DNA from anaerobic adult *Ascaris lumbricoides* and *Hymenolepis diminuta* mitochondria isolated by zonal centrifugation, *Biochem. Biophys. Acta*, **262**: 135.
- [43] CASEY J., COHEN M., RABINOWITZ M., FUKUHARA H., GETZ G. S., 1972 — Hybridization of mitochondrial transfer RNA's with mitochondrial and nuclear DNA of *grande* (wild type) yeast, *J. Molec. Biol.*, **63**: 431–440.
- [44] CHAREŹIŃSKI M., BORKOWSKI T., 1973 — Studies on binding of amino acids by mitochondrial and cytoplasmic tRNA from calf brain, *Acta Biochim. Pol.*, **20**: 153–158.
- [45] CHARRET R., ANDRE J., 1968 — La synthèse de l'ADN-mitochondrial chez

- Tetrahymena pyriformis*, étude radioautographique quantitative au microscope électronique, J. Cell. Biol., **39**: 369-381.
- [46] CHARRET R., 1970 — L'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*: forme et taille des molécules, VII Congr. Int. Micr. Electronique, Grenoble, 161-162.
- [46a] CHIU A. O. S., SUYAMA Y., 1973 — Immunologic studies on intracellular isoenzymes, the mitochondrial and cytoplasmic leucyl-tRNA synthesis, Biochim. Biophys. Acta, **299**: 557.
- [47] CLARK-WALKER G. D., 1972 — Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 388-392.
- [48] CLARK-WALKER G. D., 1973 — Size distribution of circular DNA from *petite* mutant yeast lacking, Eur. J. Biochem., **32**: 263-267.
- [49] CLAYTON D. A., BRAMBL R. M., 1972 — Detection of circular DNA from mitochondrial of *Neurospora crassa*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **46**: 1477-1482.
- [50] CLAYTON D. A., DAVIS R. W., VINOGRAD J., 1970 — Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes, J. Mol. Biol., **47**: 137-142.
- [51] COHEN S. S., 1970 — Are/were mitochondria and chloroplasts microorganisms? Amer. Sci., **58**: 281-289.
- [52] COHEN M., RABINOWITZ M., 1972 — Analysis of *grands* and *petite* yeast mitochondrial DNA by tRNA hybridization, Biochim. Biophys. Acta, **182**: 192-201.
- [53] COSGROVE W. B., 1973 — Why kinetoplasts? J. Protozool., **20**: 191-194.
- [54] COTTRELL S. F., AVERS C. J., 1970 — Evidence of mitochondrial synchrony in synchronous cell cultures of yeast, Biochem. Biophys. Res. Comm., **38**: 973-980.
- [55] DAWID I. B., 1972 — Evolution of mitochondrial DNA sequence in *Xenopus*, Developm. Biol., **29**: 139-151.
- [56] DAWID I. B., 1972 — Mitochondrial protein synthesis, Proc. 8 FEBS Meet., **28**: 35-51.
- [57] DAWID I. B., 1972 — Mitochondrial RNA in *Xenopus laevis*, I. The expression of the mitochondrial genome, J. Molec. Biol., **63**: 201-216.
- [58] DAWID I. B., BLACKLER A. W., 1972 — Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*, Developm. Biol., **29**: 152-161.
- [59] DAWID I. B., CHASE J. W., 1972 — Mitochondrial RNA in *Xenopus laevis*. II. Molecular weights and other physical properties of mitochondrial ribosomal and 4S RNA, J. Molec. Biol., **63**: 271-231.
- [60] DELAIN E., BRACK Ch., RIOU G., FESTY B., 1971 — Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast induced by the interaction of a trypanocidal drug (hydroxystilbamidine) with the kinetoplast DNA, J. Ultrastr. Res., **37**: 200-218.
- [61] DUBIN D. T., FRIEND D. A., 1971 — Degree of methylation of mitochondrial ribosomal RNA, FEBS Lettr., **18**: 287.
- [62] EHRILCH S. D., THIERY J. P., BERNARDI G., 1972 — The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. III. The pyrimidine tracts of mitochondrial DNA, J. Molec. Biol., **65**: 207-212.
- [63] ELICEIRI G. L., 1973 — Synthesis of mitochondrial RNA in hamster-mouse hybrid cells, Nature-New Biology, **241**: 233-234.

- [64] EPLER J. L., 1969 — The mitochondrial and cytoplasmic transfer ribonucleic acid of *Neurospora crassa*, *Biochemistry*, **8**: 2285–2291.
- [65] EPLER J. L., BARNETT W. E., 1967 — Coding properties of *Neurospora* mitochondrial and cytoplasmic leucine transfer RNA's, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**: 328–333.
- [66] EPLER J. L., SHUGART L. P., BARNETT W. E., 1970 — N-formylmethionyl transfer ribonucleic acid in mitochondria from *Neurospora*, *Biochemistry*, **9**: 3575–3579.
- [67] EVANS H. H., EVANS T. E., 1970 — Methylation of the deoxyribonucleic acid of *Physarum polycephalum* at various periods during the mitotic cycle, *J. Biol. Chem.*, **245**: 6436–6441.
- [68] FAIRFIELD S. A., BARNETT W. E., 1971 — On the similarity between the tRNA's of organelles and Prokaryotes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 2972–2976.
- [69] FATTERPAKER P., SATAY J. G., RAJWADE M., KATVARE S. S., NETRAWALI M. S., SREENIVASAN A., 1973 — Promitochondria like structures in rat liver, 9 Int. Congr. Biochem. Abstr. Conim. Stockholm, **291**.
- [70] FAUMAN M. A., RABINOWITZ M., SWIFT H. H., 1973 — Comparison of the mitochondrial ribonucleic acid from a wilde-type *grande* and a cytoplasmic *petite* yeast by ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, *Biochemistry*, **12**: 124–128.
- [71] FLAVELL R. A., BORST P., TER SCHEGGET J., 1972 — DNA synthesis by isolated mitochondrial. IV. Isolation of an intermediate containing newly synthesized DNA in full-length light strands, *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 341–349.
- [72] FLAVELL R. A., JONES I. G., 1971 — Base sequence distribution in *Tetrahymena* mitochondrial DNA, *FEBS Lettr.*, **14**: 354–356.
- [73] FLAVELL R. A., TRAMPÉ P. O., 1973 — The absence of an integrated copy of mitochondrial DNA in the nuclear genome of *Tetrahymena pyriformis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **308**: 101–105.
- [74] FORRESTER I. T., WATSON K., LINNANE A. W., 1971 — Mitochondrial membrane organization. A determinant of mitochondrial ribosomal RNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**: 409.
- [75] FRY M., WEISSBACH A., 1973 — A new deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase from HeLa cell mitochondria, *Biochem.*, **12**: 3601–3607.
- [76] GAITSKHOKI V. S., KISSELEV O. I., NEIFAKH S. A., 1973 — On the interaction of mitochondrial protein synthesizing system with template ribonucleic acid of nuclear origin, *FEBS Lettr.*, **31**: 93–100.
- [77] GALLERANI R., DE BENEDETTO C., SACCONI C., 1971 — Mitochondrial RNA polymerase from rat liver, 8 FEBS Meet. Amsterdam, Conim. 619.
- [78] GAUSE G. G., DOLGILEVICH S. M., FATKULLINA L. G., MIKHAILOV V. S., 1973 — Heterogenous rapidly labeled DNA with the properties of replicating form in isolated rat liver mitochondria, *Biochem. Biophys. Acta*, **312**: 179–191.
- [79] GEORGATSOS J. G., 1972 — Migration of Nuclear RNA into isolated mouse liver mitochondria, *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **139**: 667–669.
- [80] GEORGATSOS J. G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, KAREMFYLLIS T., 1972 — Incorporation of labeled precursors into nuclear and mitochondrial DNA of cells grown in culture, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**: 663–666.

- [81] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., RYTEL M., 1969 — Biochemia powstawania mitochondriów, *Post. Bioch.*, **15**: 323–338.
- [82] GOODENOUGH U. W., LEVINE R. P., 1970 — The Genetic activity of mitochondria and chloroplasts, *Sci. Am.*, **223**, 22–29.
- [83] GORDON P., RABINOWITZ M., 1973 — Evidence for deletion and changed sequence in the mitochondrial deoxyribonucleic acid of a spontaneously generated *petite* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem.* **12**: 116–123.
- [84] GRANT W. D., POULTER R. T. M., 1973 — Rifampicin-sensitive RNA and protein synthesis by isolated mitochondria of *Physarum polycephalum*, *J. Mol. Biol.*, **73**: 439–454.
- [85] HALBERICH A., RABINOWITZ M., 1971 — Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial formyltetrahydrofolic acid: methionyl-tRNA transformylase and the hybridization of mitochondrial fMet-tRNA with mitochondrial DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 294–298.
- [86] HARLEY E. H., RESS K. R., 1972 — Mitochondrial RNA in mycoplasma infected HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **259**: 228–238.
- [87] HOLLENBERG C. P., BORST P., FLAVELL R. A., VAN KREIJL C. F., VAN BRUGGEN E. F. J., ARNBERG A. C., 1972 — The unusual properties of mtDNA from a “low density” *petite* mutant of yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 44–58.
- [88] HOLLENBERG C. P., BORST P., VAN BRUGGEN E. F. J., 1970 — Mitochondrial DNA V. A. 25- μ closed circular duplex DNA molecule in wild-type yeast mitochondrial. Structure and genetic complexity, *Biochim. Biophys. Acta*, **209**: 1–15.
- [89] HOLLENBERG C. P., BORST P., VAN BRUGGEN E. F. J., 1972 — Mitochondrial DNA from cytoplasmic *petite* mutants of yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 35.
- [90] KÁRA J., DVORÁK M., CERNA H., 1972 — Presence of viral RNA-instructed DNA polymerase in the oncogenic subviral particles (virosomes) isolated from the mitochondria of Rous sarcoma cells, *FEBS Lettr.*, **25**: 33–37.
- [91] KASAMATSU H., ROBBERSON D. L., VINOGRAD J., 1971 — A novel-closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 2252–2257.
- [92] KASAMATSU H., VINOGRAD J., 1973 — Unidirectionality of Replication in mouse mitochondrial DNA, *Nature-New Biology*, **241**: 103–105.
- [93] KAZAKOVA T. B., GACHAVA M. M., CHEBOTAR N. A., 1971 — On the regulatory function of mitochondrial membranes and proteins in RNA synthesis on mitochondrial DNA template, *Mol. Biologija*, **5**: 280–290.
- [94] KIMBERG D. V., LOEB J. N., 1971 — Differential sensitivity of nuclear and mitochondrial DNA synthesis to suppression by cortisone treatment, *Biochim. Biophys. Acta*, **246**: 412–420.
- [95] KIRSCHNER R. H., WOLSTENHOLME D. R., GROSS N. J., 1968 — Replicating molecules of circular mitochondrial DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **60**: 1466–1468.
- [96] KLAGSBRUN M., 1973 — Differences in the methylation of transfer ribonucleic acid in vitro by the mitochondrial and cytoplasmic transfer ribonucleic acid methylases of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2606–2611.
- [97] KLAGSBRUN M., 1973 — An evolutionary study of the methylation of transfer and ribosomal ribonucleic acid in Prokaryote and Eukaryote organisms, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2612–2620.
- [98] KLEITMAN W., KATO K., GABARA B., KOPROWSKI H., SATO N., 1973 —

- Stable alterations in HeLa cell mitochondria following ethidium bromide treatment, *Exptl. Cell. Res.*, **78**: 47-58.
- [99] KOCH J., 1972 — The cytoplasmic DNA's of cultural human cells. Effects of ethidium bromide on their replications and maintenance, *Eur. J. Biochem.*, **30**: 53-59.
- [100] KOCH J., 1973 — Introduction of "Nicks" and "Chops" into human mitochondrial DNA in vivo and in vitro, *Eur. J. Biochem.*, **33**: 98-103.
- [100a] KOJ A., 1974 — Cykl rybosomowy w komórkach bakterii, roślin i zwierząt, *Post. Biol. Kom.*, **1**:
- [101] KOLODNER R., TEWARI K. K., 1972 — Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from Pea leaves, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1830-1834.
- [102] KROON A. M., ARENDZEN A. J., 1972 — The inhibition of mitochondrial biogenesis by antibiotics, *Proc. 8 FEBS Meet.*, **28**: 71-83.
- [103] KUNG S. D., MOSCARELLO M. A., WILLIAMS J. P., 1972 — Studies with chloroplast and mitochondrial DNA. I. Evidence of sequence homology between chloroplast and nuclear DNA (Broad Bean) **12**: 474-483.
- [104] KURIYAMA Y., LUCK D. J. L., 1973 — Ribosomal RNA Synthesis in Mitochondria of *Neurospora crassa*, *J. Mol. Biol.*, **73**: 425-437.
- [104a] KÜNTZEL H., BARATH Z., 1972 — Induction of mitochondrial RNA polymerase in *Neurospora crassa*, *Nature New Biology*, **240**: 195-197.
- [105] KÜNTZEL H., SCHAFER K. P., 1971 — Mitochondrial RNA polymerase from *Neurospora crassa*, *Nature-New Biology*, **231**: 265-269.
- [106] LAURENT M., VAN ASSEL S., STEINERT M., 1971 — Kinetoplast DNA. A unique macromolecular structure of considerable size and mechanical resistance, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**: 278-282.
- [107] LEIBOWITZ R. D., 1971 — The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells, *J. Cell. Biol.*, **51**: 116-122.
- [108] LIZARDI P. M., LUCK D. J. L., 1971 — Absence of a 5S RNA component in the mitochondrial ribosomes of *Neurospora crassa*, *Nature-New Biology*, **229**: 140-142.
- [109] MAHLER H. R., DAWIDOWICZ K., 1973 — Autonomy of mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* in their production of messenger RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 111-114.
- [110] MAHLER H. R., PERLMAN P. S., MEHROTRA B. D., 1971 — Mitochondrial specification of the respiratory chain, [W] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, North-Holland, 492-511.
- [111] MALKIN L. I., 1971 — Evidence that species of RNA found in rat liver mitochondria preparations are associated with purified cytoplasmic ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**: 787-792.
- [112] MALKIN L. I., 1972 — The Preparation of rat liver high molecular weight mitochondrial RNA free of cytoplasmic ribosomal RNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**: 1106-1109.
- [113] MASÓN T., EBNER E., POYTON R. O., SALTZGABER J., WHARTON D. C., MENNUCCI L., SCHATZ G., 1972 — The participation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in mitochondrial formation, *Proc. 8 FEBS Meet.*, **28**: 53-69.
- [114] MEYER R. R., SIMPSON M. V., 1970 — Deoxyribonucleic acid biosynthesis in mitochondria. Purification and general properties of rat liver mitochondrial deoxyribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.*, **245**: 3426-3435.

- [115] MICHAELIS G., DOUGLASS S., TSAI M. J., BURCHIEL K., SRIDDLE R. S., 1972 — In vitro transcription of mitochondrial deoxyribonucleic acid from yeast, *Biochem.* **11**: 2026–2035.
- [116] MICHEJDA J. W., HRYNIEWIECKA L., 1969 — Studies on dehydrogenases in early development of sea urchins, 6 FEBS Meet, Madrid, 1026.
- [117] MICHEJDA J. W., PIETRZYKOWSKI A., 1969 — Biogenesis of mitochondrial a review, [w] *Biochemistry of Intracellular Structures*, red. L. Wojtczak, W. Drabikowski, H. Strzelecka-Gołaszewska, PWN, Warszawa, 89–112.
- [118] MITRA R. S., BARTOOV B., MONAHAN J., FREEMAN K. B., 1972 — Comparison of mammalian mitochondrial ribosomal ribonucleic acid from different species, *Biochem. J.*, **128**: 1033–1041.
- [119] MITRA R. S., BERNSTEIN I. A., 1970 — Thymidine incorporation into deoxyribonucleic acid by isolated rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **245**: 1255–1260.
- [120] NAGLEY P., GINGOLD E. B., LUKINS H. B., LINNANE A. W., 1973 — Biogenesis of mitochondria. XXV. Studies on the mitochondrial genomes of *petite* mutants of yeast using ethidium bromide as a probe, *J. Mol. Biol.*, **78**: 335–350.
- [121] NAGLEY P., LINNANE A. W., 1972 — Biogenesis of mitochondria. XXI. Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast: The generative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain, *J. Mol. Biol.*, **66**: 181–193.
- [122] NASS M. M. K., 1972 — Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and molecular DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells, *Exptl. Cell. Res.*, **72**: 211–215.
- [123] NASS M. M. K., 1969 — Mitochondrial DNA: advances, problems and goals, *Science*, **165**: 25–35.
- [124] NASS M. M. K., 1969 — Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single and doublelength circular DNA, *J. Mol. Biol.*, **42**: 521–528.
- [125] NASS M. M. K., 1969 — Mitochondrial DNA. II. Structure and physicochemical properties of isolated DNA, *J. Mol. Biol.*, **42**: 529–545.
- [126] NASS M. M. K., 1971 — Origin of mitochondria: Are they descendants of ancestral bacteria? *Triangle*, **10**: 29–35.
- [127] NASS M. M. K., BEN-SHAUL Y., 1972 — A novel closed circular duplex DNA in bleached mutant and green strains of *Euglena gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 130–136.
- [128] NASS M. M. K., BUCK C. A., 1970 — Studies on mitochondrial tRNA from animal cells, II. Hybridization of aminoacyl-tRNA from rat liver mitochondria with heavy and light complementary strands of mitochondrial DNA, *J. Mol. Biol.*, **54**: 187–193.
- [129] NASS M. M. K., MASS S., 1962 — Fibrous structure within the matrix of developing chick embryo mitochondria, *Exptl. Cell. Res.*, **26**: 424–437.
- [130] NASS S., 1969 — The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria, *Intern. Rev. Cytol.*, **25**: 55–73.
- [131] NUSSDORFER G. G., MAZZOCHI G., 1971 — Effect of ACTH on mitochondrial RNA synthesis of rat adrenocortical cells., *Z. Zellforsch.*, **118**: 35–48.
- [132] OZEKI Y., SOOKARI Y., ONO T., INOKI S., 1971 — Studies on the ultrastructure of kinetoplasts of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma gambiense* by autoradiography and enzymatic digestion, *Biken J.*, **14**: 97–102.

- [133] PAOLETTI C., RIOU G., PAIRAULT J., 1972 — Circular oligomers in mitochondrial DNA of human and beef nonmalignant thyroid glands (nonmalignant) dimers (electron microscopy), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 847-850.
- [134] PARSONS P., SIMPSON M. V., 1973 — Deoxyribonucleic acid biosynthesis in mitochondria. Studies on the incorporation of labeled precursors in mitochondrial deoxyribonucleic acid, J. Biol. Chem., **248**: 1912-1919.
- [135] PERLMAN S., ABELSON H. T., PENMAN S., 1973 — Mitochondrial protein synthesis: RNA with the properties of eukaryotic messenger RNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**: 350-353.
- [136] PERLMAN P. S., MAHLER H. R., 1971 — Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis, Nature-New Biology, **231**: 12-16.
- [137] PICA-MATTOCCIA L., ATTARDI G., 1971 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. V. Transcription of mitochondrial DNA in relationship to the cell cycle, J. Mol. Biol., **57**: 615-621.
- [138] PICA-MATTOCCIA L., ATTARDI G., 1972 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. IX. Replication of mitochondrial DNA in relationship to the cell cycle in HeLa cells, J. Mol. Biol., **64**: 465-484.
- [139] PICA-MATTOCCIA L., ATTARDI G., 1971 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. V. Transcription of mitochondrial DNA in relationship to the cell cycle, J. Mol. Biol., **57**: 615-623.
- [140] PIPERNO G., FONTY C., BERNARDI G., 1972 — The mitochondrial genome of wildtype yeast cells. II. Investigations on the compositional heterogeneity of mitochondrial DNA, J. Mol. Biol., **65**: 191-205.
- [141] POLAN M. L., FRIEDMAN S., GALL J. G., GEHRING W., 1973 — Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Drosophila melanogaster*, J. Cell. Biol., **56**: 580-589.
- [142] POULSON R., ZBARSKY S. H., 1973 — DNA polymerase from mitochondria of rat intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta, **299**: 404-414.
- [143] POYTON R. O., ROSS E., SCHATZ G., 1973 — The biogenesis of mitochondria in yeast, LX Int. Congr. Biochem. Stockholm, Comm. 5Sb3, 249.
- [144] PREMKUMAR E., BHARGAVA P. M., 1972 — Transcription and translation in bovine spermatozoa, Nature-New Biology, **240**: 139-143.
- [145] RABINOWITZ M., SWIFT H., 1970 — Mitochondrial nucleic acids and their relations to the biogenesis of mitochondria, Physiol. Rev., **50**: 376-427.
- [146] RADSAK K., 1973 — DNA synthesis in isolated nuclei and isolated mitochondria of herpes simplex virus infected HeLa cells, FEBS Lettr., **31**: 42-46.
- [147] RADSAK K. D., FRIESE H. W., 1972 — Stimulation of mitochondrial DNA synthesis in HeLa cells by herpes simplex virus (1), Life Sciences, **11**: 717-724.
- [148] RAFF R. A., MAHLER H. R., 1972 — The nonsymbiotic origin of mitochondria, Science, **177**: 575-582.
- [149] RAVEN P. H., 1970 — A multiple origin for plastids and mitochondria, Science, **169**: 641-646.
- [150] REID H. D., PERSONS P., 1971 — Partial purification of mitochondrial RNA polymerase from rat liver, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**: 2830-2834.
- [151] REIJNDERS L., BORST P., 1972 — The number of 4S RNA genes on yeast mitochondrial DNA, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**: 126-132.
- [152] REIJNDERS L., KLEISEN C. M., GRIVELL L. A., BORST P., 1972 — Hybridization studies with yeast mitochondrial RNAs, Biochim. Biophys. Acta, **272**: 396-407.

- [153] REIJNDERS L., SLOOF P., BORST P., 1973 — The molecular weight of the mitochondrial-ribosomal RNAs of *Saccharomyces carlsbergensis*, *Eur. J. Biochem.*, **35**: 266–269.
- [154] RENGER H. C., WOLSTENHOLME D. R., 1972 — The form and structure of kinetoplast DNA of *Crithidia*, *J. Cell. Biol.*, **54**: 346–364.
- [155] RICHARDS O. C., RYAN R. S., MANNING J. E., 1971 — Effects of cycloheximide and of chloramphenicol on DNA synthesis in *Euglena gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**: 190–201.
- [156] RICHTER D., HERRLICH P., SCHWEIGER M., 1972 — Phage DNA directed enzyme synthesis in vitro system from yeast mitochondria, *Nature-New Biology*, **238**: 74–76.
- [157] RIOU G., DELAIN E., 1971 — Mitochondrial DNA from cells transformed by adenoviruses and SV 40, *Biochimie*, **54**: 831–838.
- [158] ROBBERSON D., ALONI Y., ATTARDI G., DAVIDSON N., 1972 — Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. VIII. The relative position of ribosomal RNA genes in mitochondrial DNA, *J. Mol. Biol.*, **64**: 313–317.
- [159] ROBBERSON D. L., KASAMATSU H., VINOGRAD J., 1972 — Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 737–741.
- [160] ROODYN D. B., WILKIE D., 1968 — The biogenesis of mitochondria, R. Clay. Ltd., Bungay. Suffolk, Great Britain.
- [161] RUSSEL G., SCHUNTGENS R. B. H., 1972 — Nearest-neighbour analyses of mt DNAs, 8 FEBS Meet., Amsterdam, Comm., 579.
- [162] RYTEL M., GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., 1972 — Mitochondrialne kwasy nukleinowe, *Kosmos A*, **21**: 269–275.
- [163] SACCONI C., GADALETA M. N., 1973 — The Effect of rifampicin on mitochondrial DNA, *FEBS Lettr.*, **34**: 106–108.
- [164] SACCONI C., GADALETA M. N., DE LEO T., BARLETTA A., 1971 — Influence of thyroid hormone on mitochondrial DNA transcription in rat liver, First Eur. Biophys. Cong. 14–17 Sept., Baden n. Vienna, 455–459.
- [165] SACCONI C., GALLERANI R., GADALETA M. N., GRECO M., 1971 — The effect of amanitin on RNA synthesis in rat liver mitochondria, *FEBS Lettr.*, **18**: 339–341.
- [166] SAGER R., LANE D., 1972 — Molecular basis on material inheritance, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 2410–2413.
- [167] SAGER R., 1972 — Cytoplasmic genes and organelles, Acad. Press, New York.
- [168] SANDERS J. P. M., FLAVELL R. A., BORST P., MOL J. N. M., 1973 — Nature of the base sequence conserved in the mitochondrial DNA of a low-density *petite*, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 441–457.
- [169] SCHÄFER K. P., BUGGE G., GRANDI M., KÜNTZEL H., 1971 — Transcription of mitochondrial DNA in vitro from *Neurospora crassa*, *Eur. J. Biochim.*, **21**: 478–488.
- [170] SCHÄFER K. P., KÜNTZEL H., 1972 — Mitochondrial genes in *Neurospora*: A single cistron for ribosomal RNA, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **46**: 1312–1319.
- [171] SCHATZ G., 1969 — Biogenesis of mitochondria, [w] Membranes of Mitochondria and Chloroplast, red E. Backer, Van Nostrand Reinholds Comp., New York, 251–313.
- [172] SCHMITT H., 1972 — Analysis and site of synthesis of ribosomal proteins from yeast mitochondria, *FEBS Lettr.*, **26**: 215–220.
- [173] SCHNAITMAN C., GREENAWALT J. W., 1968 — Enzymatic properties of the

- inner and outer membranes of rat liver mitochondria, *J. Cell. Biol.*, **38**: 158–175.
- [174] SCHUTGENS R. B. H., REIJNDERS L., HOEKSTRA S. P., BORST P., 1973 — Transcription of *Tetrahymena* mitochondrial DNA in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, **308**: 372–380.
- [175] SCHUTGENS R. B. H., TABAK H. F., HOEKSTRA S. P., STRUIK E. J., 1972 — Transcription and Translation of the *Tetrahymena* mitochondrial genome, 8 FEBS Meet., Amsterdam, Comm., **618**.
- [176] SIMPSON L., 1972 — The kinetoplast of the Hemoflagellates, *Intern. Rev. Cytol.*, **32**: 139–207.
- [177] SKINNER D. M., KERR M. S., 1971 — Characterization of mitochondrial and nuclear satellite deoxyribonucleic acids of five species of *Crustacea*, *Biochem.*, **10**: 1864–1872.
- [178] SLONIMSKI P. P., 1973 — Molecules of mitochondrial DNA obtained from crosses between cytoplasmic *petite* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: physical and genetic characterization, *Molec. Gen. Genet.*, **123**: 51–58.
- [179] SMITH D., TURO P., SCHWEIZER E., HALVERSON H. O., 1968 — The replication of mitochondrial DNA during the cell cycle in *Saccharomyces lactis*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**: 936–942.
- [180] STEINERT M., VAN ASSEL S., BORST P., MOL J. N. M., KLEISEN C. M., NEWTON B. A., 1973 — Specific detection of kinetoplast DNA cytological preparations of trypanosomes by hybridization with complementary RNA, *Exptl. Cell. Res.*, **76**: 175–185.
- [181] TABAK H. F., 1972 — Transcripte van mitochondrial acel DNA door RNA polymerase uit *Escherichia coli*, Teza doktorska, Amsterdam.
- [182] TABAK H. F., BORST P., TABAK A. J. H., 1973 — Search for mitochondrial DNA sequences in chick nuclear DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **294**: 184–191.
- [183] TANGUAY R., CHAUDHARY K. D., 1971 — Studies on mitochondria. I. Mitochondrial DNA in relation to morphological development of sarcosomes in thoracic muscles of the african desert locust (*Schistocerca gregaria* Forsk), *Canad. J. Biochem.*, **49**: 357–367.
- [184] TANGUAY R., CHAUDHARY K. D., 1972 — Studies on mitochondria. II. Mitochondrial DNA of throacic muscles of *Schistocerca gregaria*, *J. Cell. Biol.*, **54**: 295–301.
- [185] TER SCHEGET J., BORST P., 1971 — DNA synthesis by isolated mitochondria. I. Effect of inhibitors and characterization of product. II. Detection of product DNA hydrogen-bonded to closed duplex circles, *Biochim., Biophys. Acta*, **246**: 239–257.
- [186] TER SCHEGGET J., FLAVELL R. A., BORST P., 1971 — DNA synthesis by isolated mitochondria. III. Characterization of D-loop DNA a novel intermediate in mt-DNA synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **254**: 1–14.
- [187] TEWARI K. K., 1971 — Genetic Autonomy of Extranuclear organelles, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**: 141.
- [188] TIBBETS C. J. B., VINOGRAD J., 1973 — Properties and mode of action of a partially purified deoxyribonucleic acid polymerase from the mitochondria of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **248**: 3367–3379.
- [189] TIBBETS C. J. B., VINOGRAD J., 1973 — Synthesis of mitochondrial deoxyribonucleic acid with partially purified deoxyribonucleic acid polymerases from the mitochondria of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **248**: 3380–3385.

- [190] TZAGOLOFF A., 1973 — The synthesis and assembly of mitochondrial enzymes, IX Int. Congr. Biochem. Stockholm, Comm. 5Sb4, 250.
- [191] VAN KREIJL C. F., BORST P., FLAVELL R. A., HOLLENBERG C. P., 1972 — Pyrimidine tract analysis of mt-DNA from a "low-density" *petite* mutant of yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 61–70.
- [192] VEDEL F., QUETIER F., BAYEN M., RODE A., DALMON J., 1972 — Intramolecular heterogeneity of mitochondrial and chloroplastic DNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**: 972–978.
- [193] VIGNAIS P. V., STEVENS B. J., HUET J., ANDRE J., 1972 — Mitoribosomes from *Candida utilis*. Morphological, physical and chemical characterization of the monomer form and its subunits, *J. Cell. Biol.*, **54**: 468–492.
- [194] VOGEL F. S., 1969 — Meadow mushroom provides a model for the study of mitochondrial DNA, *Feder. Proc.*, **28**: 1820–1824.
- [195] VOLPE P., EREMENKO T., 1973 — Nuclear and Cytoplasmic DNA synthesis during the mitotic cycle of HeLa cells., *Eur. J. Biochem.*, **32**: 227–232.
- [196] WAGNER R. P., 1969 — Genetics and phenogenetics of mitochondria, *Science*, **163**: 1026–1031.
- [197] WALLACE F. G., WAGNER M., ROGERS W. E., 1973 — Varying kinetoplast ultrastructure in two subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy), *J. Protozool.*, **20**: 218–222.
- [198] WATTIAUX-DE CONINCK S., DUBOIS F., WATTIAUX R., 1973 — Submitochondrial localization of DNA polymerase in rat liver tissue, *FEDS Lettr.*, **29**: 159–163.
- [199] WEISS H., 1972 — Cytochrome *b* in *Neurospora crassa* mitochondria. A membrane protein containing subunits of cytoplasmic and mitochondrial origin. *Eur. J. Biochem.*, **30**: 469.
- [200] WEISS H., LORENTZ B., KLEINOW W., 1972 — Contribution of mitochondrial protein synthesis to the formation of cytochrome oxidase in *Locusta migratoria*, *FEBS Lettr.*, **25**: 49–51.
- [201] WELLAUER P., WEBER R., WYLER T., 1973 — Electron microscopical study on the influence of the preparative conditions on countour lught and structure of mitochondrial DNA of mouse liver, *J. Ultrastr. Res.*, **42**: 377–388.
- [202] WESTERGAARD O., LINDBERG B., 1972 — An induced mitochondrial DNA polymerase from *Tetrahymena*, *Eur. J. Biochem.*, **28**: 422–431.
- [203] WHEELDOM L., DIANOUX A. C., BOF M., 1973 — Products of mitochondrial protein synthesis in vitro, IX Int. Congr. Biochem. Stockholm, Comm. **339**, 153.
- [204] WHITTAKER P. A., HAMMOND R. C., LUHA A. A., 1972 — Mechanism of mitochondrial mutation in yeast, *Nature-New Biology*, **237**: 266–268.
- [205] WILKIE D., 1972 — Genetic aspects of mitochondria, *Proc. 8 FEBS Meet.*, **27**: 85–94.
- [206] WILLIAMSON D. H., MOUSTACCHI E., 1971 — The synthesis of mitochondrial DNA during the cell cycle in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **42**: 195–201.
- [207] WINTERSBERGER E., 1972 — Isolation of a distinct rifampicin — resistant RNA polymerase from mitochondria of yeast, *Neurospora* and liver, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**: 1287–1294.
- [208] WINTERSBERGER E., 1972 — Synthesis of mitochondrial RNA, *Proc. 8 FEBS Meet.*, **28**: 21.
- [209] WOLSTENHOLME D. R., KIRSCHNER R. G., GROSS N. J., 1972 — Heat

denaturation studies of rat liver mitochondrial DNA. A Denaturation map and changes in molecular configurations, *J. Cell. Biol.*, **53**: 393-406.

- [210] WOLSTENHOLME D. R., KOIKE K., COCHRAN-FOUTS P., 1973 — Single strand-containing replicating molecules of circular mitochondrial DNA, *J. Cell. Bioch.*, **56**: 230-245.
- [211] WOLSTENHOLME D. R., MCLAREN J. D., KOIKE K., JACOBSON E. L., 1973 — Catenated oligomeric circular DNA molecules from mitochondria of malignant and normal mouse and rat tissues, *J. Cell. Biol.*, **56**: 247-255.
- [212] WOOD D. D., LUCK D. J. L., 1969 — Hybridization of mitochondrial ribosomal RNA, *J. Mol. Biol.*, **41**: 211-224.
- [213] WORK T S., COOTE J. L., ASHWELL M., 1968 — Biogenesis of mitochondria, *Feder. Proc.*, **27**: 1174-1179.
- [214] WU GUANG-JER, DAVID I., 1972 — Purification and properties of mitochondrial deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase from ovaries of *Xenopus laevis*, *Biochem.*, **11**: 3589-3595.
- [215] MICHEJDA J. W. — Genetyczna specyfikacja błony mitochondrialnej, w opracowaniu.
- [216] MICHEJDA J. W., HRYNIEWIECKA L. — Biogeneza mitochondriów, w opracowaniu.

Otrzymano: październik, 1973.

Przyjęto: listopad, 1973.

Adres autora: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

PEROKSYSOMY, ICH STRUKTURA I FUNKCJE METABOLICZNE

Jan ZURZYCKI

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Poznanie struktury i funkcji peroksysomów datuje się od lat sześćdziesiątych. Peroksysomy nie występują u Prokariota, natomiast są organellami komórkowymi rozpowszechnionymi zarówno w świecie roślin, jak i zwierząt. W przeglądzie omówiono morfologię peroksysomów, ich ultrastrukturę oraz przypuszczalną genezę w komórce. Śądząc z zestawu enzymów obecnych w peroksysomach, funkcje biochemiczne tych organelli są najszersze u pierwotniaków. U zwierząt wyższych peroksysomy występują najliczniej w organach o aktywnej przemianie materii, jak wątroba i nerki i odgrywają pewną rolę w metabolizmie puryn, a przede wszystkim wydają się pełnić funkcję ochronną przed szkodliwym działaniem nadtlenczków. U roślin specyficzna kategoria peroksysomów zwanych glioksysomami pełni istotną rolę w przemianach tłuszczów w węglowodany, a także związana jest ściśle z procesem fotooddychania. Z ewolucyjnego punktu widzenia peroksysomy stanowiły przypuszczalnie prymitywny system oksydacyjny, który pojawił się przed powstaniem oddychania mitochondrialnego. W dalszej ewolucji organelle te przystosowały się do pełnienia specyficznej roli w metabolizmie, różnej w różnych tkankach i organizmach.

WSTĘP

Do obszernej listy organelli komórkowych, tj. tworców cytoplazmy, mających określoną strukturę i pełniących określone funkcje, przybyła w latach sześćdziesiątych nowa pozycja — peroksysomy. Organelle te mimo ich niedawnego odkrycia i zdefiniowania wzbudziły żywe zainteresowanie cytobiologów, czego dowodem jest obszerna już literatura przedmiotu i kilka opracowań monograficznych [1, 2, 3], w tym także w piśmiennictwie polskim [4].

Jako peroksysomy określamy organelle cytoplazmatyczne zawierające jedną lub kilka oksydaz, których działalność prowadzi do powstania nadtlenu wodoru oraz zawierające także katalazę lub peroksydazy rozkładające H_2O_2 . Z ewolucyjnego punktu widzenia aktywność biochemiczna

peroksysomów stanowi przypuszczalnie resztki prymitywnego systemu oksydacyjnego, który poprzedził w biogenezie organizmów powstanie oddychania mitochondrialnego.

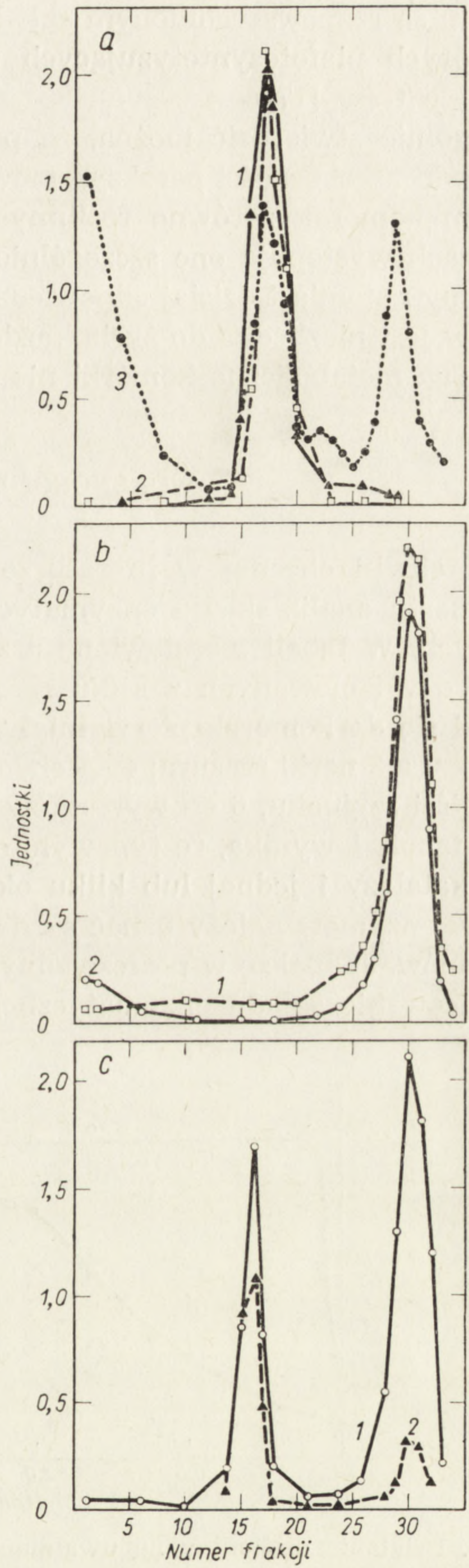
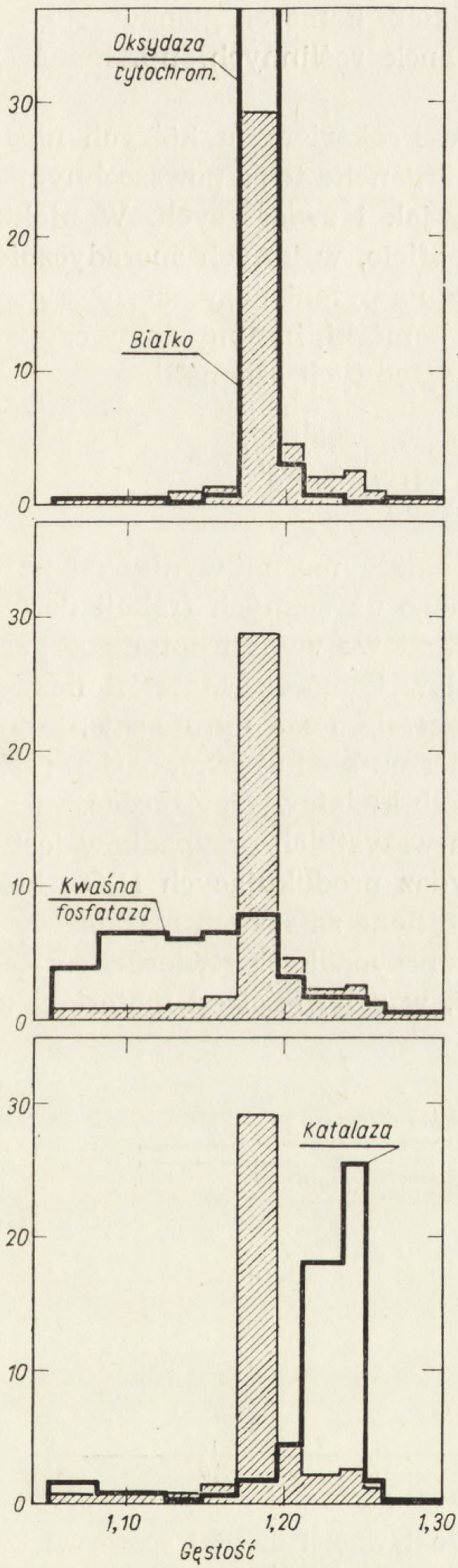
WYSTĘPOWANIE PEROKSYSOMÓW

Odkrycie peroksysomów jako jednostek biochemicznych zawdzięczamy pionierskim pracom de Duve i współpracowników [5, 6]. Wykazali oni, że wirowanie homogenatu komórek wątroby szczura w gradiencie sacharozy prowadzi do specyficznego rozkładu aktywności niektórych enzymów, takich jak oksydaza moczanowa, oksydaza D-aminokwasów, katalaza, które zlokalizowane zostają we frakcji różnej od frakcji mitochondrialnej czy frakcji lizosomalnej (rys. 1). W podobny sposób odkryto istnienie frakcji peroksysomalnej w homogenatach nerki [7, 8]. Wątroba kręgowców jest szczególnie dogodnym materiałem dla stwierdzenia obecności peroksysomów. W późniejszym okresie wykryto te organelle jeszcze w wątrobie żaby, kury, świnki morskiej, psa i człowieka [4]. Brak jest niestety szerszych informacji o występowaniu peroksysomów u bezkręgowców poza pierwotniakami. Wśród pierwotniaków peroksysomy wydają się być rozpowszechnionymi organelami. Wyizolowano je z komórek *Tetrahymena pyriformis* [7, 9] oraz z *Acanthamoeba* [10].

W świecie roślin peroksysomy są rozpowszechnionymi składnikami tkanek. Podobnie jak u zwierząt występują szczególnie licznie w pewnych organach. I tak np. wyizolowano je z endospermy nasion rącznika — rośliny magazynującej materiały zapasowe w formie tłuszczów [11, 12]. Tolbert i wsp. wykazali, że peroksysomy występują powszechnie w komórkach miękiszu asymilacyjnego liści [3, 13, 14]. Nawet z tkanek organów efemerycznych jakimi są wyrostki kolb kwiatowych w rodzinie obrazkowatych (*Araceae*) udało się wyizolować peroksysomy i zbadać ich skład enzymatyczny [15]. Niezależnie od wyników badań, które doprowadziły do izolacji frakcji peroksysomowej o występowaniu tych organeli wnosić można na podstawie analizy elektronogramów komórek. Analiza taka

Rys. 1. Przykłady rozkładu aktywności niektórych enzymów po wirowaniu homogenatu w ciągłym gradiencie stężeniowym sacharozy. Po stronie lewej — komórki wątroby szczura: oś x — gęstość w g cm^{-3} ; oś y — aktywność enzymatyczna frakcji. Gęstości około 1,1 odpowiada frakcja lizosomalna, gęstości 1,2 — mitochondrialna, przy gęstości 1,24 g cm^{-3} lokują się peryksysomy (wg [7]). Po prawej stronie podobny rozkład uzyskany z homogenatu endospermy kiełkujących nasion rącznika. Frakcja nr 16 (gęstość 1,19 g cm^{-3}) odpowiada mitochondriom, frakcja 22 (gęstość 1,23 g cm^{-3}) — proplastydom, frakcja 30 (gęstość 1,25 g cm^{-3}) — peroksysomom (wg [12])

a: 1 — dehydrogenaza bursztynianowa, 2 — oksydaza NADH, 3 — białko; b: 1 — syntetaza jabłczanowa, 2 — liaza izocytrynianowa; c: 1 — syntetaza cytrynianowa, 2 — dehydrogenaza jabłczanowa



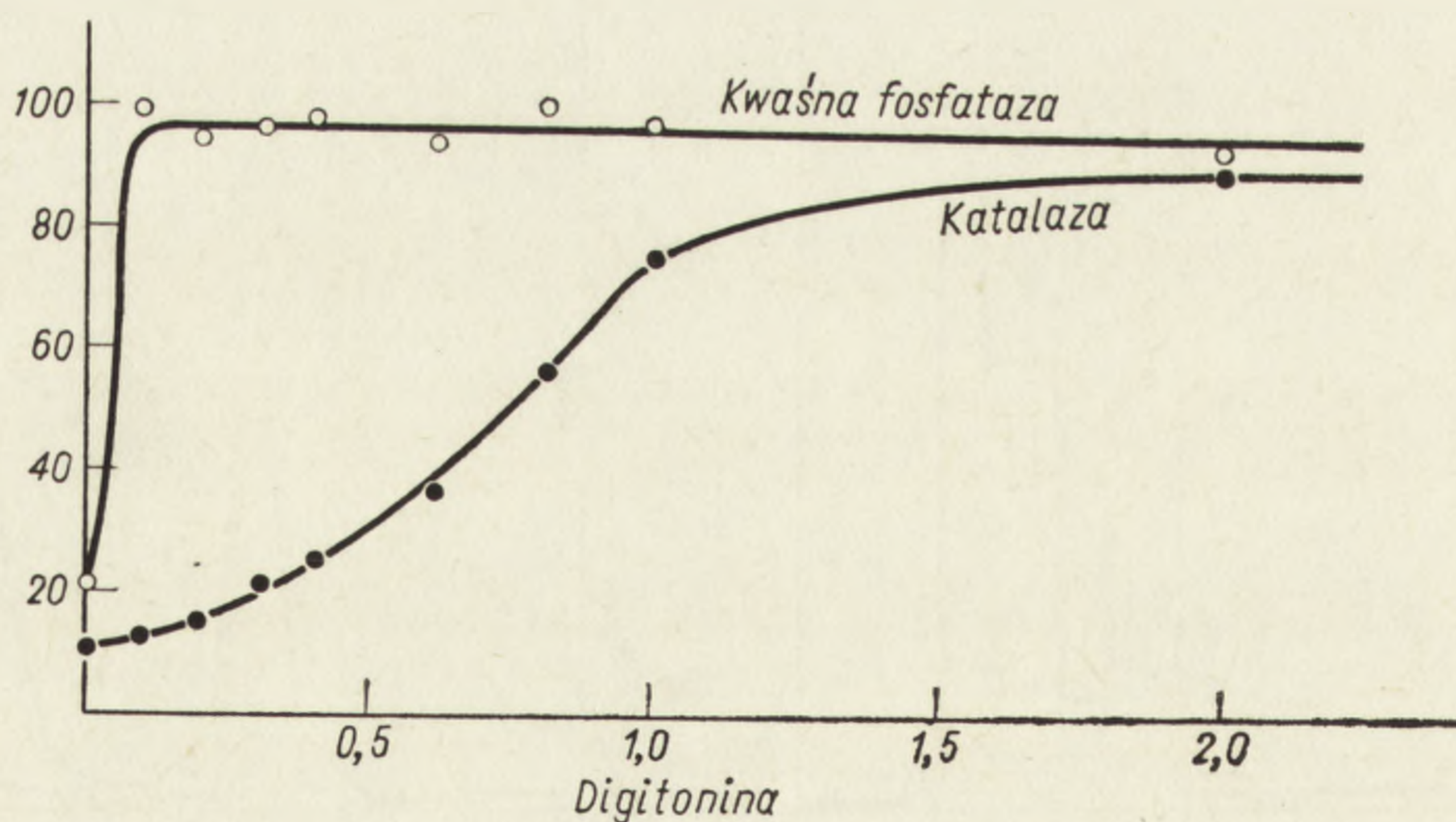
wykazuje, że organelle odpowiadające swą morfologią typowym peroksy-somom są rozpowszechnionym składnikiem komórek glonów [16], a także niektórych niefotosyntetyzujących tkanek roślinnych, np. komórek koleoptyle traw [17].

Ogólnie stwierdzić można, że poza Prokariota, u których nigdy nie stwierdzono obecności peroksysomów, organelle te są powszechnym składnikiem komórek zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. W niektórych tkankach występują one szczególnie obficie, w innych sporadycznie. Nie możemy natomiast dzisiaj odpowiedzieć na pytanie, czy obecność peroksysomów jest niezbędna do życia każdej komórki, innymi słowy czy istnieją aktywne metaboliczne komórki nie mające tych organelli.

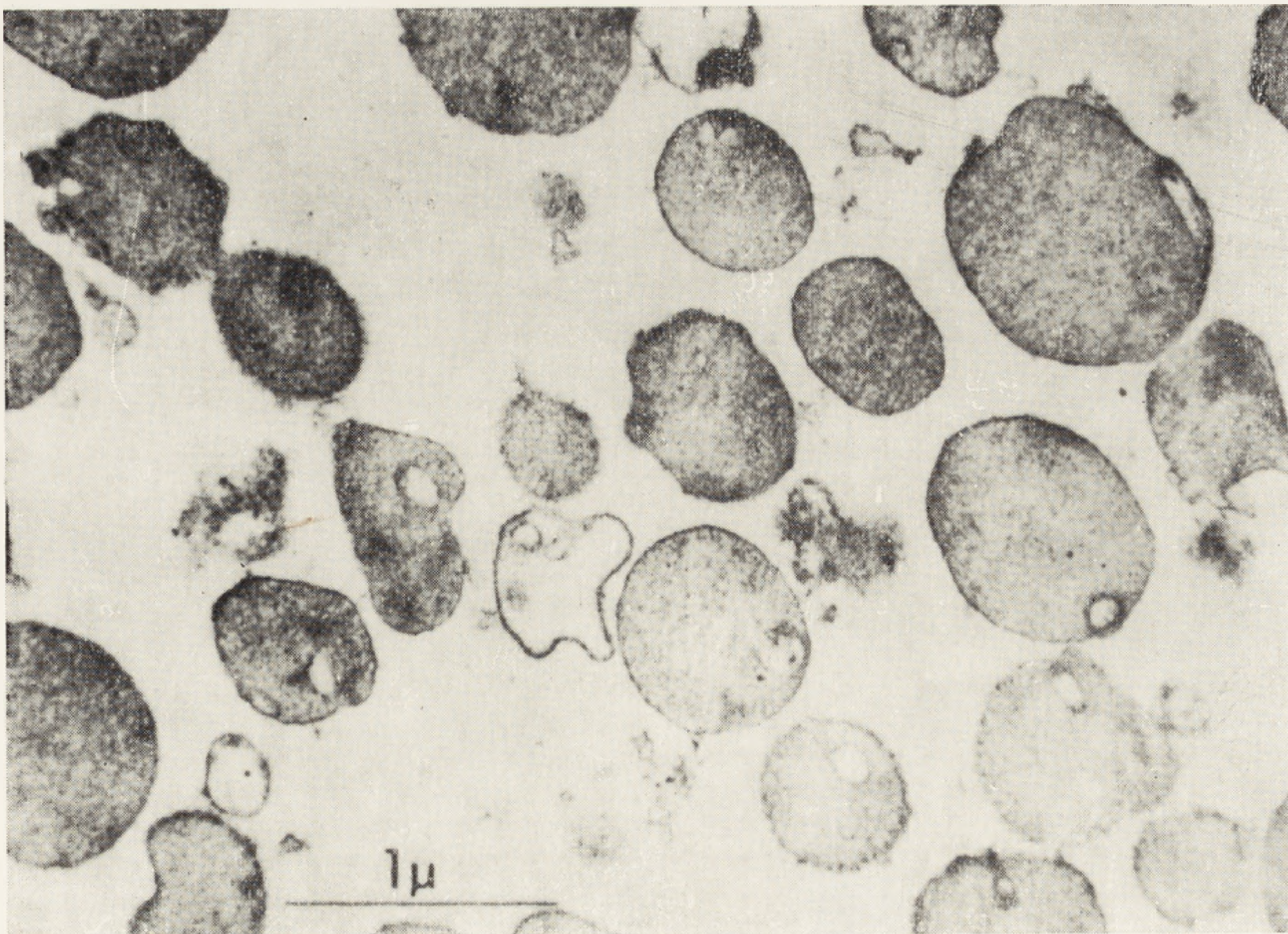
WŁASNOŚCI BIOCHEMICZNE

W chwili obecnej w literaturze znaleźć można wyniki co najmniej kilkunastu analiz składu enzymatycznego uzyskanych frakcji peroksysomalnych. W tabeli 1 zestawiono przykładowo wyniki dotyczące peroksysomów wyizolowanych z kilku rodzajów komórek. Materiał nazwany 1 odnosi się do komórek pierwotniaka *Tetrahymena pyroformis*, 2 dotyczy wątroby a 3 nerki szczura; 4 — endospermu kiełkujących nasion rącznika, 5 — liści szpinaku, 6 — wyrostków kolb kwiatowych *Araceae*.

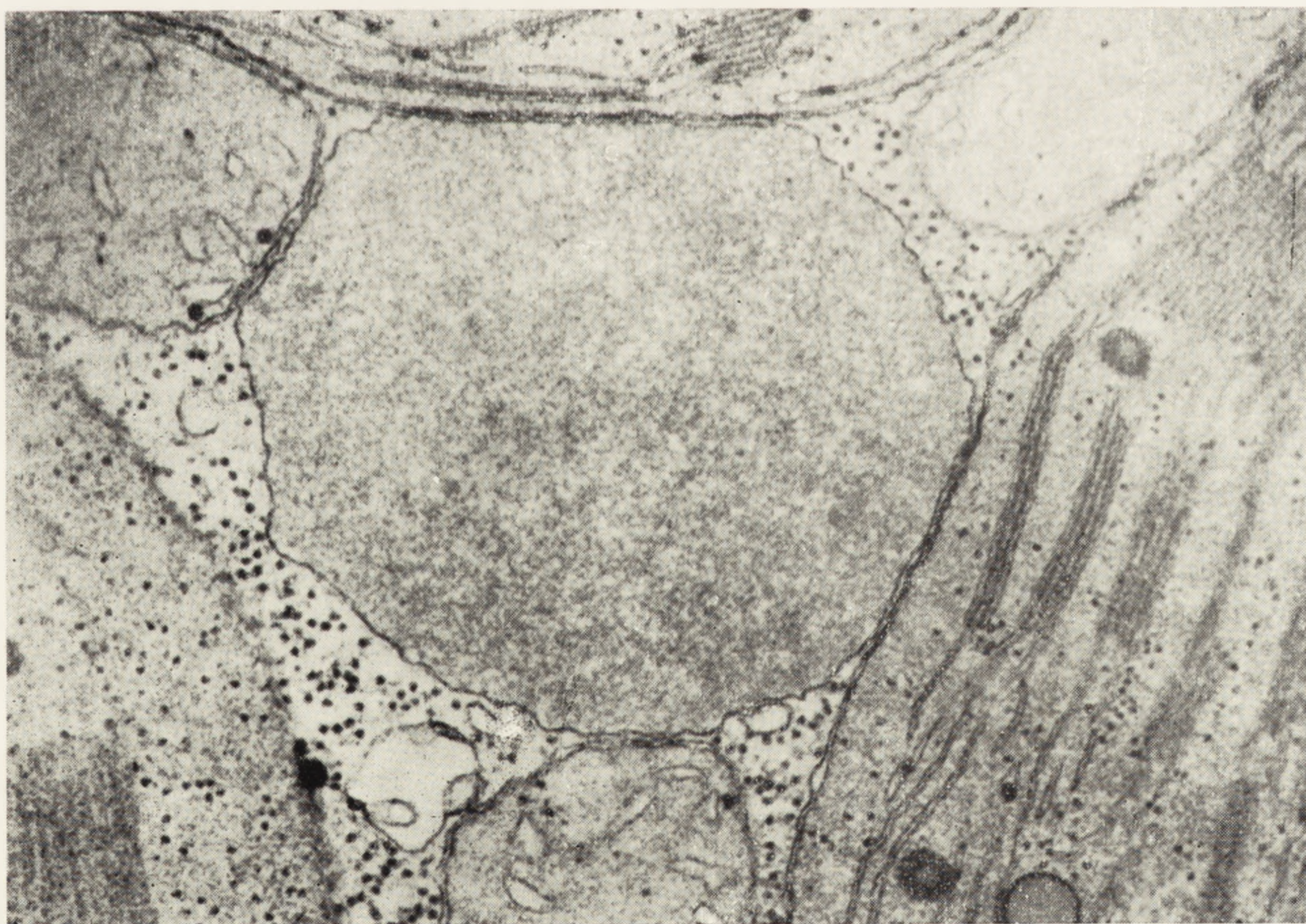
Z tabeli 1 wynika, że typowym dla wszystkich przypadków jest obecność katalazy i jednej lub kilku oksydaz produkujących H_2O_2 , który to zestaw enzymów należy uznać *ex definitione* za system markerowy peroksysomów. Jednakże w poszczególnych przypadkach stwierdzamy znaczne zróżnicowanie składu enzymatycznego, w zależności od materiału z któ-



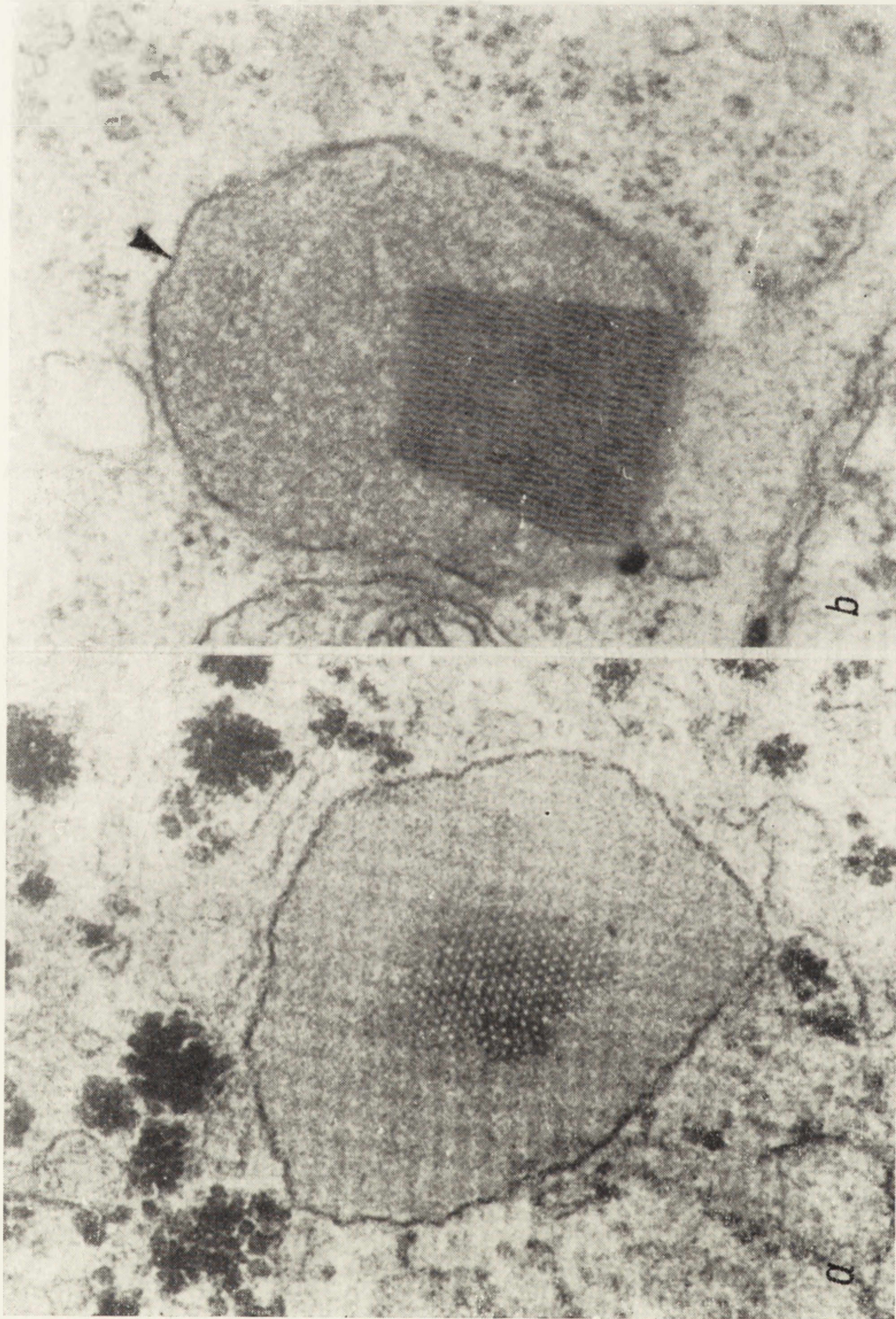
Rys. 2. Działanie digitoniny na uwalnianie aktywności ukrytej enzymów: kwaśnej fosfatazy (z lizosomów) i katalazy (z peroksysomów; oś x — stężenie digitoniny w $mg\ cm^{-3}$, oś y — swobodna aktywność w % całkowitej aktywności (wg [19])



Rys. 3. Obraz elektronomikroskopowy oczyszczonej frakcji peroksysomów z kiełkujących nasion rącznika (wg [12])



Rys. 4. Peroksysom komórki miękiszu liściowego w bliskim sąsiedztwie mitochondrium i chloroplastów (wg [21])



Rys. 5. Peroksysomy zawierające pseudokrystaliczną strukturę rdzeniową. a — z wątroby świnki morskiej (wg [24]); b — z koleoptyle owsa (wg [17])

rego peroksysomy zostały wyizolowane. Najbardziej bogatym zestawem enzymatycznym odznaczają się peroksysomy pierwotniaków (*Tetrahymena*). W pozostałym materiale, najbardziej stałe wydaje się być występowanie oksydazy glikolanowej i oksydazy L- α -hydrokwasów. O ile w tkankach zwierząt wyższych poza wymienionymi oksydazami najbardziej rozpowszechnione są oksydazy D i L aminokwasowa i moczanowa, a brak enzymów związanych z cyklem glioksalowym, o tyle w materiale roślinnym oksydaz aminokwasowych nie stwierdzono, natomiast w mniejszej lub większej liczbie reprezentowane są enzymy cyklu glioksalowego.

TABELA 1. Enzymy niektórych preparatów peroksysomów

Enzymy	Rodzaje Komórek					
	1	2	3	4	5	6
Katalaza	+	+	+	+	+	+
Oksydaza moczanowa	-	+	-	o	-	+
Oksydaza D-aminokwasowa	+	+	+	o	-	o
Oksydaza L-aminokwasowa	-	+	+	o	o	o
Oksydaza glikolanowa	+	+	+	+	+	o
Oksydaza L- α -hydrokwasowa	+	+	+	o	+	o
Oksydaza glioksalanowa	+	o	o	o	o	o
Syntetaza cytrynianowa	-	-	o	+	o	o
Akonitaza	-	o	o	+	o	o
Liaza izocytrynianowa	+	-	o	+	o	o
Syntetaza jabłczanowa	+	-	o	+	o	o
Dehydrogenaza jabłczanowa (NAD)	-	o	-	+	+	o
Dehydrogenaza izocytrynianowa (NADP)	+	o	+	-	-	o
Reduktaza glioksalanowa (NAD)	-	o	o	o	+	o
Transaminazy	o	o	o	o	+	o
Stężenie równowagi w gradiencie sacharozy g cm ⁻³	1,24	1,23	1,24	1,25	1,24	1,22 1,24

1, 2, 3, 4, 5, 6 — objaśnienia w tekście.

+ — stwierdzono aktywność;

- — nie stwierdzono aktywności;

o — nie badano.

Peroksysomy niezależnie od swego pochodzenia wykazują względnie dużą i stałą gęstość równowagi w gradiencie sacharozy (1,23–1,25 g cm⁻³) wyraźnie większą od mitochondriów, plastydów czy lizosomów. W odniesieniu do peroksysomów zwierzęcych de Duve interpretuje to zjawisko jako wynik względnie wysokiej przepuszczalności błony peroksysomów dla małych cząsteczek łącznie z cząsteczkami sacharozy. W istocie omawiane organelle nie zachowują się jak osmometr i nawet po potraktowaniu wodą destylowaną nie ulegają rozerwaniu czy poważniejszym uszkodzeniom prowadzącym do utraty enzymów [2]. Otrzymane frakcje

peroksysomów kontrolowane w mikroskopie elektronowym wykazują iż ogromna większość izolowanych organelli ma nieuszkodzoną błonę zewnętrzną (rys. 3).

W związku z brakiem zjawisk osmotycznych peroksysomy układają się w gradiencie sacharozy w pasie odpowiadającym gęstości ich uwodnionej matrix. W pewnych przypadkach stwierdzono zmianę tej gęstości związaną ze stanem rozwojowym organu. Na przykład peroksysomy wyizolowane z kolb *Araceae* wykazują w trakcie okresu kwitnienia wzrost gęstości równowagi z 1,22 do 1,24 g cm⁻³. Również zastosowanie detergentów wskazuje na znacznie większą odporność peroksysomów w porównaniu np. z lizosomami (rys. 2), co jest bez wątpienia związane z innym charakterem błon obu organelli. Podobne wnioski można wysnuć dla peroksysomów nasion tłuszczowych. Natomiast peroksysomy izolowane z liści odznaczają się znacznie większą wrażliwością [3, 13]. Ulegają one łatwo rozerwaniu przy szoku osmotycznym i nawet przy bardzo ostrożnym postępowaniu w wyizolowanej frakcji peroksysomalnej znaleźć można tylko do 50% enzymów, które przypuszczalnie w tych organellach występują (natomiast reszta znajduje się w supernatancie). Elektronogramy wykazują, że większość peroksysomów izolowanych z liści ma uszkodzoną błonę. Nie przeszkadza to ustawieniu peroksysomów liściowych w gradiencie sacharozy zgodnie z gęstością owodnionej matrix.

Duża przepuszczalność błon peroksysomów dla substratów jest przypuszczalnie powodem, dla którego nie stwierdza się ukrycia aktywności dla oksydaz peroksysomalnych. Natomiast aktywność ukryta występuje dla działalności katalazy w nieuszkodzonych peroksysomach zwierzęcych (por. rys. 2). Zjawisko to pozornie dziwne z uwagi na łatwość dyfuzji nadtlenu wodoru zostało wyjaśnione [18] faktem, że katalaza występuje w peroksysomach w bardzo wysokim stężeniu i że katalizowana przez nią reakcja jest reakcją pierwszego rzędu. W takim systemie szybkość dyfuzji może stać się czynnikiem ograniczającym nawet w przypadku wysokiej przepuszczalności błon organelli.

MORFOLOGIA PEROKSYSOMÓW

W roku 1954 Rhodin [20] opisał specjalny typ struktur komórkowych występujących w nerce myszy i nazwał te twory mikrociałkami (microbodies). Istnienie podobnych tworów zostało później stwierdzone również w wątrobie myszy. Zasługą szkoły de Duve było wysunięcie koncepcji, że mikrociałka stanowią morfologiczny odpowiednik peroksysomów. Mimo iż koncepcję identyczności mikrociałek i peroksysomów w świetle zgromadzonych faktów można uznać za udowodnioną, do dziś stosowane bywają obie nazwy na określenie omawianych organelli.

Mikrociałka są to twory mniej więcej kuliste o średnicy od 0,5 do

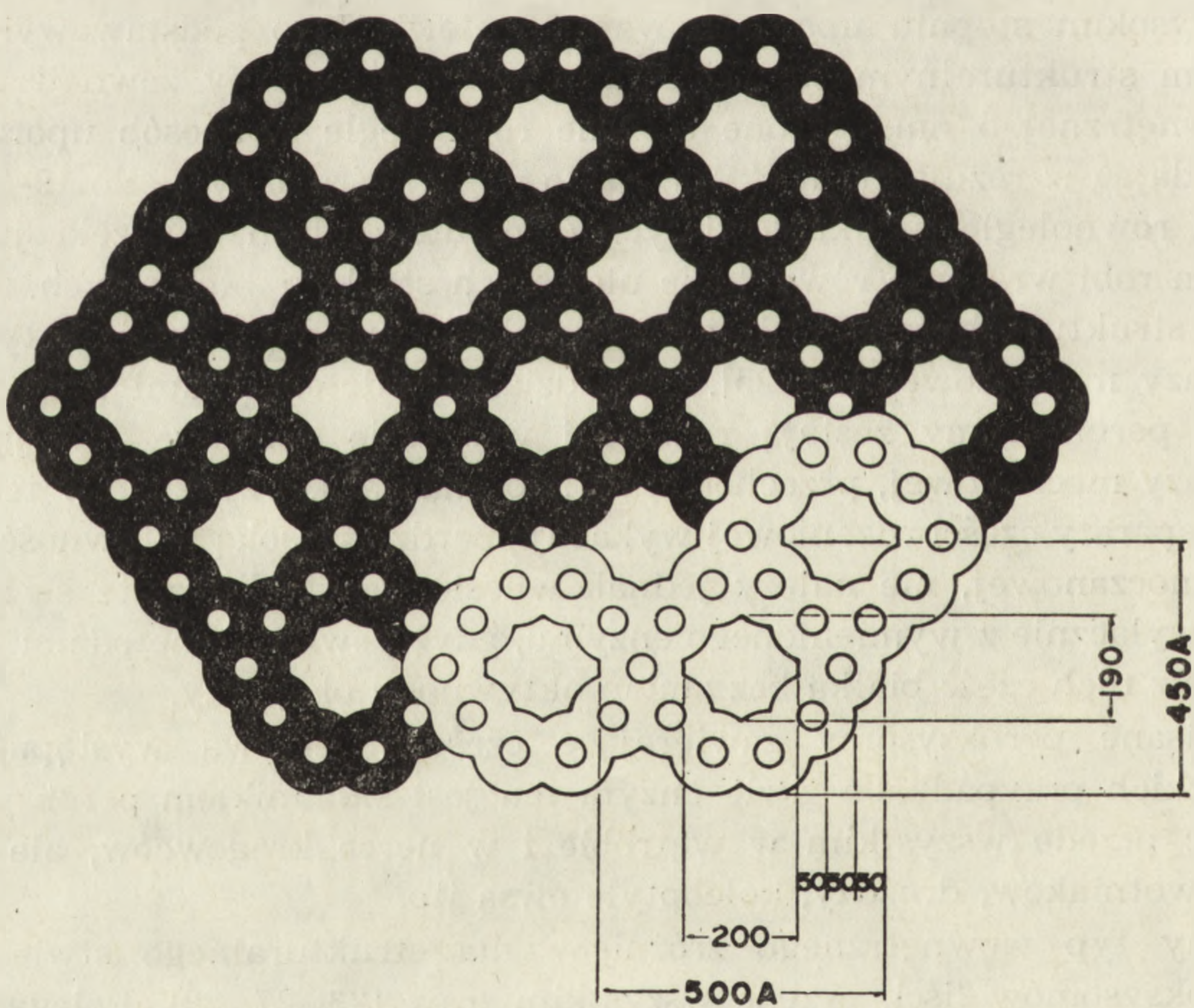
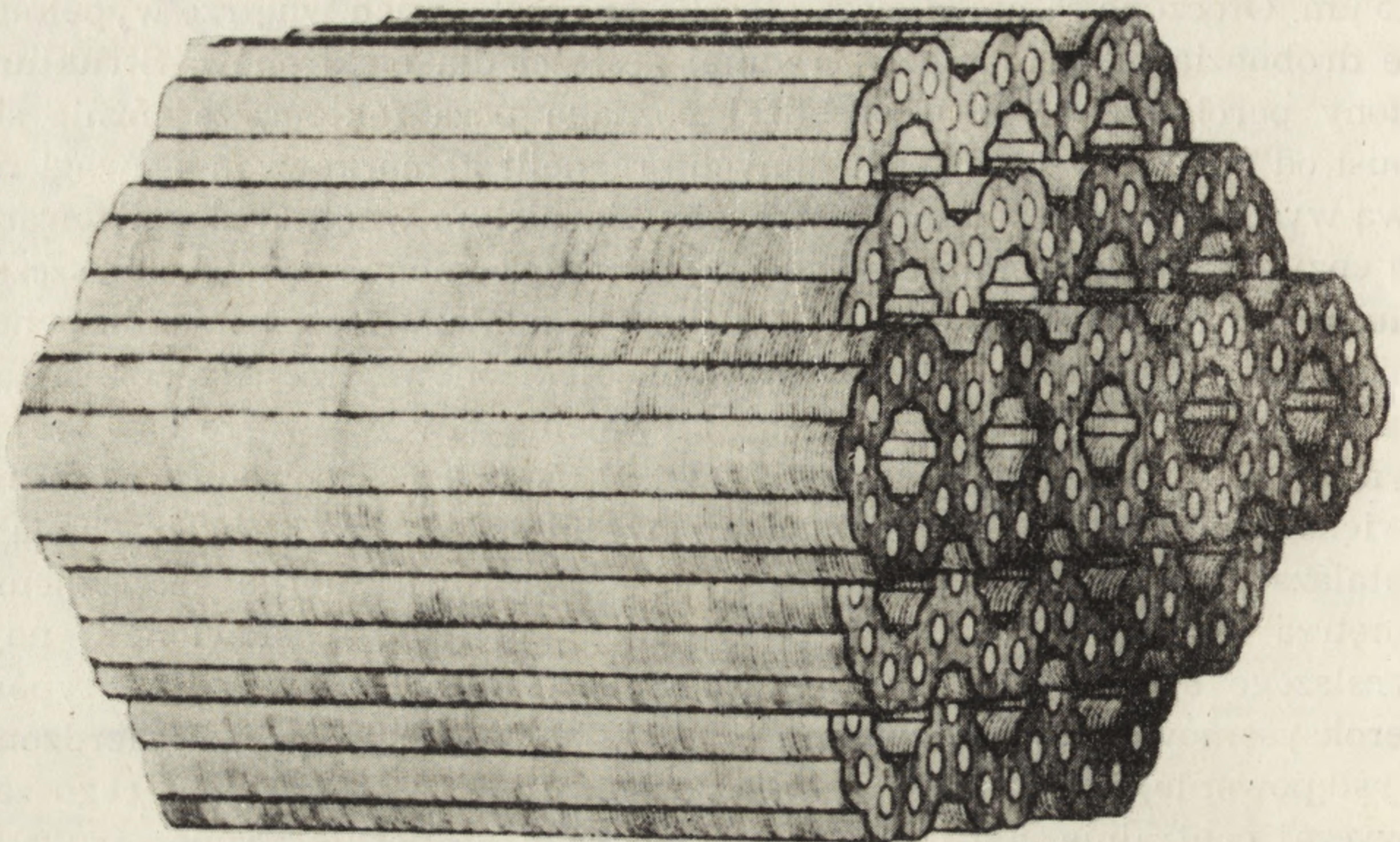
1,5 μm . Otoczone są pojedynczą otoczką błoniastą, a ich wnętrze wypełnione drobnoziarnistą matrix o średniej gęstości dla elektronów. Struktura błony peroksysomu nie jest bliżej poznana poza faktem, że różni się musi od struktury błon wielu innych organelli komórkowych z uwagi na swą wysoką przepuszczalność. W drobnoziarnistym wnętrzu zlokalizowane są enzymy peroksysomu. O ich mniej więcej równomiernym rozmieszczeniu sądzić można na podstawie lokalizacji katalazy metodami mikrochemicznymi. Opracowana dla mikroskopii elektronowej metoda polegająca na inkubacji materiału przed jego utrwaleniem w roztworze zawierającym DAB (3,3'-dwuaminobenzodynę) i H_2O_2 [22, 23] powoduje wybitne zwiększenie gęstości dla elektronów w miejscach, w których działała katalaza. Metoda ta powoduje mniej więcej równomierne zaczernienie wnętrza mikrociałek. Istnieją pewne modyfikacje przedstawionego najprostszego schematu budowy peroksysomu. I tak np. u wielu typów peroksysomów, głównie zwierzęcych, ale także roślinnych, stwierdzono występowanie silnie zagęszczonego rdzenia (nucleoid) występującego zazwyczaj centralnie, ale niekiedy zlokalizowanego peryferycznie. Tsukada i wsp. [25] zbadali bliżej ultrastrukturę rdzenia peroksysomów wątroby szczura i własności biochemiczne tych tworów. Odnośnie do pierwszego problemu stwierdzono, że rdzeń ma strukturę pseudokrystaliczną o bardzo wysokim stopniu uporządkowania materii. Jego podstawowym elementem strukturalnym są rurkowate twory o średnicy zewnętrznej 15 a wewnętrznej 5 nm. Są one ułożone równolegle w sposób uporządkowany dając w rezultacie rurki drugiego rzędu o średnicy około 19–20 nm. Dzięki równoległemu układowi tych elementów rdzeń w przekroju podłużnym robi wrażenie równolegle ułożonych struktur błoniastych.

W strukturach części rdzeniowej zlokalizowana jest cała aktywność oksydazy moczanowej [26, 25]. Po zadziałaniu detergentami typu tryton X-100 peroksysomy zostają rozbite i wszystkie enzymy, z wyjątkiem oksydazy moczanowej, przechodzą do supernatantu. Uzyskane w ten sposób preparaty części rdzeniowej wykazują bardzo wysoką aktywność oksydazy moczanowej, nie należy jednak wnosić, że struktury te są zbudowane wyłącznie z wymienionego enzymu, gdyż pewnymi metodami można usunąć z nich część białka bez zmian aktywności oksydazy.

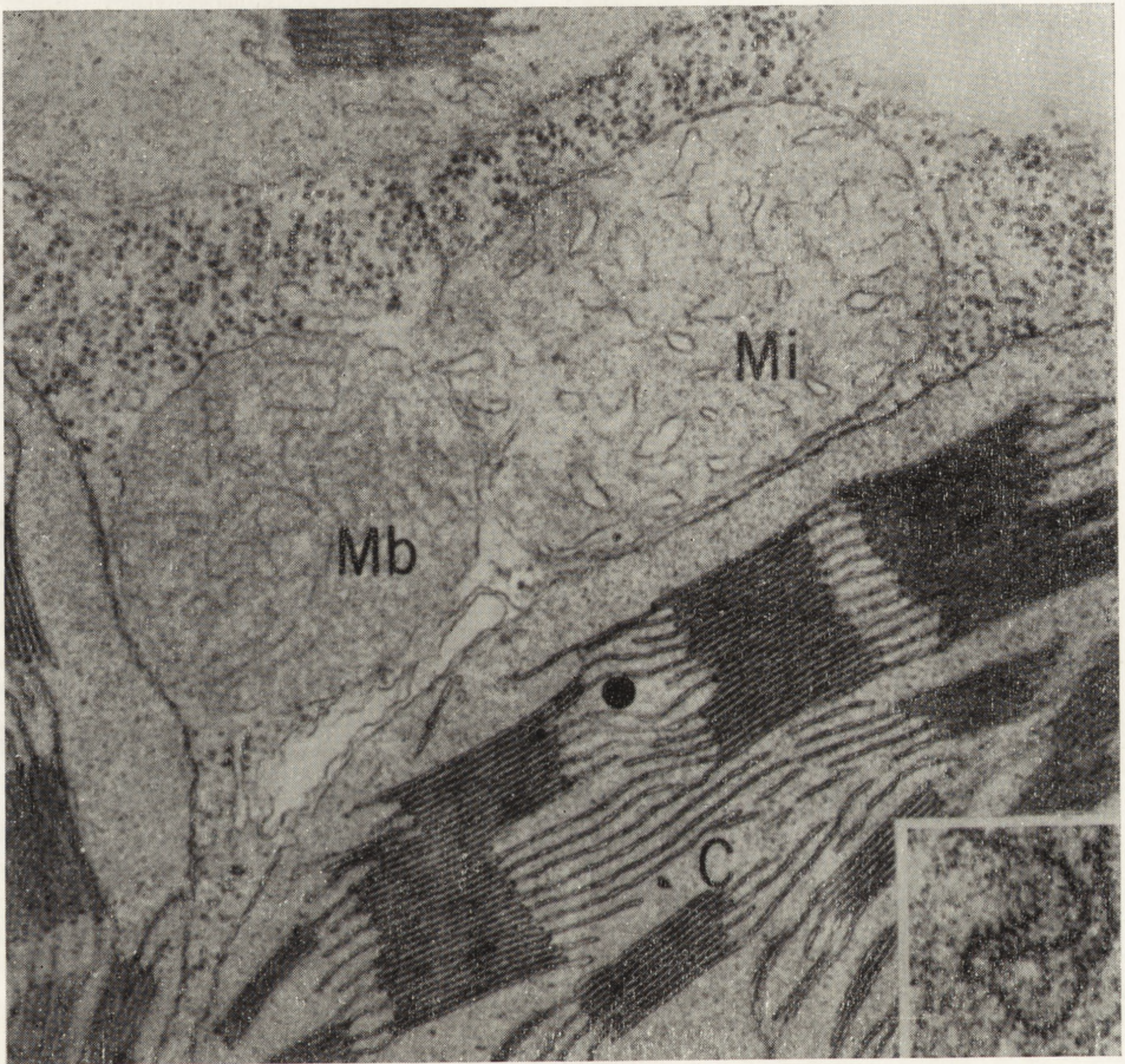
Opisane peroksysomy zawierające część rdzeniową występują we wszystkich przypadkach gdzie enzym ten jest składnikiem peroksysomu, a więc przede wszystkim w wątrobie i w nerce kręgowców, ale także u pierwotniaków, drożdży, koleoptyle owsa itp.

Inny typ wewnętrznego zróżnicowania strukturalnego stwierdzono u peroksysomów liści, przede wszystkim traw [23, 27, 28]. Polegają one na wykształceniu wewnątrz matrix licznych włókienek lub fibryli o wyrażonej i regularnej substrukturze (rys. 7).

Niekiedy nici te łączą się z amorficznym lub pseudokrystalicznym



Rys. 6. Rekonstrukcja ultrastruktury części rdzeniowej peroksysomu (wg [25]). U dołu przekrój poprzeczny, u góry schemat równoległego układu struktur rurkowatych



Rys. 7. Fragment komórki mezofilu *Avena sativa* z typowym peroksysomem (Mb) leżącym obok mitochondrium (Mi) i chloroplastu (C). Włókienka widoczne w matrix peroksysomu zostały przedstawione w dolnym prawym wycinku w większym powiększeniu (wg [27])

rdzeniem, w większości przypadków rdzeń taki nie występuje i włókienkowate twory są rozłożone nieregularnie. W strukturach nitkowatych można wyróżnić linearne lub globularne podjednostki powtarzające się w okresie rzędu 16 nm [28]. Jest wątpliwe, aby pewien szczególny typ struktury fibryli był specyficzny dla roślin prowadzących fotosyntezę według szlaku metabolicznego C-3 lub C-4. Brak jest również danych dotyczących funkcjonalnego znaczenia włókienkowatych struktur, poza stwierdzeniem opartym na reakcji z DAB, iż aktywność katalazy wydaje się być najwyższa właśnie w włókienkach i w strukturze rdzeniowej [28].

POWSTAWANIE I PRZEMIANY PEROKSYSOMÓW

Istnieje szereg sugestii zarówno ze strony morfologicznej, jak i biochemicznej, które wskazywałyby, że białka peroksysomalne wątroby są wytwarzane przez siateczkę śródplazmatyczną, a same peroksysomy powstają z siateczki drogą pączkowania i odcinania pęcherzyków na brzegach cystern siateczki gładkiej. Dane biochemiczne opierają się na rozmieszczeniu znakowanej katalazy w poszczególnych frakcjach subkomórkowych w różnym czasie po zastrzyknięciu zwierzęciu ^{14}C -leucyny. Wskazują one, że katalaza jest syntetyzowana przez rybosomy szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i następnie (w czasie rzędu 30 min) transportowana do peroksysomów. Dane morfologiczne oparte są na stwierdzeniu mniej więcej podobnej gęstości elektronowo-optycznej w cysternach siateczki i w peroksysomach w wątrobie noworodków myszy [1].

Metodą znakowanej leucyny można też oszacować półokres trwania białek peroksysomów na około 3,5 dnia. Podobne oznaczenie półokresu trwania hematyny katalazy oparte na zastosowaniu kwasu ^{14}C - δ -amino-lewulinowego daje wynik około 1,5 dnia. Mimo pewnych rozbieżności przytoczonych danych należy przyjąć, że peroksysomy ulegają zanikowi jako całość i że na pewno nie są to organelle odznaczające się wysoką stabilnością [2]. Mechanizm zaniku peroksysomów (autofagia?) nie jest znany. Również brak zupełnie danych dotyczących powstawania i dynamiki peroksysomów roślinnych.

Do badań nad powstawaniem i zanikiem peroksysomów stosowane bywają preparaty sztucznie modyfikujące te procesy. Najważniejszym z nich jest CPiB (p-chloro-fenoksy-maślan etylowy), który wybitnie zwiększa szybkość generacji i liczbę peroksysomów w komórce i to zarówno w wątrobie kręgowców, jak i u pierwotniaka *Tetrahymena*. Jednakże efekty cytologiczne uzyskane tą drogą (omówione obszernie przez Kahla i wsp. [4]) w tak wysokim stopniu odbiegają od normalnych obrazów, że na ich podstawie trudno wnosić o genezie i degradacji peroksysomów.

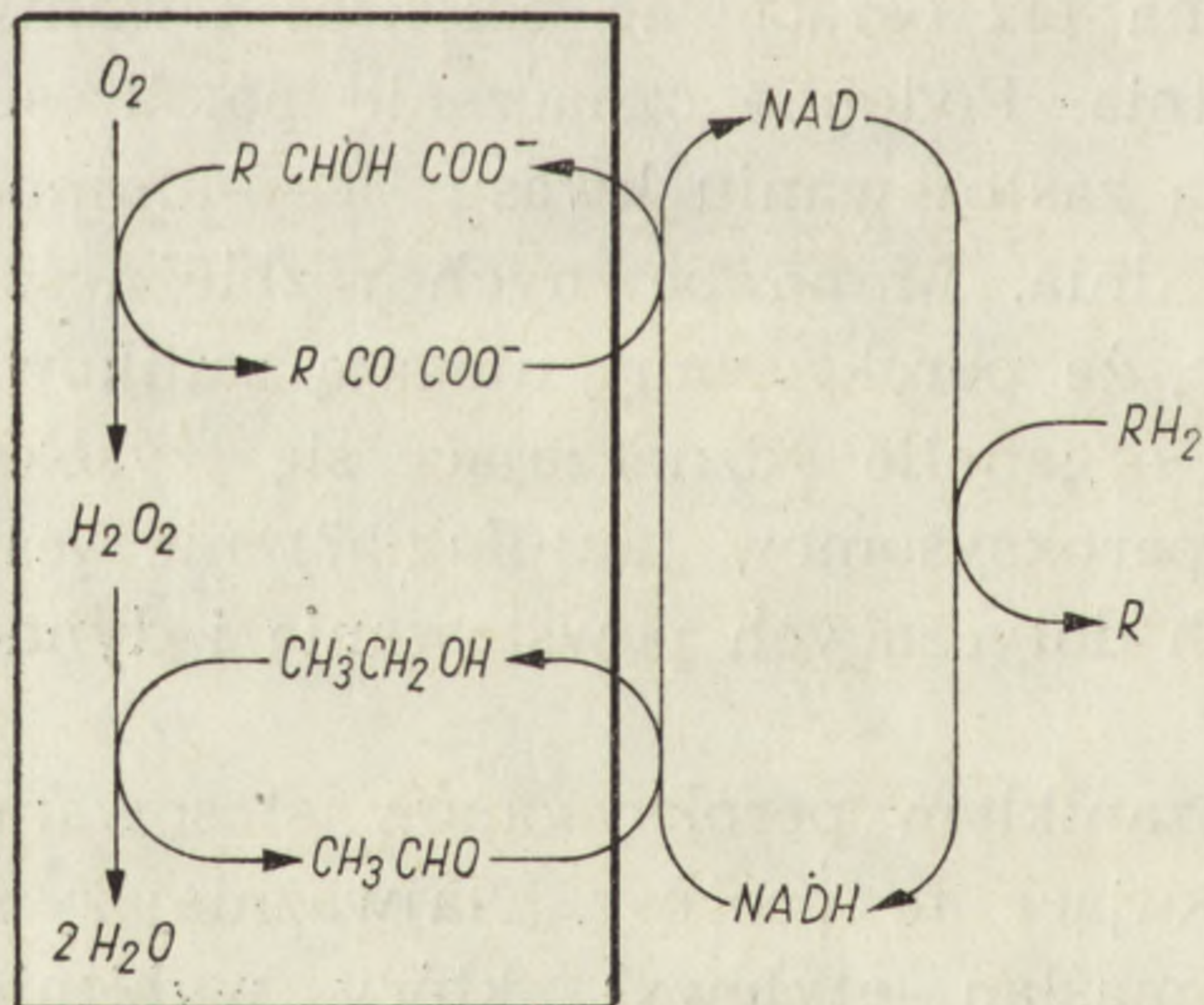
FUNKCJE METABOLICZNE PEROKSYSSOMÓW

Można wyróżnić kilka grup peroksysomów.

1. Peroksysomy kręgowców charakterystyczne dla wątroby i nerki katalizują w dwustopniowej reakcji redukcję cząsteczkowego tlenu do wody. Donorami elektronów mogą być bardzo różne substraty. Najczęściej jako donator pierwszego stopnia występują glioksalany, D- i L-aminokwasy, mleczny lub L- α -hydroksykwas. W drugim stopniu reakcji będącej rezultatem peroksydacyjnego działania katalaz największe znaczenie biologiczne wydaje się mieć utlenianie etanolu, mrówczanów i może nadtlenków kwasów tłuszczowych. Większość substratów, szczególnie drugiej grupy, wywiera w większych stężeniach działanie toksyczne. Tak więc pierwszą funkcją, którą można by przypisać peroksysomom byłoby ich działanie odtruwające.

W peroksysomach stwierdzono też występowanie dwu enzymów biorących udział w metabolizmie puryn — oksydazy moczanowej, której występowanie związane z pseudokrystalicznymi strukturami rdzeniowymi jest dość powszechne i alantoinazy o znacznie bardziej ograniczonym występowaniu [29]. W przypadku obecności obu tych enzymów pewien odcinek szlaku metabolicznego puryn może odbywać się w peroksysomach wątroby.

Wreszcie procesy utleniania wymienionych substratów mogą drogą substratowego transportu elektronów kontrolować poziom redukcji NAD



(a może i NADP) w cytoplazmie. Jak przypuszcza de Duve [1, 2] system taki (rys. 8), działając w powiązaniu z rozpuszczalną dehydrogenazą mleczanową lub etanolową, może chronić przed zbytnim przesunięciem równowagi NAD/NADH na stronę utlenioną. Ponieważ

Rys. 8. Schemat możliwej funkcji peroksysomów jako przenośników elektronów (wg [1])

stosunek NAD/NADH jest czynnikiem regulującym szereg procesów np. natężenie glikolizy, przebieg cyklu pentozowego itp., działalność peroksysomów mogłaby odgrywać pewną rolę regulacyjną. Ponieważ system utleniania peroksysomalnego jest znacznie bardziej uzależniony od stęże-

nia cząsteczkowego tlenu niż oddychanie mitochondrialne, nie jest wykluczone, że rola taka uwidacznia się dopiero wówczas, gdy działalność mitochondriów nie jest w stanie utrzymać wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu na odpowiednio niskim poziomie.

2. Peroksysomy pierwotniaków mają znacznie bogatszy zestaw enzymów. Obok enzymów występujących u kręgowców, które u pierwotniaków pełnią przypuszczalnie podobne funkcje biologiczne, występują u tych ostatnich niektóre enzymy cyklu glioksalowego. I tak np. u *Tetrahymena* stwierdzono obecność liazy izocytrynianowej i syntetazy jabłczanowej (które to enzymy nie występują w mitochondriach) oraz około połowę ogólnej aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej związanej z NADP [30]. Podobieństwo takiego rozkładu enzymów do rozkładu występującego w peroksysomach grupy 3 każe przypuszczać, iż u pierwotniaków peroksysomy spełniają podobną rolę, tj. odgrywają ważną funkcję w glukoneogenezie.

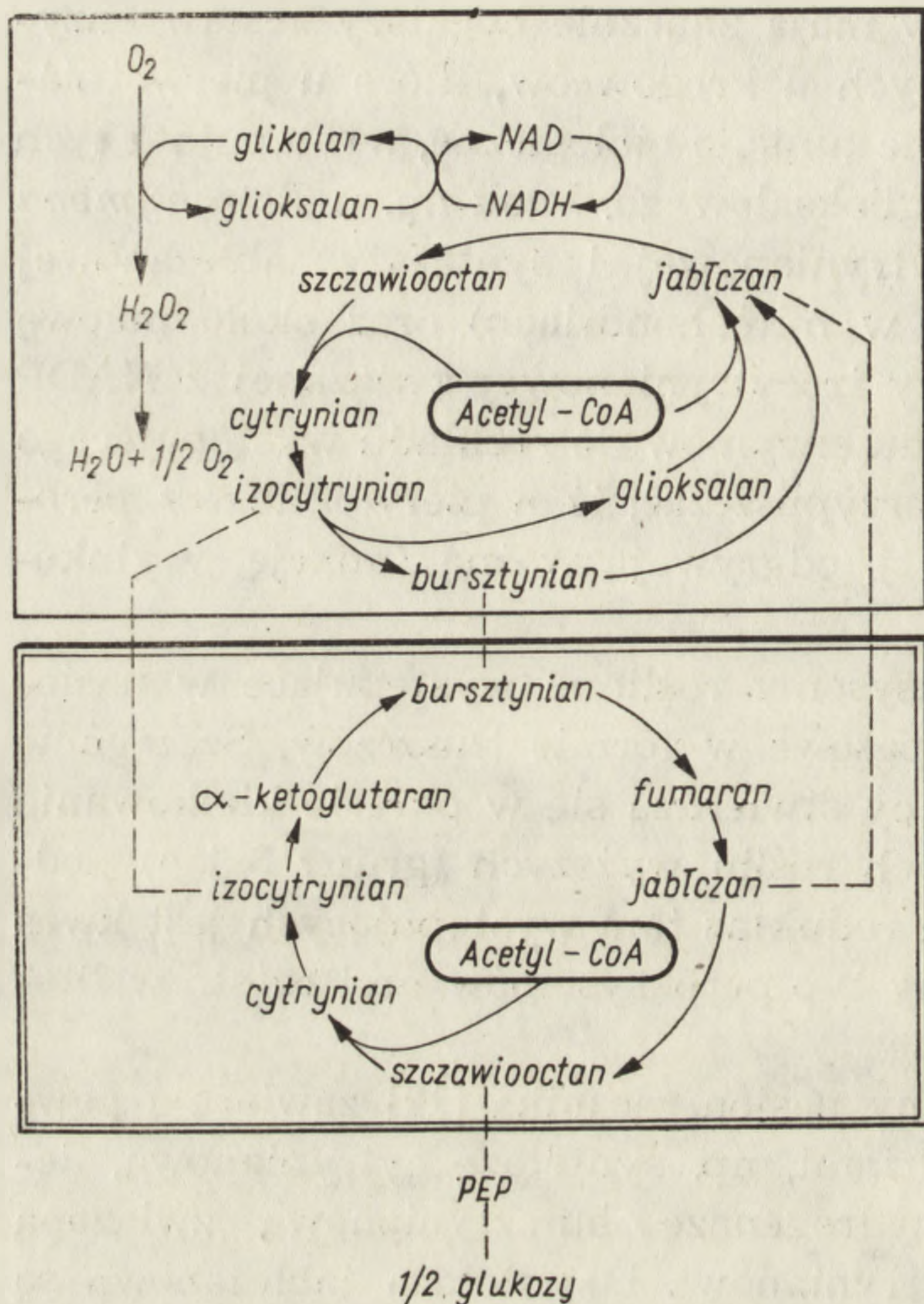
3. Do grupy tej należą peroksysomy roślinne występujące w nasionach gromadzących materiały zapasowe w formie tłuszczów. Szczególną aktywność peroksysomów tej grupy stwierdza się w okresie kiełkowania nasion. Ponieważ w peroksysomach roślin wyższych (grupy 3 i 4) podstawowymi substratami oksydaz i reduktaz tam występujących jest kwas glikolowy i glioksalowy, omawiany typ peroksysomów nosi często w literaturze nazwę glioksysomów.

Dokładniej zbadane glioksysomy nasion rącznika [12] zawierają pewne enzymy wspólne z mitochondriami, np. syntetazę cytrynianową, dehydrogenazę cytrynianową, dehydrogenazę bursztynianową związaną z NAD, inne jak np. liaza izocytrynianowa i syntetaza jabłczanowa są charakterystyczne tylko dla glioksysomów (por. rys. 1).

Należy przypuszczać, że w tym przypadku aktywność metaboliczna glioksysomów i mitochondriów polega na ich wzajemnym współdziałaniu. Schemat tych procesów przedstawiono na rysunku 9. Dwa momenty przedstawione na schemacie zasługują na uwagę. Pierwszym jest możliwość generacji pozamitochondrialnej siły redukcyjnej dzięki tworzeniu NADH w glioksysomach — organellach o błonach łatwo przepuszczalnych dla tego związku. Proces ten możliwy jest dzięki istnieniu powiązań substratowych poprzez bursztynian, izocytrynian i jabłczan, umożliwiających wymianę substancji między mitochondrium a peroksysomem. Z drugiej strony redukcja powrotna glioksalanu do glikolanu zużywa NADH. Odpowiednia regulacja natężenia obu procesów może więc zapewnić właściwy stosunek NAD/NADH w cytoplazmie.

Drugi moment dotyczy możliwości glukoneogenezy, procesu ważnego dla organizmów gromadzących materiały zapasowe w formie tłuszczów.

W zasadzie cykl metaboliczny określony dla glioksysomów polega na oksydacyjnej syntezie cząsteczki jabłczanu z glioksalanu i grupy acetylowej dostarczonej w formie acetylo-CoA. Proces ten nie może przebiegać w mitochondriach, jeżeli brak jest w nich enzymów cyklu glioksalowego.



Rys. 9. Schemat powiązań metabolicznych pomiędzy glioksysomem endospermu nasion. Procesy odbywające się w glioksysomie przedstawiono w górnej części rysunku w obszarze objętym pojedynczą linią, w mitochondrium poniżej w obszarze o podwójnej granicy

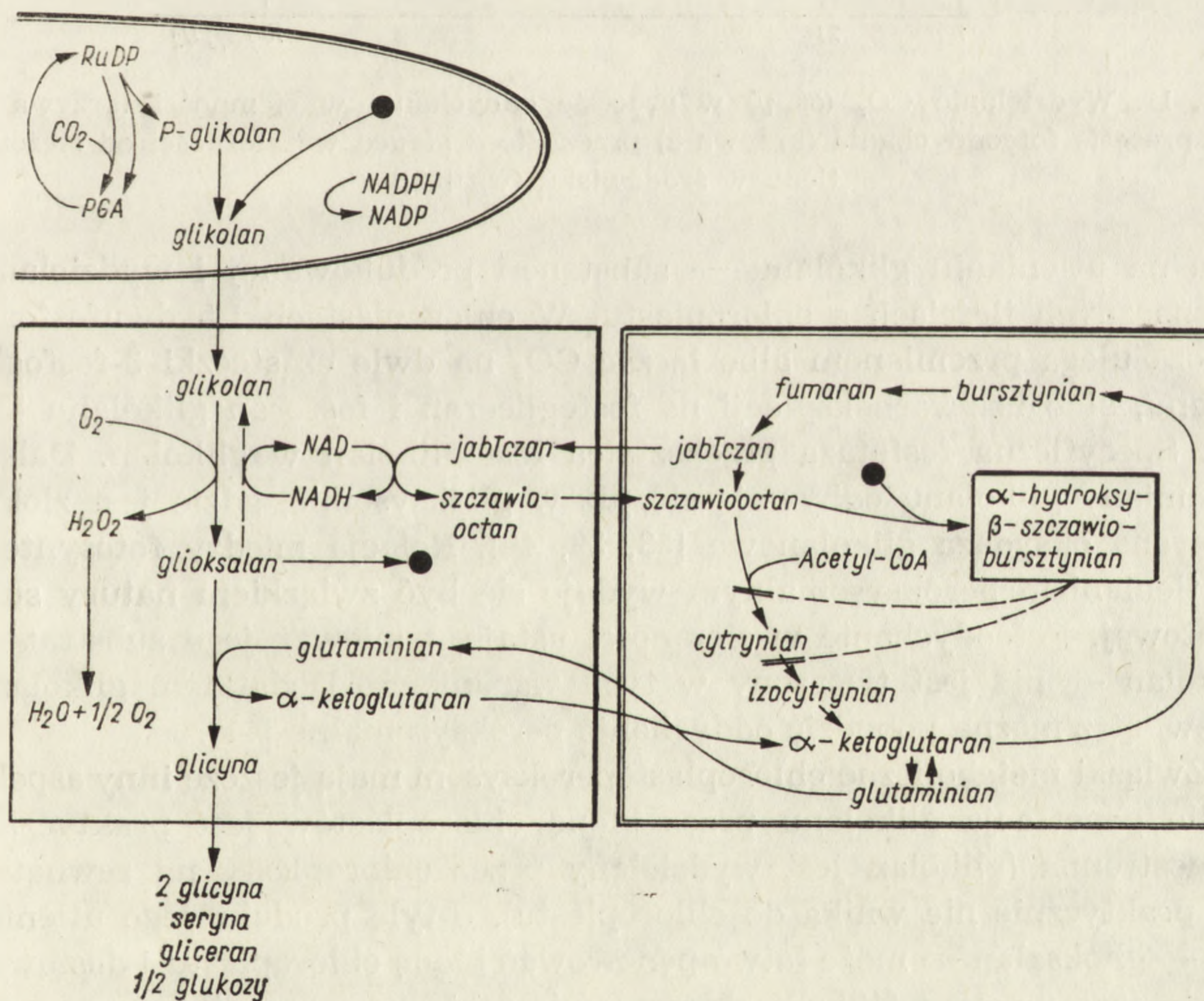
W mitochondrium włączona do cyklu Krebsa reszta acetylowa ulega tylko stopniowemu utlenianiu. Proces glukoneogenezy rozpoczynający się w glioksysomach prowadzi m. in. poprzez szczawiooctan, fosfoenolopirogronian do trioz i heksoz [31]. Jego substrat — w danym przypadku szczawiooctan — może powstawać tylko w mitochondriach, ponieważ w glioksysomach brak jest dehydrogenazy bursztynianowej i fumarazy [12]. Stąd jasno wynika konieczność współdziałania metabolizmu mitochondriów i glioksysomów w przemianach reszt acetylowych w węglowodany.

Omówione szlaki metaboliczne nie wyczerpują przypuszczalnie roli biologicznej glioksysomów, w której jednak generacja pozamitochondrialnej siły redukcyjnej i glukoneogeneza wydają się mieć zasadnicze znaczenie.

4. Jako osobną grupę glioksysomów można wyróżnić peroksysomy występujące w komórkach fotosyntetycznych i mające ścisły związek z tzw. procesem fotooddychania. Glioksysomy, których obecność stwierdzono

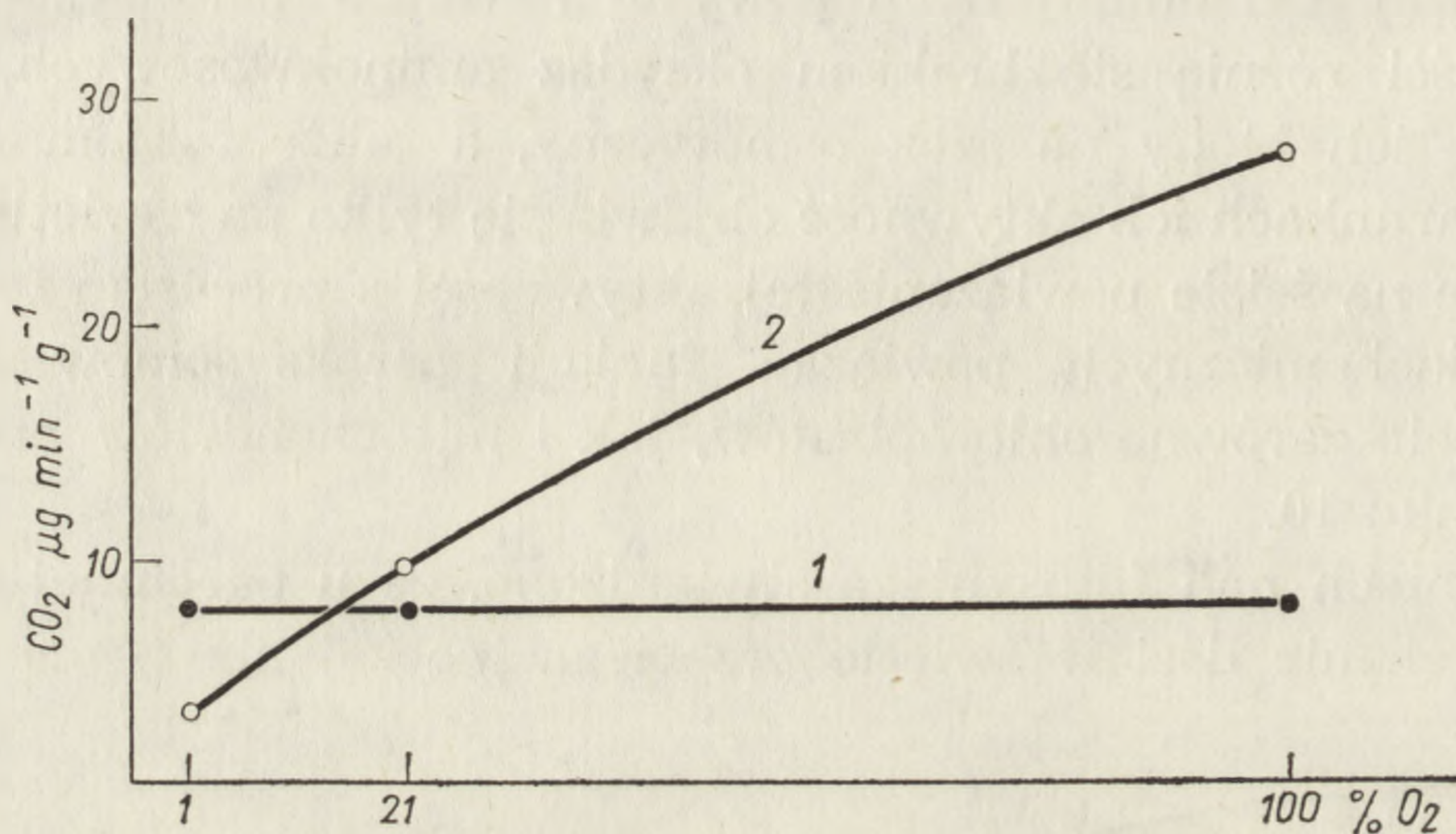
w liściach wszystkich rodzajów badanych dotychczas roślin [3, 33] zawierają obok katalazy oksydazę glikolanową, dehydrogenazę jabłczanową związaną z NAD reduktazę α -hydroksykwasów (glioksalowego, hydroksypirogronowego) i specyficzną transaminazę glioksalano-glutaminową [13, 3, 32]. Ostatnio stwierdzono również obecność dwóch innych specyficznych transaminaz: hydroksypirogroniano-serynowej i szczawiooctano-glutaminowej. Od omówionych powyżej rodzajów peroksysomów, glioksysomy liści różnią się brakiem oksydaz aminokwasowych, mniejszą odpornością ich błony na szok osmotyczny, a także faktem że w normalnych warunkach ich aktywność objawia się tylko po oświetleniu liścia, co wskazuje na ścisłe powiązanie tej aktywności z procesem fotosyntezy. Schemat biochemicznych powiązań funkcji peroksysomów liściowych z aktywnością zarówno chloroplastów, jak i mitochondriów przedstawiono na rysunku 10.

W badaniach nad fotosyntezą stwierdzono, że u ogromnej większości roślin oddychanie liści w świetle przebiega inaczej niż w ciemności. Po



Rys. 10. Schemat wzajemnych powiązań metabolicznych chloroplastu (u góry na lewo — obszar ograniczony podwójnie), glioksysomu (poniżej — obszar objęty pojedynczą linią) i mitochondrium (na prawo — podwójna linia ograniczająca)

oświetleniu liścia oddychanie „ciemne” zostaje zahamowane lub przynajmniej znacznie ograniczone, a w pobieranie tlenu zostaje zaangażowany inny proces zwany fotooddychaniem [34]. Jedną z cech różniących obie drogi oddychania jest wybitna zależność fotooddychania od stężenia tlenu (rys. 11). Z biochemicznego punktu widzenia fotooddychanie po-



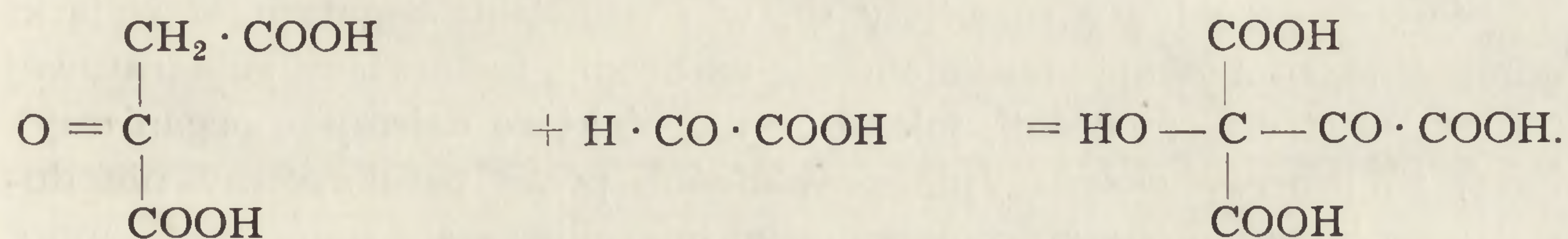
Rys. 11. Wydzielanie CO₂ (oś *y*) w procesie oddychania w ciemności (krzywa 1) i w procesie fotooddychania (krzywa 2) przez *Picea glauca* w zależności od stężenia tlenu w środowisku (wg [35])

lega na utlenianiu glikolanu — substancji produkowanej i wydzielanej w znacznych ilościach z chloroplastu. W chloroplastach 1,5 dwufosforybuloza ulega przemianom albo łącząc CO₂ na dwie cząsteczki 3-fosfogliceranu, albo bez karboksylacji na fosfogliceran i fosforan glikolanu [36, 37]. Specyficzna fosfataza przekształca fosfoglikolan w glikolan. Dalsze przemiany glikolanu odbywają się już w gliksysomie, gdzie jest zlokalizowana oksydaza glikolanowa [38, 39, 40]. Relacja między fotosyntezą a utlenianiem peroksysomalnym wydaje się być związkiem natury substratowej. Fotooddychanie w ciemności ustaje, ponieważ jego substrat — glikolan — nie jest tworzony w tych warunkach. Dodatkiem glikolanu z zewnątrz można pobudzić oddychanie peroksysomalne [41].

Związki metaboliczne chloroplast–peroksysom mają jeszcze inny aspekt. O ile penetracja glikolanu przez błonę chloroplastów jest praktycznie jednostronna (glikolan jest wydzielany przez chloroplasty na zewnątrz, ale praktycznie nie wnika do chloroplastu), o tyle produkt jego utleniania — gliksalan — może łatwo penetrować błonę chloroplastu i dostawać się do jego wnętrza [42]. W chloroplastach może następować ponowna redukcja tego związku przez NADPH (generowany w fotosyntezie) i ponowna ucieczka glikolanu na zewnątrz. Taki cykliczny proces umożliwia transport wodoru na zewnątrz chloroplastu i pozbycie się nadmiaru siły redukcyjnej tworzonej w fazie świetlnej fotosyntezy.

Bardziej złożone jest powiązanie między peroksysomami liścia a mitochondriami. Jednym z jego aspektów jest cykliczna wymiana substratowa, np. glutaminianu dającego przez transaminację z glioksalanem glicynę — jeden z produktów aktywności peroksysomów liściowych. Według ostatnich badań także pewien odcinek drogi glioksalowej wiodącej do węglowodanów (etapy: seryna — hydroksypirogronian — gliceran, nie zaznaczone na schemacie) może odbywać się w peroksysomach [33, 3].

Interesującym, choć jeszcze nie w pełni wyjaśnionym problemem, jest zagadnienie wpływu aktywności peroksysomów na oddychanie „ciemniowe”, tj. mitochondrialne. Jedną z najbardziej prawdopodobnych prób wyjaśnienia tego związku opiera się na wynikach badań D'Abra i wsp. oraz Ruffa i wsp. [43, 44], którzy wykazali, że glioksalan może tworzyć na drodze nieenzymatycznej kondensacji ze szczawiooctanem kwas α -hydroksy- β -oxaloszczawowy według reakcji



Ten ostatni związek okazał się inhibitorem dwóch enzymów cyklu kwasów trójkarboksyłowych: hydratazy akonitynowej i dehydrogenazy izocytrynianowej. Reakcja hamowana jest odwracalnie. Porównując utlenianie peroksysomowe z mitochondrialnym należy podkreślić trzy zasadnicze różnice między obu procesami. Po pierwsze, we wszystkich zbadanych dotąd przypadkach energia wyzwolana przy utlenianiu peroksysomalnym jest zamieniana na ciepło, a więc utracona dla organizmu. Nie stwierdzono sprzężenia utleniania peroksysomalnego z fosforylacją [45, 2]. Po drugie, aktywność oksydaz peroksysomalnych jest wyraźnie uzależniona od stężenia tlenu, w przeciwieństwie do oksydaz mitochondrialnych, które w bardzo szerokich granicach (z wyjątkiem krańcowo niskich stężeń O_2) są od stężenia tlenu niezależne. I wreszcie trzecia różnica dotyczy specyficzności substratowej. Peroksysomy mogą utleniać niektóre substraty, które są przez mitochondria nie atakowane, np. D-aminokwasy lub mocznany (peroksysomy zwierzęce) lub których produkty utlenienia wręcz hamują aktywność mitochondriów (glioksalany — peroksysomy liściowe).

PEROKSYSOMY A EWOLUCJA

Mimo wielu różnic charakteryzujących poznane do dziś peroksysomy świata roślinnego i zwierzęcego, istnieje tyle cech wspólnych dotyczących morfologii i funkcji tych organelli iż można przyjąć, że wywodzą się one z wspólnego pnia. Peroksysomy były przypuszczalnie pierwotnym systemem oddechowym, który pojawił się we wczesnej biogenezie (wg hipotezy de Duve i Baudhuina [1] na początku aerobiozy). Dalsze losy

peroksysomów w ewolucji można określić jako stopniowy „wzlot i upadek” ich znaczenia biologicznego.

Pierwotna atmosfera ziemi miała charakter beztlenowy, a pierwotne eobionty powstały w wodzie będącej w kontakcie z taką właśnie atmosferą. Pojawienie się w niej tlenu (na skutek działalności organizmów fotosyntetycznych) stwarzało niebezpieczeństwo dla prymitywnych eobiontów. Wiele substancji biologicznych, m. in. tiole, samorzutnie reaguje z tlenem, a produktem tych reakcji może być nadtlenek wodoru — substancja o wysokim stopniu toksyczności dla żywych komórek. Wydaje się więc zrozumiałe, że zadaniem pierwotnego systemu obronnego był przede wszystkim rozkład H_2O_2 już to drogą katalazową, bądź poprzez działalność peroksydazową. Pogląd taki potwierdzają wyniki badań dziś żyjących bakterii beztlenowych, u których obecność katalaz jest warunkiem niezbędnym dla przeżycia w środowisku tlenowym [46].

Pierwotne eobionty rozwijały się w środowisku bogatym w związki organiczne, zdobywając łatwo energię na drodze fosforylacji substratowej (np. na drodze fermentacji, jak to czynią niektóre dzisiejsze organizmy). Fakt, że procesy oksydacyjne prowadzone przez peroksysomy nie dostarczały komórce energii metabolicznej miał więc małe znaczenie, a może nawet utlenienie produktów fermentacji ułatwiało pozbycie się ich z organizmu [1]. Fosforylacja oksydacyjna, przynosząca ogromne korzyści energetyczne, nie była niezbędna w tym wczesnym okresie biogenezy i przypuszczalnie rozwinęła się znacznie później w okresie konkurencji o substraty organiczne. W świetle powyższej hipotezy dzisiejsze peroksysomy stanowią pewnego rodzaju „kopalne organelle”. Wyjaśniałoby to fakt występowania w peroksysomach wielu enzymów, bez których dzisiejszy zdrowy organizm mógłby się w zasadzie obyć, np. oksydazy moczanowej u ssaków czy oksydaz D-aminokwasów.

Najbogatszy zestaw enzymów, prawdopodobnie najbardziej zbliżony do tego jaki występował w pierwotnych peroksysomach, mają pierwotniaki (tab. 1). Zmiany peroksysomów w późniejszej ewolucji polegały w zasadzie na utracie pewnych enzymów. Tak np. oksydaza moczanowa zanikła przy odgałęzieniu ewolucyjnym kręgowców prowadzących do ptaków, pozostając u ssaków, ale i w tej gromadzie zanika u naczelnych. W ewolucji roślin zanikły z kolei oksydazy aminokwasowe, których nie spotykamy w glioksysomach. Fakt, że peroksysomy nie zanikły w procesie ewolucji wskazuje, że spełniają one wciąż jeszcze istotne, choć często wąsko wyspecjalizowane funkcje. U ssaków peroksysomy występują wyłącznie w wątrobie i nerkach — organach wykazujących szczególnie intensywną przemianę materii i rola ich może polegać na funkcji ochronnej. Klasycznym przykładem specjalizacji są glioksysomy występujące w endospermie nasion tłuszczowych, których działalność po-

zwala na skierowanie części rezerw drogą cyklu gliksalowego do węglowodanów, co istotnie ma miejsce podczas kiełkowania [11].

Charakterystyczne są ściśle powiązania metaboliczne peroksysomów z chloroplastami i mitochondriami. Istnieją poważne argumenty, że oba ostatnie typy organelli komórkowych mają genezę symbiotyczną. Mitochondria jako najbardziej sprawne w procesie utleniania biologicznego winny w zasadzie zwyciężyć we współzawodnictwie z peroksysomami. W istocie powstała jedna wzajemna współpraca i pewien podział funkcji między tymi organellami.

Niejasne jest znaczenie biologiczne procesu fotooddychania prowadzonego przez gliksysomy liści. Proces ten powoduje niekiedy istotne zmniejszenie produktywności fotosyntetycznej. Można jedynie przypuszczać, że pierwotne endosymbionty fotosyntetyczne wydzielają znaczne ilości asymilatów w postaci silnie dysocjującego kwasu glikolowego (podobnie jak to ma miejsce w pewnych warunkach u niektórych dziś żyjących glonów [47]), a dalsze przetwarzanie tego związku możliwe było tylko dzięki obecności gliksysomów z typową dla nich oksydazą glikolanową.

Należy podkreślić, że rozważania na temat roli peroksysomów w ewolucji mają charakter bardzo spekulatywny. Niewątpliwie przyszłe badania nad peroksysomami innych gatunków organizmów żywych, a w szczególności nad ich aktywnością enzymatyczną i rolą biologiczną, pozwolą stwierdzić, jak dalece przedstawiony obraz odpowiada rzeczywistości.

LITERATURA

- [1] de DUVE Ch., BAUDHUIN P., 1966 — Peroxisomes (Microbodies and related particles), *Physiol. Rev.*, **46**: 323–358.
- [2] de DUVE Ch., 1969 — The peroxisomes: a new cytoplasmic organelle, *Proc. Roy. Soc. B.*, **173**: 71–83.
- [3] TOLBERT N. E., YAMAZAKI R. K., 1969 — Leaf peroxisomes and their relation to photorespiration and photosynthesis, *Ann. New York Acad. Sci.*, **168**: 325–341.
- [4] KAHL A., GROSS M., TURSKI W., 1972 — Peroksysomy, *Post. Bioch.* **18**: 139–162.
- [5] de DUVE CH., BEAUFAY H., JACQUES P., RAHMAN Y., SELLINGER O. Z., WATTIAUX R., De CONICK S., 1960 — Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **40**: 186–187.
- [6] de DUVE Ch., 1960 — Intracellular localization of enzymes, *Nature*, **187**: 836–853.
- [7] BAUDHUIN P., MÜLLER M., POOLE B., de DUVE Ch., 1965 — Non-mitochondrial oxidizing particles (Microbodies) in rat liver and kidney and in *Tetrahymena pyriformis*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **20**: 53–59.
- [8] ALLEN J. M., BEARD M. E., 1965 — Hydroxy acid oxidase localization in renal microbodies, *Science*, **149**: 1507–1509.
- [9] MÜLLER M., HOGG J. F., de DUVE Ch., 1968 — Distribution of tricarboxylic

- acid cycle enzymes and glycolate cycle enzymes between mitochondria and peroxysomes in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5385–5395.
- [10] MÜLLER M., MAX MØLLER K., 1967 — Peroxisomes in *Acanthamoeba* sp., *J. Protozool.*, **14**: (Suppl.) 11.
- [11] BREIDENBACH R. W., BEEVERS H., 1967 — Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particles from castor bean endosperm, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **27**: 462–469.
- [12] BREIDENBACH R. W., KAHN A., BEEVERS H., 1968 — Characterisation of glyoxysomes from castor bean endosperm, *Plant Physiol.*, **43**: 705–713.
- [13] TOLBERT N. E., OESER A., KISAKI T., HAGEMAN R. H., YAMAZAKI R. K., 1968 — Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5179–5184.
- [14] OESER A., TOLBERT N. E., HAGEMAN R. H., YAMAZAKI R. K., KISAKI T., 1968 — Glycolate oxidation and peroxisomes in plants with and without photorespiration. *Plant Physiol.*, **43**: (Suppl.) 12.
- [15] BERGER Ch., GERHARDT B., 1971 — Charakterisierung der Microbodies aus Spadix-Appendices von *Arum maculatum* L. und *Saurumatum guttatum* Schott. *Planta*, **96**: 326–338.
- [16] GERGIS M. S., 1971 — The presence of microbodies in three strains of *Chlorella*. *Planta*, **101**: 180–184.
- [17] O'BRIEN T. P., THIMANN K. V., 1967 — Observation on the fine structure of the oat coleoptile. II. The parenchyma cells of the apex. *Protoplasma*, **63**: 417–442.
- [18] BAUDHUIN P., 1964 — Propriétés de la catalase, de la D-aminoacide osidase et de l'urate oxydase livés aux microbodies du foie de rat, *Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem. New York*, 296.
- [19] de DUVE Ch., 1965 — The separation and characterization of subcellular particles, *Harvey Lectures Ser.*, **59**: 49–87.
- [20] RHODIN J., 1954 — Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm, Aktienbolaged Godvil.
- [21] CLAUD P., GIBOR A., — The oxygen cycle, *Scientific American*, **223**: 111–123.
- [22] NOVIKOFF A. B., GOLDFISCHER S., 1969 — Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 675–680.
- [23] FREDERICK S. E., NEWCOMB E. H., 1969 — Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes), *J. Cell. Biol.*, **43**: 343–353.
- [24] BAUDHUIN P., BEAUFAX H., de DUVE Ch., 1965 — Combined biochemical and morphological study of particulate fraction from rat liver, *J. Cell. Biol.*, **26**: 219–243.
- [25] TSUKADA H., MOCHIZUKI Y., FUJIRORA S., 1966 — The nucleoids of rat liver cell microbodies. Fine structure and enzymes, *J. Cell. Biol.*, **28**: 449–460.
- [26] HRUBAN Z., SWIFT H., 1964 — Uricase: localization in hepatic microbodies, *Science*, **146**: 1316–1317.
- [27] FREDERICK S. E., NEWCOMB E. H., 1971 — Ultrastructure and distribution of microbodies an leaves of grasses with and without CO₂-photorespiration, *Planta*, **96**: 152–174.
- [28] HILLIARD J. H., GRACEN V. E., WEST S. H., 1971 — Leaf microbodies (peroxisomes) and catalase localisation in plants differing in their photosynthetic carbon pathways, *Planta*, **97**: 93–105.

- [29] VISENTIN L. P., ALLEN J. M., 1969 — Allantoinase association with amphibian hepatic peroxisomes, *Science*, **163**: 1463.
- [30] MÜLLER M., HOGG J. F., de DUVE Ch., 1968 — Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glycolate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Biol. Chem.*, **243**: 5385–5395.
- [31] BEEVERS H., 1961 — Metabolic production of sugars from fat, *Nature*, **191**: 433–436.
- [32] KISAKI T., TOLBERT N. E., 1969 — Glycolate and glyoxylate metabolism by isolated peroxisomes and chloroplasts, *Plant Physiol.*, **44**: 242–250.
- [33] TOLBERT N. E., OESER A., YAMAZAKI R. K., HAGEMAN R. H., KISAKI T., 1969 — A survey of plant for leaf peroxisomes, *Plant Physiol.*, **44**: 135–147.
- [34] FORRESTER M. L., KROTKOV G., NELSON C. D., 1966 — Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration nad respiration in deteached leaves. I., Soybean. *Plant Physiol.*, **41**: 422–427.
- [35] POSKUTA J., 1968 — Photosynthesis, photorespiration and respiration of deteached spruce twies as influenced by oxygen concentration and light intensity, *Physiol. Plantarum*, **21**: 1129–1136.
- [36] ANDREW T. J., LORIMER G. H., TOLBERT N. E., 1973 — Ribulose diphosphate oxigenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-1 protein of leaves, *Biochemistry*, **12**: 11–18.
- [37] LORIMER G. H., ANDREW T. J., TOLBERT N. E., 1973 — Ribulose diphosphate oxigenase. II. Further proof of the reaction products and mechanism of action, *Biochemistry*, **12**: 18–23.
- [38] ZELITCH I., 1958 — The role of glycolic acid oxidase in the respiration of leaves, *J. Biol. Chem.*, **233**: 1299–1303.
- [39] ZELITCH I., 1959 — The relationship of glycolic acid to respiration and photosynthesis in tabacco leaves, *J. Biol. Chem.*, **234**: 3077–3081.
- [40] ZELITCH I., 1966 — Increased rate of net photosynthetic carbon dioxide uptake caused by the inhibition of glycolate oxidase, *Plant Physiol.*, **41**: 1623–1631.
- [41] MOSS D. N., 1967 — High activity of the glycolic acid oxidase system in tobacco leaves, *Plant Physiol.*, **42**: 1463–1464.
- [42] KEARNEY P. C., TOLBERT N. E., 1962 — Appearance of glycolate and related products of photosynthesis outside of chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**: 164–171.
- [43] D'ABRAMO F., ROMANO M., RUFFO A., 1958 — Inhibition of citrate oxidation by glyoxylate in rat liver homogenates, *Biochem. J.*, **68**: 270–275.
- [44] RUFFO A., TESTA E., ADINOLFI A., PELIZZA G., MORATTI R., 1967 — Control of citric acid cycle by glyoxylate. Mechanism of the inhibition by oxalomalate and γ -hydroxy- α -oxoglutarate, *Biochem. J.*, **103**: 19–23.
- [45] ZELITCH I., 1960 — Oxidative phosphorylation and glycolate oxidation by particles from spinach leaves. *Plant Physiol.*, **35**: 205–209.
- [46] DOLIN M. I., 1961 — Cytochrome independent electron transport enzymes in bacteria, [w] *The bacteria*, red. Gunsales I. C., R. Y. Stanler, New York Acad. Press, Vol. 2 p. 425–460.
- [47] MILLER R. M., MEYER C. M., TANNER H. A., 1963 — Glycolate excretion and uptake by *Chlorella*, *Plant Physiol.*, **38**: 184–188.

Otrzymano: grudzień, 1973.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in approximately 15 horizontal lines, but the characters are too light and blurry to be transcribed accurately.

STRUKTURY GOLGIEGO W ŚWIECIE ROŚLIN

Barbara GABARA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii,
Uniwersytet Łódzki

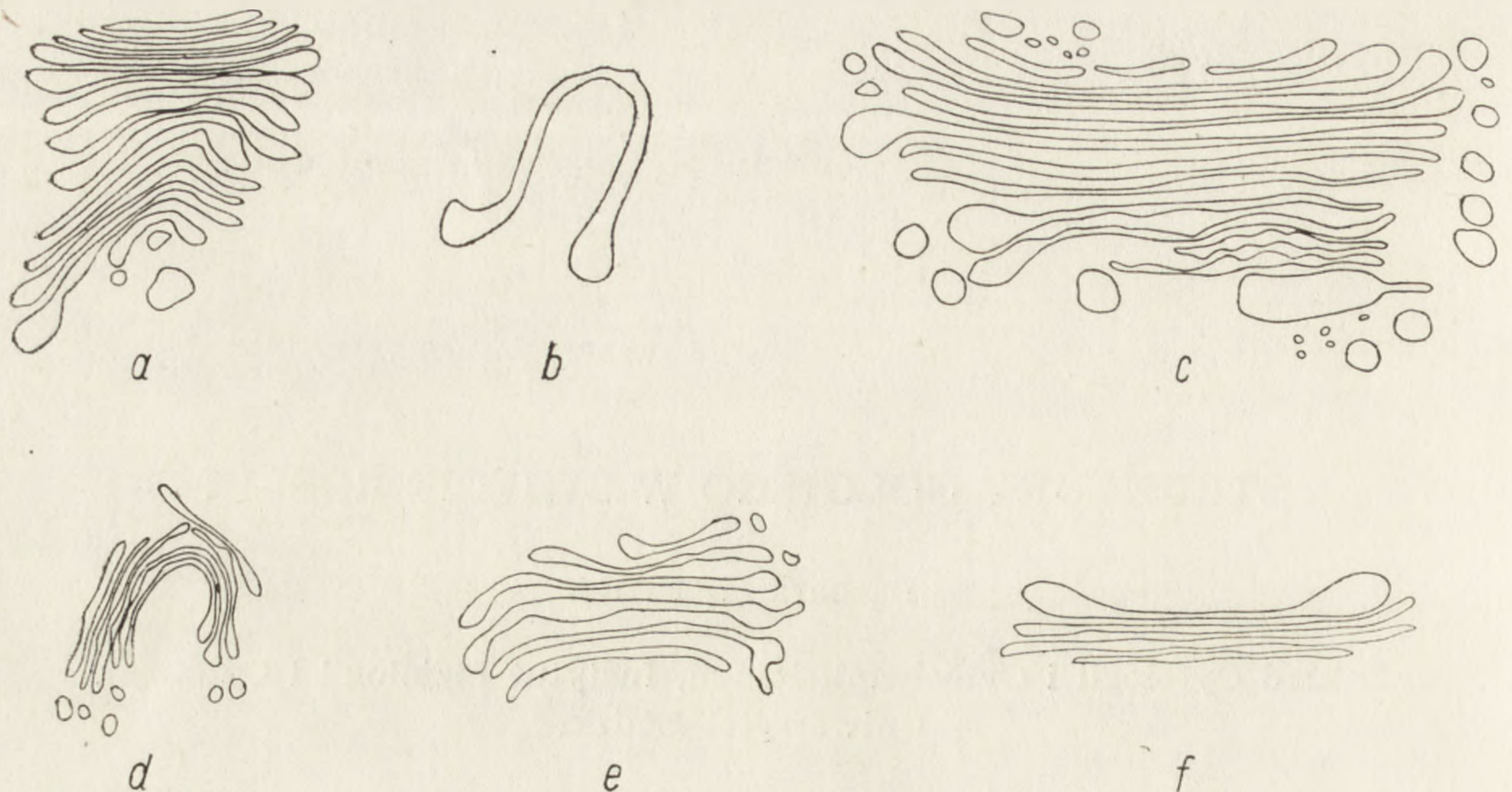
Streszczenie. Struktury Golgiego, występujące w komórkach prawie wszystkich roślin z wyjątkiem bakterii i sinic, zbudowane są z cystern i pęcherzyków wykazujących obecność niektórych enzymów hydrolitycznych a także polisacharydów i białek. Funkcja struktur Golgiego w komórce roślinnej polega na regulacji zawartości wody w komórkach niektórych glonów oraz na dostarczaniu materiału dla blaszki środkowej i ściany komórkowej. Ponadto, struktury Golgiego uczestniczą w tworzeniu i rozbudowie plazmalemy oraz biorą udział w produkcji śluzów.

Odkrycie przez Camillo Golgiego w roku 1898/1899 organelli komórkowych, nazwanych potem strukturami Golgiego, zainicjowało wiele badań, spekulacji i dociekań.

Szczególne kontrowersje budził aparat Golgiego w komórkach roślin ze względu na obecność garbników oraz fosforanów nieorganicznych i organicznych uniemożliwiających zastosowanie metod selektywnej impregnacji tych organelli komórkowych solami metali ciężkich, jak osm czy srebro, a wykorzystywanych z powodzeniem do ujawniania struktur Golgiego u zwierząt. Niemniej jednak sugerowano możliwość po zastosowaniu odpowiednich metod wykrycia u roślin struktur Golgiego analogicznych jak w komórkach zwierzęcych [1].

Pogląd o braku aparatu Golgiego u roślin przetrwał przez wiele lat i aż do chwili zastosowania mikroskopii elektronowej do badań biologicznych uważano struktury Golgiego za organelle charakterystyczne dla komórek zwierzęcych.

Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały obecność struktur Golgiego w komórkach prawie wszystkich roślin, z wyjątkiem najniżej uorganizowanych — bakterii i sinic. Okazało się ponadto, że wygląd struktur Golgiego jest różny w komórkach glonów, grzybów, wątrobowców czy roślin wyższych (rys. 1).



Rys. 1. Schemat budowy struktur Golgiego w komórkach niektórych przedstawicieli roślin: a — *Dunaliella* sp. [2]; b — *Paecilomyces berlinensis* [3]; c — *Spirogyra* sp. [4]; d — *Marchantia polymorpha* [5]; e — *Zea mays* [1]; f — *Tradescantia paludosa* [6]

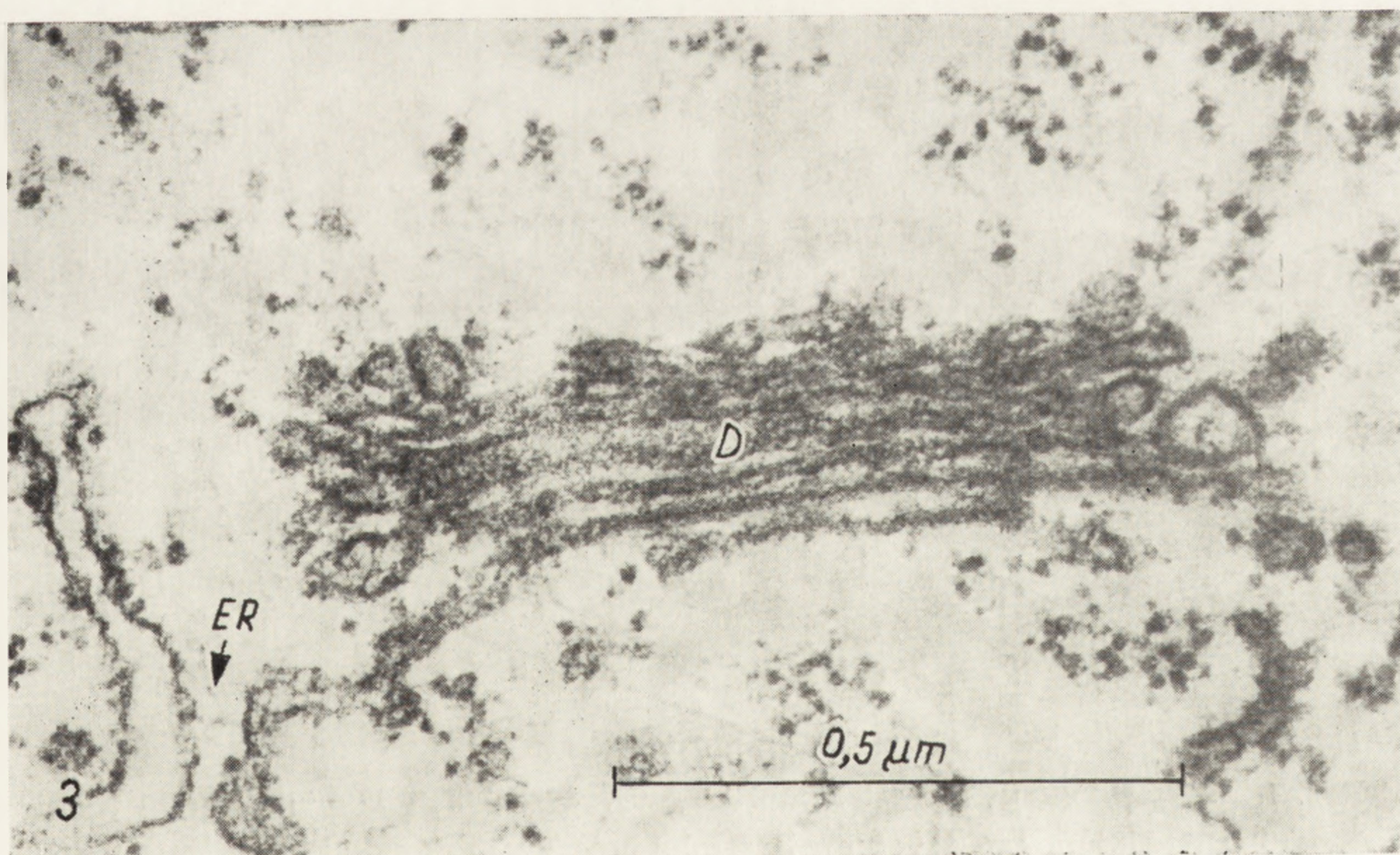
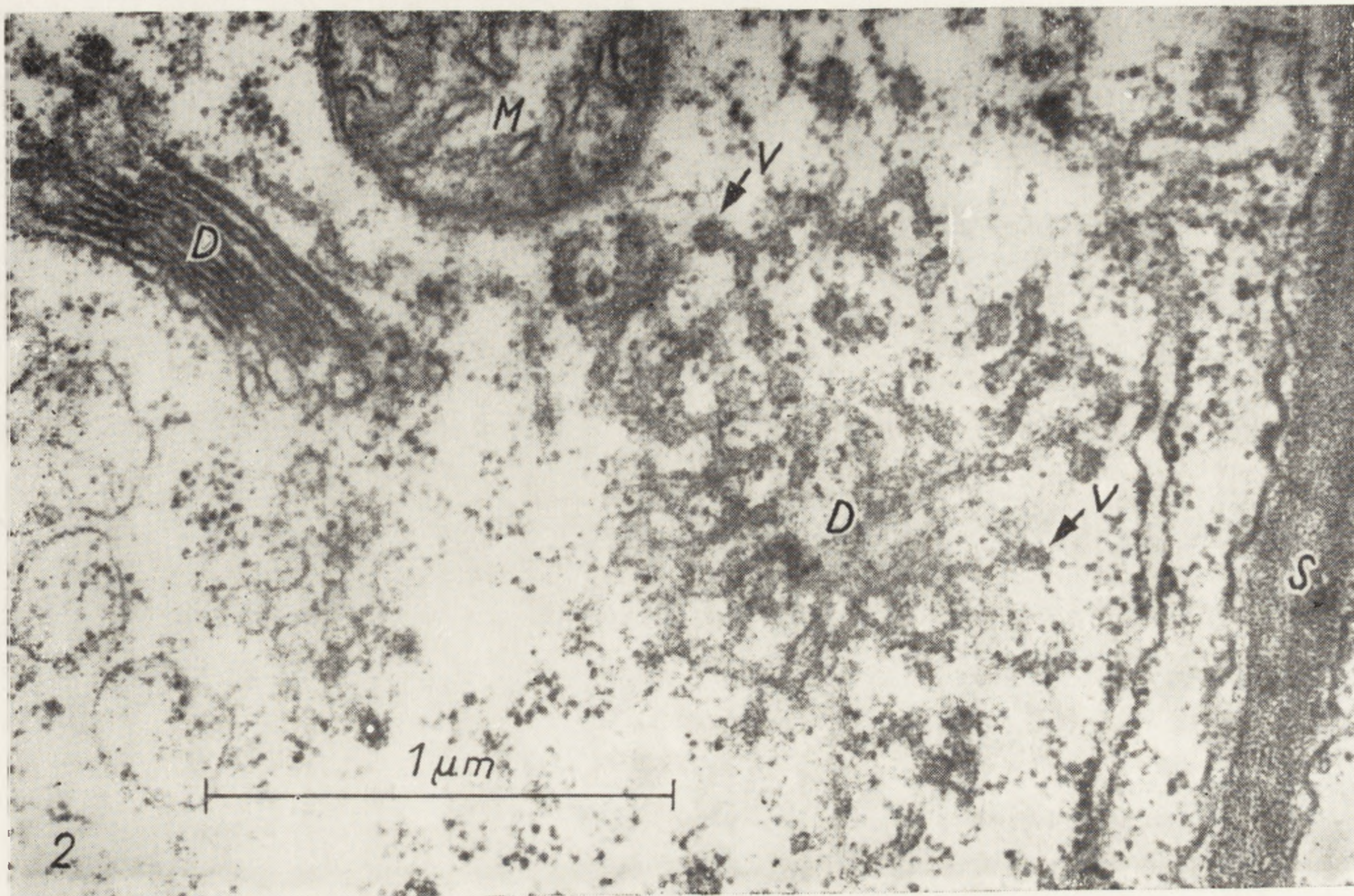
Wymiary diktiosomów u roślin wahają się w granicach od 0,5 μm do kilku μm (np. u *Laminaria* 3 μm [7], u *Micrasterias rotata* 2–5,5 μm a w żywej komórce nawet do 8 μm [8]), natomiast ich liczba w jednej komórce wynosi od 1 (*Schizochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium* sp. [9], *Dinobryon sertulata* [10]) do dwudziestu kilku tysięcy (rhizoidy *Chara foetida* [11]). Wyliczono ponadto, że na jedną komórkę gruczołową *Mentha* o średnicy 22 μm przypada 840 diktiosomów [12].

BUDOWA

Z badań w mikroskopie elektronowym wynika, że w skład struktur Golgiego wchodzi dwa podstawowe elementy: cysterny i pęcherzyki. Cysterny są spłaszczonymi woreczkami ułożonymi w stos stanowiący centralną część struktur Golgiego, noszącą nazwę diktiosomu. Diktiosom ma kształt soczewkowaty lub dyskowaty i jego średnica zależy od średnicy cystern, a wysokość od ich liczby i grubości.

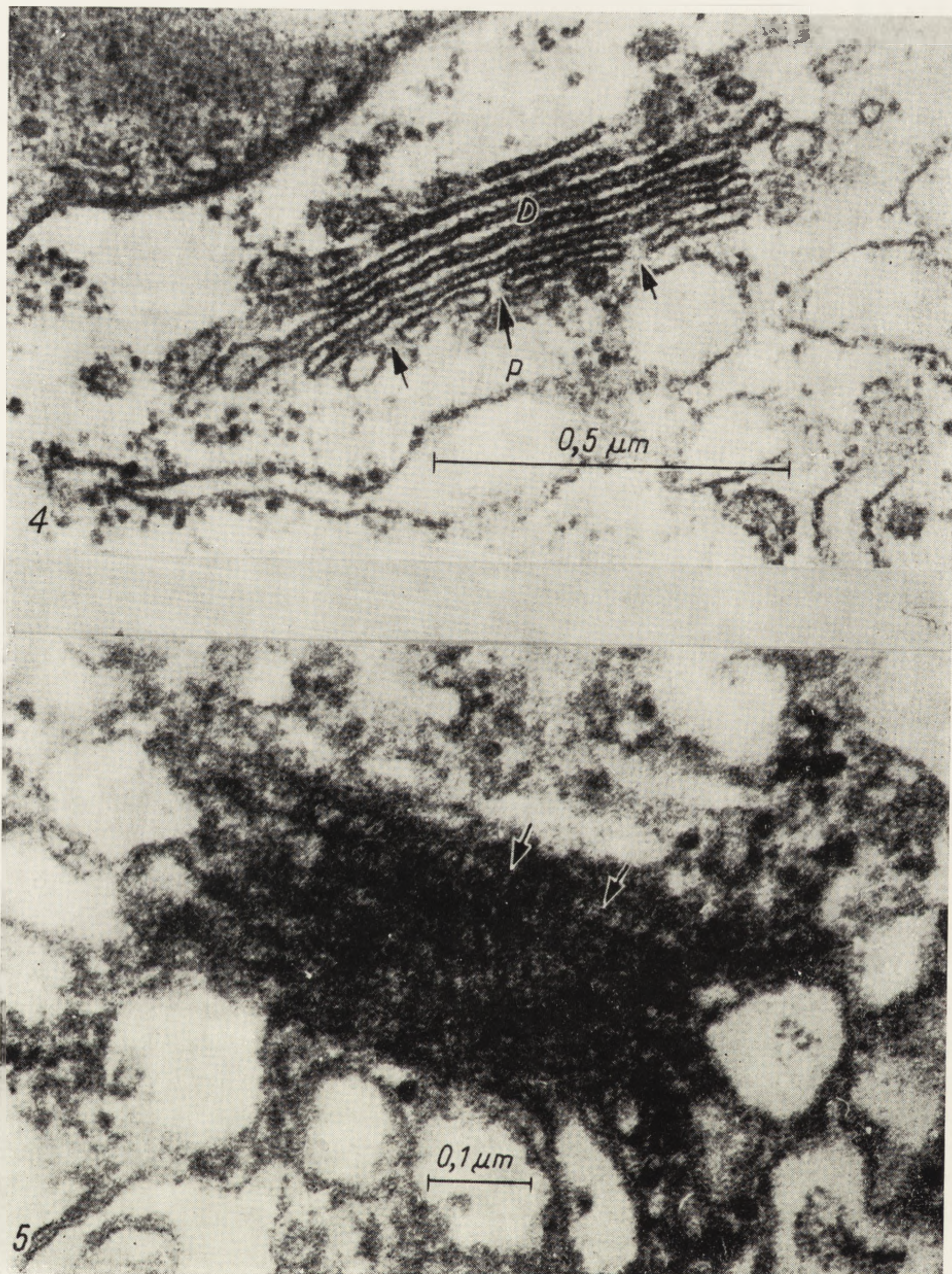
Liczba cystern w diktiosomie waha się od 1 (*Paecilomyces berlinensis* [3]) do 12 cystern (*Dinobryon sertulata* [10]) a nawet 15 (*Ceramium* [13]).

Cysterny są zwykle napęczniałe na brzegach diktiosomu, wskutek czego na przekroju podłużnym mają kształt maczugowaty. Wokół diktiosomu występują pęcherzyki Golgiego połączone z cysternami siecią długich, rozgałęziających się wypustek (rys. 2), widocznych jako system kanalików [14]. Wyróżnić można dwie kategorie pęcherzyków Golgiego: małe, elektronowoptycznie gęste, o średnicy 80–250 nm i duże, bardziej



Rys. 2. *Pinus silvestris*, merystem korzeniowy. M — mitochondria, D — diktiosom, S — ściana komórkowa, V — pęcherzyki Golgiego (46 750 ×)

Rys. 3. *Pinus silvestris*, merystem korzeniowy. ER — retikulum endoplazmatyczne, D — diktiosom (105 000 ×)



Rys. 4. *Pinus silvestris*, merystem korzeniowy, P — pory; D — diktiosom (98 000 ×)
Rys. 5. *Delphinium* sp., tapetum. Pasemka między cysternami (strzałki) (138 380 ×)

przepuszczalne dla elektronów, o średnicy 0,3–1 μm [15]. Duże pęcherzyki Golgiego nazywane są wakuolami Golgiego.

Ponadto, w okolicy diktiosomu niektórzy autorzy [16] zaobserwowali jeszcze jeden rodzaj pęcherzyków o średnicy 85 μm tzw. „coated vesicles”, które według ich opinii powstawać mogą z większych pęcherzyków podczas oddalania się ich od cystern Golgiego.

Z obserwacji mikroskopowo-elektronowych materiału roślinnego wynika, że im bardziej pęcherzyki oddalają się od cystern tym osiągają większe rozmiary.

Powszechnie uważa się, że pęcherzyki Golgiego są wyrazem aktywności diktiosomów, a ich brak charakteryzuje nieaktywne struktury Golgiego.

Diktiosom wykazuje zróżnicowanie na biegun proksymalny zwany niekiedy regenerującym (forming), charakteryzujący się powstawaniem nowych cystern oraz biegun dystalny zwany też wydzielniczym (maturing), gdzie cysterny rozpadają się na pęcherzyki [17, 18, 19]. Czasem poszczególne cysterny mogą pęcznieć w całości i w rezultacie powstaje duża przestrzeń otoczona błoną Golgiego. Taka cysterna opuszczająca diktiosom zastępowana jest nową, i w ten sposób odbywa się przemieszczanie cystern z bieguna proksymalnego do dystalnego. W ten właśnie sposób powstają wodniczki tętniące u glonów [20, 21]. Z badań niektórych autorów [22, 23] wynika, że cysterny diktiosomu mogą być w ścisłym związku z retikulum endoplazmatycznym (rys. 3).

Ponadto wykazano, że w strukturach Golgiego widoczne są pory zawierające granule podobne do tych jakie występują w porach błony jądrowej (rys. 4). Liczba por w cysternie regenerującej jest większa aniżeli dojrzałych cystern bieguna wydzielniczego. Obecność por może być związana z istnieniem biegunowego przenoszenia makrocząsteczek koniecznych do dojrzewania zawartości cystern [24].

Pomiędzy cysternami, a także w ich wnętrzu, występują krótkie, cienkie, gęste elektronowo fibrylarne pasma łączące sąsiednie cysterny (rys. 5). Uważa się, że struktury te są odpowiedzialne za ułożenie i przyleganie cystern wewnątrz diktiosomu [25].

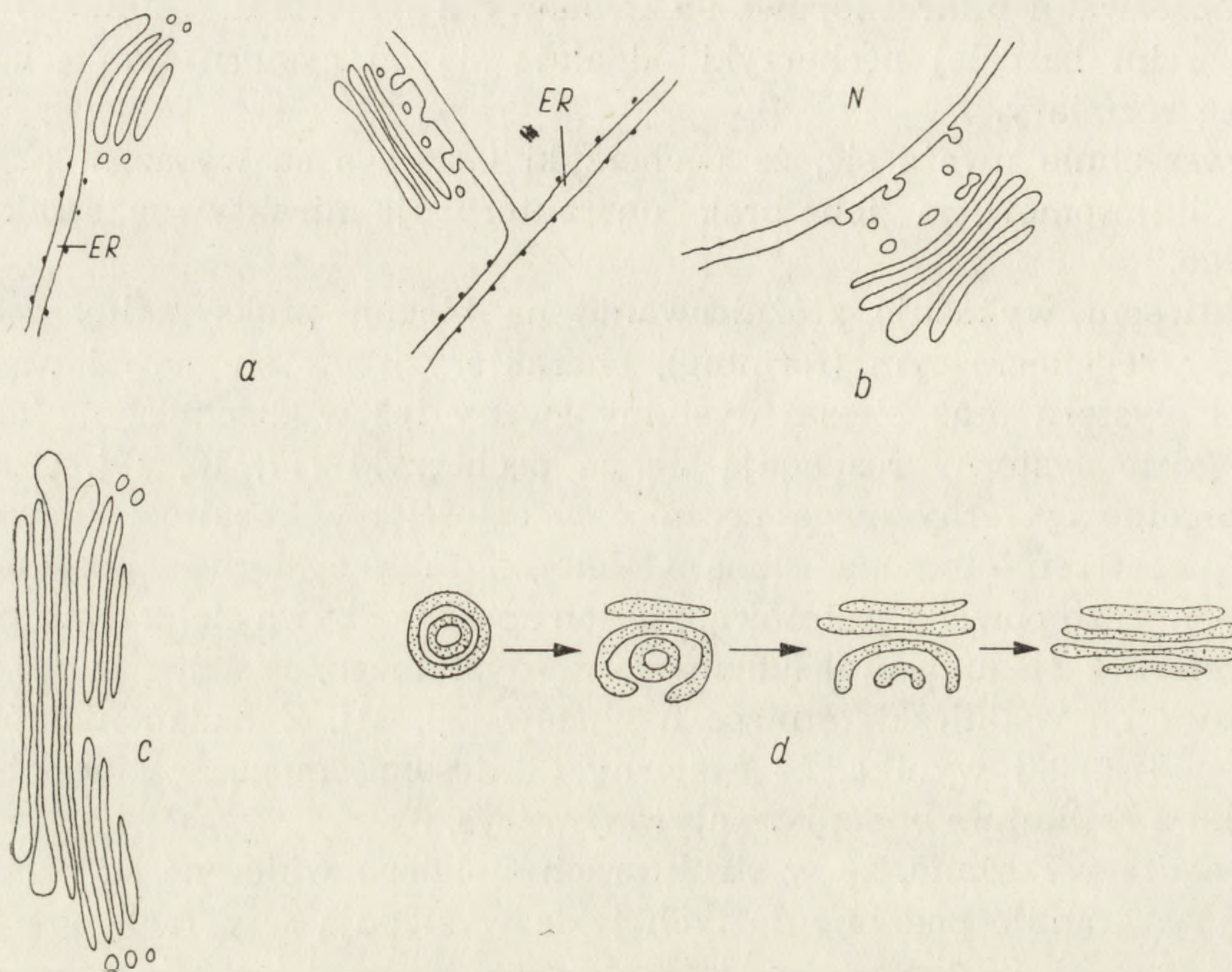
Ponadto, między kolejnymi cysternami diktiosomu zaobserwować można pasma składające się z rzędu pałeczek, których średnica wynosi 2,5 nm. Zachodzą przypuszczenia, że są to mikrotubule [26, 27].

ONTOGENEZA

Panuje powszechnie pogląd, że struktury Golgiego powstawać mogą z udziałem retikulum endoplazmatycznego [28, 19] lub z błony jądrowej [29, 30]. W obu przypadkach cysterny Golgiego powstają w wyniku fuzji

pęcherzyków odsznurowujących się z gładkiego retikulum endoplazmatycznego lub też z zewnętrznej błony otoczki jądrowej (rys. 6 a b, 7).

Tworzenie cystern zachodzić musi niesłychanie szybko; wykazano mianowicie, że w aktywnym diktiosomie, mimo wydzielania z jego struktur co 30 sek. jednego pęcherzyka, liczba cystern nie ulega redukcji [20].



Rys. 6. Schemat powstawania struktur Golgiego

W trakcie przemieszczania się cystern z miejsca tworzenia do bieguna wydzielniczego zachodzi proces ich dojrzewania. W tym właśnie okresie następuje gromadzenie się substancji PAS pozytywnych wewnątrz kanałów retikulum endoplazmatycznego lub wewnątrz otoczki jądrowej [24].

Z badań przeprowadzonych na glonach wynika, że przynajmniej część pęcherzyków na terenie bieguna proksymalnego pochodzi z błony jądrowej [30, 31]. Natomiast, na podstawie obserwacji niektórych przedstawicieli krasnorostów uważa się, że struktury Golgiego mogą powstawać z udziałem retikulum endoplazmatycznego i otoczki jądrowej równocześnie [18].

Panuje także pogląd, w myśl którego struktury Golgiego powstają przez podział istniejących organelli [22, 15]. W pierwszym etapie cysterny Golgiego wydłużają się, a następnie dzielą poprzecznie (rys. 6 c).

W trakcie mikrosporogenezy u *Tradescantia paludosa* pojawiają się

pierścieniowate struktury, które w miarę trwania mikrosporogenezy otwierają się, zwiększając równocześnie liczbę cystern [6]. W ten właśnie sposób powstają struktury Golgiego, a koliste formy stanowią ich młodocianą postać (rys. 6 d). Podobne struktury koliste przekształcające się w cysterny Golgiego wskutek pęknięcia leżących obok siebie błon opisywane były przez innych badaczy [32].

W przeciwieństwie do przytoczonych poglądów, struktury Golgiego u *Acetabularia* powstawać mogą z pozbawionych błon ciał tworzących się prawdopodobnie wewnątrz jądra [33]. Badania prowadzone na bezjądrowych fragmentach komórek *Acetabularia* zdają się świadczyć, że tworzenie struktur Golgiego jest regulowane przez DNA jądrowy, ponieważ w przypadku zablokowania aktywności genetycznej DNA nie tworzą się ani wspomniane ciała, ani też struktury Golgiego. Z badań tych wynika ponadto, że zaciemnienie glonu powodujące spadek zawartości rybonukleoproteidów hamuje tworzenie tych ciał i prowadzi do powstania nieaktywnych diktiosomów.

Brak światła wydaje się być ponadto czynnikiem redukującym liczbę struktur Golgiego u *Euglena gracilis* [34].

SKŁAD CHEMICZNY

Wiadomo powszechnie, że struktury Golgiego zawierają białka i lipidy będące składnikiem konstytucyjnym ich błon. Podczas gdy badania prowadzone na izolowanych strukturach Golgiego dotyczą wyłącznie ich budowy [35] bądź metod otrzymywania nie zmienionych morfologicznie poszczególnych elementów struktur Golgiego [36], to ustalenie ich składu chemicznego in situ ze względu na obecność w komórkach roślinnych fosforanów nieorganicznych i organicznych wyczerniających się metodami siarczkowymi stosowanymi do wykrywania enzymów napotyka poważne trudności.

Mimo tych trudności udało się wykazać za pomocą mikroskopu świetlnego, że struktury Golgiego zawierają fosfatazy: kwaśną i zasadową oraz pirofosfatazę tiaminową [37, 38]. Zastosowanie metod cytochemicznych do badań w mikroskopie elektronowym pozwoliło zlokalizować występujące w strukturach Golgiego enzymy na peryferiach cystern, a niekiedy i w całych cysternach lub w pęcherzykach Golgiego [39, 40, 41].

Oprócz kwaśnej i zasadowej fosfatazy oraz pirofosfatazy tiaminowej wykazano ponadto na terenie struktur Golgiego komórek merystemu korzeniowego *Cucumis sativus* obecność różnych nukleozydodwufosfataz w optymalnym pH 7,0, jak np. adenzynodwufosfatazy i inozynodwufosfatazy [39]. Poux [42, 43] zlokalizowała w tych komórkach również peroksydazę, występującą na terenie diktiosomów.

Zaar i Schnepf [44] zwrócili uwagę na biegunową lokalizację enzymów na terenie diktiosomu. I tak np. nukleozydodwufosfataza wykryta w strukturach Golgiego włósników korzenia *Lepidium sativum* zlokalizowana jest, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, na biegunie wydzielniczym, natomiast biegun regenerujący nie ma tego enzymu.

Modyfikacja metody PAS pozwoliła wykazać obecność polisacharydów w pęcherzykach Golgiego oraz na terenie cystern [45]. Z badań autoradiograficznych w mikroskopie elektronowym wynika ponadto, że D-glukoza-1-³H lub D-glukoza-6-³H włącza się wybiórczo po krótkim czasie inkubacji do pęcherzyków Golgiego [46].

Szczególnie dogodnym materiałem do badań składu chemicznego wydają się być struktury Golgiego grzybni i zarodników *Paecilomyces berliensis*. Jedyna cysterna stanowiąca diktiosom wykazuje obecność polisacharydów, białek z grupami S-S oraz enzymów — fosfatazy kwaśnej i pirofosfatazy tiaminowej. Podczas gdy białka, polisacharydy i fosfataza kwaśna obecne są w rozszerzonych zakończeniach cysterny, to pirofosfataza tiaminowa zlokalizowana jest na powierzchni tej jedynej cysterny, rzadko zaś w pęcherzykach otaczających diktiosom [3].

FUNKCJA

Rola struktur Golgiego w komórce roślinnej jest różnorodna i zależy od gatunku rośliny, stadium różnicowania i specjalizacji funkcjonalnej komórek w danym organizmie. Ogólnie można przyjąć, iż pełnią one funkcję wydzielniczą, przy czym produktem wydzielanym jest woda, a najczęściej polisacharydy, względnie inne związki chemiczne wchodzące w skład ściany komórkowej.

W komórkach autospor jednokomórkowych glonów *Glaucocystis* i *Vacuolaria virens* cysterny diktiosomu przekształcone w wodniczki tętniące pełnią funkcje organelli regulujących zawartość wody w komórce [20, 21]. Zawartość wakuoli o średnicy 0,8 μm wylewa się co 75 sek. drogą egzocytozy, a błona wodniczki łączy się z błoną komórkową. Z obliczeń Schnepfa i Kocha [21] wynika, że tą drogą struktury Golgiego dostarczają w ciągu 1 godz. błonę do rozbudowującej się plazmalemy w ilości sześciokrotnie przekraczającej powierzchnię komórki *Vacuolaria*. Ponieważ komórki tych glonów drogą pinocytozy pobierają wodę, można więc przyjąć, że taka sama ilość błony komórkowej bierze udział w tworzeniu wakuol pinocytozowych [24].

Z badań nad glonami wynika, że istnieje ścisły związek między położeniem diktiosomów i miejscem tworzenia ściany komórkowej (*Chlorella vulgaris* [47]). Ponadto Brown [48] wykazał, że składniki ściany u *Pleurochrysis* są syntetyzowane wewnątrz cystern Golgiego w postaci płytek.

Te cienkie płytki wydalone z komórek drogą egzocytozy wtapiane są następnie w bezpostaciową substancję ściany komórkowej. Płytki te zawierają celulozę [49].

Struktury Golgiego u *Navicula pelliculosa* brałyby natomiast udział w dostarczaniu krzemionki dla ściany komórkowej, przenosząc spolimeryzowaną krzemionkę w mikropęcherzykach, jak również uczestniczyłyby w tworzeniu silikolemmy [31].

Dobberstein i Kiermayer [50] uważają, że struktury Golgiego u *Micrasterias denticulata* produkują rodzaj dyskowatych pęcherzyków pojawiających się w trakcie tworzenia ściany wtórnej a przenoszących globularne cząstki o średnicy 25 nm do miejsca syntezy celulozowych mikrofibryli, dostarczając jednocześnie błony do rozbudowy plazmalemmy.

Podobnie wydaje się, że aparat Golgiego bierze udział w tworzeniu ściany komórkowej, zakładającej się centrypetalnie (dośrodkowo) u nitkowatych glonów jak *Spirogyra* czy *Cladophora* oraz w rozbudowie plazmalemmy [51, 4].

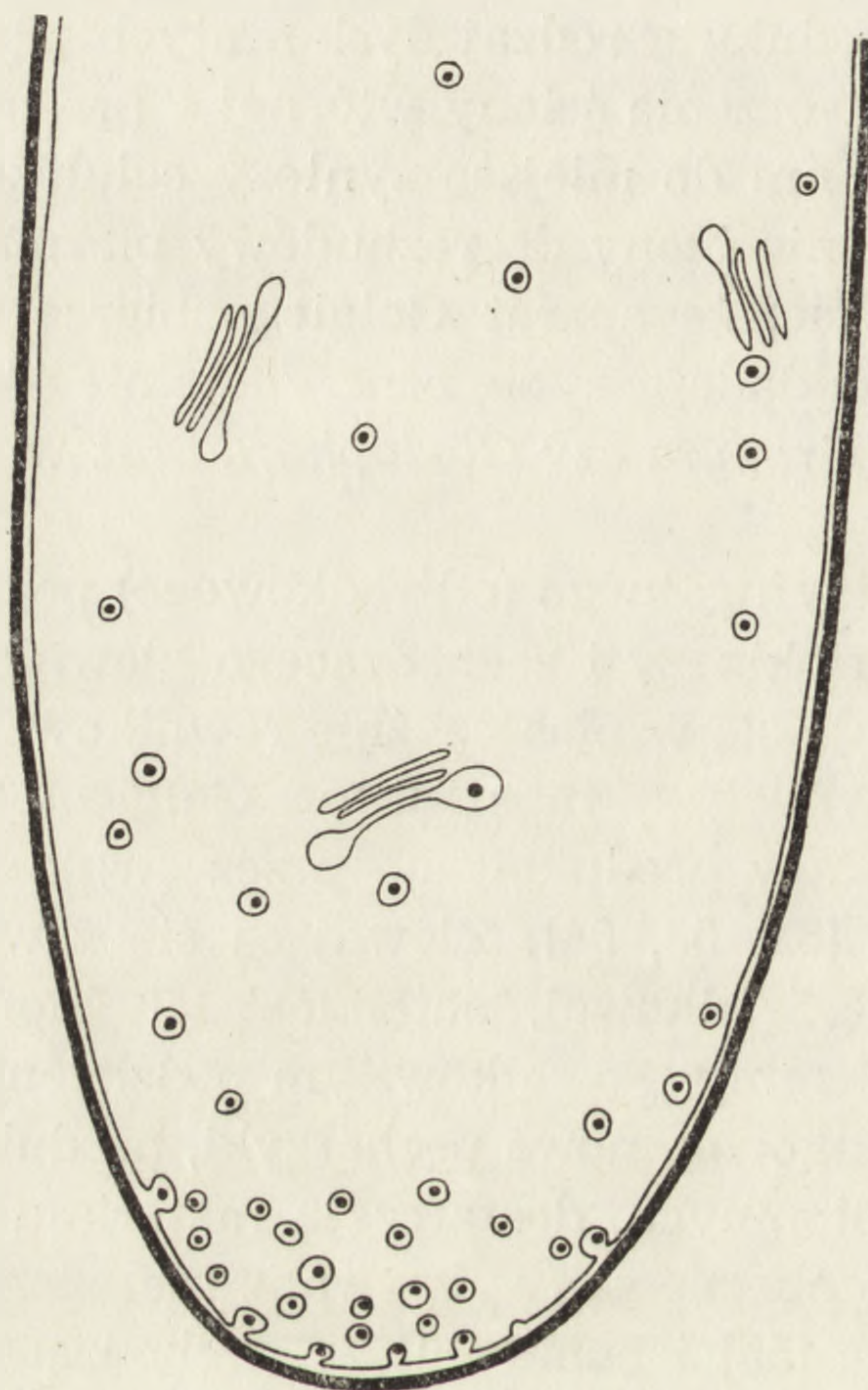
W przypadku centryfugalnego (odśrodkowego) podziału będącego zawsze konsekwencją kariokinezy i zachodzącego głównie w komórkach roślin wyższych obserwuje się w płaszczyźnie równikowej fragmoplastu duże nagromadzenie aktywnych form struktur Golgiego. Pęcherzyki submikroskopowych wymiarów produkowane przez struktury Golgiego tworzą przegrodę pierwotną [52, 53, 54]. Zlewająca się zawartość pęcherzyków daje początek blaszce środkowej, natomiast ich błona wcielana jest do tworzącej się plazmalemmy. Po całkowitym podzieleniu cytoplazmy i wytworzeniu blaszki środkowej, nowe pęcherzyki, produkowane przez aparat Golgiego komórek potomnych, dostarczają materiału dla ścian komórkowych. W tym okresie obecne są (wykrywane metodami cytochemicznymi) substancje pektynowe [55] i hemicelulozy, wchodzące w skład substancji podstawowej ściany. W dalszym okresie rozbudowy, ściana pierwotna wzbogacana jest w fibryle celulozowe przy współudziale plazmalemmy [24].

Proces produkcji polisacharydów i ich wbudowywanie do tworzącej się ściany zachodzić musi bardzo szybko skoro, jak wynika z obliczeń kinetyki sekrecji, pęcherzyki Golgiego potrzebują około 2,5 min. dla przebycia drogi od diktiosomu do miejsca wydalenia zawartości na powierzchni komórki [56]. Dodatkowym argumentem przemawiającym za znacznym tempem tego jest fakt podwajania powierzchni komórek skórki korzenia pszenicy w ciągu 8 godz., a epidermy koleoptylu owsa tylko w 30 min. [24].

Strukturom Golgiego przypisuje się udział w tworzeniu ścian komórek różnicujących się, jak np. komórki drewna [57, 58]. Produkt aparatu Golgiego w postaci fibrylarnego materiału [59] wcielany jest do ściany komórkowej, a błona pęcherzyków Golgiego — do plazmalemmy. Z badań

Pickett-Heapsa [60] wynika, że prekursor ligniny — kwas cynamonowy włącza się intensywnie początkowo do struktur Golgiego, a dopiero później widoczny jest w ścianie komórek drewna.

W komórkach charakteryzujących się wzrostem szczytowym, jak strzępki grzyba [28], łagiewka pyłkowa [61] czy włósniki korzeniowe [11, 62, 63], wzrost ściany poprzedzony jest zawsze pojawianiem się dużej ilości pęcherzyków Golgiego w strefie wzrostu (rys. 8). Zawartość tych

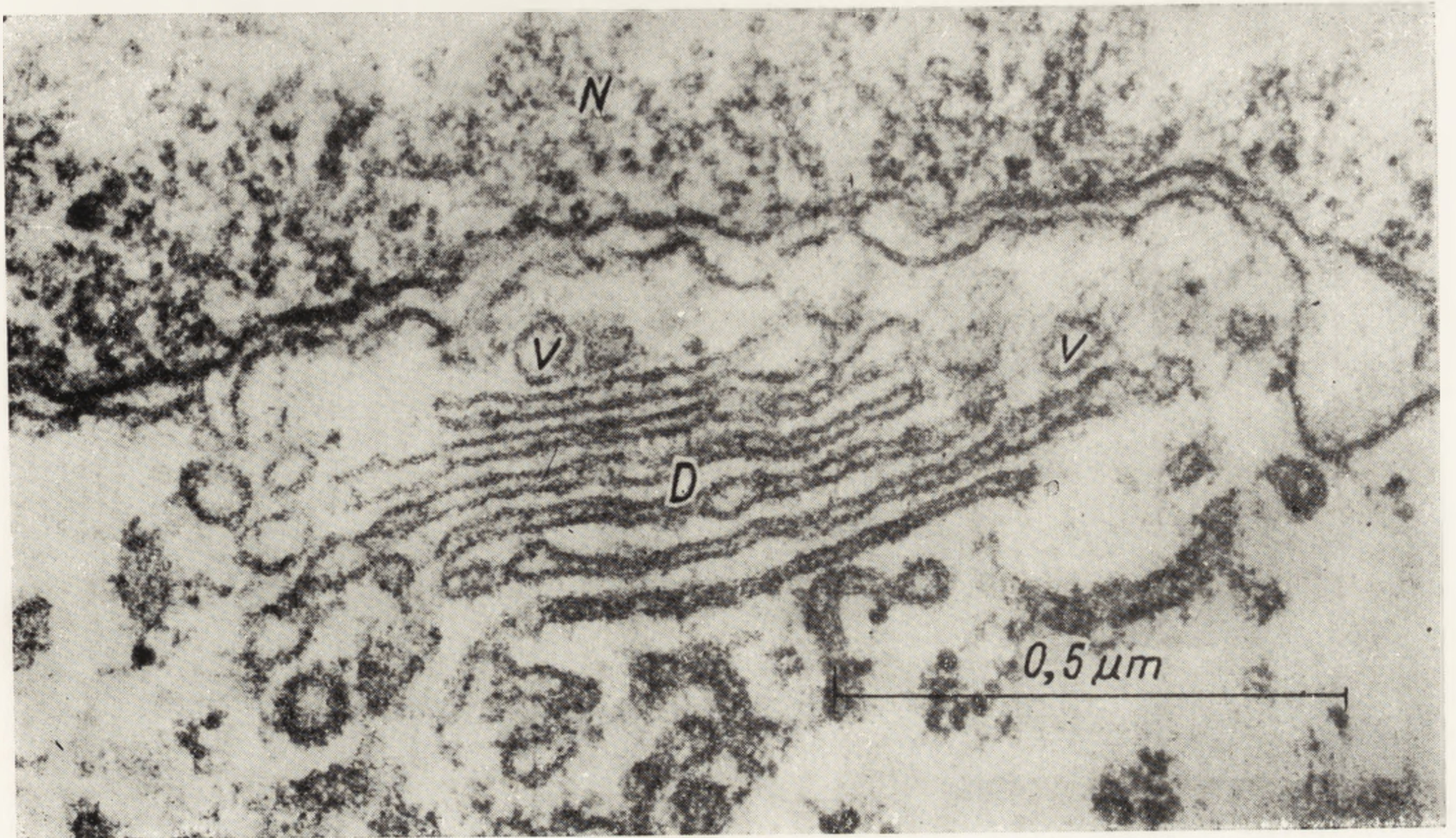


Rys. 8. Schemat funkcjonowania struktur Golgiego w rosnącym włóśniku (wg Sievers [63])

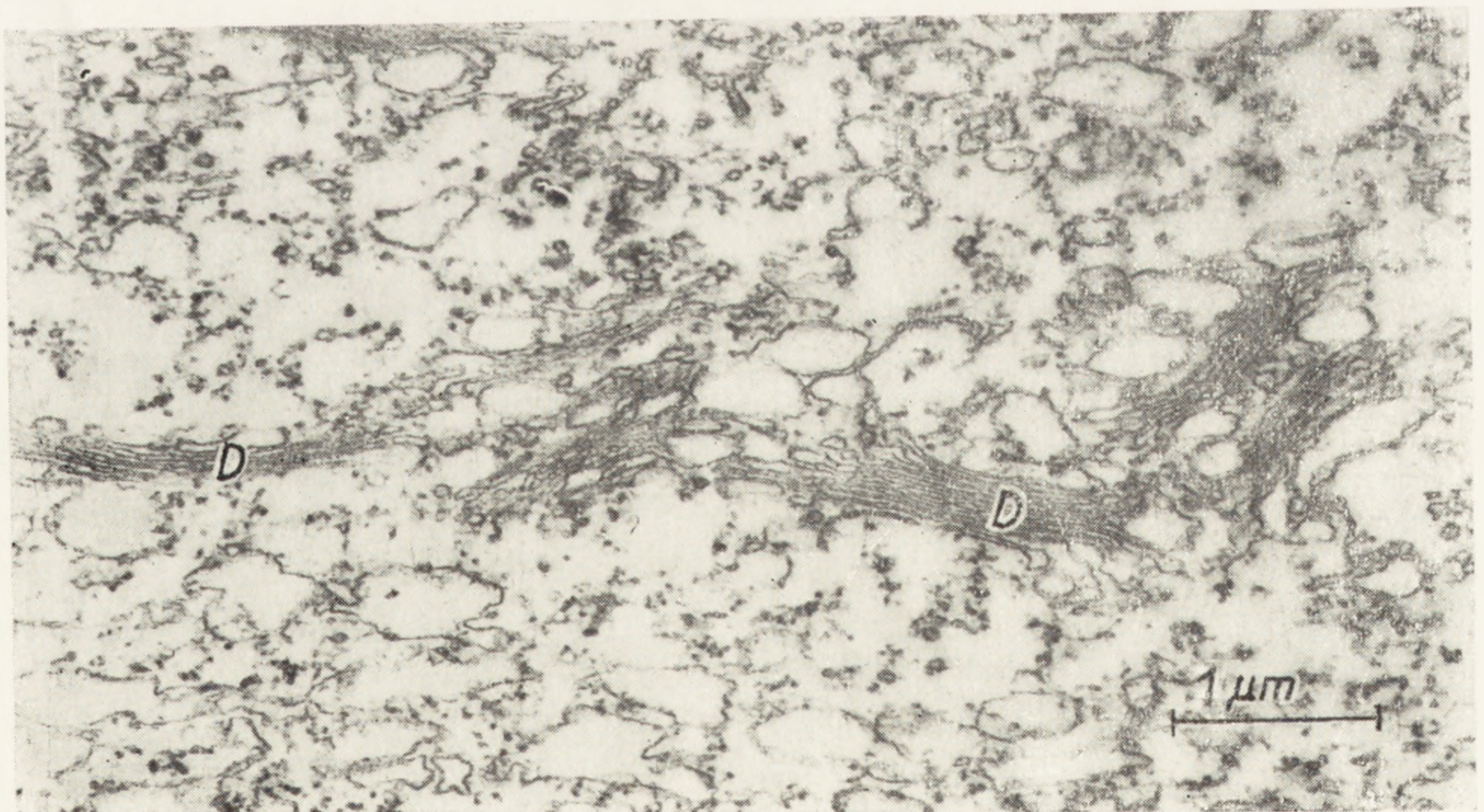
pęcherzyków wcielana jest następnie do rozbudowującej się ściany, a ich błona do plazmalemy [11, 61]. W miejscu gromadzenia się pęcherzyków nie obserwuje się nigdy całych diktiosomów, które występują w znacznej ilości dopiero poniżej strefy wzrostu.

Trawienie pektynazą usuwa zawartość pęcherzyków Golgiego, jak również materiał ściany łagiewki pyłkowej [61]. Ponadto, jeżeli podać mioinozytol-³H będący prekursorem pektyn i metioninę metylo-³H jako dawcę grupy metylowej, do łagiewek pyłkowych to zawsze znakowane są najpierw pęcherzyki Golgiego, a radioaktywność w miejscu wzrostu ściany wykrywalna jest nieco później [61].

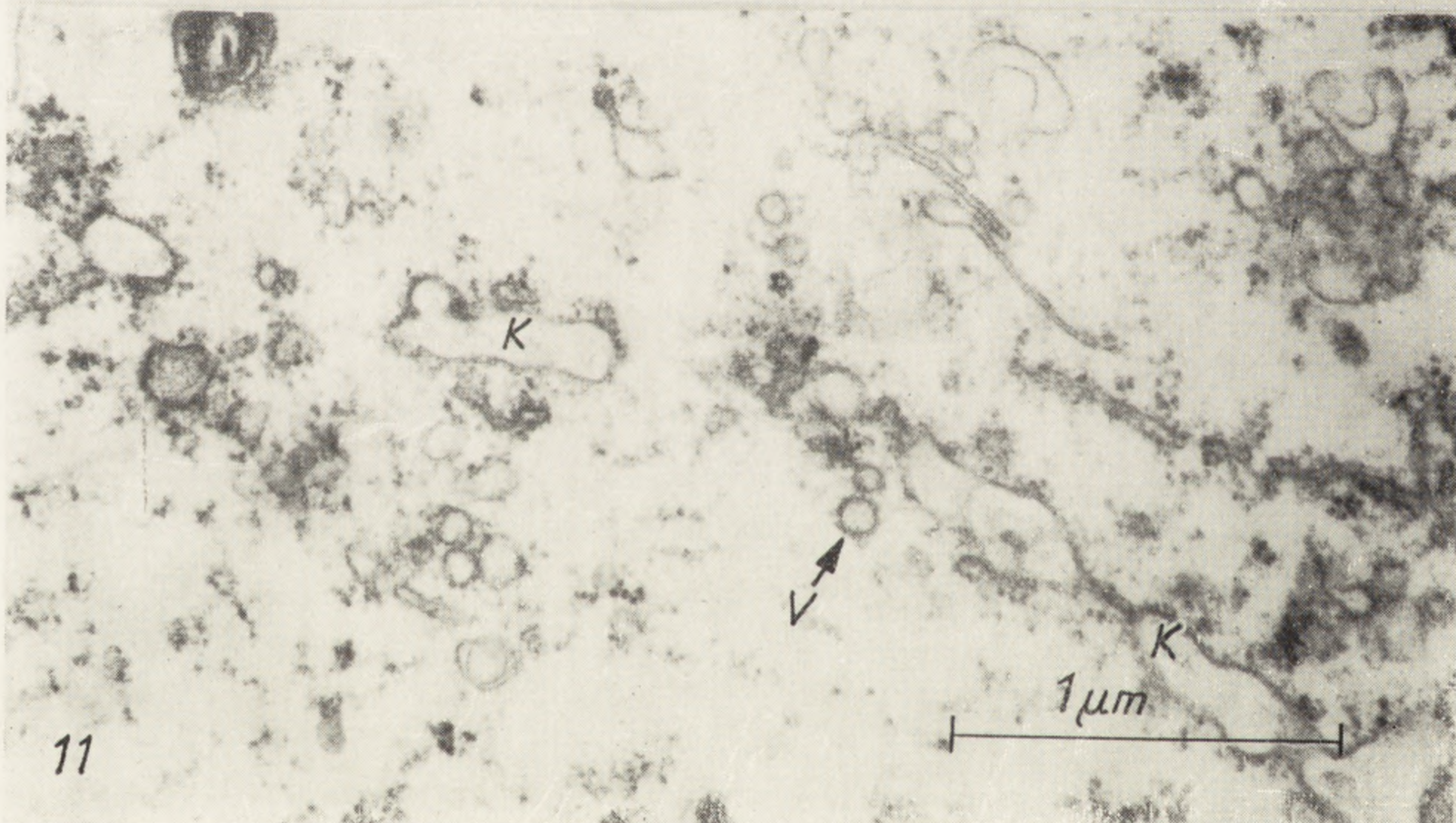
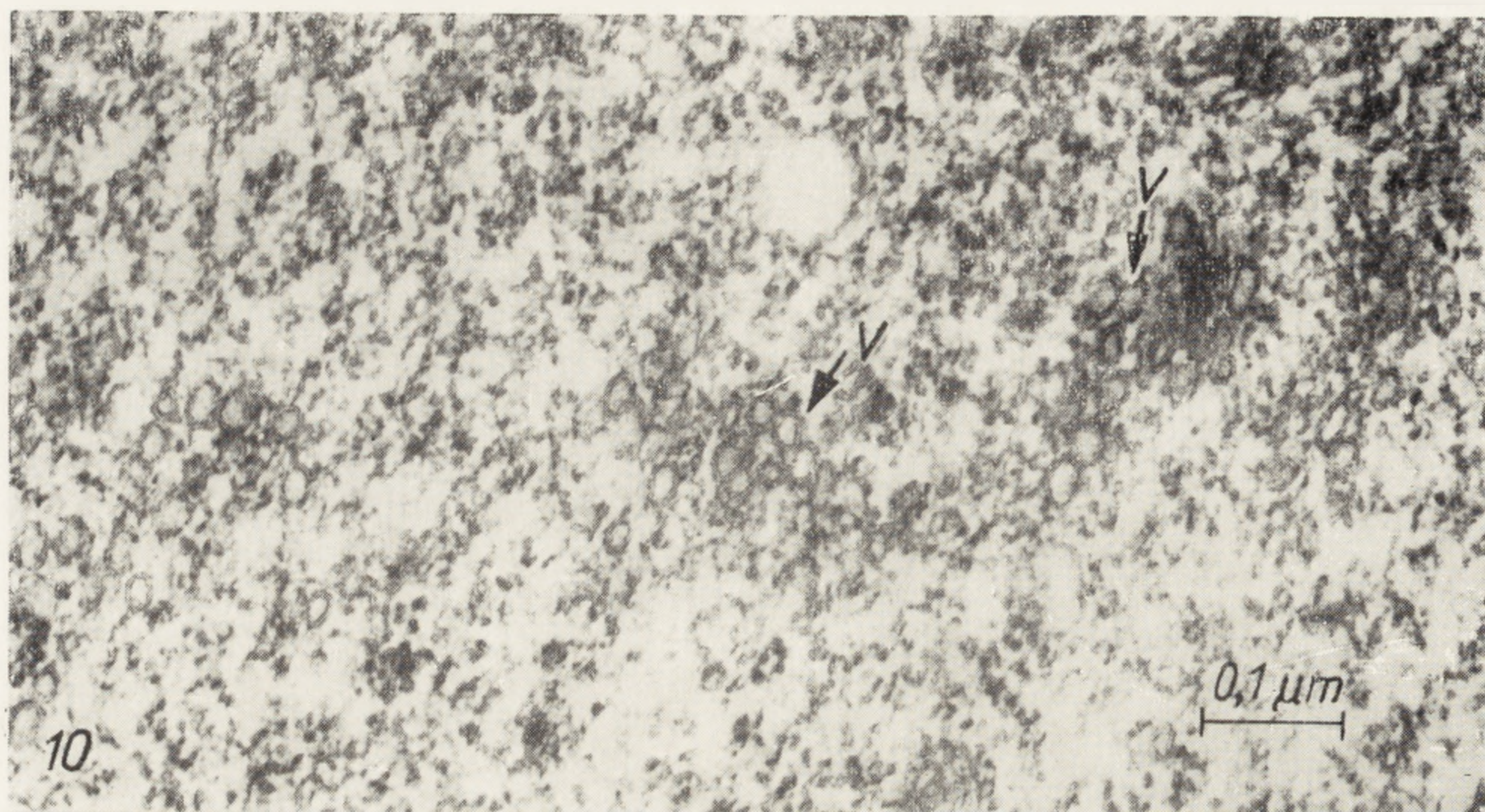
Z badań Olszewskiej i Gabara [64] wynika, że apikalne części włósników, zawierające duże ilości struktur Golgiego i wykazujące obecność



Rys. 7. *Pinus silvestris*, merystem korzeniowy. N — jądro, D — diktiosom, V — pęcherzyki Golgiego (94 500 ×)

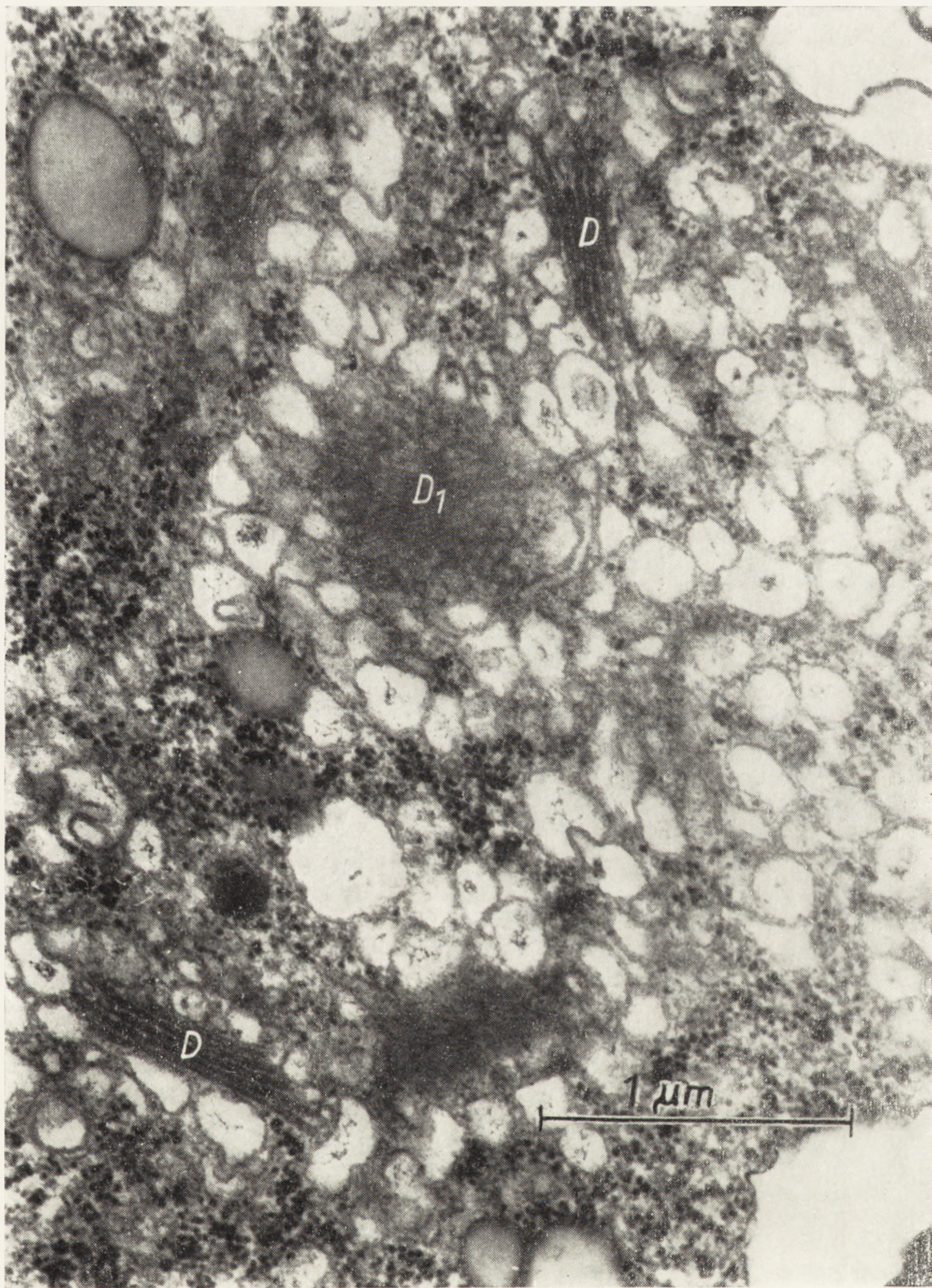


Rys. 9. *Larix* sp., komórka macierzysta pyłku. D — diktiosom (17 850 ×) (Mikulska, niepubl., dzięki uprzejmości autorki)

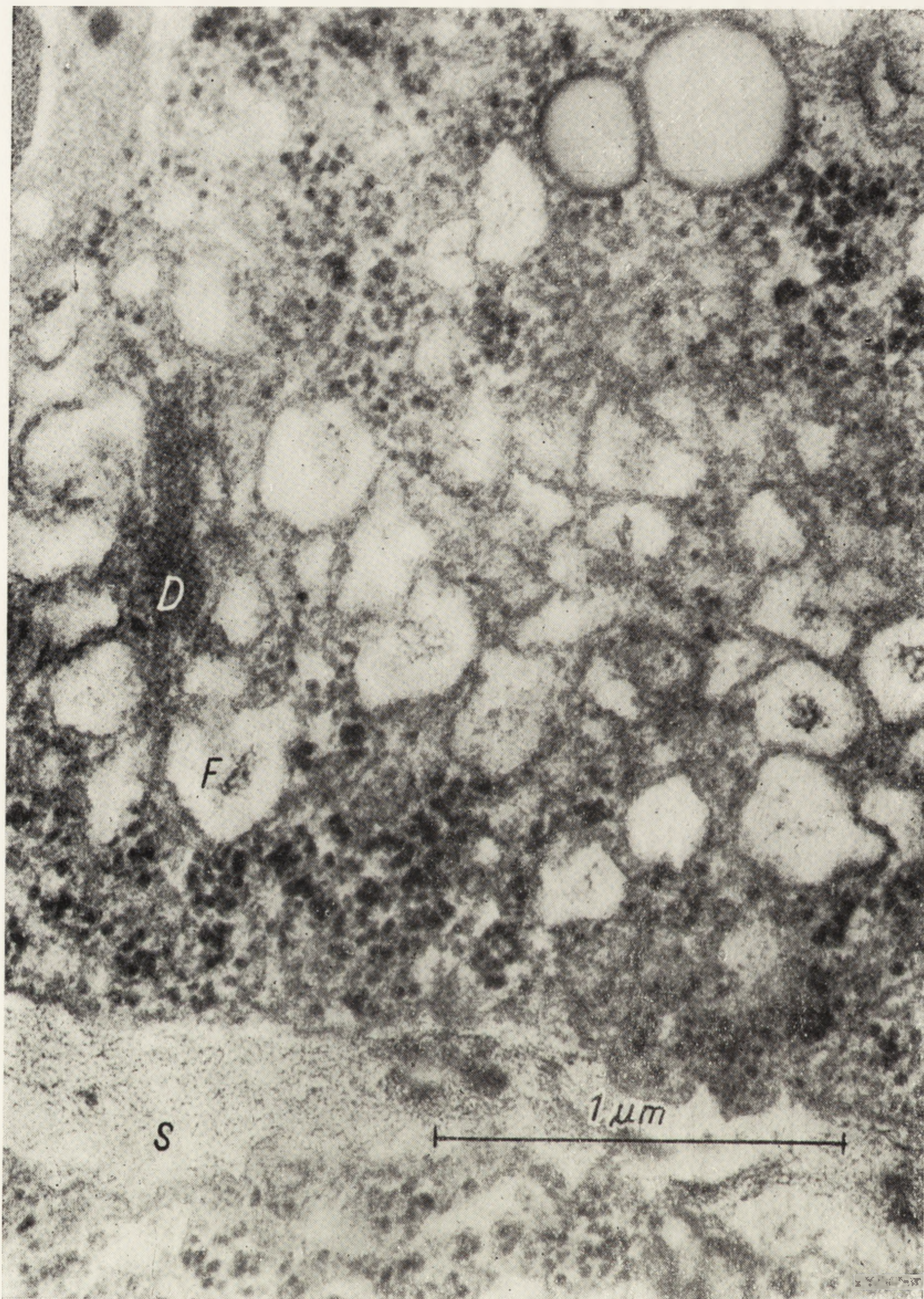


Rys. 10. *Magnolia soulangeana* Soul., komórka macierzysta pyłku. V — pęcherzyki Golgiego (105 000 ×)

Rys. 11. *Berberis* sp., komórka macierzysta pyłku. V — pęcherzyki Golgiego, K — kalozowe zaczątki ściany (33 660 ×)



Rys. 12. *Delphinium* sp., tapetum. D — diktyosom (przekrój poprzeczny), D₁ — diktyosom (przekrój skośny) (37 500 ×)



Rys. 13. *Delphinium* sp., tapetum. D — diktiosom, F — materiał fibrylarny, S — ściana komórkowa (47 150 ×)

glikozydaz i polisacharydów uronowych, bardzo intensywnie włączają D-glukozę- ^3H , przy czym największe nasilenie radioaktywności znajduje się w obszarze zajęтым przez same pęcherzyki oraz na terenie ściany komórkowej. Przytoczone dane wskazują, że w pęcherzykach Golgiego zachodzi polimeryzacja substancji pektynowych i hemiceluloz uronowych, a także metylacja pektyn.

Ponadto Bonnett i Newcomb [16] sugerują, że „coated vesicles” wchodzące w skład struktur Golgiego włósnika rzodkiewki, przez analogię do wyników uzyskanych na materiale zwierzęcym, mogłyby brać udział w segregacji i transporcie białek w komórce. Przypuszczenia te jednak nie są poparte badaniami cytochemicznymi.

Strukturom Golgiego przypisuje się udział w tworzeniu ściany kalozowej powstającej w procesie mikrosporogenezy [65]. Zarówno w trakcie I i II podziału mejotycznego w przypadku cytokinezy sukcesywnej i wyłącznie w okresie II podziału komórek, charakteryzujących się podziałem jednoczesnym, obserwuje się nagromadzenie dużej ilości diktiosomów (rys. 9) w okolicy tworzenia się ściany komórkowej ([65]; Gabara, nie publ.). Pęcherzyki Golgiego, submikroskopowych wymiarów, wydzielane w dużej ilości (rys. 10) i gromadzące się w płaszczyźnie równikowej podziału komórki zlewając się tworzą ciągłą warstwę kalozową (rys. 11), a ich błona wciela się prawdopodobnie do plazmalemy. Udział struktur Golgiego w tworzeniu kalozy sugeruje także Eschrich [66] uważając, że niektóre pęcherzyki Golgiego zawierają fosforylowane prekursorzy kalozy wydzielane w okresie tworzenia ściany. O udziale struktur Golgiego w produkcji kalozy świadczyć mogłoby ponadto silne znakowanie ściany kalozowej u *Magnolia* po podaniu D-glukozy- $1-^3\text{H}$, (Gabara, nie publ.), przy czym wewnątrzkomórkowa lokalizacja izotopu radioaktywnego odpowiada lokalizacji aktywnych struktur Golgiego [65]. Godny podkreślenia wydaje się fakt, że jedynie pokłady kalozy wytworzone w czasie podawania prekursora radioaktywnego są wyznakowane, co świadczyć mogłoby o tworzeniu się ściany kalozowej drogą apozycji (nakładania).

Podobnie, pojawienie się dużej ilości hipertroficzných form struktur Golgiego w komórkach tapetum — tkance odżywczej dla komórek macierzystych pyłku — zdaje się wskazywać na wydzielniczą funkcję tych organellów komórkowych (rys. 12), a obecność materiału fibrylarnego w pęcherzykach Golgiego podobnego strukturalnie do materiału ściany komórkowej (rys. 13) świadczyć może o udziale struktur Golgiego komórek tapetum w budowie ściany. Być może, że w ten sposób syntetyzowana jest sporopollenina, która jak się wydaje powstaje z udziałem komórek tapetum [67].

Ponadto dyskutowany jest udział struktur Golgiego w tworzeniu intyny [68].

O udziale struktur Golgiego w budowie ściany komórek roślinnych

świadczyć może pośrednio fakt, że inhibitory wzrostu, np. D-galaktoza, hamują tworzenie przegrody pierwotnej i ściany komórkowej oraz powodują wyraźne zmiany w morfologii diktiosomów. Diktiosomy stają się nieaktywne, a pęcherzyki Golgiego, wcielające się do ściany w materiale kontrolnym, nie wędrują pod wpływem D-galaktozy do przegrody pierwotnej. D-galaktoza hamuje syntezę hemiceluloz lub pektyn, a ponadto rozbudowę plazmalemmy [69].

Do niedawna panował powszechnie pogląd, że aparat Golgiego jest odpowiedzialny za dostarczanie prekursorów bezpostaciowej substancji ściany, przede wszystkim kwaśnych polisacharydów, natomiast synteza celulozy, krzemionki czy kalozy odbywa się wyłącznie przy współudziale retikulum endoplazmatycznego i plazmalemmy [70].

Z wielu przytoczonych prac wynika jednak, że struktury Golgiego zdolne są również do syntezy wszelkich substancji ścian komórkowych wydzielanych przez pęcherzyki Golgiego do miejsca powstawania ściany w formie gotowego materiału. Z tego też względu Frey-Wyssling [24] wysuwa wniosek o identyczności struktur Golgiego i plazmalemmy.

Struktury Golgiego biorą ponadto udział w wytwarzaniu śluzów, które wydzielane są na zewnątrz komórek jako substancja ochronna takich organów, jak korzeń [71, 72] bądź też u roślin owadożernych — *Drosera* czy *Pinguicula* — gdzie pełnią funkcje w wabienu i przyklejaniu owadów [56, 73, 74]. Wydzielanie śluzów jest tak obfite, że możliwe było ustalenie metodą chromatografii składu chemicznego związków produkowanych przez aparat Golgiego komórek czapeczki *Zea mays* (tab. 1). Z danych przedstawionych w tej tabeli wynika, że śluzy wydzielane przez aparat Golgiego zawierają najwięcej glukozy i galaktozy oraz kwasu galakturonowego [72]. Ponadto, udało się wykazać, że struktury Golgiego komórek produkujących śluzy wybiórczo włączają D-glukozę-1-³H i D-glukozę-6-³H [46, 54].

TABELA 1. Skład chemiczny polisacharydów wydzielanych z komórek czapeczki *Zea mays* [72]

Składnik	mg/100 mg
Kwas galakturonowy	12
Galaktoza	39
Glukoza	22
Mannoza	6
Fukoza	8
Ramnoza	1
Arabinoza	7
Ksyloza	5

Z przeprowadzonych danych wynika, że rola struktur Golgiego w komórce roślinnej jest różnorodna i polega na regulacji zawartości wody w komórkach niektórych jednokomórkowych glonów, syntezie i wydzielaniu substancji wchodzących w skład blaszki środkowej (kwaśnych polisacharydów) i ściany komórkowej (kwaśnych polisacharydów, krzemionki, ligniny, kalozy i ewentualnie celulozy) oraz na budowie i rozbudowie plazmalemmy. Ponadto, struktury Golgiego produkują śluzy pełniące rolę ochronną niektórych organów roślin, a także biorą udział w wabieniu i przyklejaniu owadów u roślin owadożernych.

LITERATURA

- [1] WHALEY W. G., KEPHART J. E., MOLLENHAUER H. H., 1959 — Developmental changes in the Golgi-apparatus of maize root cells, *Amer. J. Bot.*, **46**: 743–751.
- [2] BERKALOFF C., 1966 — Observations sur l'organisation infrastructurale d'une Volvocale, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**: 1232–1234.
- [3] GYÖRGY-MIKLOS O., 1973 — Activités enzymatiques et infrastructure du dictyosome simple, *C. R. Acad. Sci.*, **276**: 2261–2263.
- [4] FOWKE L. C., PICKETT-HEAPS J. D., 1969 — Cell division in *Spirogyra*. II. Cytokinesis, *J. Phycol.*, **5**: 273–281.
- [5] VÖLKER H., HALBSGUTH W., 1966 — Zur Feinstruktur der Rhizoidinitialen bei den Brutkörpern von *Marchantia polymorpha* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, **55**: 158–164.
- [6] MARUYAMA K., 1965 — Cyclic changes of the Golgi body during microsporogenesis in *Tradescantia paludosa*, *Cytologia*, **30**: 354–374.
- [7] EVANS L. V., SIMPSON M., CALLOW M. E., 1973 — Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae, *Planta*, **110**: 237–252.
- [8] DRAWERT H., MIX M., 1962 — Zur Funktion des Golgi-Apparates in der Pflanzenzelle, *Planta*, **58**: 448–452.
- [9] DARLEY W. M., PORTER D., FULLER M. S., 1973 — Cell wall composition and synthesis via Golgi directed scale formation in the marine Eucaryote, *Schizochytrium aggregatum* with a note on *Thraustochytrium* sp. *Arch. Mikrobiol.*, **90**: 89–106.
- [10] FRANKE W. W., HERTH W., 1973 — Cell and lorica fine structure of the Chrysomonad alga *Dinobryon sertularia* Ehr. (*Chrysophyceae*), *Arch. Mikrobiol.*, **91**: 323–344.
- [11] SIEVERS A., 1965 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen am geotropische Reaktion. I. Über Besonderheiten im Feibau der Rhizoide von *Chara foetida*, *Z. Pflanzenphysiol*, **53**: 193–255.
- [12] VON AMELUNXEN F., 1964 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Drüsenhaaren von *Mentha piperita* L., *Planta Medica*, **12**: 121–139.
- [13] CHAMBERLAIN A. H. L., EVANS L. V., 1973 — Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*, *Protoplasma*, **76**: 139–159.
- [14] MOLLENHAUER H. H., MORRÉ D. J., 1966 — Tubular connections between dictyosomes and forming secretory vesicles in plant Golgi apparatus, *J. Cell. Biol.*, **29**: 373–376.
- [15] KIERMAYER O., 1970 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Prob-

- lem der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* Bréb. I. Allgemeiner Überblick, *Protoplasma*, **69**: 97–132.
- [16] BONNETT H. T., NEWCOMB E. H., 1966 — Coated vesicles and other cytoplasmic components of growing root hairs of radish, *Protoplasma*, **62**: 59–75.
- [17] GRASSÉ P. P., 1957 — Ultrastructure, polarité et reproduction de l'appareil de Golgi, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **245**: 1278–1281.
- [18] BOUCK G. B., 1965 — Fine structure and organelle association in brown algae, *J. Cell. Biol.*, **26**: 523–537.
- [19] AMELUNXEN F., GRONAU G., 1966 — Über die Polarität der Dictyosomen von *Acorus calamus* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, **55**: 327–336.
- [20] SCHNEPF E., KOCH W., 1966 — Golgi-Apparat und Wasserausscheidung bei *Glaucocystis*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **55**: 97–109.
- [21] SCHNEPF E., KOCH W., 1966 — Über die Entstehung der pulsierenden Vacuole von *Vacuolaria virescens* (*Chloromonadophyceae*) aus dem Golgi-Apparat, *Arch. Mikrobiol.*, **54**: 229–236.
- [22] MOLLENHAUER H. H., 1965 — Transition forms of Golgi apparatus secretion vesicles, *J. Ultrastruct. Res.*, **12**: 439–446.
- [23] JENSEN W. A., 1965 — The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton, *Amer. J. Bot.*, **52**: 238–256.
- [24] FREY-WYSSLING A., 1973 — Comparative organellography of the cytoplasm, *Spring Verlag, Wien, New York*.
- [25] FRANKE W. W., KARTENBECK J., KRIEN S., VANDERWOUDE W. J., SCHEER U., MORRÉ D., 1972 — Inter- and intracisternal elements of the Golgi apparatus. A system of membrane to membrane cross-links, *Z. Zellforsch.*, **132**: 365–380.
- [26] MOLLENHAUER H. H., MORRÉ D. J., 1966 — Golgi apparatus and plant secretion, *Ann. Rev. Plant Phys.*, **17**: 27–46.
- [27] JORDAN E. G., 1970 — Ultrastructural aspects of cell wall synthesis in *Spirogyra*, *Protoplasma*, **69**: 405–416.
- [28] GROVE S. N., BRACKER C. E., MORRÉ D. J., 1970 — An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*, *Amer. J. Bot.*, **57**: 245–266.
- [29] MORRÉ R. T., McALEAR J. H., 1963 — Fine structure of mycota. 4 The occurrence of the Golgi dictyosome in the fungus *Neobulgaria pura* (Fr.) Petrak, *J. Cell Biol.*, **16**: 131–142.
- [30] MILLINGTON W. P., GAWLIK S. R., 1970 — Ultrastructure and initiation of wall pattern in *Pediastrum boryanum*, *Amer. J. Bot.*, **57**: 552–561.
- [31] COOMBS J., LAURITIS J. A., DARLEY W. M., VOLCANI B. E., 1968 — Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in Diatoms. V. Effects of colchicine on wall formation in *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse, *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**: 124–152.
- [32] FREY-WYSSLING A., MÜHLETHALER K., 1965 — Ultrastructural plant cytology with an introduction to molecular biology, *Elsevier Publ. Co. Amsterdam, London, New York*.
- [33] WERZ G., 1964 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Genese des Golgi-Apparates (Dictyosomen) und ihrer Kernabhängigkeit bei *Acetabularia*, *Planta*, **63**: 366–381.
- [34] KÖNITZ W., 1965 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Euglena gracilis* im Tagesperiodischen Licht-Dunkel-Wechsel, *Planta*, **66**: 345–373.
- [35] MORRÉ D. J., MOLLENHAUER H. H., 1964 — Isolation of the Golgi apparatus from plant cells, *J. Cell Biol.*, **23**: 295–305.

- [36] ENGELS F. M., 1973 — Function of Golgi vesicles in relation to cell wall synthesis in germinating petunia pollen. I. Isolation of Golgi vesicles, *Acta Bot. Neer*, **22**: 6–13.
- [37] OLSZEWSKA M. J., GABARA B., STEPLEWSKI Z., 1966 — Recherches cytochimiques sur la succession d'enzymes hydrolytiques, sur la présence de la thiamine pyrophosphatase et des polysaccharides au cours du développement de la plaque cellulaire, *Protoplasma*, **61**: 60–80.
- [38] OLSZEWSKA M. J., GABARA B., KWIATKOWSKA M., PALCZEWSKA I., 1965 — Recherches cytochimiques sur la présence de la thiamine pyrophosphatase dans les cellules végétales, *Bull. Soc. Sci. Let. de Łódź*, Cl. III, 16 no 5.
- [39] POUX N., 1969 — Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. I. Activités phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme, *J. Microsc.*, **6**: 1043–1058.
- [40] POUX N., 1970 — Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. III. Activité phosphatasique acide, *J. Microsc.*, **9**: 407–434.
- [41] KAZAMA F., 1973 — Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores. III. Cytolysosomes and acid phosphatase distribution, *Arch. Mikrobiol.*, **89**: 95–104.
- [42] POUX N., 1969 — Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. II. Activité peroxydasique, *J. Microsc.*, **8**: 855–866.
- [43] POUX N., 1972 — Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. IV. Reactions avec la diaminobenzidine mise en évidence de peroxysomes, *J. Microsc.*, **14**: 183–218.
- [44] ZAAR K., SCHNEPF E., 1969 — Membranfluss und Nucleosidolphosphatase-Reaktion in Wurzelhaaren von *Lepidium sativum*, *Planta*, **88**: 224–232.
- [45] PICKETT-HEAPS J. D., 1968 — Further ultrastructural observations on polysaccharide localisation in plant cells, *J. Cell Sci.*, **3**: 55–64.
- [46] PICKETT-HEAPS J. D., 1967 — The use of radioautography for investigating wall secretion in plant cells, *Protoplasma*, **64**: 49–66.
- [47] BISALPUTRA T., ASHTON F. M., WEIER T. E., 1966 — Role of dictyosome in wall formation during cell division of *Chlorella vulgaris*, *Amer. J. Bot.*, **53**: 213–216.
- [48] BROWN R. M., 1969 — Observations on the relationship of the Golgi apparatus to wall formation in the marine chrysophycean alga, *Pleurochrysis scherffelli* Pringsheim, *J. Cell Biol.*, **41**: 109–123.
- [49] BROWN R. M., FRANKE W. W., KLEINIG H., FALK H., SITTE P., 1970 — Scale formation in Chrysophycean algae. I. Cellulose and noncellulosic wall components made by the Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **45**: 246–271.
- [50] DOBBERSTEIN B., KIERMAYER O., 1972 — Das Auftreten eines besonderen Typs von Golgivesikeln während der Sekundärwandbildung von *Micrasterias denticulata* Bréb., *Protoplasma*, **75**: 185–194.
- [51] GABARA B., 1967 — Przebieg cytokinezy u *Spirogyra* sp. i *Cladophora* sp., *Zesz. Nauk. U. Ł. seria II*, **23**: 113–132.
- [52] WHALEY W. C., MOLLENHAUER H. H., 1963 — The Golgi apparatus and cell plate formation — a postulate, *J. Cell Biol.*, **17**: 216–221.
- [53] FREY-WYSSLING A., LÓPEZ-SÁEZ J. F., MÜHLETHALER K., 1964 — Formation and development of the cell plate, *J. Ultrastruc. Res.*, **10**: 432–432.
- [54] PICKETT-HEAPS J. D., 1967 — Further observations on the Golgi apparatus and its function in cells of the wheat seedlings, *J. Ultrastruc. Res.*, **18**: 287–303.

- [55] OLSZEWSKA M. J., 1960 — Recherches sur la caractère chimique de la plaque cellulaire, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **29**: 249–261.
- [56] SCHNEPF E., 1961 — Quantitative Zusammenhänge Zwischen der Sekretion des Fangschleimes und den Golgi-Strukturen bei *Drosophyllum lusitanicum*, *Z. Naturforsch.*, **16**: 605–613.
- [57] ESAU K., CHEADLE V. I., GILL R. H., 1966 — Cytology of differentiating tracheary elements. I. Organelles and membrane systems, *Amer. J. Bot.*, **53**: 756–764.
- [58] CRONSHAW J., BOUCK G. B., 1965 — The fine structure of differentiating xylem elements, *J. Cell Biol.*, **24**: 415–431.
- [59] CRONSHAW J., 1967 — Tracheid differentiation in tobacco pith cultures, *Planta*, **72**: 78–90.
- [60] PICKETT-HEAPS J. D., 1968 — Xylem wall deposition. Radioautographic investigations using lignin precursors, *Protoplasma*, **65**: 181–205.
- [61] DASHEK W. V., ROSEN W. G., 1966 — Elektron microscopical localization of chemical components in the growth zone of Lily pollen tubes, *Protoplasma*, **61**: 192–204.
- [62] SIEVERS A., 1963 — Über die Feinstruktur des Plasmas wachsender Wurzelhaare, *Z. Naturforsch.*, **18**: 830–836.
- [63] SIEVERS A., 1963 — Beteiligung des Golgi-Apparates bei der Bildung der Zellwand vom Wurzelhaaren, *Protoplasma*, **56**: 188–192.
- [64] OLSZEWSKA M. J., GABARA B., 1967 — Recherches cytoenzymatiques et autoradiographiques sur les poils absorbants eu croissance, *Protoplasma*, **64**: 381–399.
- [65] GABARA B., 1971 — Cytokinesis in pollen mother cells. II. *Magnolia soulangeana* Soul., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **162**: 450–458.
- [66] ESCHRICH W., 1962 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pollen-Mutterzellen-Callose. IV. Mitteilung über Callose, *Protoplasma*, **55**: 419–423.
- [67] HESLOP-HARRISON J., DICKINSON H. G., 1969 — Time relationship of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*, *Planta*, **84**: 199–214.
- [68] MEPHAN R. H., LANE G. R., 1970 — Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*, *Protoplasma*, **70**: 1–20.
- [69] ENDO R. M., THOMSON W. W., KRAUSMAN E. M., 1968 — Effects of D-galactose on the ultrastructure of bentgrass root apices, *Can. J. Bot.*, **46**: 391–395.
- [70] NORTHCOTE D. H., 1969 — Fine structure of cytoplasm in relation to synthesis and secretion in plant cells, *Proc. Roy. Soc. B.*, **173**: 21–30.
- [71] MORRÉ D. J., JONES D. D., 1967 — Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*, *Planta*, **74**: 286–301.
- [72] JONES D. D., MORRÉ D. J., 1973 — Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. III. Control by exogenous sugars, *Physiol. Plant.*, **29**: 68–75.
- [73] SCHNEPF E., 1961 — Licht- und Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Insektivoren-Drüsen Über die Sekretion des Fangschleimes, *Flora*, **151**: 73–87.
- [74] SCHNEPF E., 1965 — Die Morphologie der Sekretion in pflanzlichen Drüsen, *Ber. dtsh. bot. Ges.*, **78**: 478–483.

Otrzymano: grudzień, 1973.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autorki: ul. Nowopółdniowa 12/16, 90-227 Łódź.

CYKL RYBOSOMOWY W KOMÓRKACH BAKTERII, ROŚLIN I ZWIERZĄT

Aleksander KOJ

Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Omówiono główne składniki rybosomów u Prokariota i Eukariota, zwracając szczególną uwagę na białka rybosomowe i 5S RNA. Przedstawiono przyjęty schemat zapoczątkowania, wydłużania i zakończenia syntezy łańcucha peptydowego, podkreślając podobieństwa i różnice tego procesu u bakterii, w mitochondriach i chloroplastach oraz w cytoplazmie komórek roślin i zwierząt.

Nazwę „rybosom” zaproponował de Robertis na określenie submikroskopowych cząsteczek rybonukleoproteidów, nazywanych także „ziarenkami Palade”, które są obecne we wszystkich żywych komórkach. W dalszych badaniach ustalono, że rybosomy biorą udział w syntezie białek i reprezentują około $\frac{2}{5}$ całkowitej ilości kwasów rybonukleinowych komórki. Przy niskich stężeniach magnezu rybosom dysocjuje odwracalnie na dwie nierównej wielkości podjednostki, które określane są na podstawie ich współczynników sedymentacji podczas ultrawierowania. Zakładając pewne uproszczenia można zaklasyfikować wszystkie rybosomy do 2 typów różniących się zasadniczo wielkością i strukturą (tab. 1). Mniejsze rybosomy znaleziono u bakterii oraz w mitochondriach i chloroplastach komórek jądrazastych, natomiast większe są obecne w cytozolu Eukariota. W rzeczywistości zróżnicowanie strukturalne rybosomów jest znaczne (por. „minirybosomy” mitochondriów wątroby — tab. 1), przy czym mogą one ulegać dodatkowo pewnym modyfikacjom w procesie preparatyki.

W komórce populacje rybosomów występują w postaci mieszaniny podjednostek, pojedynczych rybosomów (monosomów) oraz agregatów zawierających po kilka do kilkunastu rybosomów (polirybosomy lub polysomy) połączonych wspólną nicią mRNA. Te składniki rybosomów można najłatwiej rozdzielić przez ultrawierowanie ekstraktu komórkowego w gradiencie gęstości (rys. 1 i 2). Profil rybosomowy danej komórki zależy

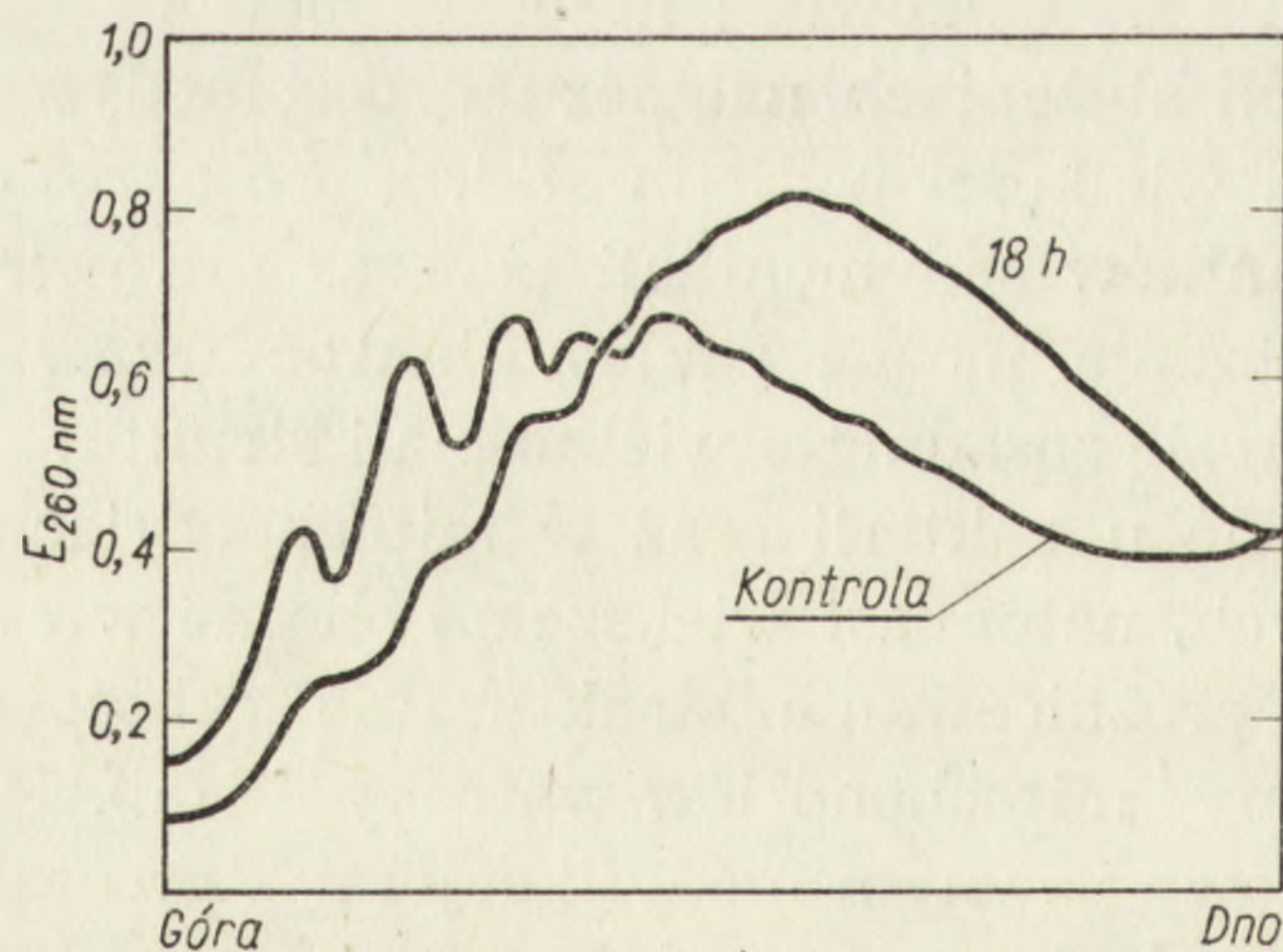
TABELA 1. Główne składniki rybosomów

	Rybosomy 70S (Prokariota, mitochondria* chloroplasty)	Rybosomy 80S (Eukariota)
Podjednostki	30S + 50S	40S + 60S
r-RNA	16S 23S 5S**	17-18S 25-30S 5-7S
Procent masy rybosomu (łącznie)	około 64	około 51
Białka rybosomów	Podj. 30S: S1....S21 Podj. 50S: L1....L34	Ponad 60 różnych białek, w większości silnie zasado- wych
Procent masy rybosomu (łącznie)	około 36	około 49

* „Minirybosomy” mitochondriów wątroby 55S z podj. 28S+39S [1].

** Brak w rybosomach mitochondriów *N. crassa* [2].

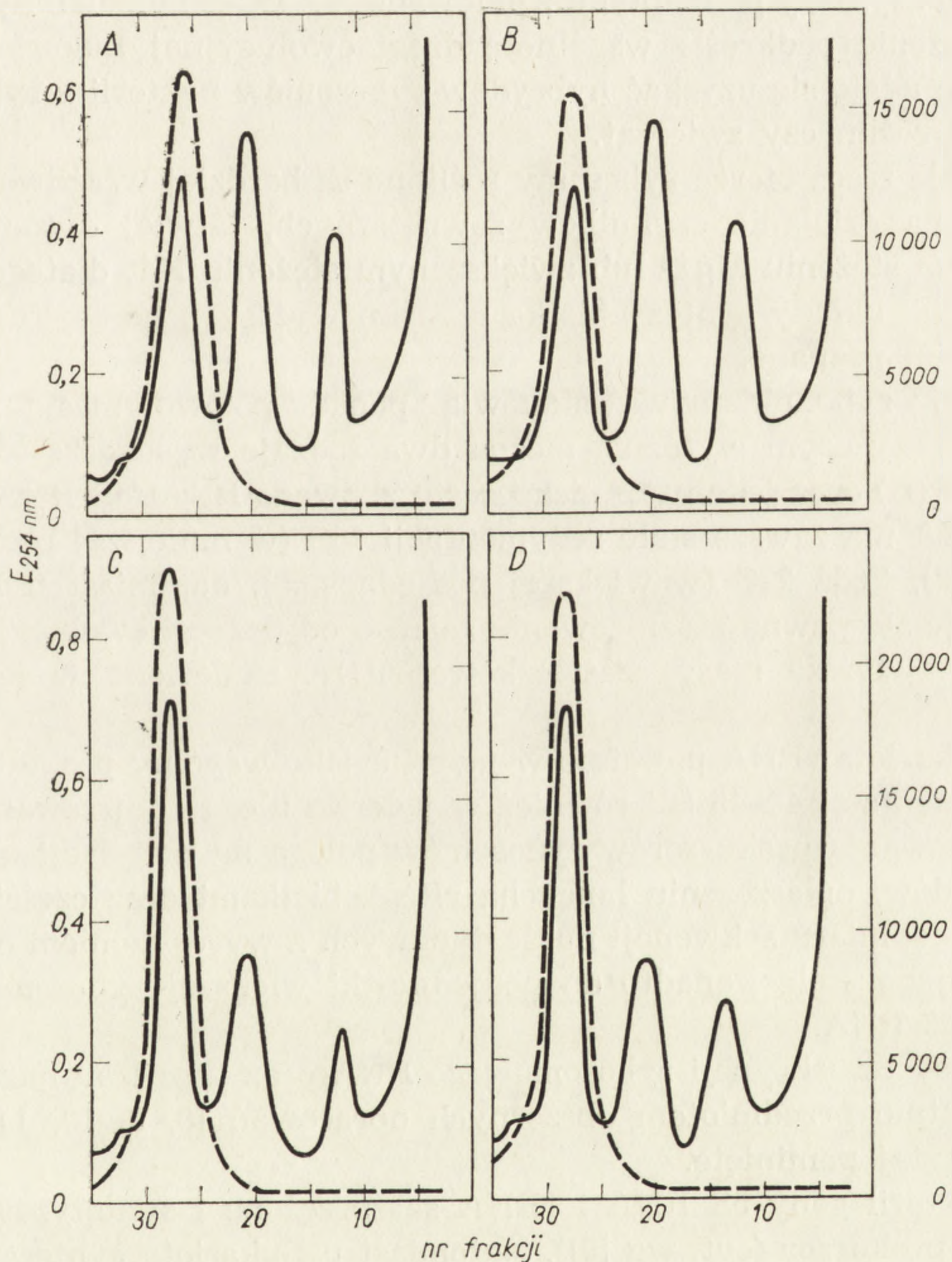
głównie od intensywności syntezy białka, przy czym podczas translacji długich, policistronowych mRNA przeważają układy polisomowe. Liu i Neuhaus [3] wykazali, że indukcja syntezy glikoproteidów osocza u szczura prowadzi do charakterystycznego wzrostu liczby polirybosomów w wątrobie. Maksymalną reakcję w postaci zwiększonego szczytu polirybosomów obserwuje się po 18 godzinach od urazu, co zgadza się z nasileniem syntezy białek ostrej fazy w tym okresie (rys. 1). Należy dodać, że w ko-



Rys. 1. Profil rybosomów wątroby szczura po ultrawiirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy (wg Liu i Neuhausa [3], zmodyfikowane)

Poszczególne maksima absorpcji przy 260 nm na górze probówki odpowiadają podjednostkom i pojedynczym rybosomom, a w miarę zbliżania się do dna probówki odpowiadają coraz cięższym agregatom (polisomy). U zwierząt kontrolnych przeważają pojedyncze rybosomy oraz agregaty paru rybosomów, natomiast w wątrobie 18 godz. po urazie (laparatomia) przeważają polisomy

mórkach produkujących białka „na eksport” (np. białka osocza wytwarzane w wątrobie) znaczna część polirybosomów występuje w formie związanej z błonami siateczki śródplazmatycznej, skąd można je uwolnić działaniem detergentów. Według Pitota i wsp. [4] mozaikowa struktura siateczki śródplazmatycznej decyduje, że tylko pewne typy mRNA związane z rybosomami mogą przyczepić się do błony i ulec translacji (teoria „membronu”).



Rys. 2. Hybrydy rybosomów kiełków grochu i wątroby myszy (wg Cammarano i wsp. [7], zmodyfikowane)

A — 60S mysz + 40S groch; B — groch (kontrola); C — mysz (kontrola); D — 40S mysz + 60S groch. Linia ciągła — zawartość rRNA ($E_{254 \text{ nm}}$); linia przerywana — radioaktywność preparatu nierozpuszczalnego w gorącym kwasie trójchlorooctowym (po inkubacji z poli-U i ^{14}C -fenyloalaniną)

Porównawcze badania Cammarano i wsp. [5, 6] wskazują, że wśród rybosomów Eukariota podjednostka mniejsza, tzn. 40S, wykazuje dosyć stałą masę cząsteczkową, około 1,5 miliona daltonów. Natomiast masa cząsteczkowa większej podjednostki waha się od około 2,4 miliona u roślin wyższych do około 3 milionów u ssaków. Te różnice nie są jednak istotne dla funkcjonowania rybosomów, gdyż *in vitro* udało się otrzymać hybrydy rybosomów z kielków grochu i wątroby myszy [7] (rys. 2). W obecności odpowiedniej matrycy (polinukleotyd urydyłowy) hybrydy te były zdolne *in vitro* do syntezy polipeptydu zbudowanego z ^{14}C -fenyloalaniny. Opisane doświadczenie podkreśla wspólnotę drogi ewolucyjnej Eukariota. Natomiast nie udało się uzyskać hybrydów rybosomów bakterii z rybosomami komórek roślin czy zwierząt.

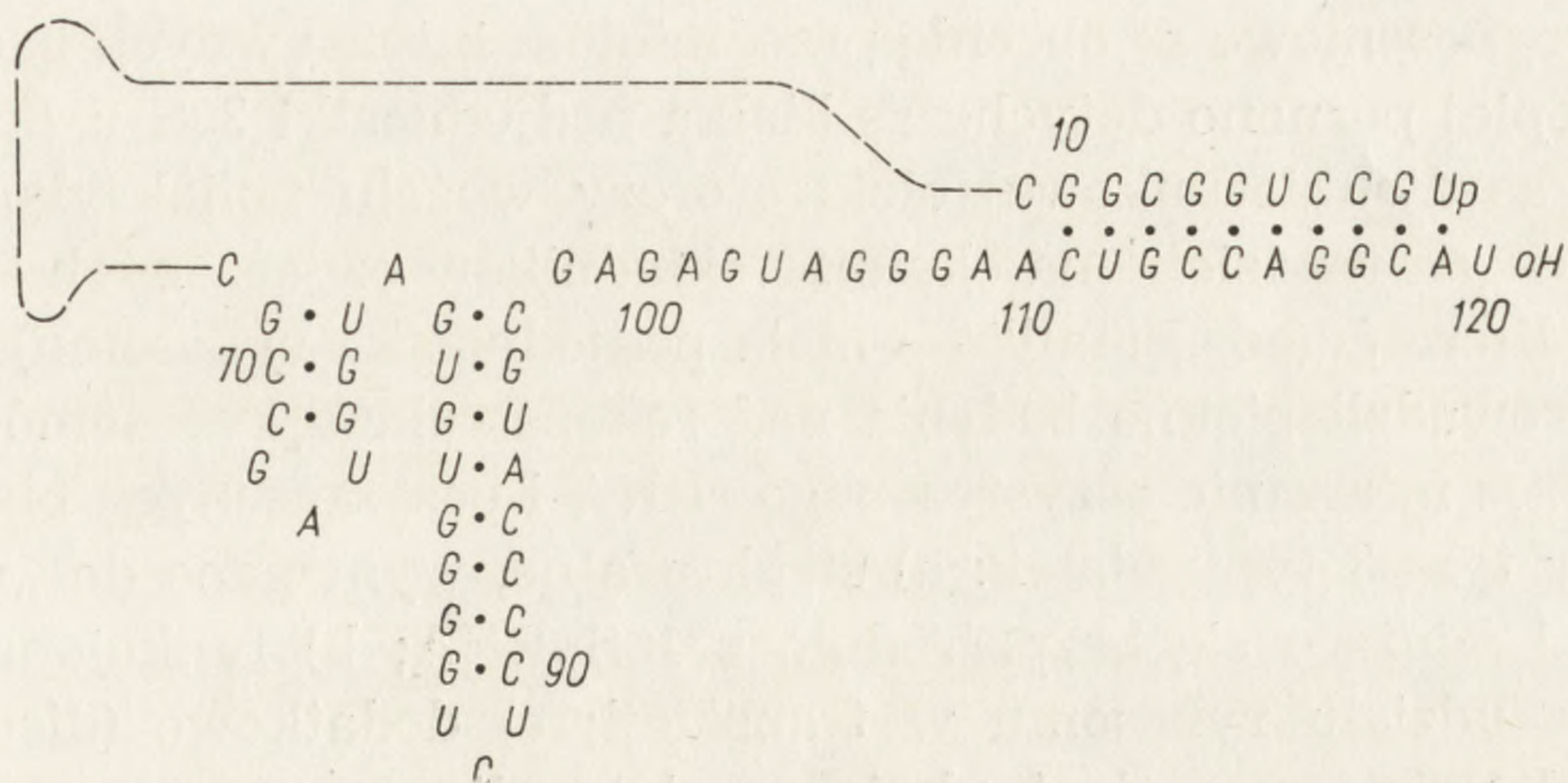
Ogólnie rzecz biorąc rybosomy roślinne są bardziej wrażliwe od zwierzęcych na działanie czynników zewnętrznych, łatwiej dysocjują przy obniżonym stężeniu Mg^{+2} lub zwiększonym stężeniu K^{+} , dlatego też bezkomórkowe układy syntezy białka u roślin wyższych gorzej funkcjonują i są słabiej poznane.

Kwasy rybonukleinowe stanowią ponad połowę masy rybosomu (tab. 1), przy czym wyróżnić można dwa rodzaje wysokocząsteczkowego RNA (rRNA) oraz jeden typ niskocząsteczkowego RNA (5S RNA). U bakterii rRNA ma zawsze stałe sedymentacji 16S (w mniejszej podjednostce rybosomu), bądź 23S (w większej podjednostce), natomiast u Eukariota obserwuje się pewne zróżnicowanie zależne od pozycji ewolucyjnej organizmu: najwyższe masy cząsteczkowe rRNA znaleziono w komórkach ssaków.

U Eukariota rRNA powstaje w jąderku jako wspólny prekursor o stałej sedymentacji 40–45 S i również w jąderku ulega „dojrzwaniu”. Proces dojrzwania prekursorów rybosomów polega na metylacji niektórych nukleotydów, opłaszczeniu łańcucha rRNA białkami oraz częściowej degradacji nadmiaru sekwencji nukleotydowych z wytworzeniem odpowiednich podjednostek. Ponadto do podjednostki większej-rybosomu przyłącza się 5S RNA.

Procesy transkrypcji rybosomowego RNA oraz jego losy metaboliczne były ostatnio przedmiotem obszernych opracowań [8, 9, 10, 11] dlatego zostaną tutaj pominięte.

U bakterii geny 5S RNA i rRNA są sprzężone i syntetyzowany jest wspólny prekursor (cyt. wg [9]). Natomiast u Eukariota synteza 5S RNA odbywa się poza jąderkiem, a geny mogą być rozrzucone w różnych chromosomach. 5S RNA nie zawiera metylowanych zasad i pseudourydyny, a pewne odcinki łańcucha mogą występować w postaci podwójnej spirali [12] (rys. 3).



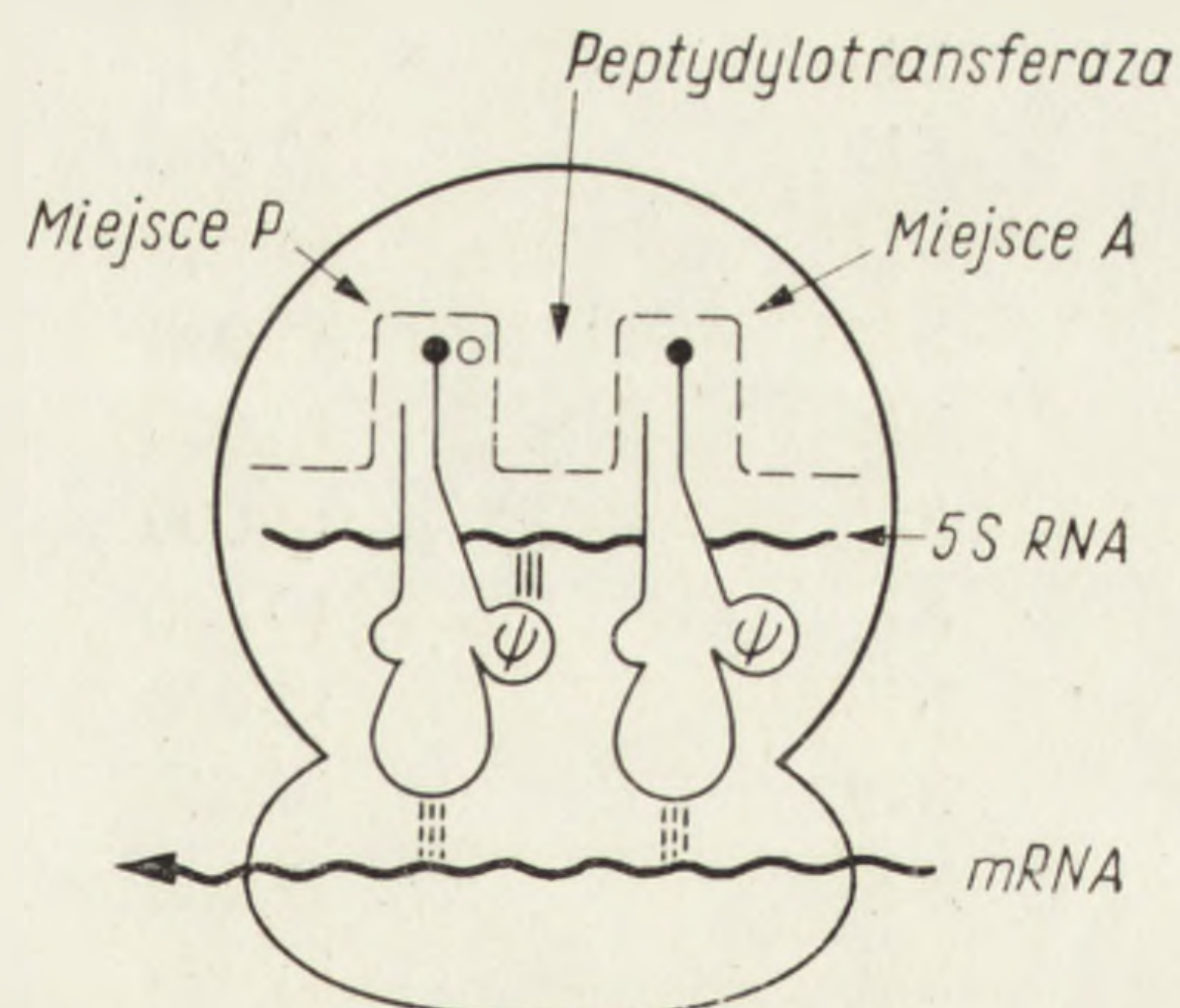
Rys. 3. Sekwencja nukleotydów i przypuszczalne pary zasad w odcinku 5S RNA, do którego wiążą się białka L18 i L25 z podjednostki 50S rybosomu *E. coli* (wg Garretta i Wittmanna [12])

Ford i wsp. [13] donieśli o istnieniu tkankowej odrębności 5S RNA pod względem sekwencji nukleotydów: nerka ropuchy zawiera tylko jeden rodzaj, a jajnik pięć rodzajów 5S RNA. Te doświadczenia mogą przemawiać za pewną specyficznością tkankową rybosomów zależną od 5S RNA, ale wymagają jeszcze potwierdzenia.

Avadhani i Buetow [14] wykazali, że pomimo częściowego rozkładu wysokocząsteczkowego RNA w rybosomie przez rybonukleazę *in vitro* rybosomy zachowują zdolność translacji póki 5S RNA pozostaje nienaruszony. Wiadomo również, że rybosomy zrekonstruowane *in vitro* bez 5S RNA nie przyłączają 4 białek podjednostki 50S i nie wykazują aktywności peptydylotransferazy (cyt. wg [15]). Chladek [15] postuluje, że rola 5S RNA polega na wytworzeniu komplementarnych wiązań z pętlą pseudourydyny w cząsteczce tRNA. Dzięki temu może nastąpić lepsze „dopasowanie” tRNA do odpowiednich miejsc wiążących na rybosomie (rys. 4). Zdaniem Dube [16] 5S RNA ułatwia rozpoznanie tRNA przez rybosom. Jednakże wypada dodać, że aktywne rybosomy mitochondriów nie zawierają 5S RNA [2, 17].

Rys. 4. Przypuszczalna rola 5S RNA podczas translacji (wg Chladek [15], zmodyfikowane)

5S RNA tworzy komplementarne wiązanie z pętlą pseudourydyny peptydylo tRNA, która zawiera sekwencję —GT ψ CG(A)— wspólną dla wszystkich cząsteczek tRNA. Po wytworzeniu tego wiązania może ulegać modyfikacji miejsce wiążące P (peptydylowe), co ułatwia reakcję wytworzenia wiązania peptydowego. Miejsce A (akceptorowe) zajmowane jest przez aa-tRNA



Białka rybosomowe są obecnie przedmiotem intensywnych badań, przy czym najlepiej poznano dotychczas białka podjednostki 30S u *Escherichia coli*. Podczas dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym białka te można rozdzielić na około 20 składników oznaczonych kolejnymi liczbami i literą S (od „small” — mała podjednostka rybosomu). Nomura [18] przeprowadził piękne badania nad rekonstrukcją rybosomów *E. coli* in vitro przez mieszanie oczyszczonego rRNA i oczyszczonych białek. Wyróżnił przy tym 3 typy białek: a) strukturalne, wymagane do „montażu” rybosomu i wiążące się bezpośrednio z 16S RNA; b) funkcjonalne, niezbędne dla udziału rybosomu w translacji; c) dodatkowe (dispensable), bez których rybosom może funkcjonować in vitro.

Zależnie od zawartości poszczególnych białek w podjednostce 30S Voynow i Kurland [19] oraz Garrett i Wittmann [12] wyróżniają: a) białka jednostkowe w ilości 1 cząsteczka białka na 1 rybosom; b) białka brzeżne o średniej zawartości 0,5–0,8 cząsteczki na rybosom; c) białka cząstkowe — mniej niż średnio 0,5 cząsteczki na rybosom (tab. 2).

Mutacje białek rybosomowych mogą być przyczyną oporności pew-

TABELA 2. Własności białek rybosomowych podjednostki 30S u *E. coli*
(wg Garrettta i Wittmanna [12], zmodyfikowane)

Białko	Masa cząsteczkowa	pK	Wiązanie z 16S RNA	Klasa białka
S1	65 000	?	—	F
S2	27 000	6,7	—	F
S3	28 000	12,0	—	M
S4	25 000	10,4	+	U
S5	21 000	9,9	—	M
S6	17 000	4,9	—	M
S7	26 000	12,2	+	U
S8	16 000	9,1	+	U
S9	17 500	> 12,0	—	U
S10	17 000	7,8	—	M
S11	?	> 12,0	—	F
S12	17 000	> 12,0	—	F
S13	14 000	> 12,0	?	?
S14	15 000	> 11,0	—	F
S15	13 000	> 12,0	+	U
S16	13 000	11,6	—	U
S17	10 000	9,7	—	U
S18	12 000	> 12,0	—	M
S19	14 000	> 12,0	—	F
S20	13 000	12,0	+	M
S21	13 000	> 12,0	—	F

U — białka jednostkowe, M — białka brzeżne, F — białka cząstkowe.

nych szczepów bakteryjnych na antybiotyki. Wittmann i wsp. [20] wykazali, że mutanty *E. coli* niewrażliwe na streptomycynę mają zmodyfikowane białko S12. Zmiana dotyczy tylko zastąpienia lizyny w pozycji 42 lub 87 na argininę lub amid kwasu glutaminowego, a wywołuje znaczne efekty biologiczne. Inne badania dowiodły, że oporność *E. coli* na streptomycynę może polegać na mutacji prowadzącej do zmiany pojedynczego aminokwasu w białku S5 (cyt. wg [12]). Jednakże w pewnych przypadkach mutacja wywołująca oporność na antybiotyki dotyczy nie białka, lecz rRNA: mutanty *E. coli* odporne na kasugamycynę zawierają 16S RNA ze zmniejszoną zawartością metylowanych nukleotydów na końcu 3' (cyt. wg [12]).

Skład białkowy rybosomów Eukariota jest dotychczas poznany tylko fragmentarycznie. Delaunay i wsp. [21], używając dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wykazali w rybosomach zwierzęcych typu 80S obecność ponad 60 białek, w większości silnie zasadowych. Nie udało się przy tym zaobserwować istotnych zmian w składzie tych białek podczas różnicowania tkankowego i transformacji nowotworowej. Natomiast Gambino i wsp. [22] stwierdzili wyraźne zmiany w białkach rybosomowych następujące wkrótce po zapłodnieniu jaj jeżowca.

W ostatnich latach pojawiły się ciekawe dane na temat odwracalnej modyfikacji białek rybosomowych Eukariota przez kinazy przenoszące resztę fosforanową z ATP na grupy -OH seryny lub treoniny w białku. Loeb i Blat [23] obserwowali taką reakcję w rybosomach wątroby szczura a Kabat w retikulocytach królika. Fosforylacja białek rybosomów wątroby jest aktywowana przez glukagon, który działa poprzez system cyklicznej adenilowej i cykliczny AMP. Według Kabata [24] fosforylacja białka Si z rybosomu 80S utrwała postać monosomu, co może hamować syntezę białka. Również Manier i wsp. [25] obserwowali hamowanie wbudowywania aminokwasów przez izolowane rybosomy wątroby poddane enzymatycznej fosforylacji. Jednakże regulacyjna rola fosforylacji białek rybosomowych u Eukariota nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona [26], a fosforylacja białek rybosomowych u bakterii ma chyba mniejsze znaczenie biologiczne [27].

Zasadnicza funkcja rybosomów związana jest z procesem translacji, w którym można wyróżnić trzy etapy (tab. 3). Czynniki białkowe uczestniczące w tym procesie zostały dokładnie poznane u bakterii, słabiej u zwierząt i roślin niższych, najslabiej u roślin wyższych, jednakże zasadniczy schemat biosyntezy białka jest wszędzie bardzo podobny.

Podczas procesu inicjacji u bakterii najpierw podjednostka 30S łączy się z mRNA w obecności czynników białkowych F2 i F3. Czynniki F2 i F3 nie jest konieczny, kiedy stosuje się syntetyczne matryce, np. poli-U. Następnie do kodonu startowego AUG przyłącza się inicjatorowy tRNA w obec-

TABELA 3. Główne czynniki uczestniczące w procesie translacji

Etap translacji	Prokariota	Eukariota
Zapoczątkowanie (initiation)	30S + mRNA f-Met-tRNA _F F1 + F2 + F3 + GTP	40S + mRNA Met-tRNA _F M1 + M2 + M3 + GTP
Wydłużanie (elongation)	50S + (Tu-Ts) + G + GTP + aa-tRNA	60S + T1 + T2 + GTP + aa-tRNA
Zakończenie (termination)	R1 + R2 + S	R

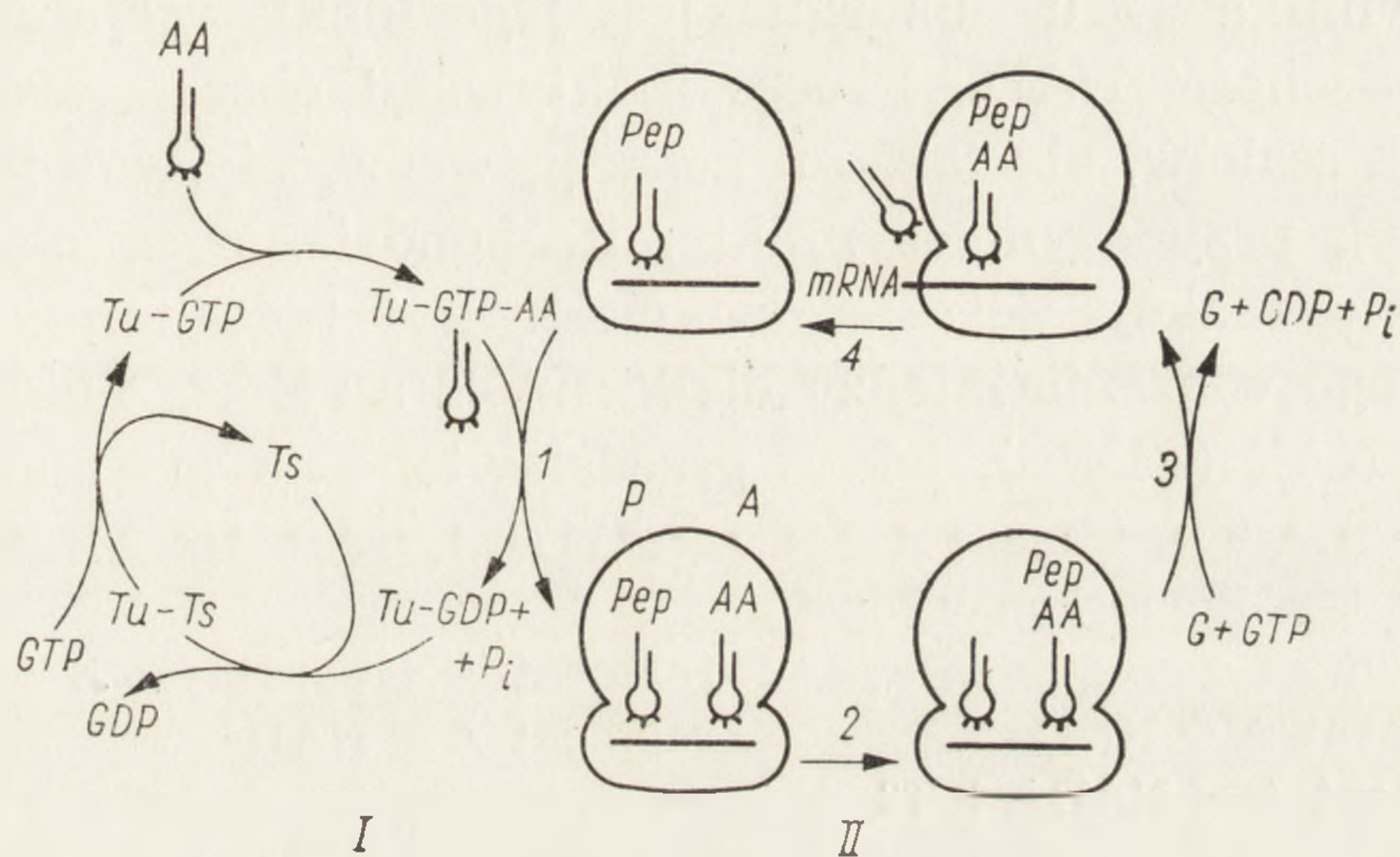
ności GTP oraz czynników białkowych F1 i F2. U bakterii oraz w mitochondriach i chloroplastach funkcję inicjującą spełnia N-formylo-metionylo-tRNA, natomiast w cytozolu komórek zwierząt i roślin specjalny rodzaj metionylo-tRNA z niezablokowaną grupą aminową metioniny (te zagadnienia omawiają także Gąsior [28], Lucas-Lenard i Lipmann [29] oraz Rudland i Clark [30]). W dalszym etapie u Prokariota po przyłączeniu podjednostki 50S powstaje pełny kompleks inicjujący oraz uwalniają się czynniki F, GDP i fosforan. Rola GTP w procesie inicjacji nie jest jednoznacznie wyjaśniona: przyjmuje się, że energia uwalniana przy hydrolizie tego nukleotydu służy do odpowiedniego „dopasowania” f-Met-tRNA w miejscu donatorowym peptydylotransferazy.

Pewne dane wskazują na to, że czynniki inicjujące mogą wykazywać różnicowanie funkcjonalne, decydujące o regulacji szybkości translacji różnych typów mRNA *in vivo*. Do dziś nie jest całkiem jasne w jaki sposób czynniki inicjujące rozpoznają kodony startowe AUG od kodonów wewnętrznych metioniny. Przyjmuje się, że decydujące znaczenie ma II-rzędowa struktura mRNA, ale jest także możliwe bardziej swoiste rozpoznawanie miejsc inicjacji na podstawie sekwencji poprzedzającej AUG, zakładając istnienie wielu rodzajów swoistych czynników F3. Na poparcie tej tezy można przytoczyć prace wykazujące, że po zakażeniu *E. coli* fagiem T4 rybosomy bakteryjne mają wyraźnie osłabioną zdolność translacji natywnego mRNA bakterii w porównaniu z RNA faga (przeгляд piśmiennictwa na ten temat podany jest m. in., w artykułach Revela [31] oraz Filipowicza i Zagórskiego [32]). Zebrano również pewne dane przemawiające za tkankową specyficznością czynników inicjacji (M) u Eukariota. Stwierdzono m. in., że mRNA miozyny wykazuje małe powinowactwo do rybosomów retikulocytów w obecności czynników inicjujących krwinek [33]. Rolę czynników białkowych w translacji heterologowego mRNA w bezkomórkowych układach Eukariota omawiają m. in. Revel [31] i Kruh [34].

Ilość czynników inicjujących w komórce może również ograniczać wydajność translacji, gdyż szacuje się, że w komórce bakteryjnej występuje

1 komplet czynników inicjujących na 5 rybosomów, podczas gdy ilość czynników elongacji odpowiada ilości rybosomów.

Badania ostatnich lat dowiodły, że proces elongacji wymaga specyficznych białek dla rozpoznania kodonów wewnętrznych i utworzenia kompleksu aa-tRNA z rybosomem [29, 35]. Czynniki bakteryjny Tu o masie cząsteczkowej około 40 000 tworzy kompleksy z GTP lub GDP, które mogą chronić go *in vitro* od denaturacji cieplnej. Jednocześnie czynnik Tu wykazuje wysokie powinowactwo do białka Ts o masie cząsteczkowej około 19 000. W komórce Ts służy do regeneracji aktywnego Tu przez wytworzenie kompleksu Tu-Ts, z którego jest następnie wypierany przez GTP (rys. 5).



Rys. 5. Główne reakcje w procesie elongacji łańcucha peptydowego (wg Haenni [35], zmodyfikowane). I — dostarczanie substratów (cykl T); II — właściwy cykl elongacji. P — miejsce peptydylowe; A — miejsce akceptorowe. 1 — wiązanie substratu; 2 — przeniesienie peptydy; 3 — enzymatyczna translokacja; 4 — uwolnienie tRNA

Po związaniu aa-tRNA z miejscem akceptorowym na rybosomie natychmiast następuje przerzucenie peptydylo-tRNA (lub f-Met-tRNA) na wolną grupę aminową zaktywowanego aminokwasu, a reakcja jest katalizowana przez peptydylotransferazę związaną z większą podjednostką rybosomu. Wytworzenie wiązania peptydowego nie wymaga dodatkowego nakładu energii, natomiast hydroliza GTP zachodzi pod wpływem czynnika G (lub T2 u Eukariota) w procesie translokacji, która jest dość złożonym procesem i obejmuje:

1. Przesunięcie mRNA względem rybosomu dokładnie o jeden tryplet nukleotydowy, przez co kolejny kodon staje się dostępny dla translacji.

2. Uwolnienie deacylowanego tRNA i przesunięcie peptydylo-tRNA z miejsca A do P.

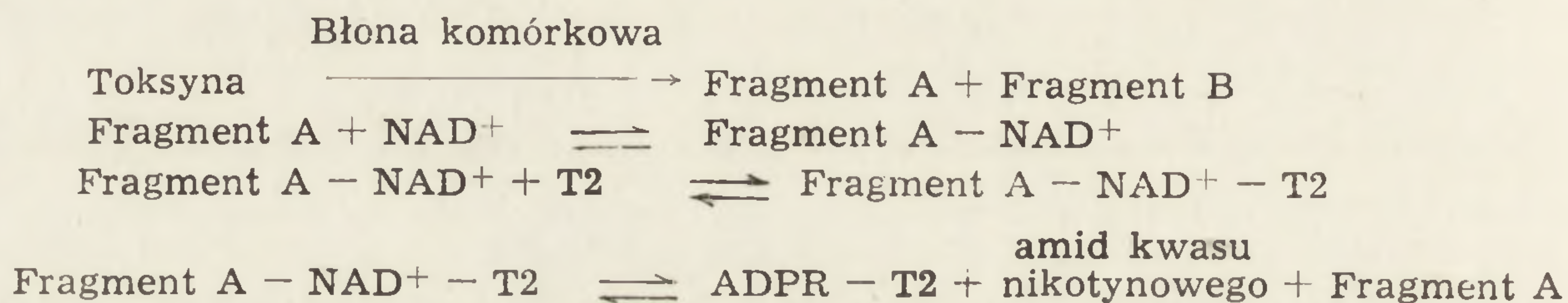
Przez powtórzenie procesu rozpoznawania kodonu w obecności czyn-

ników T i GTP przyłącza się kolejny aa-tRNA i proces wydłużania powtarza się.

Ilość cząsteczek GTP zużywana podczas elongacji nie jest jednoznacznie ustalona. Dawniej przyjmowano, że jedna cząsteczka GTP wymagana jest do wiązania aa-tRNA a druga do translokacji. Jednakże doświadczenia z antybiotykami, które hamują czynnik G i translokację, przemawiają za hydrolizą tylko jednej cząsteczki GTP właśnie w tym procesie [35].

Elongacja u Eukariota przebiega analogicznie jak u bakterii, ale czynnik T1 spełnia funkcje Tu-Ts. Istnienie kompleksu aa-tRNA-T1-GTP wykazano m. in. w drożdżach, kielkach pszenicy i retikulocytach.

Ilość czynników T i G u bakterii jest znaczna i w fazie wykładniczej wzrostu mogą one stanowić 5% wszystkich białek komórki. Z kolei wspólną cechą czynnika T2 u Eukariota jest jego inaktywacja przez toksynę błonicy w obecności NAD. Proces inaktywacji obserwowano nie tylko w komórkach ssaków, ale także u bezkręgowców, pierwotniaków i roślin wyższych [36], przy czym czynniki mitochondrialne są niewrażliwe na toksynę. Sama reakcja jest bardzo ciekawa i polega na wytworzeniu kowalencyjnego wiązania między białkiem T2 a rybozą nukleotydu nikotynowego w NAD (ADPR), jak to przedstawiono na schemacie [36]:

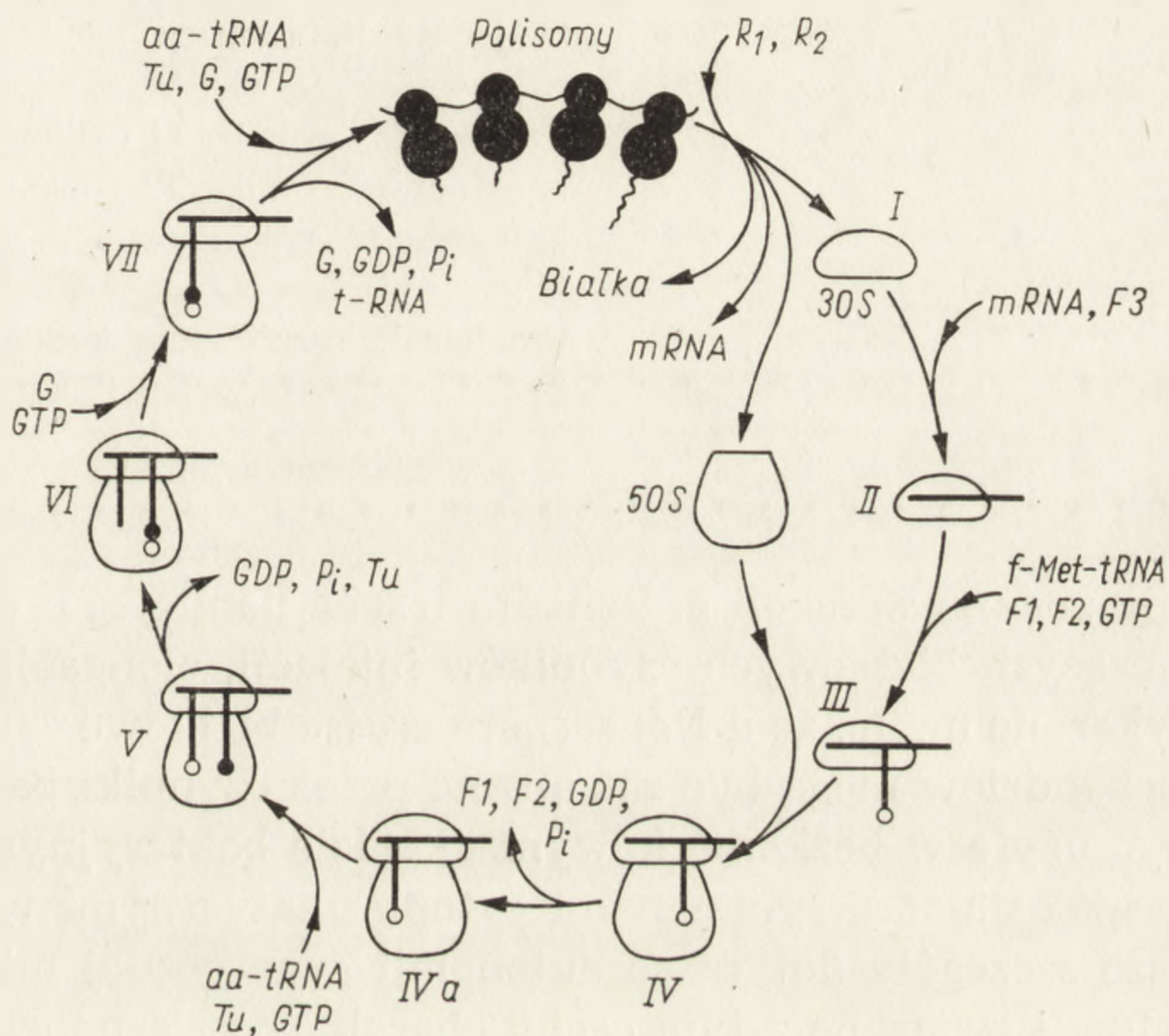


Zarówno u Prokariota, jak Eukariota proces translacji odbywa się do momentu, gdy kolejny kodon mRNA jest nośnikiem sygnału kończącego (UAA, UAG lub UGA). Wówczas do rybosomu przyłącza się swoisty czynnik białkowy R, który nadaje peptydylotransferazie na podjednostce 50S własności hydrolazy. U *E. coli* czynnik R1 rozpoznaje kodony UAA i UAG, a czynnik R2 kodony UAA i UGA [29], [37]. Ponadto wyizolowano czynnik stymulujący S, który wymaga GTP do swojej aktywności. U zwierząt wykazano istnienie tylko jednego czynnika kończącego, być może łącznie z kompleksem S, gdyż jego masa cząsteczkowa jest 4–6 razy większa od bakteryjnych czynników R.

Należy podkreślić, że odszczepienie peptydu i tRNA od rybosomu nie jest jednoznaczne z dysocjacją rybosomu na podjednostki. Do tego potrzebne są dodatkowe czynniki, być może identyczne z F3 z grupy czynników inicjujących [38], co podkreśla istotną rolę puli podjednostek rybosomowych w procesie translacji. Doświadczenia z dodawaniem znakowanych podjednostek 30 lub 50S wykazały, że wszystkie polisomy pochodzą

właśnie z puli podjednostek, natomiast monosomy stanowią nieaktywną rezerwę.

Charakterystyczne przemiany rybosomów podczas translacji można przedstawić w postaci cyklu rybosomowego [39] (rys. 6). Zapoczątkowanie obejmuje fazy I–IV, wydłużanie fazy IVa–VII. Proces wydłużania ma charakter epicyklu (rys. 5) nałożonego wielokrotnie na główny cykl rybosomowy, przy czym ilość powtórzeń epicyklu zależy od długości łańcucha peptydowego. Cykl rybosomowy u Eukariota jest bardzo podobny, a główna różnica dotyczy wielkości rybosomów oraz nomenklatury czynników białkowych, inicjacji, elongacji i zakończenia.



Rys. 6. Cykl rybosomowy podczas syntezy białka u bakterii (wg Pestki [39], zmodyfikowane)

Zróżnicowanie funkcjonalne rybosomów w czasie translacji jest podkreślone przez fakt, że różne antybiotyki działają wybiórczo na poszczególne fazy cyklu. W tabeli 4 przedstawiono jedynie przykłady z tego zakresu, gdyż rzeczywista liczba antybiotyków modyfikujących translację jest bardzo długa, a sam przedmiot jest omawiany w obszernych monografiach [40, 41]. Należy dodać, że wiele antybiotyków działa kompleksowo na syntezę białka, a niektóre z nich, jak np. kwas fusydynowy, hamują zarówno rybosomy bakteryjne, jak i rybosomy Eukariota.

Należy jednocześnie zwrócić uwagę, że w obrębie jednej komórki zwierzęcej czy roślinnej może istnieć znaczne zróżnicowanie mechanizmu translacji w cytozolu oraz w mitochondriach i chloroplastach. Niektóre

TABELA 4. Hamowanie głównych etapów translacji przez niektóre antybiotyki (dane zestawione wg Munoz i wsp. [40])

Antybiotyk	Wiążąca podjednostka rybosomu	Mechanizm działania
Inhibitory zapoczątkowania		
kasugamycyna	30S	hamowanie tworzenia kompleksu inicjującego
phenomycyna	40S	
Inhibitory wydłużania		
sparsomycyna	50S	hamowanie peptydylotransferazy oraz hamowanie wiązania aa-tRNA na rybosomie
chloramfenikol	50S	
tiostrepton	50S	hamowanie translacji
siomycyna	50S	
Kwas fusydynowy	50S	hamowanie czynnika G (bakterie)
	60S	hamowanie czynnika T2 (Eukariotu)
cykloheksimid	60S	„zamrożenie” polisomów
Inhibitory zakończenia		
tetracyklina	30S	utrudnienie rozpoznania kodonu kończącego
streptomycyna	30S	
sparsomycyna	50S	hamowanie peptydylotransferazy
chloramfenikol	50S	

z tych różnic podano w tabeli 5. Ponadto trzeba pamiętać o dalszych różnicach dotyczących białkowych czynników inicjacji, elongacji i zakończenia [42]. Wykazano m. in., że u *Neurospora crassa* białkowe czynniki translacji z mitochondriów mogą być zastąpione przez czynniki bakteryjne lub też mogą być użyte w bezkomórkowym układzie bakteryjnym, natomiast nie mogą współdziałać z rybosomami cytoplazmatycznymi tej samej komórki. Dalsze szczegóły dotyczące autonomii genetycznej mitochondriów i chloroplastów i związane z tym cechy charakterystyczne syntezy białek w tych organellach zawarte są m. in. w pracy Kroona i wsp. [17] oraz w artykułach przeglądowych Michejdy [43] i Więckowskiego [44] w tym samym zeszycie Postępów Biologii Komórki.

TABELA 5. Niektóre różnice w mechanizmie translacji na rybosomach cytoplazmatycznych w mitochondriach i chloroplastach (dane zestawione wg Kroona i wsp. [17])

	Cytoplazma	Mitochondria	Chloroplasty
Rybosomy	80S	55–60S zwierzęcy 67–75S rośliny	66–70S
Inicjatorowy tRNA	Met-tRNA _F	f-Met-tRNA _F	f-Met-tRNA,
5S RNA	obecny	brak	obecny
Hamowanie przez chloramfenikol	–	+	+
Hamowanie przez cykloheksimid	+	–	–

Porównując mechanizm translacji w świecie Prokariota i Eukariota oraz w świecie roślin i zwierząt można się pokusić o następujące wnioski przy obecnym stanie wiedzy:

1. Istnieje zasadniczy wspólny schemat translacji w całym świecie żywym.

2. Główne różnice w szczegółach tego procesu występują między Prokariota i Eukariota.

3. Obserwuje się znaczne podobieństwo między roślinami i zwierzętami w procesie translacji, m. in. zdolność tworzenia aktywnych hybrydów rybosomowych, inaktywacja czynnika T2 przez toksynę błonicy.

4. Zaskakujące różnice w funkcjonowaniu cyklu rybosomowego mogą wystąpić w obrębie jednej komórki u Eukariota między cytozolem a mitochondriami lub chloroplastami — różnice niemal tak duże jak między Prokariota i Eukariota.

LITERATURA

- [1] O'BRIEN T. W., 1971 — The general occurrence of 55S ribosomes in mammalian liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **246**: 3409–3417.
- [2] LIZARDI P. T., LUCK D. J., 1972 — Absence of 5S RNA component in the mitochondrial ribosomes of *Neurospora crassa*, *Nature New Biol.*, **229**: 140–141.
- [3] LIU A. Y., NEUHAUS O. W., 1968 — Injury and plasma protein biosynthesis. II. Hepatic microsomal activity and polysomal organization, *Biochim. Biophys. Acta*, **166**: 195–204.
- [4] PILOT H. C., INOUE H., KAPLAN J. H., 1971 — Mechanisms in cellular metabolic regulation, *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 1035–1039.
- [5] CAMMARANO P. S., PONS S., ROMEO A., GALDIERI M., GUALERZI C., 1972 — Characterization of unfolded and compact ribosomal subunits from plants and their relationship to those of lower and higher animals: evidence for physicochemical heterogeneity among eucaryotic ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 571–596.
- [6] CAMMARANO P., ROMEO A., GENTILE M., FELSANI A., GUALERZI C., 1972 — Size heterogeneity of the large ribosomal subunits and conservation of the small subunits in eucaryote evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 597–624.
- [7] CAMMARANO P., FELSANI A., GENTILE M., GUALERZI C., ROMEO A., WOLF G., 1972 — Formation of active hybrid 80S particles from subunits of pea seedlings and mammalian liver ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 625–642.
- [8] ATTARDI G., AMALDI F., 1970 — Structure and synthesis of ribosomal RNA, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 183–226.
- [9] SZALA S. CHORAŻY M., 1972 — Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów, *Monografie Biochemiczne*, tom 27, PWN, Warszawa.
- [10] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J., 1972 — Badania nad syntezą rybosomowych kwasów nukleinowych, *Post. Biochem.*, **18**: 553–568.
- [11] GOŁASZEWSKI T., 1973 — Losy metaboliczne rybosomowych kwasów nukleinowych, *Post. Biochem.*, **19**: 393–422.

- [12] GARRETT R. A., WITTMANN H. G., 1973 — Structure and function of the ribosome, *Endeavour*, **32**: 8–14.
- [13] FORD P. J., SOUTHERN E., PARDUE M. L., BIRNSTIEL M. L., 1972 — The genes for ribosomal RNA, Abstracts of VIII FEBS Meeting, Amsterdam, Nr 490a.
- [14] AVADHANI N. G., BUETOW D. E., 1973 — A proposed role for 5S ribosomal RNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**: 443–451.
- [15] CHLADEK S., 1971 — Possible relationship of peptidyl transferase binding sites, 5S RNA and peptidyl-tRNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**: 695–700.
- [16] DUBE S. K., 1973 — Recognition of tRNA by the ribosome, a possible role of 5S RNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**: 39–42.
- [17] KROON A. M., AGSTERIBBE E., De VRIES H., 1972 — Protein synthesis in mitochondria and chloroplasts, [w] *The mechanism of protein synthesis and its regulation*, red. L. Bosch, North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology, tom 27, s. 539–582.
- [18] NOMURA M., 1973 — Assembly of bacterial ribosomes, *Science*, **179**: 873–874.
- [19] VOYNOW P., KURLAND C. G., 1971 — Stoichiometry of the 30S ribosomal proteins of *E. coli*, *Biochemistry*, **10**: 517–524.
- [20] FUNATSU G., NIERHAUS K., WITTMANN H. G., 1972 — Ribosomal proteins XXXVII. Determination of allele types and amino acid exchanges in protein S12 of three streptomycin-resistant mutants of *E. coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **287**: 282–291.
- [21] DELAUNAY J., MATHIEU C., SCHAPIRA G., 1972 — Eukaryotic ribosomal proteins, *Eur. J. Biochem.*, **31**: 561–564.
- [22] GAMBINO R., METAFORA S., FELICETTI L., RAISMAN J., 1973 — Properties of the ribosomal salt wash from unfertilized and fertilized sea urchin eggs and its effect on natural mRNA translation, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 377–391.
- [23] LOEB J. E., BLAT C., 1970 — Phosphorylation of some rat liver ribosomal proteins and its activation by cyclic AMP, *FEBS Lettr.*, **10**: 105–111.
- [24] KABAT D., 1971 — Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. A cell-free system with ribosomal protein kinase activity, *Biochemistry*, **10**: 197–203.
- [25] MANIER D., SANTHANAM K., WAGLE S. R., 1972 — Studies on the inhibition of amino acid incorporation into protein by isolated rat liver ribosomes by protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**: 1881–1886.
- [26] DELAUNAY J., LOEB J. E., PIERRE M., SCHAPIRA G., 1973 — Mammalian ribosomal proteins: studies on the in vitro phosphorylation patterns of ribosomal proteins from rabbit liver and reticulocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 147–151.
- [27] GAŚSIOR E., GRANKOWSKI N., KUREK E., 1972 — Phosphorylation of bacterial ribosomes, Abstracts of VIII FEBS Meeting, Amsterdam, Nr 508.
- [28] GAŚSIOR W., 1971 — Inicjacja biosyntezy białka u organizmów eukariotycznych, *Post. Biochem.*, **17**: 515–524.
- [29] LUCAS-LENARD J., LIPMANN F., 1971 — Protein biosynthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 409–448.
- [30] RUDLAND P. S., CLARK B. F., 1972 — Polypeptide chain initiation and the role of methionine tRNA, [w] *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch, North Holland Research Monographs Frontiers of Biology, tom 27, North Holland Amsterdam–London, s. 55–86.
- [31] REVEL M., 1972 — Polypeptide chain initiation, the role of ribosomal protein

- factors and ribosomal subunits, [w] *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch, North Holland Research Monographs Frontiers of Biology, tom 27, North Holland, Amsterdam-London, s. 87-132.
- [32] FILIPOWICZ W., ZAGÓRSKI M., 1972 — Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy. II. RNA i jego translacja, *Post. Biochem.*, **18**: 593-617.
- [33] HEYWOOD S. M., 1970 — Specificity of mRNA binding factor in eukaryotes, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **67**: 1782-1788.
- [34] KRUH J., 1972 — RNA and the control of gene expression in animal cells, *Rev. Europ. Etudes Clin. Biol.*, **17**: 739-744.
- [35] HAENNI A. L., 1972 — Polypeptide chain elongation, [w] *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch, North Holland Research Monographs Frontiers of Biology, tom 27, North Holland, Amsterdam-London, s. 33-54.
- [36] PAPPENHEIMER A. M., GILL D. M., 1972 — Inhibition of protein synthesis by activated diphtheria toxin, [w] *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes*, red. E. Munoz, F. Garcia-Fernandez i D. Vazquez, Elsevier, Amsterdam-London-N. York, s. 134-149.
- [37] BEAUDET A. L., CASKEY C.T., 1972 — Polypeptide chain termination, [w] *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch, North Holland Research Monographs Frontiers of Biology, tom 27, North Holland, Amsterdam-London, s. 133-172.
- [38] WILLIAMS G. R., MASER J. A., 1973 — Plant ribosome-bound protein: a fraction from leaves that dissociates bean ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **53**: 52-58.
- [39] PESTKA S., 1971 — Inhibitors of ribosome functions, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 697-710.
- [40] MUNOZ E., GARCIA-FERNANDEZ F., VAZQUEZ D. (red.), 1972 — *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes*, Elsevier, Amsterdam-London-N. York.
- [41] RACZYŃSKA-BOJANOWSKA K., (red.) 1974 — *Monografie Biochemiczne*, w druku.
- [42] CIFERRI O., TIBONI M., 1973 — Different elongation factors for chloroplast and mitochondrial protein synthesis, *Nature New Biol.*, **245**: 209-211.
- [43] MICHEJDA J. W., 1974 — Mitochondrialny DNA i zakres jego działania, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 99-141.
- [44] STRZAŁKA K., WIĘCKOWSKI S., 1974 — Autonomia genetyczna chloroplastów w świetle badań biochemicznych, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 193-219.

Otrzymano: listopad, 1973.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

AUTONOMIA GENETYCZNA CHLOROPLASTÓW W ŚWIETLE BADAŃ BIOCHEMICZNYCH

Kazimierz STRZAŁKA i Stanisław WIĘCKOWSKI

Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Wyniki dotychczasowych badań biochemicznych jak i genetycznych wskazują, że plastydy mogą syntetyzować białko według własnego kodu genetycznego (zawierają DNA, różne formy RNA, polimerazy DNA i RNA, oraz kompletny układ biosyntezy białek). Nie należą one jednak do struktur całkowicie autonomicznych pod względem genetycznym, gdyż znaczna część białek enzymatycznych i strukturalnych tych organelli powstaje na rybosomach 80S zgodnie z informacją zawartą w DNA jądrowym. Pod względem natury kwasów nukleinowych i układu biosyntezy białek plastydy są bardziej podobne do Prokariota niż Eukariota. Wyniki współczesnych badań stoją więc w zgodzie z teorią tłumaczącą pochodzenie chloroplastów od sinic.

W końcu ubiegłego wieku Meyer i Schimper jako pierwsi zaobserwowali, że w czasie podziału komórki dzieli się nie tylko jądro komórkowe, ale także temu procesowi podlegają chloroplasty. Obserwacje te były podstawą do opracowania teorii ciągłości plastydów [1], według której organelle te nie powstają *de novo*, lecz zawsze z sobie podobnych struktur. Ciągłość plastydów stosunkowo łatwo było udowodnić w glonach, zwłaszcza jednokomórkowych, i mchach, natomiast znacznie trudniej w roślinach wyższych. Niemniej udało się wykazać, że zarówno w komórkach merystematycznych, jak również w gametach (głównie żeńskich) i zygotie występują chloroplasty lub ich prekursory (proplastydy, leukoplasty), które ulegają także procesom podziału i wzrostu [2, 3]. Wykazano przy tym, że podziały te poprzedzają lub odbywają się równocześnie z podziałem komórki.

Wykrycie procesu dzielenia się chloroplastów i ich prekursorów w różnych grupach roślin oraz wykazanie możliwości przekazania ich z jednego pokolenia na drugie nie tylko potwierdziło teorię Schimpera,

ale także wskazało na pewną autonomię tych organelli. Bodźcem do podjęcia dalszych badań w tym kierunku było wykrycie mutantów, w których cecha zmutowana nie była przekazywana zgodnie z prawami Mendla (nie zachodziła typowa segregacja i rekombinacja cech), np. Baur [4] stosując krzyżowanie przeciwne różnych ras *Pelargonium zonale*, które różniły się między sobą zawartością chlorofilu w liściach, stwierdził, że cecha ta jest przekazywana głównie przez gamety żeńskie. Wynik ten wskazywał, że w komórkach organizmu potomnego poza genomem powstałym w równej mierze z genomu gamety żeńskiej i męskiej, znajdują się także geny pozajądrowe, wniesione przez komórkę jajową. Podobne obserwacje zostały przeprowadzone na różnych rasach *Mirabilis jalapa* [5], *Antirrhinum majus* [6] i wielu innych [7]. Jeżeli plastydy są przekazywane z jednego pokolenia na drugie przez obie gamety (jak w przypadku roślin z rodzaju *Oenothera*), to wówczas w organizmie potomnych występują komórki mieszane (mixed cells) zawierające plastydy, które pochodzą od obu rodziców. Ten typ komórek łatwo zauważyć w organizmach powstałych ze skrzyżowania ze sobą ras różniących się morfologią chloroplastów. Na przykład dimorfizm chloroplastów wystąpi w komórkach organizmu powstałego ze skrzyżowania dwóch osobników, gdy jeden z nich był mutantem mającym chloroplasty o małych rozmiarach i słabo wykształconym systemie lamellarnym [8, 9].

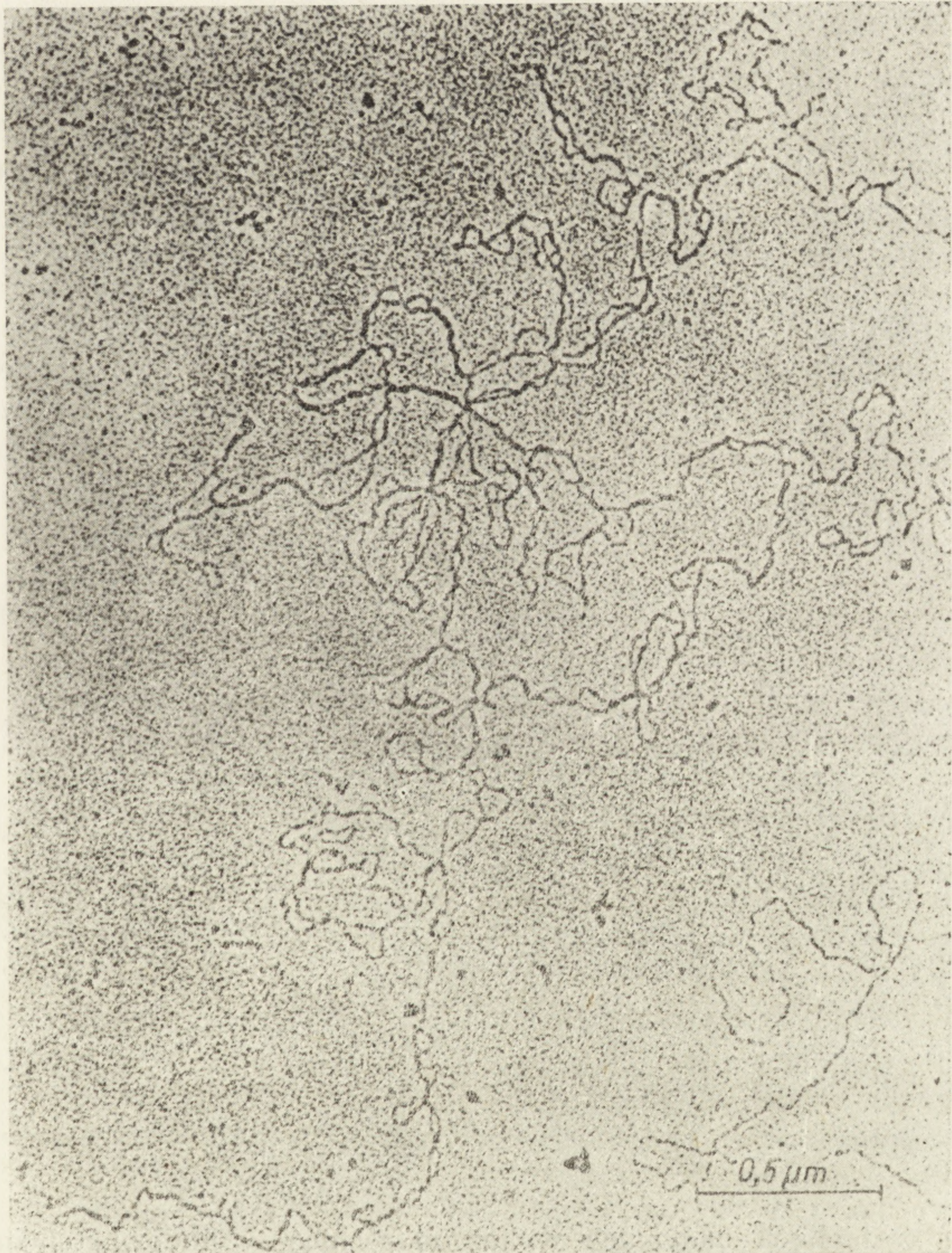
Wykrycie mechanizmu przekazywania informacji genetycznej z jednego pokolenia na drugie oraz chemizmu biosyntezy białek zapoczątkowało także nowy etap w określeniu stopnia autonomii genetycznej chloroplastów.

KWASY NUKLEINOWE CHLOROPLASTÓW

Powszechnie wiadomo, że informacja o I-rzędowej strukturze białek jest zakodowana w kwasie dezoksyrybonukleinowym (DNA) w postaci odpowiedniej sekwencji nukleotydów, a odczytywana jest za pośrednictwem kwasu rybonukleinowego (RNA). Chloroplasty powinny więc zawierać oba rodzaje kwasów jeżeli należą do organelli autonomicznych pod względem genetycznym. Pierwsze dane o występowaniu DNA i RNA w plastydach pochodzą jeszcze z lat pięćdziesiątych. W roku 1951 Chiba stwierdził, że plastydy w liściach *Selaginella savatieri*, *Tradescantia fluminensis* i *Rhoeo discolor* wykazują pozytywną reakcję Feulgena i z zielenią metylową [10]. Podobne wyniki uzyskano badając chloroplasty *Agapanthus umbellatus* [11], *Beta vulgaris* [12] i innych gatunków roślin. Reakcje te nie występowały, jeżeli materiał roślinny potraktowano wcześniej gorącym kwasem trójchlorooctowym lub DNAazą. Za pomocą metod cytochemicznych (pozytywna reakcja z pyroniną) wykryto również

RNA w plastydach [10, 11]. W późniejszych latach obecność kwasów nukleinowych w chloroplastach została potwierdzona za pomocą innych metod, np. autoradiografii, mikroskopii elektronowej, itp.

Za pomocą tych metod stwierdzono, że DNA w chloroplastach występuje w postaci spirali wolnej od histonów. Na elektronogramach preparatów traktowanych octanem uranylu i cieniowanych platyną cząsteczka DNA ma postać sznura [13, 14, 15], który występuje na terenie stromy



Rys. 1. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego silnie poskręcanego kolistego DNA z chloroplastów szpinaku (wg [17]). Całkowita długość cząsteczki — 42 μm , $\times 43\,300$

i może być przyczepiony końcem do błony tylakoidu [14]. Ostatnio Manning i Richards wykryli kolisty DNA (podobny do DNA bakterii) w chloroplastach *E. gracilis* [16] oraz szpinaku i kukurydzy [17] (rys. 1) Według danych Kolodnera i Tewari [18] w chloroplastach liści grochu około 37% DNA występuje w formie kolistej, reszta w formie liniowej. Kowallik i Herrmann [19] stwierdzili, że w każdej chloroplaście *Beta vulgaris* jest kilka regionów (oddzielonych tylakoidami), w których znajdują się oddzielne cząsteczki DNA; każdy region może być więc traktowany jako nukleoid.

Za pomocą wirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu wykazano niejednorodność DNA z komórek liści. Na przykład Chun i wsp. [20] rozdzielili DNA ze szpinaku i buraka na trzy frakcje o gęstościach: 1,695 gcm⁻³ (α), 1,705 gcm⁻³ (β) i 1,719 gcm⁻³ (γ). Badacze ci stwierdzili dalej, że izolowane jądra komórkowe zawierały tylko frakcję α . Natomiast pozostałe dwie frakcje dominowały w DNA izolowanych chloroplastów. Wyciągnięto z tych wyników wniosek, że DNA o gęstości 1,695 występuje w jądrach komórkowych, natomiast o gęstości 1,705 i 1,719 gcm⁻³ w chloroplastach. Wielu innym badaczom udało się również oddzielić za pomocą tej samej techniki DNA jądrowy od plastydowego i wykazać, że obie formy wyizolowane z liści różnych gatunków roślin tworzą frakcje o nieco innych gęstościach, co prawdopodobnie jest związane z gatunkiem rośliny (patrz tab. 1).

TABELA 1. Gęstości i skład zasad DNA chloroplastowego i jądrowego niektórych roślin wyższych (wg [21])

Gatunek rośliny	DNA jądrowy		DNA chloroplastowy	
	gęstość w CsCl (g cm ⁻³)	%GC	gęstość w CsCl (g cm ⁻³)	%GC
Bób	1,695	38,8	1,697	37,8
Rzepa	1,694	37,8	1,695	35,7
Szpinak	1,694	37,8	1,696	36,8
Sałata	1 694	37,8	1,697	37,8
Groszek pachnący	1,695	38,8	1,697	37,8
Tytoń	1,697	40,8	1,700	40,8
Wyżlin	1,689	32,7	1,698	38,8
Fasola	1,697	40,8	1,696	36,7
Burak	1,694	37,8	1,696	37,3
Cebula	1,691	34,7	1,696	37,2
Pszenica	1,702	47,0	1,697	38,4

W następnych badaniach wykazano różnice w budowie chemicznej pomiędzy DNA jądrowym a chloroplastowym, np. DNA chloroplastów nie zawiera 5-metylocytozyny [22, 23], a stosunek adeniny do guaniny jest

większy niż w DNA jądrowym [24, 25]. W porównaniu do DNA jądrowego w DNA plastydowym glonów jednokomórkowych jest względnie większa zawartość adeniny i tyminy. W roślinach wyższych zawartość guaniny i cytozyny w DNA chloroplastowym może być taka sama lub większa niż w DNA jądrowym [26].

Dotychczas otrzymane dane wskazują, że synteza, replikacja i reparacja DNA zachodzą także w plastydach. Włączanie znakowanych trójfosforanów nukleozydów (np. ^3H -tymidyno-5'-trójfosforanu) do DNA obserwowano w izolowanych chloroplastach *Euglena* [27], szpinaku [28] i innych roślin. Potwierdzeniem tego było wykrycie w tych organellach aktywnej polimerazy DNA [29, 30, 28], której produkt działania hybridyzował w 45% z DNA chloroplastowym, a tylko w 7% z DNA jądrowym. Ostatnio Keller i wsp. [31] wyizolowali i dokładniej scharakteryzowali polimerazę DNA z chloroplastów *E. gracilis*. Ze względu na swoje właściwości (np. optymalna aktywność w pH obojętnym i niskim stężeniu jonów Mg^{2+} , większa aktywność w stosunku do DNA zdenaturowanego) przypominała inne polimerazy DNA Eukariota. W stosunku do tych ostatnich cechowała się jednak znacznie większą aktywnością.

Według Gibora [32] synteza i replikacja DNA w chloroplastach *Acetabularia mediterranea* ma zachodzić niezależnie od DNA jądrowego. Natomiast Vanden Driessche i wsp. [33] na podstawie doświadczeń wykonanych na tym samym gatunku, doszli do wniosku, że replikacja DNA w tych organellach jest kontrolowana przez jądro komórkowe, jedynie czynniki odpowiedzialne za tę regulację mają stosunkowo długi okres życia.

Ilość DNA przypadająca na jeden chloroplast jest różna u różnych roślin, ale na ogół mieści się w granicach od 10^{-16} do 10^{-14} g (tab. 2). W porównaniu z ilością przypadającą na jedno jądro komórkowe jest to zawartość mniejsza o kilka rzędów wielkości. Interesujące było stwierdzenie, że ilość DNA w chloroplastach *E. gracilis* jest tego samego rzędu

TABELA 2. Zawartość DNA w plastydach niektórych gatunków roślin (wg [34])

Gatunek rośliny	Metoda oznaczenia	DNA g/plastyd
<i>Acetabularia mediterranea</i>	fluorymetria	1×10^{-16}
	mikroskop elektronowy	do 3×10^{-15}
<i>Vicia faba</i>	metoda dwufenyloaminowa	2×10^{-15}
<i>Euglena gracilis</i>	gradient CsCl	$1,1 \times 10^{-14}$
<i>Chlamydomonas reinhardi</i>	gradient CsCl	8×10^{-15}
<i>Chlamydomonas reinhardi</i>	gradient CsCl	1×10^{-14}
<i>Nicotiana glutinosa</i>	gradient CsCl	$4,7 \times 10^{-15}$
<i>Euglena gracilis</i>	gradient CsCl	$1,2 \times 10^{-15}$

co w komórce sinicy *Anabaena variabilis* [35]. Obliczano, że ilość DNA przypadająca na jeden chloroplast może stanowić kod genetyczny dla syntezy 150–15 000 różnych białek o przeciętnym ciężarze cząsteczkowym 20 000. Przyjmuje się jednak, że w organellach tych istnieje od kilku do kilkunastu odcinków o takiej samej sekwencji zasad. Na przykład Wells i Birnstiel [36], badając kinetykę renaturacji obliczyli, że chloroplasty sałaty zawierają DNA o łącznej długości 1000 μm , o powtarzających się odcinkach długości 1,5 i 60 μm . Natomiast w każdym chloroplastie *Ch. reinhardi* ma istnieć około 25 podobnych kopii DNA [37], każda wielkości $1-10 \times 10^6$ daltonów. Chloroplasty należy więc uważać za pewnego rodzaju poliploidy [38]. Ponadto wykazano, że nie cały DNA plastydowy jest dostępny dla procesu transkrypcji; według Whitfelda i wsp. [39] jedynie około 40% może uczestniczyć w tym procesie.

Jeżeli uwzględni się istnienie kilkunastu powtarzających się kopii DNA oraz nieaktywnych w procesie transkrypcji odcinków nici, to i tak ta pozostała część wystarczy na zakodowanie informacji o strukturze 100–1000 różnych białek, co znaczy, że potencjalnie każde białko występujące w chloroplastach może być kodowane przez DNA zlokalizowany w tych organellach.

Występowanie kwasu rybonukleinowego w chloroplastach nie budzi dzisiaj również żadnych wątpliwości. Stwierdzono, że w liściach występuje około 140–157 μg RNA/mg chlorofilu, z tego około 14–29% przypada na RNA plastydowy [40, 41]. Główną część tego kwasu stanowią dwie formy RNA rybosomowego: 16S (ciężar cząsteczkowy $0,56 \times 10^6$) i 23S (ciężar cząsteczkowy $1,1 \times 10^6$). Obecność innych form RNA trudniej jest udowodnić, gdyż występują one w znacznie mniejszych ilościach. Ponadto wykazano, że rRNA o większej masie ulega łatwo dysocjacji (na skutek zaniku II-rzędowej struktury) w temperaturze pokojowej i w nieobecności Mg^{2+} [42]. Niemniej udało się wykazać, że chloroplasty zawierają jeszcze inne formy RNA, np. Galling i Jordan [43] opisali 5S rRNA, który swoim składem nukleotydów różnił się od 5S rRNA rybosomów 80S. Różne tRNA wykryto w chloroplastach fasoli [44], grochu [45] i innych roślin. tRNA tych organelli ma się różnić budową od analogicznych form kwasów nukleinowych występujących w innych przedziałach komórkowych i wykazywać specyficzność wobec plastydowych syntetaz aminocylo-tRNA [46, 47, 48]. Trudniej jeszcze jest udowodnić istnienie mRNA. Pewnego rodzaju dowodem pośrednim może być wykrycie polirybosomów w chloroplastach *Acetabularia* [49].

Syntezę RNA, którą katalizuje m. in. polimeraza RNA zależna od DNA plastydowego [50, 51] stwierdzono w izolowanych chloroplastach z różnych gatunków roślin [52–57, 30]. W etioplastach kukurydzy występuje prawdopodobnie kilka polimeraz RNA, których aktywność wzrasta po

oświetleniu roślin etiolowanych [34, 58]. Joussaume [59] wyizolowała z chloroplastów grochu dwie formy polimerazy RNA zależnej od DNA. Jedna z nich ma być związana z błonami tylakoidów i może odczytywać zarówno DNA jądrowy jak i chloroplastowy. Natomiast druga forma występująca w stromie wykazuje specyficzność względem DNA plastydowego; ma ona odgrywać, zdaniem autorki, pewną rolę w systemie regulującym kontrolę jądra nad chloroplastami (rys. 2). O istnieniu w plastydach dwóch różnych polimeraz RNA, różniących się między innymi wrażliwością na działanie antybiotyków z grupy rifampicyn oraz jonów Mg^{2+} i Mn^{2+} donieśli wcześniej Bogorad i Woodcock [60].

Interesujące było stwierdzenie, że egzogeny DNA stymulował włączanie trójfosforanów nukleozydów w RNA chloroplastów szpinaku i grochu [15]. Jednakże nie był on w tym przypadku matrycą dla transkrypcji, ale działał zapewne w sposób podobny do działania innych związków o charakterze polianionów, jak np. heparyna czy RNA wirusowy. Związki te powodują prawdopodobnie oddysocjowanie DNA od błon, przez co transkrypcja może zachodzić na dodatkowych odcinkach DNA.

Dość przekonujące dowody na obecność syntezy RNA wewnątrz chloroplastów uzyskała Gibbs [61]. Wykazała ona metodą radioautografii w mikroskopie elektronowym, że znakowana trytem urydyna była włączana do RNA w tych miejscach chloroplastu *Ochromonas danica*, gdzie zlokalizowany był DNA. Po 2 godzinach inkorporacji radioaktywność rozproszona była w całej stromie, natomiast nie można było jej wykryć w innych przedziałach komórki, co może świadczyć o tym, że RNA był syntetyzowany wewnątrz chloroplastu, mając DNA tych organelli jako matrycę.

Aczkolwiek synteza RNA w plastydach wydaje się być rzeczą udowodnioną, nie ma jednak pewności czy dotyczy to w równej mierze wszystkich jego rodzajów, np. synteza mRNA oparta na DNA plastydowym nie została do tej pory całkowicie udowodniona. Aktywność matrycową plastydowego RNA, jaką wykazano w układach bezkomórkowych w obecności bakteryjnego systemu syntezy białka [62], niekoniecznie trzeba wiązać z istnieniem chloroplastowego mRNA; w translacji mogły uczestniczyć fragmenty rozbitego rybosomowego RNA.

Wykazano, że niektóre rodzaje tRNA powstają na matrycy DNA plastydowego [47, 63]. Na podstawie doświadczeń z hybrydyzacją DNA chloroplastów szpinaku stwierdzono, że w organellach tych może być zawarty kod dla około 30 różnych tRNA [64].

Obecnie powszechnie przyjmuje się, że również synteza rRNA plastydów zachodzi na podstawie informacji zawartej w DNA tych organelli [65, 61]. Rawson i Haselkorn [66], izolując DNA z chloroplastów *E. gracilis* w gradiencie gęstości chlorku cezu, otrzymali oprócz głównego pasma

w gęstości 1,686 także drugie słabe w gęstości 1,700 gcm⁻³. To drugie pasmo ma stanowić DNA satelitarny, łatwo oddzielający się od „chromosomu”, zawierający geny dla plastydowego rRNA. Jeden komplet genów kodujących rRNA ma przypadać na każdą jednostkę DNA wielkości 90×10^6 daltonów. Zdaniem Surzyckiego i Rochaix [67] geny te występują w tandemach tworzących jednostki transkrypcyjne; każdy tandem ma zawierać 2 lub 3 pary genów kodujących 16 i 23S rRNA.

Synteza rRNA plastydów u niektórych gatunków roślin jest zależna od światła [68, 69]; natomiast u wielu innych zależność ta nie występuje. Badając syntezę rRNA w synchronicznych kulturach *Ch. reinhardi* stwierdzono [70], że poziom tej formy RNA w cytoplazmie wzrasta liniowo podczas całej fazy G₁, natomiast takiej zależności nie udało się wykazać w akumulacji chloroplastowego rRNA. Pewne różnice w metabolizmie tych kwasów stwierdzono również podczas fazy S. Otrzymane wyniki wskazują na istnienie odrębnych mechanizmów kontroli syntezy rRNA w tych dwóch przedziałach komórki.

PLASTYDOWY APARAT BIOSYNTETY BIAŁEK

W poprzednim rozdziale wykazano, że w plastydach występuje DNA i różne formy RNA. Przytoczono również prace z których wynika, że synteza przynajmniej niektórych typów kwasów nukleinowych odbywa się na miejscu. Należy postawić pytanie, czy w plastydach istnieją warunki do syntezy białek?

Wiadomo, że w biosyntezie białek na terenie cytoplazmy uczestniczą rybosomy, na których zachodzi, pod wpływem odpowiednich syntetaz, powstawanie łańcuchów polipeptydowych na podstawie informacji zawartej w mRNA [70a]. Należałoby oczekiwać, że podobny aparat funkcjonuje wewnątrz plastydów. Rybosomy w chloroplastach zostały po raz pierwszy opisane przez Lyttletona w roku 1962 [71]. Okazało się później, że w tych organellach może być zlokalizowanych około 30% wszystkich rybosomów liścia [72]. Bardzo intensywne badania prowadzone w następnych latach doprowadziły do poznania struktury rybosomów plastydowych i mechanizmu syntezy łańcuchów polipeptydowych. Okazało się przy tym, że rybosomy plastydów należą do typu 70S i przez to wykazują wiele cech podobnych do rybosomów Prokariota (dysocjują na podjednostki 50 i 30S, wymagają większego niż rybosomy 80S stężenia jonów Mg²⁺ dla zachowania integralności, mając rRNA o tych samych rozmiarach, reagują na te same antybiotyki), (tab. 3). Stwierdzono również, że rRNA ulega w takim samym stopniu metylacji jak rRNA bakterii [73]. Nie oznacza to jednak, że poszczególne elementy systemu syntezy białek w chloroplastach są identyczne, jak np. w komórkach bakterii. Między

TABELA 3. Porównanie niektórych właściwości aparatu biosyntezy białek chloroplastów, komórek Prokariota i komórek Eukariota

Składnik lub typ reakcji	Chloroplasty	Komórki Prokariota	Komórki Eukariota
DNA	występuje w stromie, wolny od histonów	występuje w cytozolu, wolny od histonów	występuje w jądrze komórkowym w połączeniu z histonami
	występuje w połączeniu z błonami	występuje w połączeniu z błonami	występuje w połączeniu z białkami chromatynowymi
Zawartość DNA	$10^{-16} - 10^{-14}$ g	3×10^{-15} g (<i>E. coli</i>)	$0,55 \times 10^{-11} - 31 \times 10^{-11}$ g (diploidalne jądro rośliny wyższej)
Rybosomowy RNA	16S i 23S	16S i 23S	18S i 25S
Rybosomy	70S	70S	80S
Inicjujący tRNA	N-formylometionylo-tRNA	N-formylometionylo-tRNA	metionylo-tRNA
Wrażliwość na inhibitory			
a) transkrypcji			
rifampicyna	wrażliwe	wrażliwe	niewrażliwe
b) translacji			
chloramfenikol	wrażliwe	wrażliwe	niewrażliwe
linkomycyna	wrażliwe	wrażliwe	niewrażliwe
aktidion	niewrażliwe	niewrażliwe	wrażliwe
Hybrydyzacja podjednostek rybosomowych	tworzą aktywne hybrydy z podjednostkami rybosomów Prokariota	tworzą aktywne hybrydy z podjednostkami rybosomów chloroplastów	nie tworzą aktywnych hybrydów z podjednostkami chloroplastów i Prokariota

innymi wykryto znaczne różnice we właściwościach białek rybosomowych [74]. Trzeba jednak podkreślić, że zachodzą istotniejsze różnice między naturą białek rybosomów 80S i rybosomów 70S; dotyczy to zarówno białek kwaśnych [75], jak również zasadowych [76]. Obrazy elektroforetyczne białek obu typów rybosomów zależą także w pewnej mierze od stopnia rozwoju ewolucyjnego organizmu [77].

Rybosomy występują na terenie stromy w postaci wolnej lub polirybosomów [78–81]. Część z nich jest także przyczepiona do błon tylakoidów; te ostatnie mają być zaangażowane w biosyntezie innych polipeptydów niż rybosomy wolne [82, 83].

Dotychczas opisano tylko nieliczne rośliny, które zawierały chloroplasty pozbawione rybosomów. Na przykład ten typ plastydów znaleziono w mutancie *Pelargonium zonale* [84]; organelle takie były zdolne do po-

działu (zachodziła w nich także replikacja DNA), ale nie osiągały pełnych rozmiarów i normalnego zróżnicowania.

Poza rybosomami na terenie chloroplastów wykryto również syntetazy aminoacylo-tRNA [47], które, jak wiadomo, są odpowiedzialne za aktywowanie aminokwasów i łączenie ich z właściwymi tRNA. Wykazano, że syntetazy te charakteryzują się dużą specyficznością w stosunku do tRNA chloroplastowego. Interesującym faktem o znaczeniu ewolucyjnym było stwierdzenie, że syntetazy aminoacylo-tRNA z *E. coli* wykazują większe powinowactwo do tRNA z chloroplastów niż z cytoplazmy roślin wyższych [85].

Biosynteza polipeptydów została bezpośrednio udowodniona metodą pomiaru włączania znakowanych aminokwasów do frakcji białkowej plastydów. Na przykład Margulies [86] wykazał, że izolowane chloroplasty fasoli włączały radioaktywną leucynę do karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy. Również Ranaletti i wsp. [87] opisali włączanie znakowanych aminokwasów w ATPazę zależną od wapnia w plastydach wyizolowanych z liści fasoli. O włączaniu znakowanych aminokwasów w białka przez izolowane chloroplasty donosiło także wielu innych autorów [79, 88, 62]. Jednakże liniową inkorporację udało się najczęściej utrzymać tylko przez pierwszych kilka minut po wyizolowaniu tych organelli. Po tym czasie zachodzi znaczna destrukcja plastydów i wzrasta możliwość zakażenia bakteriami. Stosunkowo dobrym obiektem do tego typu badań okazały się chloroplasty *Acetabularia mediterranea*. Komórka tego glonu ma znaczne rozmiary i łatwo można oddzielić fragment zawierający jądro od fragmentu zawierającego chloroplasty. Ponadto stwierdzono, że chloroplasty *Acetabularia* mają otoczkę, która jest względnie oporna na uszkodzenia mechaniczne i działanie wielu czynników chemicznych (np. detergenty). Goffeau i Brachet [89] stwierdzili, że chloroplasty izolowane z enukleowanych komórek *Acetabularia* włączają intensywnie znakowane aminokwasy w białko nawet przez godzinę. Radioaktywność ta pojawiała się w białkach strukturalnych i enzymatycznych błon tylakoidów oraz we frakcji białek rozpuszczalnych [90]; około 60% radioaktywności znajdowało się we frakcji membran i około 36% we frakcji rozpuszczalnej. Wyniki uzyskane na chloroplastach wyizolowanych w 1 dzień po enukleacji były identyczne jak w przypadku chloroplastów wyizolowanych po 25, a nawet 31 dniach po enukleacji. Fakt ten wyklucza, zdaniem autorów, udział czynnika jądrowego, nawet długo żyjącego w syntezie przynajmniej części białek chloroplastów.

Radioaktywność odnajduje się w białkach również wówczas, gdy izolowane chloroplasty oświetla się w atmosferze zawierającej $^{14}\text{CO}_2$ [91]. Oznacza to, że w organellach tych zachodzi nie tylko synteza białek z gotowych aminokwasów, ale także same aminokwasy są w nich syntetyzowane.

Ostatnio udało się opracować metodę izolowania aktywnych fizjologicznie chloroplastów z komórek *Euglena* [92]; liniowa inkorporacja znakowanych aminokwasów utrzymywała się w tym przypadku w ciągu 45 min. od chwili wyizolowania. Wyniki te wskazywały, że na rybosomach chloroplastowych zachodzi synteza białek o różnej wielkości cząsteczki: od polipeptydów o masie cząsteczkowej mniejszej niż 10 000 do białka o masie cząsteczkowej około 600 000 (to ostatnie odpowiada masie cząsteczkowej karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy), przy czym najczęściej były znakowane białka o masie 15 000 do 40 000 daltonów.

Synteza białek w chloroplastach jest regulowana światłem, np. Hearing [93] stwierdził, że po oświetleniu wyizolowanych etioplastów kukurydzy zwiększa się nie tylko ogólna pula białek, ale zaczynają powstawać nowe, charakterystyczne tylko dla chloroplastów.

ROLA GENOMU I RYBOSOMÓW TYPU 80S W SYNTEZIE BIAŁEK PLASTYDOWYCH

Przedstawione fakty nie wskazują jeszcze na to, że wszystkie białka występujące w chloroplastach muszą być syntetyzowane w tych organelach opierając się na własnym materiale genetycznym. Opisano bardzo wiele mutantów chloroplastowych, w których cecha zmutowana ulegała dziedziczeniu zgodnie z prawami Mendla, co wskazywałoby, że mutacja musiała zajść w genomie. W ten sposób wykazano, że na przykład ostatnie etapy biosyntezy chlorofilu, karotenoidów i wielu nośników elektronów w fotosyntezie są pod genetyczną kontrolą jądra komórkowego [7]. Von Wettstein i wsp. [94, 151] wykryli w jęczmieniu 86 genów jądrowych kontrolujących syntezę określonych białek plastydowych.

Wyniki badań genetycznych już więc sugerowały, że albo część białek plastydowych jest syntetyzowana na rybosomach 80S w cytoplazmie na podstawie informacji zawartej w DNA jądrowym, albo niektóre rodzaje mRNA powstałe na DNA jądrowym, dostają się do chloroplastu i wchodzi w proces translacji na rybosomach chloroplastowych [95]. Omawiane zagadnienie nie jest jeszcze całkowicie rozwiązane, niemniej wiele cennych informacji uzyskano już po wprowadzeniu do badań antybiotyków selektywnie blokujących określone etapy biosyntezy kwasów nukleinowych lub białek. Spośród bardzo długiej listy tego typu inhibitorów (patrz [7]) szczególnie cztery okazały się pożyteczne w tych badaniach: chloramfenikol (chloromycetyna), cykloheksimid (aktidion), aktynomycyna D, oraz rifampicyna. Pierwszy z wymienionych hamuje proces translacji tylko na rybosomach 70S, drugi tylko na rybosomach 80S. Aktynomycyna D jest inhibitorem transkrypcji we wszystkich przedziałach komórkowych, natomiast rifampicyna hamuje proces transkrypcji wewnątrz plastydów.

TABELA 4. Miejsca transkrypcji i tran-

Składnik chloroplastu	Miejsce transkrypcji	Miejsce translacji	Gatunek rośliny	Autor
RNA rybosomowy (5S, 16S, 23S)	chloroplast		<i>E. gracilis</i> <i>Ch. reinhardi</i>	65, 129, 130
Niektóre białka rybosomowe	chloroplast	chloroplast	<i>Ch. reinhardi</i> <i>Ochromonas danica</i> , tytoń	131, 132, 133, 134, 111,
Inne białka rybosomowe	jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i> <i>A. mediterranea</i>	109, 112, 131, 135,
RNA	chloroplast		groch, fasola	141, 63
Niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA (np. izolecylo-tRNA)	prawdopodobnie chloroplast	prawdopodobnie chloroplast	<i>E. gracilis</i>	144,
Inne syntetazy aminoacylo-tRNA (np. fenyloalanino-tRNA)	jądro	cytoplazma	<i>E. gracilis</i>	144
Polimeraza DNA	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i> <i>E. gracilis</i>	113, 114
Polimeraza RNA zależna od DNA	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i>	130
Zewnętrzna otoczka chloroplastu		cytoplazma	jęczmień	137
Niektóre białka lamellarne		chloroplast	<i>Vicia faba</i> , kukurydza, <i>Antirrhinum majus</i> , groch, <i>Ch. reinhardi</i> , tytoń, <i>Ochromonas danica</i>	136, 93, 101, 147, 104, 134, 148
Jeden z głównych polipeptydów błon tylakoidów, białko L	jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i>	145, 152, 108
Niektóre białka błon chloroplastów	jądro	chloroplast	<i>Ch. reinhardi</i>	95
Niektóre białka związane z błonami		chloroplast	groch	72
Białko odpowiedzialne za fuzję lamell		chloroplast	<i>E. gracilis</i>	146
Niektóre białka fotosystemu I	prawdopodobnie chloroplast	chloroplast	<i>Vicia faba</i> , tytoń, <i>Antirrhinum majus</i>	105, 143, 102, 103
Niektóre białka fotosystemu II		cytoplazma	<i>Vicia faba</i>	103

slacji niektórych składników chloroplastów

Składnik chloroplastu	Miejsce transkrypcji	Miejsce translacji	Gatunek rośliny	Autor
Czynnik Q związany z fotosystemem II		chloroplast	<i>Ch. reinhardi</i>	140
Ferredoksyna		prawdopodobnie chloroplast	szpinak	141
Ferredoksyna	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i>	130
Reduktaza ferredoksyna-NADP	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i>	130
Cytochrom 559	prawdopodobnie jądro	chloroplast	<i>Ch. reinhardi</i>	140
Cytochrom <i>b</i> -559 _{LP}		prawdopodobnie chloroplast	fasola	150
Cytochrom <i>b</i> -563	chloroplast	chloroplast i cytoplazma	fasola, <i>Ch. reinhardi</i>	150, 148, 130
Cytochrom 553	jądro i chloroplast	chloroplast	<i>Ch. reinhardi</i>	148, 130
Cytochrom <i>f</i>		prawdopodobnie chloroplast	fasola	150
Alkaliczna DNAaza	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>E. gracilis</i>	149
ATPaza		chloroplast i cytoplazma	fasola	100
Dehydrogenaza jabłczanowa	jądro		<i>A. mediterranea</i>	142
Dehydrogenaza mleczanowa	jądro		<i>A. mediterranea</i>	142
Dehydrogenaza NADP-aldehyd fosfoglicerynowy	jądro	cytoplazma	<i>E. gracilis</i>	139
Mała podjednostka karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy	jądro	cytoplazma	jęczmień, groch, tytoń	138, 97, 99, 98
Duża podjednostka karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy	chloroplast	chloroplast	jęczmień, groch, tytoń	138, 97, 96, 98
Fosforybulokinaza	prawdopodobnie jądro	cytoplazma	<i>Ch. reinhardi</i>	130

Blokując biosyntezę kwasów nukleinowych lub polipeptydów tylko w określonych przedziałach komórki można było stwierdzić, że duża część białek chloroplastów powstaje na rybosomach 80S, według kodu genetycznego zawartego w jądrze komórkowym. Na przykład duża podjednostka karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy, enzymu kluczowego w fotosyntetycznym wiązaniu CO₂, jest kodowana przez DNA chloroplastowy [96] i syntetyzowana na rybosomach tych organelli [97, 98], natomiast mała podjednostka powstaje poza chloroplastami na podstawie informacji z jądra komórkowego [99]. Zatem w produkcji karboksylazy 1,5-dwufosforybulozy zaangażowane są dwa systemy syntezy białka: chloroplastowy i pozachloroplastowy, przypuszczalnie oba systemy partycypują również w syntezie ATPazy [100] i białek lamellarnych [101, 102]. Zwłaszcza wiele białek wchodzących w skład fotosystemu II ma powstawać na rybosomach 80S [103] zgodnie z informacją zawartą w DNA jądrowym [104], natomiast białka fotosystemu I są kodowane przez DNA plastydowy [105].

Cenne informacje uzyskano badając wpływ chloramfenikolu i aktidionu na powstawanie białek lamellarnych w mutancie *Chlamydomonas reinhardi* y-1 [106, 107]. Mutant ten hodowany w ciemności na pożywce z octanem jako źródłem węgla zawierał chloroplasty, które nie miały jednak typowego systemu lamellarnego. Po oświetleniu takiej kultury synteza barwników fotosyntetycznych, lipidów i białek znacznie wzrastała. Porównując wzory elektroforetyczne nie stwierdzono dużych różnic między białkami wyekstrahowanymi z komórek hodowanych w ciemności, a białkami wyekstrahowanymi z komórek hodowanych w świetle. Próba pochodząca z komórek z wykształconymi normalnie chloroplastami (kultura ze światła) miała jedynie dodatkowo silny prążek; to dodatkowe białko oznaczono jako białko L [108]. Po oświetleniu kultury ilość białka L wzrastała równolegle do ilości chlorofilu co wskazywało, że wchodzi ono w skład lamell. Chloramfenikol, choć hamuje stopień rozbudowy systemu lamellarnego, nie hamował powstawania białka L. Natomiast jego synteza była zatrzymana przez aktidion. Z tych doświadczeń również wynika, że część białek budujących lamelle powstaje na rybosomach 80S, a część na rybosomach 70S wewnątrz chloroplastów.

Przeprowadzono także badania nad miejscem biosyntezy poszczególnych białek wchodzących w skład rybosomów plastydowych. Na przykład Kloppstech i Schweiger [109] badali wpływ transplantacji jąder komórkowych między pięcioma gatunkami *Acetabularia* na obrazy elektroforetyczne białek rybosomów plastydowych. Mogli oni w ten sposób stwierdzić, że przynajmniej część tych białek jest kodowana przez DNA jądrowy. Istnieją także doniesienia, że część białek mniejszej podjednostki

rybosomów 70S powstaje wewnątrz plastydów na matrycy DNA plastydowego [110], białka wchodzące w skład dużej podjednostki mają powstawać na podstawie informacji zawartej w DNA jądrowym [111] na rybosomach 80S [112].

Jak wykazały badania wykonane na komórkach *Chlamydomonas reinhardi*, polimerazy DNA i RNA są kodowane przez geny jądrowe, a syntetyzowane są na rybosomach 80S [113, 114].

Znane miejsca transkrypcji i translacji białek plastydowych zestawiono w tabeli 4.

UWAGI OGÓLNE

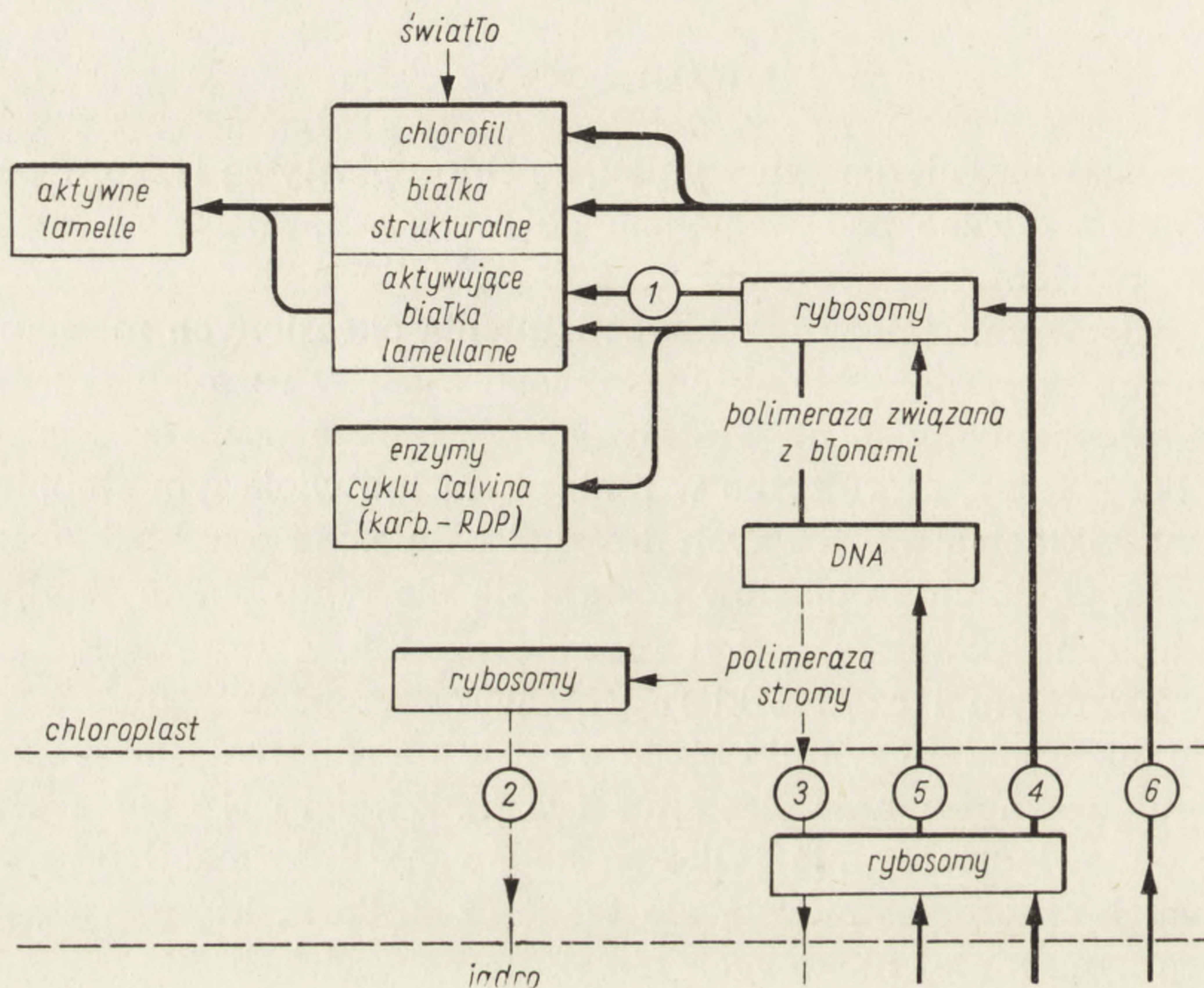
Z przedstawionych danych wynika, że chloroplasty są tylko w pewnym stopniu autonomiczne pod względem genetycznym, znaczna część białek powstaje bowiem na rybosomach 80S zgodnie z informacją zawartą w DNA jądrowym. Należy oczekiwać istnienia określonych mechanizmów regulujących biosyntezę białek chloroplastowych w różnych przedziałach komórki. Mechanizmy te nie zostały jednak jeszcze poznane. Zaproponowano kilka hipotez, które tylko w mniejszym lub większym stopniu opierają się na faktach stwierdzonych doświadczalnie. Na przykład Joussaume [59], uważa, że do chloroplastów dostają się nie tylko białka strukturalne i enzymatyczne powstałe w cytoplazmie zgodnie z informacją zawartą w DNA jądrowym i cząsteczki mRNA wytworzone w jądrze komórkowym, ale także jakieś czynniki białkowe zależne od DNA jądrowego, które mają regulować aktywność plastomu (rys. 2). Z kolei DNA chloroplastowy ma być odpowiedzialny nie tylko za kodowanie informacji o strukturze części białek chloroplastowych, ale także czynników, które wpływają na syntezę przynajmniej niektórych białek na rybosomach 80S.

Według Vanden Driessche i wsp. [33] replikacja DNA plastydowego ma zależeć od aktywności genomu. Od ilości DNA w jądrze komórkowym ma zależeć liczba chloroplastów w komórce [115]. Według Stubbe [3] od wzajemnego oddziaływania genom-plastom zależy tempo podziału plastydów, podział komórki, wzrost blaszki liściowej, kształt ziarn pyłku oraz wzrost łagiewki pyłkowej.

Czy w świetle przedstawionych faktów można uważać kwestię pochodzenia chloroplastów za wyjaśnioną? Jak wiadomo po raz pierwszy Mereszkowsky [116] wysunął hipotezę o symbiotycznym pochodzeniu chloroplastów. Uważał on, że w roślinach wyższych i w większości glonów chloroplasty są endosymbiontami, które w ciągu ewolucji utraciły swoją samodzielność, podobnie jak to miało być z mitochondriami [116a]. Wszystkie do tej pory otrzymane fakty nie przeczą tej hipotezie, a raczej ją popierają (por. tab. 3). Natura DNA, RNA rybosomów, syntetaz amino-

acylo-tRNA tych organelli jest zbliżona do natury analogicznych związków występujących w komórkach Prokariota. Ponadto w chloroplastach, podobnie jak w komórkach Prokariota kompleksem inicjującym syntezę łańcucha polipeptydowego jest N-formylmetionyno-tRNA, a nie metionyno-tRNA, jak w przypadku inicjacji syntezy łańcuchów polipeptydowych w cytoplazmie komórek Eukariota [117].

Dodatkowym argumentem, przemawiającym za pochodzeniem chloroplastów od Prokariota, mogą być wyniki badań nad hybrydyzacją podjedno-



Rys. 2. Schemat obrazujący współdziałanie genomu i plastomu w biosyntezie białek chloroplastów (wg [59], z uwzględnieniem roli dwóch form plastydowej polimerazy RNA

KONTROLA PLASTYDOWA

a) synteza na rybosomach chloroplastowych: 1 — aktywujące białka lamellarne (łańcuch transportu elektronów), zaangażowana polimeraza RNA związana z błonami; 2 — białka oddziałujące na DNA jądrowy, zaangażowana polimeraza RNA stromy;

b) synteza na rybosomach cytoplazmatycznych: 3 — białka oddziałujące na DNA jądrowy, zaangażowana polimeraza RNA stromy.

KONTROLA JĄDROWA

a) synteza na rybosomach cytoplazmatycznych: 4 — białka pozwalające na tworzenie błon tylakoidów (białka strukturalne) i chlorofilu; 5 — białka oddziałujące na DNA plastydowy, umożliwiające działanie polimerazy RNA związanej z błonami.

b) synteza na rybosomach chloroplastowych: 6 — aktywujące białka lamellarne (łańcuch transportu elektronów) i enzymy cyklu Calvina (karboksylaza 1,5-dwufosforybulozy = karb.-RDP).

stek rybosomów. Wiadomo, że zmniejszając stężenie Mg^{2+} w środowisku można odwracalnie zdysocjować rybosomy na podjednostki. Ponowne asocjaty są dalej aktywne w biosyntezie peptydów. Wykazano, że w układzie *in vitro* powstają aktywne biochemicznie asocjaty z połączenia podjednostki 50S z chloroplastów z podjednostką 30S z *E. coli*, tzn. na takich sztucznych asocjatach w układzie *in vitro* zachodzi synteza peptydu zbudowanego z alaniny w obecności syntetycznego polinukleotydu urydylowego jako matrycy [118, 119].

Chloroplasty należy więc uważać za organizmy prokariotyczne, które po dostaniu się do komórki organizmu eukariotycznego uległy mutacjom biochemicznym, dzięki czemu wiele szlaków metabolicznych w ogóle nie funkcjonuje, natomiast inne mogą funkcjonować tylko dzięki dostarczeniu odpowiednich metabolitów przez komórkę gospodarza. Defekty w wielu szlakach metabolicznych doprowadziły do kompletnego uzależnienia rozwoju plastydów od komórki „gospodarza”; chloroplasty wyizolowane z komórki nie są zdolne do normalnego rozwoju nawet na dość złożonej pożywce [120].

Pewne światło na pochodzenie chloroplastów mogą rzucić, między innymi, badania nad naturą symbiozy pomiędzy komórką auto- i heterotroficzną w takich organizmach jak np. porosty (symbioza grzyba i zielonego glonu jednokomórkowego z rodzaju *Chlorella*) lub *Paramecium* (endosymbioza komórki heterotroficznej z komórką *Chlorella*).

Interesujące badania nad wzajemną współzależnością rozwoju dwóch partnerów w komórce *Paramecium bursaria* przeprowadził Pado [121]. Stwierdził, że po wyizolowaniu komórki glonu bardzo szybko giną w kulturach na powszechnie stosowanych pożywkach; mogą one normalnie rozwijać się tylko wówczas, gdy do pożywki doda się tiaminy. Rasy *Chlorella* żyjące w komórce *Paramecium* są więc mutantami biochemicznymi niezdolnymi do produkcji tej witaminy; składnik ten musi być więc dostarczony wraz z solami mineralnymi przez komórkę gospodarza. Pado [122] stwierdził również, że komórka gospodarza może regulować podziały i wzrost współżyjących z nią glonów: w każdej komórce *Paramecium* występuje znaczna liczba glonów w warunkach korzystnych dla fotosyntezy. Natomiast liczba ta jest w dużym stopniu zredukowana w warunkach niekorzystnych dla fotosyntezy, tzn. wówczas gdy glon żyje nie jako symbiont, ale pasożyt.

Przytoczony przykład symbiozy mówi tylko o możliwości współżycia komórki (czy zespołu komórek) auto- i heterotroficznej, natomiast niewiele o symbiotycznym pochodzeniu chloroplastów. Na pochodzenie chloroplastów mogą rzucić światło badania endosymbiozy między autotroficzną komórką Prokariota (komórka otoczona pojedynczą błoną, brak wyróżnicowanych chloroplastów) a komórką heterotroficzną prymityw-

nych Eukariota. Większość badaczy uważa, że nie bakterie zdolne do fotosyntezy, ale sinice mogłyby być „przodkami” dzisiejszych chloroplastów. Sinice te przypuszczalnie dostały się do wnętrza komórki poprzez fagocytozę; błona wewnętrzna osłonki chloroplastu byłaby więc plazmolemmą endosymbionta, natomiast zewnętrzna — fragmentem plazmolemmy komórki gospodarza. Do tej pory wykryto jednak niewiele organizmów, w których można byłoby doszukiwać się pośrednich etapów ewolucji plastydów. Jednym z lepiej poznanych przykładów jest *Geosiphon* [123, 124] — asocjacja grzyba z sinicą z rodzaju *Nostoc*. *Nostoc* dostaje się do komórki grzyba przypuszczalnie w procesie fagocytozy. Po rozdzieleniu oba symbionty doskonale rozwijają się, jeżeli tylko w podłożu znajdują potrzebne im do życia składniki.

Innymi przykładami są jednokomórkowe glony z rodzaju *Glaucocystis* i *Cyanophora*, o nieustalonej jeszcze przynależności systematycznej. Występujące na terenie ich cytoplazmy organelle zwane cyjanellami są uważane przez jednych badaczy [125, 126] za endosymbiotyczne, uproszczone w swojej budowie komórki sinic (w otoczce cyjanelli można dostrzec się szczątków ściany komórkowej, oraz stosunek G:C w DNA tych organelli jest taki sam jak w niektórych sinicach), a przez innych [127, 128] tylko za chloroplasty będące na wcześniejszym etapie ewolucyjnego różnicowania się. Zdaniem tej drugiej grupy badaczy cyjanelle pod względem struktury i składu chemicznego przypominają nie sinice ale chloroplasty prymitywnych krasnorostów (zawierają fikobiliny podobne do fikobilin krasnorostów, nie zawierają echinenonu i myksoksantyny — barwników charakterystycznych dla sinic, nie zawierają również kwasu dwuaminopimelinowego, charakterystycznego składnika ścian komórek bakterii i sinic).

LITERATURA

- [1] SCHIMPER A. T. W., 1885 — Untersuchungen über die Chlorophylkörner und die ihnen homologen Gebilde, *Jb. wiss. Botan.*, **16**: 1–247.
- [2] FREY-WYSSLING A., MÜHLETHALER K., 1965 — *Ultrastructural Plant Cytology*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, London, New York.
- [3] STUBBE W., 1971 — Origin and continuity of plastids, [w] *Origin and Continuity of Cell Organelles*, red. J. Reinert, H. Ursprung, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, s. 65–81.
- [4] BAUR E., 1909 — Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der „Varietates albomarginatae hort.” von *Pelargonium zonale*, *Z. Vererbungslehre*, **1**: 330–351.
- [5] CORRENS C., 1909 — Vererbungsversuche mit blass/gelb/grünen und buntblöttrigen Sippen bei *Mirabilis jalapa*, *Urtica pilulifera* und *Lunaria annua*, *Z. Vererbungslehre*, **1**: 291–329.
- [6] WILD A., 1958 — Experimentelle Beeinflussung des Granamusters einer abweichenden Plastidensorte von *Antirrhinum majus*, *Planta*, **50**: 379–387.

- [7] KIRK J. T. O., TILNEY-BASSETT R. A. E., 1967 — The Plastids, W. H. Freeman and Co., London, San Francisco.
- [8] DÖBEL P., HAGEMANN R., 1963 — Elektronenmikroskopischen Nachweis echter Mischzellen bei *Antirrhinum majus status albomaculatus*, Biol. Zbl., **82**: 749–751.
- [9] DÖBEL P., 1964 — Über die Plastiden einer Herkunft des *status albomaculatus* von *Antirrhinum majus* L., Z. Vererbungslehre, **95**: 226–235.
- [10] CHIBA Y., 1951 — Cytochemical studies on chloroplasts. I. Cytologic demonstration of nucleic acids in chloroplasts, Cytologia (Tokyo), **16**: 259–264.
- [11] METZNER H., 1952 — Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nucleinsäuren in Chloroplasten, Biol. Zbl., **71**: 257–272.
- [12] KISLEV N., SWIFT H., BOGORAD L., 1965 — Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss chard, J. Cell Biol., **25**: 327–344.
- [13] RIS H., PLAUT W., 1962 — Ultrastructure of DNA-containing areas in chloroplasts of *Chlamydomonas*, J. Cell Biol., **13**: 383–391.
- [14] WOODCOCK C. L. F., FERNÁNDEZ-MORÁN H., 1968 — Electron microscopy of DNA conformations in spinach chloroplasts, J. Mol. Biol., **31**: 627–631.
- [15] BOTTOMLEY W., WHITFIELD P. R., SPENCER D., 1972 — Stimulation of chloroplast DNA-dependent RNA polymerase by exogenous DNA, Archiv. Biochem. Biophys., **151**: 35–42.
- [16] MANNING J. E., RICHARDS O. C., 1972 — Isolation and molecular weight of circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*, Biochim. Biophys. Acta, **259**: 285–296.
- [17] MANNING J. E., WOLSTENHOLME D. R., RICHARDS O. C., 1972 — Circular DNA molecules associated with chloroplasts of spinach, *Spinacia oleracea*, J. Cell Biol., **53**: 594–601.
- [18] KOLODNER R., TEWARI K. K., 1972 — Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves, J. Biol. Chem., **247**: 6355–6365.
- [19] KOWALLIK K. V., HERRMANN R. G., 1972 — Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts. IV. Three dimensional arrangement of DNA in fully differentiated chloroplasts of *Beta vulgaris* L., J. Cell Sci., **11**: 357–377.
- [20] CHUN E. H. L., VAUGHAN M. H., RICH A., 1963 — The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations, J. Mol. Biol., **7**: 130–141.
- [21] KIRK J. T. O., 1971 — Will the real chloroplast DNA please stand up, [w] Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 267–276.
- [22] BRAWERMAN G., EISENSTADT J., 1964 — Deoxyribonucleic acid from chloroplasts of *Euglena gracilis*, Biochim. Biophys. Acta, **91**: 477–485.
- [23] RAY D. S., HANAWALT P. C., 1964 — Properties of the satellite DNA associated with chloroplasts of *Euglena gracilis*, J. Mol. Biol., **9**: 812–824.
- [24] KIRK J. T. O., 1963 — The deoxyribonucleic acid of broad-bean chloroplasts, Biochem. J., **88**: 45 P.
- [25] KIRK J. T. O., 1963 — The deoxyribonucleic acid of broad bean chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta, **76**: 417–424.
- [26] SMILLIE R. M., SCOTT N. S., 1969 — Organelle biosynthesis: the chloroplast, [w] Progress in Molecular and Subcellular Biology, red. F. E. Hahn, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, vol. 1, s. 136–202.

- [27] SCOTT N. S., SHAH V. C., SMILLIE R. M., 1968 — Synthesis of chloroplast DNA in isolated chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **38**: 151–157.
- [28] SPENCER D., WHITFIELD P. R., 1967 — DNA synthesis in isolated chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**: 538–542.
- [29] TEWARI K. K., WILDMAN S. G., 1967 — Polymerase in isolated tobacco chloroplasts and nature of the polymerized product, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **58**: 689–696.
- [30] SPENCER D., WHITFIELD P. R., 1967 — Ribonucleic acid synthesizing activity of spinach chloroplasts and nuclei, *Arch. Biochem.*, **121**: 336–345.
- [31] KELLER S. J., BIEDENBACH S. A., MEYER R. R., 1973 — Partial purification of chloroplast DNA polymerase from *Euglena gracilis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**: 620–628.
- [32] GIBOR A., 1967 — DNA synthesis in chloroplasts, [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York, vol. II, s. 321–328.
- [33] VANDEN DRIESSCHE T., HELLIN J., HARS R., 1973 — Limitations in chloroplast multiplication in *Acetabularia mediterranea*, *Protoplasma*, **76**: 465–472.
- [34] WOODCOCK C. L. F., BOGORAD L., 1971, — Nucleic acids and information processing in chloroplasts, [w] *Structure and Function of Chloroplasts*, red. M. Gibbs, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, s. 89–128.
- [35] CRAIG J. W., LEACH C. K., CARR N. G., 1969 — Studies with deoxyribonucleic acid from blue-green algae, *Arch. Mikrobiol.*, **65**: 218–227.
- [36] WELLS R., BIRNSTIEL M., 1969 — Kinetic complexity of chloroplastal deoxyribonucleic acid and mitochondrial deoxyribonucleic acid from higher plants, *Biochem. J.*, **112**: 777–786.
- [37] ROCHAIX J. D., 1972 — Cyclization of chloroplast DNA fragments of *Chlamydomonas reinhardi*, *Nature New Biology*, **238**: 76–78.
- [38] HERRMANN R. G., 1969 — Are plastids polyploid? *Exp. Cell Res.*, **55**: 414–416.
- [39] WHITFIELD P. R., SPENCER D., BOTTOMLEY W., 1973 — Products of chloroplast DNA-directed transcription and translation, [w] *The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms*, red. J. K. Pollak, J. W. Lee, Australian and New Zealand Book Co., Sydney, Australia, s. 504–522.
- [40] WOLLGIEHN R., RUESS M., MUNSCHE D., 1966 — Ribonucleic acids of chloroplasts, *Flora*, **157**: 92–108.
- [41] SMILLIE R. M., EVANS W. R., LYMAN H., 1963 — Metabolic events during the formation of photosynthetic from a nonphotosynthetic cell, *Brookhaven Symp. Biol.*, **16**: 89–108.
- [42] LEAVER C. J., 1973 — Molecular integrity of chloroplast ribosomal ribonucleic acid, *Biochem. J.*, **135**: 237–240.
- [43] GALLING G., JORDAN B. R., 1972 — Isolation and characterisation of cytoplasmic and chloroplastic 5S RNAs in the unicellular green alga *Chlorella*, *Biochimie*, **54**: 1257–1265.
- [44] BURKARD G., ECHLANCHAR B., WEIL J. H., 1967 — Presence of N-formyl-methionyl-tRNA in bean chloroplasts, *FEBS Letters*, **4**: 571–574.
- [45] SISSAKIAN N. M., FILIPPOVITCH J. J., SVETAILLO E. N., ALEVY K. A., 1965 — On the protein-synthesizing system of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **95**: 474–485.
- [46] DURE III L. S., MERRICK W. C., 1971 — Synthesis of chloroplast tRNA species during plant seed embryogenesis and germination, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Lin-

- nane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 413-421.
- [47] GUDERIAN R. H., PULLIAM R. L., GORDON M. P., 1972 — Characterization and fractionation of tobacco leaf transfer RNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **262**: 50-65.
- [48] KISLEV N., SELSKY M. J., NORTON C., EISENSTADT J. M., 1972 — tRNA and tRNA aminoacyl synthetases of chloroplasts, mitochondria and cytoplasm from *Euglena gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **287**: 256-269.
- [49] BALTUS E., EDSTROM J. E., JANOWSKI M., HANOCQ-QUERTIER J., TENCER R., BRACHET J., 1968 — Base composition and metabolism of various RNA fractions in *Acetabularia mediterranea*, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **59**: 406-413.
- [50] SHEPHARD D. C., 1965 — An autoradiographic comparison of the effects of enucleation and actinomycin D on the incorporation of nucleic acid and protein precursors by *Acetabularia chloroplasts*, *Biochim. Biophys. Acta*, **108**: 635-643.
- [51] JANOWSKI M., 1965 — Synthèse chloroplastique d'acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*, *Biochim. Biophys. Acta*, **103**: 399-408.
- [52] KIRK J. T. O., 1964 — DNA-dependent RNA synthesis in chloroplast preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **14**: 393-397.
- [53] SEMAL J., SPENCER D., KIM Y. T., WILDMAN S. G., 1964 — Properties of a ribonucleic acid synthesizing system in cell-free extracts of tobacco leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, **91**: 205-216.
- [54] SHAH V. C., LYMAN H., 1966 — DNA dependent RNA synthesis in chloroplasts of *Euglena gracilis*, *J. Cell Biol.*, **29**: 174-176.
- [55] BERGER S., 1967 — RNA-synthesis in *Acetabularia*. II. RNA-synthesis in isolated chloroplasts, *Protoplasma*, **64**: 13-25.
- [56] BOVÉ J. M., BOVÉ C., RONDOT M. J., MOREL G., 1967 — Chloroplast and virus RNA synthesis, [w] *Biochemistry of Chloroplast*, red. T. W. Goodwin, Academic Pres, London, New York, vol. II, s. 329-339.
- [57] TEWARI K. K., WILDMAN S. G., 1969 — Function of chloroplast DNA. II. Studies on DNA-dependent RNA polymerase activity of tobacco chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**: 358-372.
- [58] HAREL E., BOGORAD L., 1973 — Effect of light on ribonucleic acid metabolism in greening maize leaves, *Plant Physiol.*, **51**: 10-16.
- [59] JOUSSAUME M., 1973 — Mise en évidence de deux formes de RNA polymérase dépendante du DNA dans les chloroplastes isolés de feuilles de Pois, *Physiol. Vég.*, **11**: 69-82.
- [60] BOGORAD L., WOODCOCK C. L. F., 1971 — Rifamycins: the inhibition of plastid RNA synthesis in vivo and in vitro and variable effects on chlorophyll formation in maize leaves, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 92-97.
- [61] GIBBS S. P., 1967 — Synthesis of chloroplast RNA at the site of chloroplast DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**: 653-657.
- [62] BRAWERMAN G., EISENSTADT J. M., 1964 — Template and ribosomal ribonucleic acids associated with the chloroplasts and cytoplasm of *Euglena gracilis*, *J. Mol. Biol.*, **10**: 403-411.
- [63] WILLIAMS G. R., WILLIAMS A. S., 1970 — Hybridization of bean leaf leucyl-tRNA with nuclear DNA and with chloroplast DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**: 858-863.

- [64] TEWARI K. K., WILDMAN S. G., 1970 — Information content in the chloroplast DNA, [w] Control of Organelle Development, red. P. L. Miller, Cambridge Univ. Press, s. 147-179.
- [65] SCOTT N. S., SMILLIE R. M., 1967 — Evidence for the direction of chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28: 598-603.
- [66] RAWSON I. R. Y., HASELKORN R., 1973 — Chloroplast ribosomal RNA genes in the chloroplast DNA of *Euglena gracilis*, J. Mol. Biol., 77: 125-132.
- [67] SURZYCKI S. J., ROCHAIX J. D., 1971 — Transcriptional mapping of ribosomal RNA genes of the chloroplast and nucleus of *Chlamydomonas reinhardi*, J. Mol. Biol., 62: 89-109.
- [68] HARTLEY M. R., ELLIS R. J., 1973 — Ribonucleic acid synthesis in chloroplasts, Biochem. J., 134: 249-262.
- [69] BROWN R. D., HASELKORN R., 1971 — Chloroplast RNA population in dark-grown, light-grown and greening *Euglena gracilis*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68: 2536-2539.
- [70] CATTOLICO R. A., SENNER J. W., JONES R. F., 1973 — Changes in cytoplasmic and chloroplast ribosomal ribonucleic acid during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardi*, Archiv. Biochem. Biophys., 156: 58-65.
- [70a] KOJ A., 1974 — Cykl rybosomowy w komórkach bakterii, roślin i zwierząt, Post. Biol. Kom., 1: 177: 191.
- [71] LYTTLETON J. W., 1962 — Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts, Exptl. Cell Res., 26: 312-317.
- [72] ELLIS J. R., FORRESTER E. E., 1972 — The function of chloroplast ribosomes, Proc. Biochem. Soc., 130: 28 P.
- [73] RIJVEN A. H. G. C., ZWAR J. A., 1973 — Methylation patterns of ribonucleic acids from chloroplasts and cytoplasm of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) cotyledons, Biochim. Biophys. Acta, 299: 564-567.
- [74] KROON A. M., AGSTERIBBE E., VRIES H., 1972 — Protein synthesis in mitochondria and chloroplasts, [w] The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation, red. L. Bosch, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 539-582.
- [75] GUALERZI C., CAMMARANO P., 1969 — Comparative electrophoretic studies on the protein of chloroplast and cytoplasmic ribosomes of spinach leaves, Biochim. Biophys. Acta, 190: 170-186.
- [76] ODINTSOVA M. S., YURINA N. P., 1969 — Proteins of chloroplast and cytoplasmic ribosomes, J. Mol. Biol., 40: 503-506.
- [77] GUALERZI C., CAMMARANO P., 1970 — Species specificity of ribosomal proteins from chloroplast and cytoplasmic ribosomes of higher plants; electrophoretic studies, Biochim. Biophys. Acta, 199: 203-213.
- [78] MEHTA S. L., HADZIYEV D., ZALIK S., 1968 — Chloroplast and cytoplasmic polysomes and ribosomal RNA from wheat, Biochim. Biophys. Acta, 169: 381-386.
- [79] BAMJI M. S., JAGENDORF A. T., 1966 — Amino acid incorporation by wheat chloroplasts, Plant Physiol., 41: 764-770.
- [80] CLARK M. F., MATTHEWS R. E. F., RALPH R. K., 1964 — Ribosomes and polyribosomes in *Brassica pekinensis*, Biochim. Biophys. Acta, 91: 289-304.
- [81] GUNNING B. E. S., 1965 — The fine structure of chloroplast stroma following aldehyde osmium tetroxide fixation, J. Cell Biol., 24: 79-93.
- [82] WILDMAN S. G., 1971 — An approach toward ascertaining the function of

- chloroplast DNA in tobacco plants, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 402-412.
- [83] APEL K., SCHWEIGER H. S., 1973 — Sites of synthesis of chloroplast-membrane proteins. Evidence for three types of ribosomes engaged in chloroplast-protein synthesis, *Eur. J. Biochem.*, **38**: 373-383.
- [84] BÖRNER T., KNOTH R., HERRMANN F., HAGEMANN R., 1972 — Struktur und Funktion der genetischen Information in der Plastiden. V. Das Fehlen von ribosomaler RNS in den Plastiden der Plastidmutante "Mrs. Parker" von *Pelargonium zonale* Ait., *Theoret. Appl. Genetics*, **42**: 3-11.
- [85] MERRICK W. C., DURE III L. S., 1973 — Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. Preferential charging of cotton chloroplastic transfer ribonucleic acid by *Escherichia coli* enzymes, *Biochemistry*, **12**: 629-635.
- [86] MARGULIES M. M., 1970 — In vitro protein synthesis by plastids of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiol.*, **46**: 136-141.
- [87] RANALETTI M. L., GNANAM A., JAGENDORF A. T., 1969 — Amino acid incorporation by isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**: 192-204.
- [88] SPENCER D., 1965 — Protein synthesis by isolated spinach chloroplasts, *Arch. Biochem.*, **111**: 381-390.
- [89] GOFFEAU A., BRACHET J., 1965 — Deoxyribonucleic acid-dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate *Acetabularia* fragments, *Biochim. Biophys. Acta*, **95**: 302-313.
- [90] GOFFEAU A., 1969 — Incorporation of amino acids into the soluble and membrane bound proteins of chloroplasts isolated from enucleated *Acetabularia*, *Biochim. Biophys. Acta*, **174**: 340-350.
- [91] SHEPHARD D. C., LEVIN W. B., 1972 — Biosynthesis in isolated *Acetabularia* chloroplasts. I. Protein amino acids, *J. Cell Biol.*, **54**: 279-294.
- [92] HARRIS E. H., PRESTON J. F., EISENSTADT J. M., 1973 — Amino acid incorporation and products of protein synthesis in isolated chloroplasts of *Euglena gracilis*, *Biochemistry*, **12**: 1227-1234.
- [93] HEARING V. J., 1973 — Protein synthesis in isolated etioplasts after light stimulation, *Phytochemistry*, **12**: 277-282.
- [94] VON WETTSTEIN D., HENNINGSEN K. W., BOYNTON J. E., KANNANGARA G. C., NIELSEN D. F., 1971 — The genic control of chloroplast development in barley, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 205-223.
- [95] JENNINGS R. C., OHAD I., 1972 — Biogenesis of chloroplast membranes. XI. Evidence for the translation of extrachloroplast RNA on chloroplast ribosomes in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* y-1, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **153**: 79-87.
- [96] CHAN PAK-HOO, WILDMAN S. G., 1972 — Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction I protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 677-680.
- [97] BLAIR G. E., ELLIS R. J., 1972 — Light-driven synthesis of the large subunit of fraction I protein by isolated chloroplasts, *Biochem. J.* **127**: 42 P.
- [98] BLAIR G. E., ELLIS R. J., 1973 — Protein synthesis in chloroplasts. I. Light-driven synthesis of the large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **319**: 223-234.

- [99] KAWASHIMA N., WILDMAN S. G., 1972 — Studies on fraction I protein. IV. Mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains the code for a chloroplast protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **262**: 42–49.
- [100] HORAK A., HILL R. D., 1972 — Adenosine triphosphatase of bean plastids, its properties and site of formation, *Plant Physiol.*, **49**: 365–370.
- [101] HERRMANN F., 1972 — Chloroplast lamellar proteins of the plastid mutant en: viridis-1 of *Antirrhinum majus* having impaired photosystem II, *Exptl. Cell Res.*, **70**: 452–453.
- [102] HERRMANN F., 1971 — Genetic control of pigment-protein complexes I and Ia of the plastid mutant en: alba-1 of *Antirrhinum majus*, *FEBS Letters*, **19**: 267–269.
- [103] MACHOLD O., AURICH O., 1972 — Sites of synthesis of chloroplast lamellar protein in *Vicia faba*, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 103–112.
- [104] KUNG S. D., THORNER J. P., WILDMAN S. G., 1972 — Nuclear DNA codes for the photosystem II chlorophyll-protein of chloroplast membranes, *FEBS Letters*, **24**: 185–188.
- [105] WILDMAN S. G., LU-LIAO C., WONG-STAAAL F., 1973 — Maternal inheritance, cytology and macromolecular composition of defective chloroplast in a variegated mutant of *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **113**: 293–312.
- [106] OHAD I., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., 1967 — Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardi*), *J. Cell Biol.*, **35**: 521–533.
- [107] HOOBER J. K., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., 1969 — Formation of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardi* y-1. Effects of inhibitors of protein synthesis, *J. Biol. Chem.*, **244**: 2621–2631.
- [108] EYTAN G., OHAD J., 1970 — Biogenesis of chloroplast membranes. VI. Cooperation between cytoplasmic and chloroplast ribosomes in the synthesis of photosynthetic lamellar proteins during the greening process in a mutant of *Chlamydomonas reinhardi*, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4297–4307.
- [109] KLOPPSTECH K., SCHWEIGER H. G., 1973 — Nuclear genome codes for chloroplast ribosomal proteins in *Acetabularia*. II. Nuclear transplantation experiments, *Exptl. Cell Res.*, **80**: 69–78.
- [110] ELLIS R. J., HARTLEY M. R., 1971 — Sites of synthesis of chloroplast proteins, *Nature New Biology*, **233**: 193–196.
- [111] BOURQUE DON P., WILDMAN S. G., 1973 — Evidence that nuclear genes code for several chloroplast ribosomal proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**: 532–537.
- [112] HONEYCUTT R. C., MARGULIES M. M., 1973 — Protein synthesis in *Chlamydomonas reinhardi*. Evidence for synthesis of proteins of chloroplastic ribosomes on cytoplasmic ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **248**: 6145–6153.
- [113] SURZYCKI S. J., GOODENOUGH U. W., LEVINE R. P., ARMSTRONG J. J., 1970 — Nuclear and chloroplast control of chloroplast structure and function in *Chlamydomonas reinhardi*, [w] *Control of Organelle Development*, red. P. L. Miller, Cambridge Univ. Press, s. 13–15.
- [114] RICHARDS O. C., RYAN R. S., MANNING J. E., 1971 — Effects of cycloheximide and chloramphenicol on DNA synthesis in *Euglena gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**: 190–201.
- [115] BUTTERFASS T., 1973 — Control of plastid division by means of nuclear DNA amount, *Protoplasma*, **76**: 167–195.

- [116] MERESZKOWSKY C., 1905 — Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche, *Biol. Zbl.*, **25**: 593-604.
- [116a] MICHEJDA J. W., 1974 — Mitochondrialny DNA i zakres jego działania, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 99-141.
- [117] LEIS J. P., KELLER E. B., 1970 — Protein chain initiating methionine tRNAs in chloroplasts and cytoplasm of wheat leaves, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **67**: 1593-1599.
- [118] LEE S. G., EVANS W. R., 1971 — Hybrid ribosome formation from *Escherichia coli* and chloroplast ribosome subunit, *Science*, **173**: 252-253.
- [119] GRIVELL L. A., WALG H. L., 1972 — Subunit homology between *Escherichia coli*, mitochondrial and chloroplast ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 1452-1459.
- [120] GILES K. L., SARAFIS S. V., 1971 — On the survival and reproduction of chloroplasts outside the cell, *Cytobios*, **4**: 61-74.
- [121] PADO R., 1969 — Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*, *Acta Soc. Bot. Polon.*, **38**: 39-55.
- [122] PADO R., 1965 — Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I. The influence of light on the growth of symbionts, *Folia Biol.*, **13**: 173-182.
- [123] VON WETTSTEIN F., 1915 — *Geosiphon* Fr. Wettst., eine interessante Siphonée, *Österr. bot. Z.*, **65**: 145-156.
- [124] KNAPP E., 1933 — Über *Geosiphon pyriforme* Fr. Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen Symbiose, *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **51**: 210-216.
- [125] HALL W. T., CLAUS G., 1963 — Ultrastructural studies on the blue-green algae symbiont in *Cyanophora paradoxa* Korschikoff, *J. Cell Biol.*, **19**: 551-563.
- [126] HALL W. T., CLAUS G., 1967 — Ultrastructural studies on the cyanelle of *Glaucocystis nostochinearum* Itzigsohn, *J. Phycol.*, **3**: 37-51.
- [127] SCHNEPF E., 1966 — Die Kompartimentierung der Zelle in morphologischer Sicht, *Biol. Rdsch.*, **4**: 259-275.
- [128] SCHNEPF E., BROWN R. M., Jr., 1971 — On relationship between endosymbiosis and the origin of plastids and mitochondria, [w] *Origin and Continuity of Cell Organelles*, red. J. Reinert and H. Ursprung, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, s. 299-322.
- [129] SCOTT N. S., MUNNS R., GRAHAM D., SMILLIE R. M., 1971 — Origin and synthesis of chloroplast ribosomal RNA and photoregulation during chloroplast biogenesis, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 383-392.
- [130] LEVINE R. P., 1971 — Interactions between nuclear and organelle genetic systems, *Brookhaven Symposia in Biology*, No 23; *Evolution of Genetic Systems*, s. 503-532.
- [131] METS L., BOGORAD L., 1972 — Altered chloroplast ribosomal proteins associated with erythromycin-resistant mutants in two genetic systems of *Chlamydomonas reinhardi*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **12**: 3779-3783.
- [132] SURZYCKI S. J., GILLHAM N. W., 1971 — Organelle mutations and their expression in *Chlamydomonas reinhardi*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 1301-1306.
- [133] SCHLANGER G., SAGER R., RAMANIS Z., 1972 — Mutation of cytoplasmic gene in *Chlamydomonas* alters chloroplast ribosome function, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **12**: 3551-3555.

- [134] SMITH-JOHANNSEN H., GIBBS S. P., 1972 — Effects of chloramphenicol on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Ochromonas danica*, *J. Cell Biol.*, **52**: 598–614.
- [135] KLOPPSTECH K., SCHWEIGER H. G., 1973 — Nuclear genome codes for chloroplast ribosomal proteins in *Acetabularia*. I. Isolation and characterization of chloroplast ribosomal particles, *Exptl. Cell Res.*, **80**: 63–68.
- [136] MACHOLD O., 1971 — Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as affected by iron deficiency and antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**: 324–331.
- [137] SPREY B. 1972 — Ribosomale RNA und Thylakoid-membranen in Plastiden von Chlorophylldefektmutanten der Gerste, *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**: 223–243.
- [138] CRIDDLE R. S., DAU B., KLEINKOPF G. E., HUFFAKER R. C., 1970 — Differential synthesis of ribulosediphosphate carboxylase subunits, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**: 621–627.
- [139] SCHIFF J. A., 1971 — Developmental interaction among cellular compartments in *Euglena*, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 98–118.
- [140] GOODENOUGH U. W., TOGASAKI R. K., PASZEWSKI A., LEVINE R. P., 1971 — Inhibition of chloroplast ribosome formation by gene mutation in *Chlamydomonas reinhardi*, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 224–234.
- [141] SPENCER D., WHITFIELD P. R., BOTTOMLEY W., WHEELER A. M., 1971 — The nature of the proteins and nucleic acid synthesized by isolated chloroplasts, [w] *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London, s. 98–118.
- [142] SCHWEIGER H. S., 1970 — Synthesis of RNA in *Acetabularia*, [w] *Control of Organelle Development*, red. P. L. Miller, Cambridge Univ. Press, s. 327–344.
- [143] WONG-STAAAL F., WILDMAN S. G., 1973 — Identification of a mutation in chloroplast DNA correlated with formation of defective chloroplasts in a variegated mutant of *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **113**: 313–326.
- [144] REGER B. J., FAIRFIELD S. A., EPLER J. L., BARNETT W. E., 1970 — Identification and origin of some chloroplast aminoacyl-tRNA synthetases and tRNAs, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**: 1207–1213.
- [145] HOOBER J. K., 1972 — A major polypeptide of chloroplast membranes of *Chlamydomonas reinhardi*. Evidence for synthesis in the cytoplasm as a soluble component, *J. Cell Biol.*, **52**: 84–96.
- [146] BISHOP D. G., BAIN J. M., SMILLIE R. M., 1973 — The effect of antibiotics on the ultrastructure and photochemical activity of a developing chloroplast., *J. Exp. Bot.*, **24**: 361–375.
- [147] CHUA N.-H., BLOBEL G., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., 1973 — Attachment of chloroplast polysomes to thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardi*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 1554–1558.
- [148] THOMSON W. W., ELLIS R. J., 1972 — Inhibition of grana formation by lincomycin, *Planta*, **108**: 89–99.
- [149] EGAN J. M., CARELL E. F., 1972 — Studies on chloroplast development and replication in *Euglena*. III. A study of the site of synthesis of alkaline

- deoxyribonuclease induced during chloroplast development in *Euglena gracilis*, *Plant Physiol.*, **50**: 391-395.
- [150] GREGORY P., BRADBEER J. W., 1973 — Plastid development in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*: the light-induced development of the chloroplast cytochromes, *Planta*, **109**: 317-326.
- [151] HENNINGSEN K. W., BOYNTON J. E., VON WETTSTEIN D., BOARDMAN N. K., 1973 — Nuclear genes controlling chloroplast development in barley, [w] *The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms*, red. J. K. Pollak, J. W. Lee, Australian and New Zealand Book Co., Sydney, Australia, s. 457-478.
- [152] EYTAN G., OHAD I., 1972 — Biogenesis of chloroplast membranes. VIII. Modulation of chloroplast lamellae composition and function induced by discontinuous illumination and inhibition of ribonucleic acid and protein synthesis during greening of *Chlamydomonas reinhardi* γ -1 mutant cells, *J. Biol. Chem.*, **247**: 122-129.

Otrzymano: grudzień 1973.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autorów: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

STRUKTURA I FUNKCJE LIZOSOMÓW (SFEROSOMÓW) W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Irena PALCZEWSKA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Lizosomy roślinne stanowią zróżnicowaną pod względem morfologicznym grupę organelli. Powstają jako pęcherzyki oddzielające się od retikulum endoplazmatycznego, są to lizosomy pierwotne. Dalsze różnicowanie tych struktur jest w znacznym stopniu uzależnione od tkanki w jakiej występują. Lizosomy tkanek merystematycznych, nazywane wakuolami, pełnią funkcje hydrolityczne podczas rozwoju siewki. Funkcję wakuol, w których odbywa się rozkład białkowych substancji zapasowych, pełnią także ziarna aleuronowe, występujące w tkankach zapasowych. Lizosomy charakterystyczne przede wszystkim dla tkanek nasion gromadzących tłuszcze, nazywane sferosomami, są uważane za miejsca ewentualnej syntezy tłuszczów. W sferosomach takich, obok innych enzymów hydrolitycznych charakterystycznych dla wakuol, występuje lipaza. Występowanie w lizosomach aktywności wielu enzymów hydrolitycznych zostało stwierdzonych na podstawie badań biochemicznych izolowanych frakcji. Przy zastosowaniu metod cytochemii ultrastrukturalnej wykryto w lizosomach kwaśną fosfatazę, esterazę, arylosulfatazę oraz fosfatazy działające przy pH 7. Występujące w różnego typu komórkach roślinnych cytolizosomy pełnią rolę w procesach morfogenezy i trawienia wewnątrzkomórkowego.

Termin sferosomy, wprowadzony przez Pernerę [1, 2] przyjął się w literaturze od roku 1953, chociaż został zaproponowany już wcześniej, w 1921 r. przez Dangearda (patrz Olszewska [3]). Pierwszy okres badań nad sferosomami przynosi informacje o ich morfologii i składzie chemicznym [1, 2, 4-8].

Sferosomy oglądane w komórkach żywych przedstawiają się jako utwory kuliste o średnicy 0,3-1,5 μm (rysunek 1), widoczne wyraźnie w komórce, z tego względu, że mają większy niż cytoplazma podstawowa współczynnik załamania. Za pomocą metod cytochemicznych wykazano w nich obecność dwu składników — białka i lipidów. Barwią się one barwnikami lipofilnymi; barwniki fluorescencyjne jak błękit Nilu oraz 3,4-benzopiren [9] fluorochromują je selektywnie.

Wykrycie lokalizacji fosfatazy kwaśnej w sferosomach komórek skórki łuski cebuli za pomocą metod cytoenzymatycznych przez Wałek-Czernecką [10], zwróciło uwagę na funkcję sferosomów. Autorka w tym samym materiale stwierdziła później obecność innych enzymów hydrolytycznych: esterazy, DNAazy, arylosulfatazy, β -glukuronidazy, β -galaktozydazy i lipazy [11], co pozwoliło jej uznać sferosomy za struktury analogiczne z lizosomami zwierzęcymi. Liczne prace, które ukazały się w późniejszym czasie, wykazały obecność wymienionych enzymów w komórkach roślin wyższych i niższych [11–22, patrz także 3] (rys. 2, 3).

Pierwsze mikrofotografie elektronowe sferosomów otrzymano w latach 1962–1966 [23–27]. Wygląd sferosomów jest uzależniony od zastosowanego utrwalacza: po OsO_4 są nieprzenikliwe dla elektronów, a błona otaczająca je nie jest wyraźnie widoczna, natomiast po KMnO_4 przedstawiają się jako częściowo lub całkowicie puste pęcherzyki objęte silnie skonstrastowaną otoczką (rys. 4, 5). W wyniku obu typów utrwalania sferosomy przybierają kształt nieregularny. Zastosowanie w późniejszym czasie jako utrwalacza aldehydu glutarowego z wtórnym utrwaleniem OsO_4 ukazało sferosomy w postaci osmofilnych kul otoczonych błoną „inną niż błona elementarna” (rys. 6) (temat ten będzie omówiony w dalszych partiach tekstu).

Frey-Wyssling i wsp. [24, 25] prześledzili rozwój sferosomów w komórkach merystematycznych *Zea mays*. Powstają one jako małe pęcherzyki odrywane od kanałów retikulum endoplazmatycznego. Pęcherzyki te rosną szybko, osiągając średnicę 10 000–15 000 nm — w tym stadium jest w nich widoczna dobrze ziarnista strona. Nie ulegając dalszym zmianom powiększają się i wtedy ich średnica wynosi 0,5–1 μm . U roślin nie gromadzących tłuszczów jest to ich postać ostateczna, natomiast u kukuzydzy ich rozwój postępuje dalej — centralna część staje się jasna (w materiale utrwalonym KMnO_4), co jest spowodowane gromadzeniem tłuszczu. Stopniowo ziarnistość stromy zanika i powstaje otoczone błoną ciało tłuszczowe.

Powstawanie sferosomów jako pęcherzyków oddzielających się od cystern retikulum endoplazmatycznego jest widoczne także na mikrofotografiach elektronowych młodych strzępek wegetatywnych grzyba wodnego *Achlya flagellata* (rys. 7).

W okresie intensywnej badań nad enzymami hydrolytycznymi w lizosomach komórek zwierzęcych, podjęto szereg badań biochemicznych na frakcjach izolowanych, wybierając do nich bądź materiał konwencjonalny, a mianowicie tkanki merystematyczne, pochodzące z młodych siewek [28–31], bądź też materiał, w którym należało się spodziewać występowania procesów hydrolytycznych. Tego rodzaju procesy występują w liścieniach i bielmie kiełkujących nasion, zaopatrzonych w substancje

zapasowe (białka i tłuszcze), mobilizowane podczas kiełkowania dla rozwoju przyszłej rośliny [32–37].

Kilka prac poświęcono także charakterystyce biochemicznej izolowanych struktur — odpowiedników lizosomów w komórkach grzybów [38–40]. Badania te wykazały występowanie znacznej aktywności enzymów hydrolitycznych w trzech kategoriach wyizolowanych organelli, mianowicie w wakuolach pochodzących z tkanek merystematycznych i grzybni, ziarnach (wakuolach) aleuronowych oraz sferosomach pochodzących z tkanek zapasowych nasion zawierających tłuszcze. Struktury te zostały uznane za aparat lizosomalny komórek roślinnych.

Wykaz enzymów występujących w izolowanych frakcjach przedstawiony jest w tabeli 1.

Z tkanek merystematycznych *Nicotiana tabacum* i *Zea mays* [28–31] za pomocą frakcjonowanego wirowania w gradiencie sacharozy otrzymano dwie frakcje różniące się gęstością (1,138 i 1,05 gcm⁻³), charakteryzujące się wysoką zawartością hydrolaz. Frakcja cięższa składała się z cząstek o średnicy 0,1–0,3 μm otoczonych błonami, przypominającymi błony wakuoli retikulum endoplazmatycznego. W skład tej frakcji wchodziły — zdaniem autora przynajmniej trzy populacje różniące się gęstością i składem enzymatycznym. Cząstki, tworzące frakcję lżejszą miały średnice w granicach 0,3–1,5 μm, można je było izolować w mannitolu i były identyczne z małymi wakuolami widocznymi w tkankach merystematycznych w mikroskopie elektronowym. W obu frakcjach nie wykryto obecności lipazy, fosfolipazy C, arylosulfatazy A i B. We frakcji cięższej — poza enzymami hydrolitycznymi — występowały jeszcze dwie charakterystyczne dla retikulum endoplazmatycznego oksydoreduktazy, natomiast we frakcji lżejszej — dwie transaminazy — glutaminowo-szczawioctowa i glutaminowo-pirogronowa.

Kwaśne hydrolazy, zawarte we frakcji lizosomalnej pochodzącej z siewek *Nicotiana* trawiły wyizolowane mitochondria i mikrosomy.

Wakuole merystematyczne zostały scharakteryzowane dokładniej dzięki badaniom Matile'a i Moora [41], przeprowadzonym za pomocą techniki łupania i wytrawiania zamrożeniowego (freeze etching). W genezie wakuol można wyróżnić następujące stadia: a) utworzenie małych, pochodzących z retikulum endoplazmatycznego pęcherzyków-prowakuol; b) łączenie się prowakuol i tworzenie w ten sposób wakuol; c) włączenie do wakuol dużych pęcherzyków diktiosomowych drogą inwaginacji tonoplastu; d) inkorporacja materiału cytoplazmatycznego do wakuol. Morfologiczne obrazy są zgodne z wynikami badań biochemicznych. W rezultacie tych badań można by uznać prowakuole za pierwotne lizosomy — ich hydrolazy pochodziły z retikulum endoplazmatycznego. Występowanie transaminaz w błonach wakuol (lekka frakcja) może wskazywać,

TABELA 1. Enzymy w izolowanych frakcjach

Typ organelli	Charakterystyka frakcji	Enzymy
Wakuole (lizosomy, sferosomy)		
Tkanki merystematyczne <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Cucurbita pepo</i> <i>Zea mays</i>	ciężka 1,138 gcm ⁻³ (prowa- kuole) 0,1–0,3 μm izolowane w sacharozie lekka 1,05 gcm ⁻³ (wakuole) 0,3–0,1 μm izolowane w mannitolu	proteazy kwaśne fosfataza kwaśna DNAaza RNAaza β-amylaza α-glukozydaza karboksypeptydaza esteraza α-naftylooctanowa esteraza p-nitrofenylooctanowa arylosulfataza C
Grzyby <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Coprinus lagopus</i>	izolowane w sorbitolu i ficollu	proteazy (kwaśna i zasadowa) aminopeptydazy esteraza fosfataza kwaśna fosfodiesteraza RNAaza (pH 6,5 i 8,6) α-glukozydaza chitynaza
Wakuole aleuronowe		
Tkanki zapasowe <i>Pisum sativum</i> <i>Gossypium hirsutum</i>	izolowane w glicerolu lub w sacharozie i sorbitolu	proteaza kwaśna fosfataza kwaśna esteraza RNAaza β-amylaza α-glukozydaza
Sferosomy		
Tkanki niezapasowe <i>Allium cepa</i> <i>Brassica capitata</i>	81 % lipidy 14 % białko	
Tkanki zapasowe <i>Arachis hypogea</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Gossypium hirsutum</i>	98,1 % lipidy całkowite 0,77 % fosfolipidy 1,27 % białko 1–3 μm izolowane w mannicie	proteazy (pH 3,5 i 6,0) fosfataza kwaśna esteraza lipaza ++ – RNAaza } DNAaza } mała aktywność

że osiągnęły one status funkcjonalny lizosomów wtórnych. Obrazy materiału przygotowanego metodą „freeze etching” wykazują wewnątrz wakuol obecność materiału strukturalnego. Może zatem występować w nich rozkład makrocząsteczek.

Autorzy [31, 41] tłumaczą w sposób następujący rolę procesów litycz-

nych związanych z wakuolami, odpowiednikami lizosomów: zaopatrzony w transaminazy tonoplast może brać udział w transporcie grup aminowych od aminokwasów (rozpad białek w lizosomie) do obecnych w cytoplazmie cząsteczek akceptorowych. Podobne znaczenie może być przypisane także występującej w błonie wakuoli ATPazie. Konsekwencją tego procesu jest nagromadzenie w wakuolach kwasów organicznych.

Jest niewykluczone, że podczas włączania pęcherzyków Golgiego do wakuoli następuje wydzielenie węglowodanów do przestrzeni wakuolarnej. Istotnie, izolowane wakuole zawierają dużą ilość substancji redukujących. Inny sposób gromadzenia cukrów jest sugerowany przez występowanie w izolowanych wakuolach glikohydrolaz — β -amylazy i α -glukozydazy. Te enzymy katalizują końcowe reakcje rozkładu skrobi. Pierwsze produkty rozkładu skrobi — dekstrany — powstałe w wyniku działania α -amylazy (enzym rozpuszczalny) mogą być inkorporowane do wakuoli wraz z fragmentami cytoplazmy: β -amylazy i α -glukozydaza rozkładałaby je następnie do glukozy.

Preparaty izolowanych wakuol ze strzępek wegetatywnych, owocników i zarodników grzybów także wykazują wysoką aktywność enzymów hydrolitycznych (tab. 1, [38–40]). Wakuole grzybów są przykładem lizosomów wyposażonych w kwaśne i zasadowe hydrolazy. Maksimum aktywności RNAazy w wakuolach zarodników *Neurospora* występuje przy pH 8,6; w grzybni *Coprinus* i komórkach *Saccharomyces* działają zasadowe proteazy. U *Coprinus* większość enzymów występuje w wakuolach podczas całego cyklu rozwojowego, natomiast chitynaza pojawia się w komórkach owocnika podczas dojrzewania zarodników (u tego gatunku rozpuszczenie owocnika powoduje uwolnienie, a więc i rozsiewanie spor).

U drożdży stwierdzono [38, 42], że aktywność hydrolityczna enzymów lizosomalnych zależy od fazy wzrostu. Wzrasta ona znacznie podczas okresu indukcji, kiedy komórki przygotowują się do metabolizmu oddechowego albo fermentacyjnego. Także podczas fazy stacjonarnej komórki enzymów lizosomalnych mają dużą aktywność. Jeden z enzymów hydrolitycznych — proteaza — jest indukowany w strzępkach wegetatywnych grzybni *Neurospora* [43, 44] hodowanej na podłożu zawierającym azot organiczny (np. pepton). Proteaza zostaje następnie wydzielona do podłoża. Badania biochemiczne oraz obserwacja w mikroskopie elektronowym wykazały, że cząstki zawierające proteazy są strukturami kulistymi o średnicy 0,15–0,3 μm , wykazującymi gęstą zawartość, otoczoną błoną elementarną. Ich specyficzna gęstość 1,35 gcm^{-3} pozwala je zaliczyć do klasy pierwotnych lizosomów. Według autorów lizosomy te powstają najprawdopodobniej z cystern retikulum endoplazmatycznego.

Następną grupą struktur zakwalifikowanych jako lizosomy przez

Matile'a [37] są ziarna — wakuole aleuronowe, które stanowią białko zapasowe występujące w licznych nasionach. We frakcji wakuol aleuronowych pochodzących z liścieni wykiełkowanych (24 godz.) nasion *Pisum* [37] oraz liścieni niewykiełkowanych nasion *Gossypium* wykryto kilka enzymów hydrolitycznych o dużych aktywnościach specyficznych (tab. 1). W ziarnach aleuronowych *Gossypium* zlokalizowano również fosfatazę kwaśną na poziomie ultrastrukturalnym. W ziarnach aleuronowych nie występuje DNAaza, enzym obecny w wakuolach merystematycznych.

Ze względu na zaopatrzenie w taki komplet enzymatyczny, wakuola aleuronowa spełniałaby funkcję lizosomu wtórnego. Mimo, iż wakuole aleuronowe gromadzą białka i fosforany, są w nich obecne nie tylko enzymy mające brać udział w ich degradacji (proteaza i fosfataza). Podobnie jak w przypadku lizosomów merystematycznych, produkt rozkładu skrobi — dekstryny mogą być inkorporowane do wakuoli aleuronowej, w której następuje dalszy rozkład, o czym może świadczyć obecność enzymów β -amylazy i α -glukozydazy. Matile przypuszcza, że występujące w nasionach sferosomy także są trawione w wakuolach aleuronowych, co mogłoby wyjaśnić występowanie stosunkowo dużej ilości lipidów w izolowanych wakuolach.

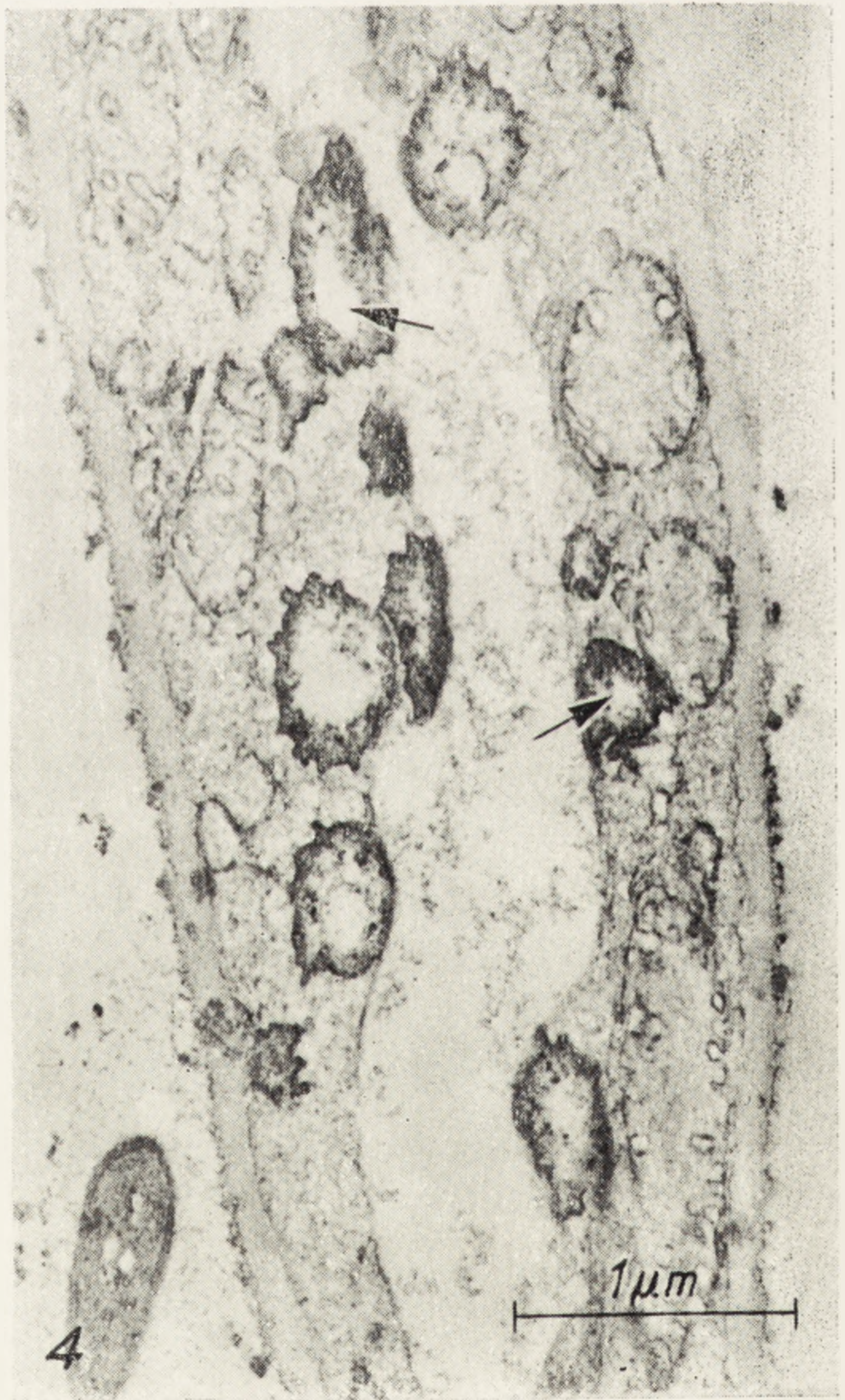
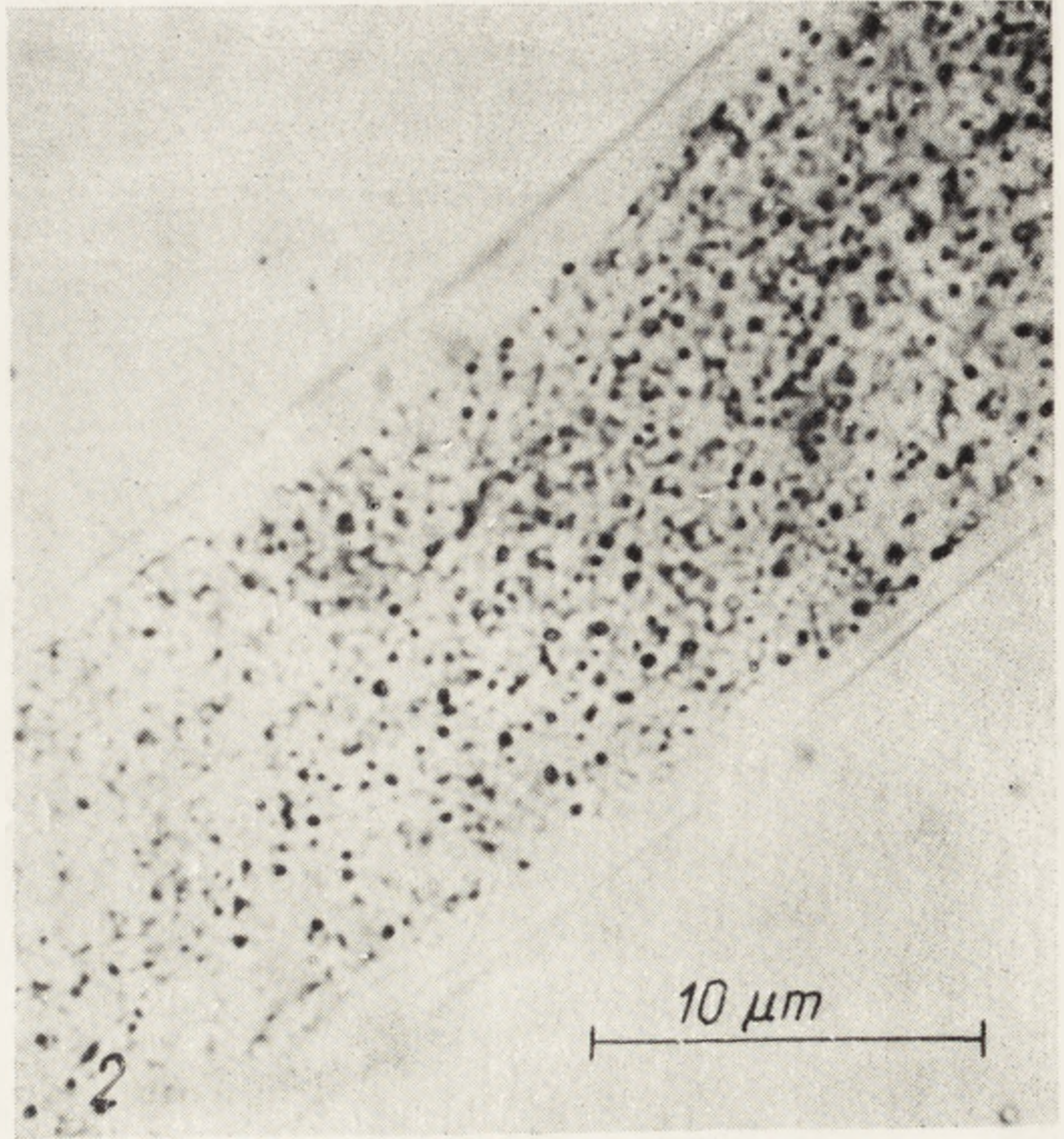
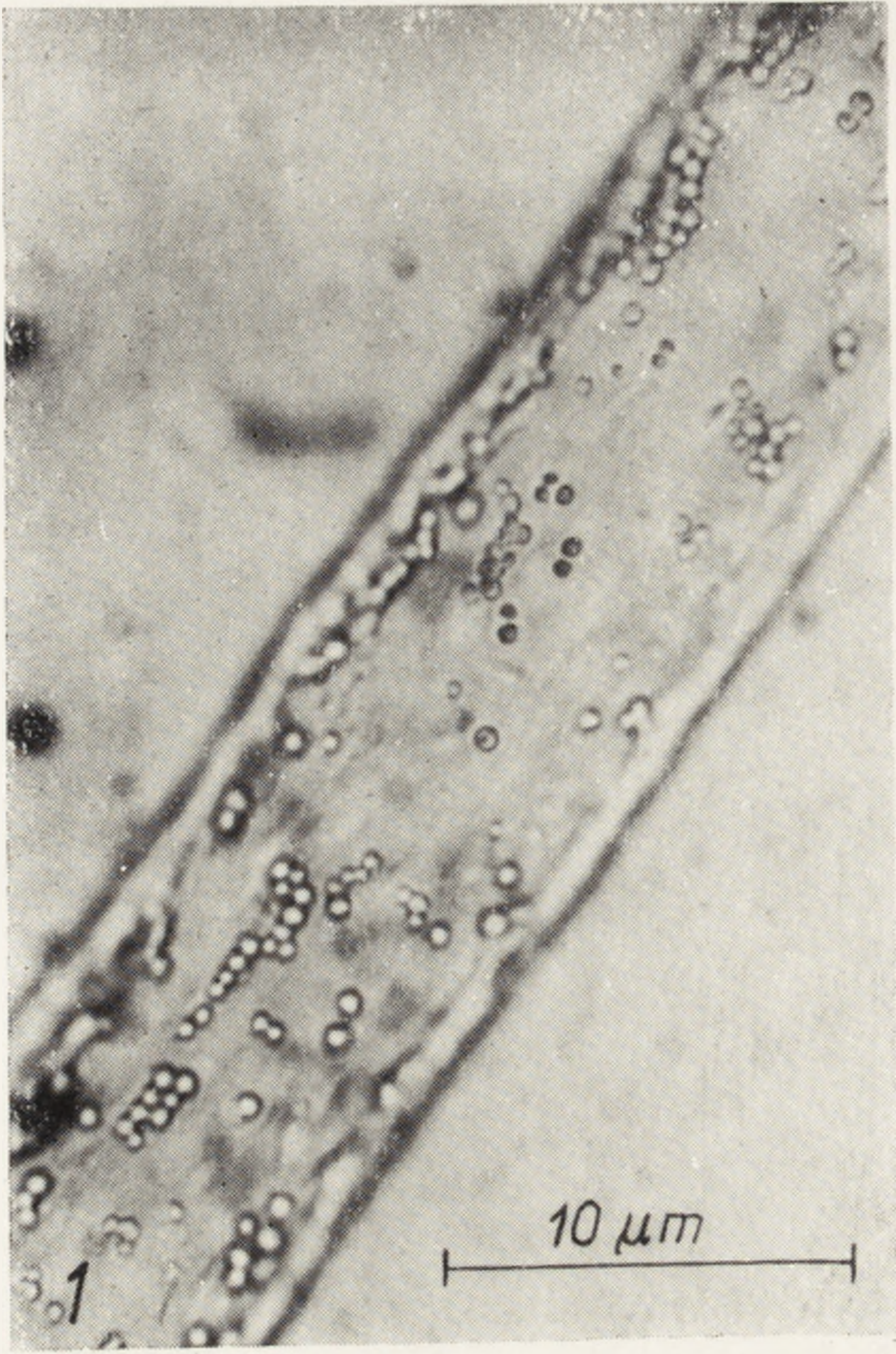
Włączanie sferosomów do wakuoli, które jak wiadomo są także zaopatrzone w enzymy lizosomalne, prowadziłyby do akumulacji tych enzymów we wtórnym lizosomie. Matile podkreśla, że proces lityczny, spełniany przez enzymy związane z błoną wakuoli ma miejsce wewnątrz metabolicznie czynnej komórki. Taka organizacja wydaje się niezbędna dla regulacji transportu makrocząsteczek w kierunku rosnącego zarodka.

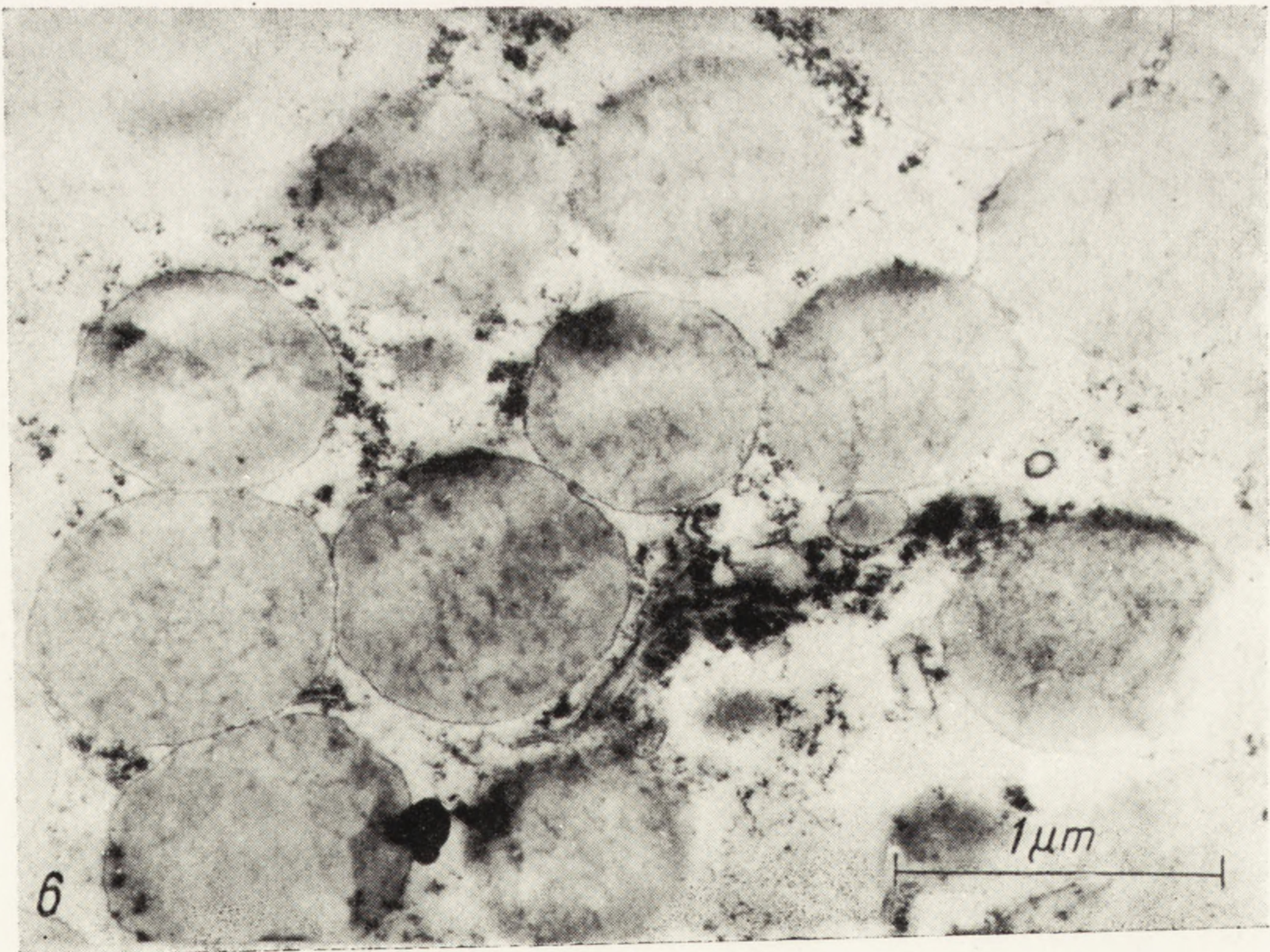
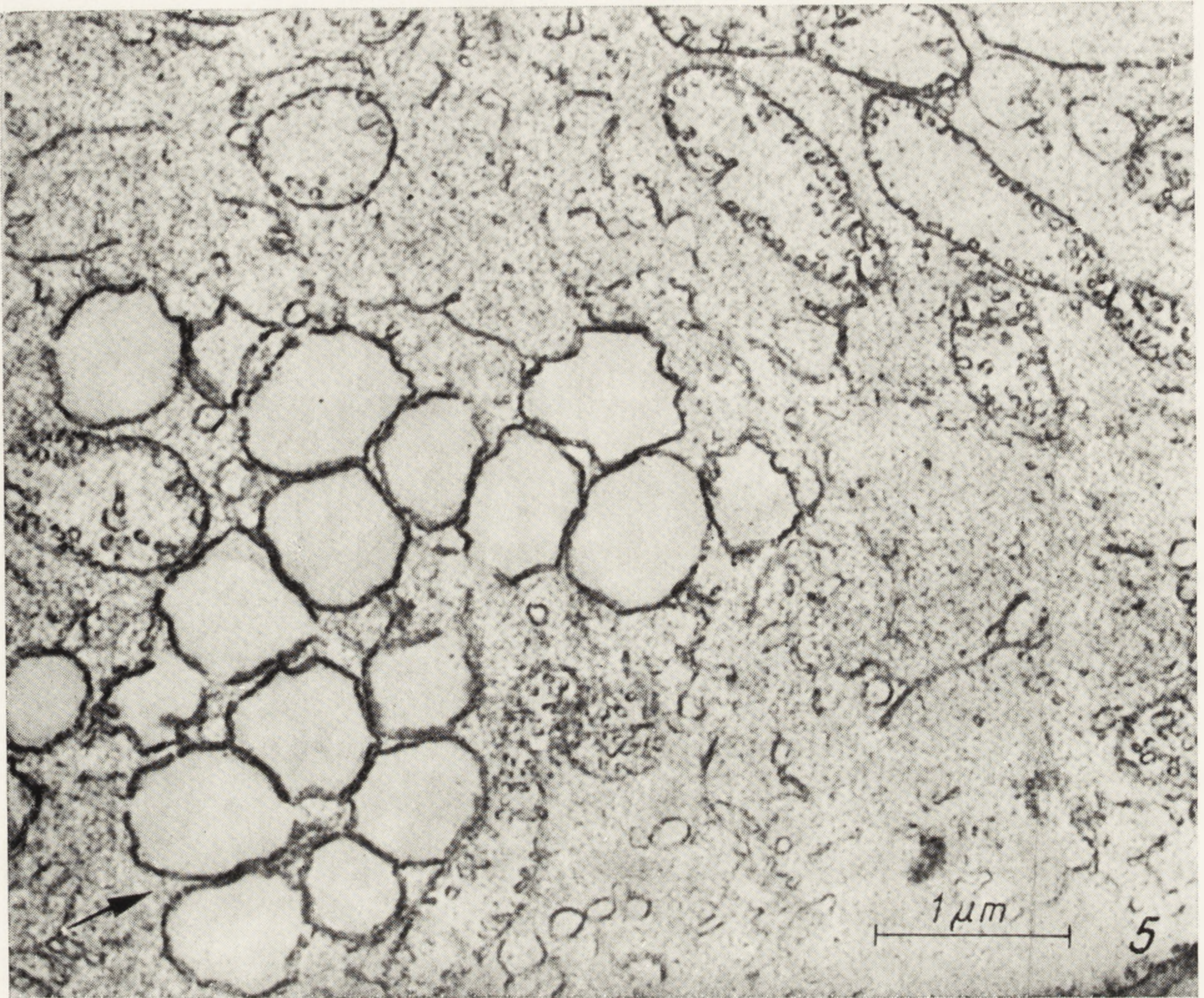
Trzecią grupę organelli uznanych za odpowiedniki lizosomów z powodu wysokiej aktywności enzymów hydrolitycznych (tab. 1) są sferosomy, uważane za miejsce syntezy lub gromadzenia tłuszczów, a także ich mobilizowania w odpowiednim czasie. Obiektem badań były liścienie i bielmo nasion spoczynkowych i kiełkujących *Nicotiana tabacum*, *Arachis hypogea*, *Ricinus communis* [32–35].

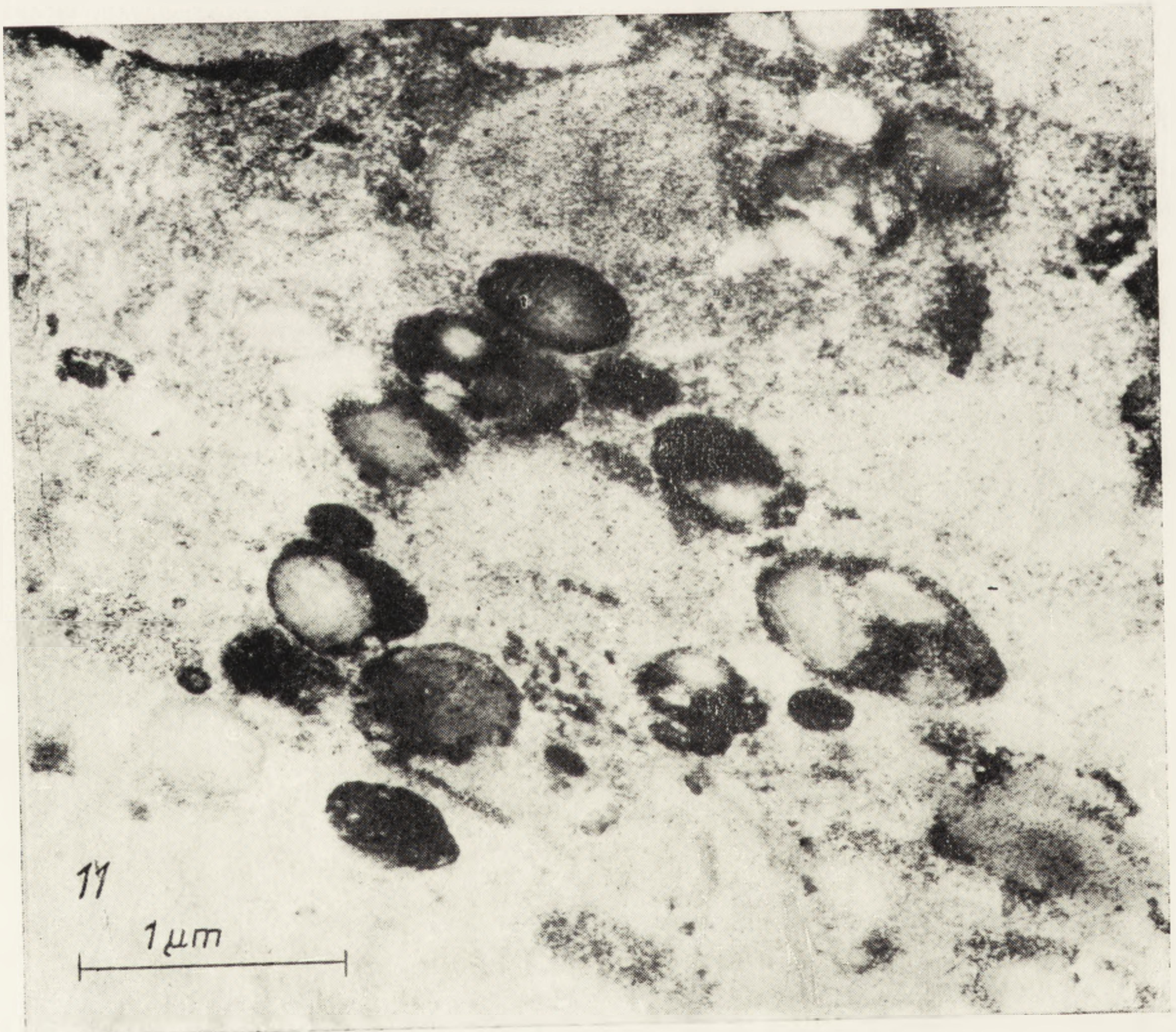
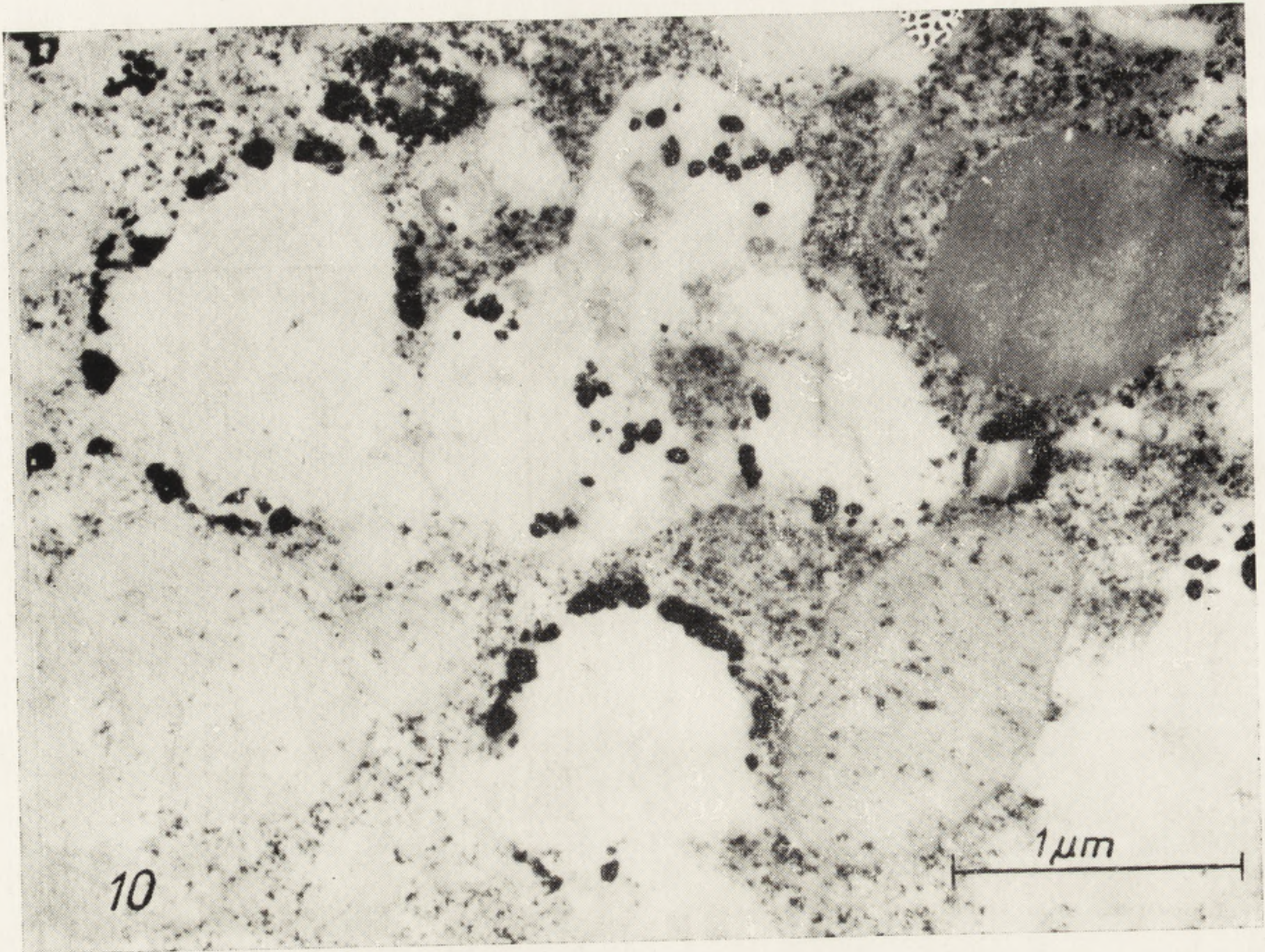
Według biochemicznej charakterystyki [32] sferosomy pochodzące z kiełkujących liścieni *Arachis* zawierają 98,1% lipidów całkowitych, w tym 0,77% fosfolipidów oraz 1,27% białka. Zawartość lipidów jest mniejsza w sferosomach, pochodzących z tkanki niezapasowej liści *Brassica capitata* ([45], tab. 1). Struktury wyizolowane z nasion są podobne do sferosomów in situ. Po utrwaleniu w czterotlenku osmu, otaczająca je błona jest niewidoczna, ujawnia się dopiero po rozpuszczeniu lipidów heksanem. Już wcześniej wspomniano, że błona ta przez niektórych badaczy była określana jako inna niż błona elementarna. Do wyjaśnienia jej struktury przyczyniły się wyniki badań Schwarzenbacha [46] przeprowadzonych na rozwijającym się bielmie *Ricinus*. Poczynając od 10

Podpisy pod rysunki

- Rys. 1. Fragment żywej strzępki grzyba *Achlya* sp., widoczne sferosomy i mitochondria ($\times 2500$)
- Rys. 2. Lokalizacja fosfatazy kwasnej w strzępce *Saprolegnia* sp. (utrwalacz aceton, α -naftylofosforan sodu + Fast blue RR) ($\times 2500$)
- Rys. 3. Lokalizacja esterazy indoksylowej w oosporach (strzałka) *Achlya flagellata* (nieutrwalony) ($\times 1500$), (Palczewska [22])
- Rys. 4. Fragment młodej strzępki *Achlya* sp. utrwalonej w $KMMnO_4$, widoczne sferosomy (strzałki), w których część centralna jest elektronowo pusta ($\times 21900$)
- Rys. 5. Sferosomy (strzałka) w starszej strzępce vegetatywnej *Achlya* sp., utrwalonej w $KMnO_4$ ($\times 18500$)
- Rys. 6. Sferosomy w strzępce vegetatywnej *Achlya* sp., utrwalonej w aldehydzie glutarowym, otoczone „half unit-membrane” ($\times 25760$)
- Rys. 7. Prosferosomy oddzielające się od cystern retikulum endoplazmatycznego (strzałki) w vegetatywnej strzępce *Achlya* sp., utrwalonej w $KMnO_4$, N — jądra ($\times 19320$)
- Rys. 8. Sferosomy w oosporach *Achlya flagellata*, widoczna otaczająca je „half unit membrane” (cienka strzałka), błona elementarna (gruba strzałka) ($\times 80500$)
- Rys. 9. Lokalizacja kwasnej β -glicerofosfatazy w wakuolach (v) komórki merystematycznej *Cucumis sativus*, utrwalonej w aldehydzie glutarowym. N — jądro; nu — jąderko; ch — chromatyna; p — plastyd; e — retikulum endoplazmatyczne; d — dik-tiosom; gl — kropla lipidowa; pc — ściana komórkowa; m — mitochondrium ($\times 7000$) (Poux [55])
- Rys. 10. Cytolisom w komórce przetrwalnikowej *Saprolegnia* sp., lokalizacja β -glicerofosfatazy kwasnej ($\times 25760$)
- Rys. 11. Lokalizacja β -glicerofosfatazy w różnicującej się zarodni *Saprolegnia* sp., cytolisomy wykazujące aktywność enzymatyczną wyznaczającą strefy rozdziału cytoplazmy dla przyszłych zarodników ($\times 25760$)







dnia kiełkowania, można obserwować w jego komórkach pojawianie się prosferosomów, stanowiących liczną grupę kuleczek. W czasie dalszego rozwoju nasilenia prosferosomy gromadzą lipidową substancję zapasową między dwoma gęstymi dla elektronów warstwami błony elementarnej. W ten sposób podczas różnicowania sferosomów warstwy zewnętrzna i wewnętrzna błony zostają rozdzielone. Zewnętrzna część błony powiększa się, natomiast wewnętrzna staje się niewidoczna. Chociaż mechanizm tego procesu pozostaje niejasny, jest zupełnie prawdopodobne, że występujące w błonie enzymy mogą odgrywać rolę w tym rozwoju.

Na podstawie później przeprowadzonych badań [47] błona ta została określona jako „half unit membrane” (rys. 8), grubość jej wynosi od 2 do 3,5 nm.

W związku z gromadzeniem i mobilizacją lipidów zawartych w sferosomach najbardziej interesująca wydaje się aktywność lipazy. Wyniki badań nad występowaniem lipaz w nasionach są niejednoznaczne. U *Arachis* nie wykryto lipazy związanej z frakcją sferosomową [32]. Spichiger [35] oznaczał aktywność lipazy w czystej frakcji sferosomowej z bielma tytoniu. Zastosowanie jako substratów trójoleinianu glicerolu i tweenu 80 (oleinianu poliglikolu lub polimannitolu) nie dało rezultatów. Natomiast sztuczny substrat dwubutyrylofluoresceina była rozszczepiana w obecności ekstraktu z bielma. Izolowane sferosomy wykazywały jednak bardzo nieznaczną aktywność. Natomiast we frakcji sferosomów, które były inkubowane w 28°C (środowisko mannit pH 7,0) prawie połowa trójglicerydów była zhydrolizowana przy wzroście zawartości dwu- i monoglicerydów. Wyniki te prowadzą do wniosku, że trójglicerydy zawarte w tłuszczach zapasowych są hydrolizowane przez lipazy, a odszczepione kwasy tłuszczowe przemieszczają się do innych obszarów cytoplazmatycznych, gdzie ulegają dalszym przekształceniom. Reakcje te przebiegają wolniej niż rozszczepianie trójglicerydów, ponieważ w przeciwieństwie do izolowanych sferosomów w ekstrakcie z bielma udział wolnych kwasów tłuszczowych w lipidach całkowitych silnie wzrasta.

Na podstawie badań Spichigera i późniejszych [48, 49], przeprowadzonych na liścieniach *Helianthus*, *Cucumis* i *Lycopersicum* wiadomo, że dalsze przemiany kwasów tłuszczowych są związane z glioksosomami, określoną kategorią mikrociał, pochodzących z retikulum endoplazmatycznego, mających ziarnistą stronę, otoczonych błoną elementarną. Nie wiadomo czy glioksosomy biorą udział w początkowej lipolitycznej reakcji, jaka musi mieć miejsce wewnątrz ciała tłuszczowego lub na jego powierzchni, zanim kwasy tłuszczowe będą przydatne do dalszego metabolizmu.

Obecność enzymów takich jak fosfataza, proteaza, DNAaza i RNAaza w sferosomach bielma tytoniu pozwala przypuszczać, że organelle te nie

są jedynie miejscem mobilizacji trójglicerydów lecz służą także jako miejsce trawienia innych składników komórek bielma.

Jedyne dane o cytochemicznej lokalizacji lipazy pochodzą z pracy Ory i wsp. [33]. Badacze ci stosując olej bawełniany jako substrat wykryli ją we frakcji sferosomowej z niewykiełkowanych nasion *Ricinus*. W mikroskopie elektronowym sferosomy te mają wygląd typowy, produkt aktywności lipazy w postaci mydła ołowiowego jest zlokalizowany na ich powierzchni.

Wydaje się, że w obliczu tak skąpych danych trudno jest zgodzić się z Frey-Wysslingiem [50], że lipaza jest enzymem typowym dla wszystkich sferosomów.

Niewątpliwie występujące w różnych tkankach zapasowych sferosomy, wykazujące nieco odmienny skład w zawartości lipidów i białek nie są strukturami identycznymi i mogą się różnić znaczną specyficzną wobec substratów. Wydaje się, że badania jeszcze innych typów sferosomów pozwolą na wyjaśnienie tego zagadnienia.

Z przedstawionych danych wynika, że nie ma jeszcze podstaw do wyróżnienia sferosomów jako oddzielnej grupy organelli zaangażowanych w komórce roślinnej do syntezy lipidów. Z punktu widzenia morfologii traktowanie sferosomów jako oddzielnych organelli, różnych od kropli lipidowych, nie zostało jeszcze udokumentowane. Dlatego spotyka się używane jako synonimy nazwy dla tych ciał: sferosomy i krople lipidowe.

Trudno jest również już obecnie rozstrzygnąć w jakich organellach komórkowych występowały enzymy hydrolityczne wykrywane w mikroskopie świetlnym w sferosomach.

Wobec zaistnienia znacznych rozbieżności w wynikach badań różnych autorów powodowanych zapewne użyciem różnorodnego materiału, praca Yatsu i wsp. [45] może być potraktowana jako próba porównania sferosomów znanych z mikroskopu świetlnego, pochodzących z tkanek niezapasowych i niemerystematycznych (cebula *Allium cepa* i liście *Brassica capitata*) ze sferosomami nasion *Gossypium*, uważanymi przez tych autorów za krople lipidowe. Ze względu na trudność w otrzymaniu wystarczającej objętości frakcji sferosomów cebuli ostatecznie porównano tylko sferosomy frakcji otrzymanych z kapusty i bawełny. W ultracienkich skrawkach liści kapusty i skórki łusek cebuli jedynymi osmofilnymi strukturami były sferosomy mające kształt gwiazdek po utrwaleniu w OsO_4 , wykazujące ciemną obwódkę i elektronooptycznie puste po utrwaleniu w KMnO_4 . Sferosomy z nasion bawełny wyglądały tak samo. Sferosomy pochodzące z frakcji otrzymanych z kapusty i bawełny wyglądały na mikrofotografiach elektronowych identycznie. We frakcjach

sferosomowych nie wykryto fosfatazy kwaśnej. Autorzy podtrzymują pogląd, że sferosomy są kroplami lipidowymi i proponują dla nich nazwę oleosomy. Jednakże dane przedstawione w ich pracy wydają się niewystarczające do oceny funkcji tych struktur, natomiast termin oleosomy związany nie z kształtem lecz z funkcją wydaje się bardziej odpowiedni.

Podsumowując przedstawione dane dotyczące badań biochemicznych nad frakcjami różnego typu lizosomów tzn. struktur wyposażonych w kilka co najmniej enzymów hydrolitycznych, poparte obserwacjami w mikroskopie elektronowym można stwierdzić co następuje:

a) organelle te powstają w ten sam sposób — jako pęcherzyki oddzielone od cystern retikulum endoplazmatycznego;

b) oddzielone małe pęcherzyki nazywane prowakuolami, prosferosomami, lizosomami pierwotnymi, stanowią frakcję niejednorodną o różnej gęstości i różnych aktywnościach enzymów;

c) różnicowanie pierwotnych lizosomów może następować w trzech kierunkach; jest to w znacznym stopniu związane z tkanką w jakiej występują;

d) w tkankach merystematycznych — pełnią one funkcje hydrolityczne podczas rozwoju siewki — intensywność tych procesów w dojrzałych komórkach jest mniejsza; w dalszych etapach następuje włączanie do wakuol pęcherzyków Golgiego — takie struktury porównuje się do wtórnych lizosomów;

e) białkowe substancje zapasowe są gromadzone w ziarnach aleuronowych, ich wyposażenie enzymatyczne jest nieco odmienne, a przede wszystkim między innymi brak jest DNAazy — w okresie kiełkowania następuje przekształcenie ziaren aleuronowych w wakuole, które będąc zaopatrzone nie tylko w proteazę, fosfatazę i esterazę lecz w α -glukozydazę i β -amylazę mogą brać udział w trawieniu także innych substancji;

f) w tkankach zapasowych gromadzących tłuszcze następuje różnicowanie się w kierunku sferosomów; w takich sferosomach obok enzymów hydrolitycznych charakterystycznych dla wakuol występuje jeszcze lipaza; sferosomy są uważane za miejsca gromadzenia i ewentualnej syntezy tłuszczów; proponuje się dla nich termin oleosomy.

Należy stwierdzić, że metodami cytochemii ultrastrukturalnej, nie udało się znaleźć organelli homologicznych z lizosomami ocenianymi na podstawie kryteriów biochemicznych. W komórkach roślinnych nie można zakwalifikować określonego składnika komórkowego jako lizosomu, przynajmniej przy aktualnym stanie wiedzy.

Mimo wielu badań [51–62] występowanie w komórkach roślinnych utworów wyposażonych przynajmniej w kilka enzymów hydrolitycznych nie zostało dowiedzione w mikroskopie elektronowym. Aktywność enzy-

mów hydrolitycznych, wśród nich głównie fosfatazy kwaśnej, wykrywa się w zróżnicowanym pod względem morfologicznym i funkcjonalnym materiale roślinnym, w strukturach typu wakuol nazywanych lizosomami. Nagromadzone dane nie wystarczają do poszukiwań analogii między tymi utworami a pierwotnymi i wtórnymi lizosomami zwierzęcymi.

Wśród licznych prac wyróżniają się piękną dokumentacją oraz staranną analizą prace Poux poświęcone lokalizacji enzymów hydrolitycznych w tkankach głównie merystematycznych [51–55]. Miejscem intensywnej aktywności fosfatazy kwaśnej są małe wakuole (rys. 9), przy czym wakuole pozbawione tej aktywności sąsiadują z wakuolami obfitującymi w osady produktu reakcji. W miarę powiększania się objętości wakuol, aktywność wydaje się maleć. W dużych wakuolach spotyka się mało osadów. Tego typu wakuole należą do kategorii wakuol, których nie udawało się wyizolować z materiału, będącego przedmiotem badań biochemicznych. W utworach tych autorka zlokalizowała ponadto aktywność arylosulfatazy, a także aktywność fosfataz specyficznych działających przy pH 7 z zastosowaniem jako substratów: IDP, TPP, ATP, ADP, AMP. Do enzymów zlokalizowanych w wakuolach należy jeszcze esteraza, rozkładająca octan naftolu ASD [58].

W wakuolach aleuronowych wykryto kwaśną fosfatazę [51, 52].

Coulomb w swych pracach, których obiektem jest merystem korzeniowy *Cucurbita pepo* [63–67], a także formacje tak specyficzne, jak brodawki korzeniowe i tumory bakteryjne [68, 69] poszukuje zależności między fitolisomami (termin autora) a innymi składnikami komórki przez analogię do układu GERL (Golgi — endoplazmatyczne retikulum — lizosomy) typowego dla niektórych komórek zwierzęcych. Opisywane przez niego utwory, będące miejscami lokalizacji fosfatazy kwaśnej, arylosulfatazy, esterazy tioloctowej (nie wykazujące aktywności DNAazy) mające ziarnistą stronę i otoczone błoną, niestety niezbyt dobrze widoczną na zdjęciach, różnią się wyglądem od wakuoli. Trudno jest ocenić obecnie czy u tej rośliny występuje inny, specyficzny typ lizosomów, który nie dawał reakcji na peroksydazę z odczynnikiem DAB, a więc nie przypominał mikrociał występujących w niewielkiej liczbie w komórkach merystemów korzeniowych, w których wykrywano fosfatazę kwaśną i peroksydazę [55, 70]. Aktywność peroksydazową mają także wakuole merystematyczne. Wydaje się więc prawdopodobne w związku z tym, że sygnalizowana w pewnych pracach aktywność fosfatazy kwaśnej mogła dotyczyć właśnie mikrociał-peroksysomów. Jedynie Marty [69, 71] uważa, że może odróżnić lizosomy od peroksysomów w komórkach merystemu korzeniowego *Euphorbia characias*.

Ultrastrukturalne aspekty pochodzenia, rozwoju i funkcji wakuol przedstawiła ostatnio Berjak [60] na przykładzie komórek merystemu

korzeniowego *Lepidium sativum*, utrwalanych podwójnie, w aldehydzie glutarowym i nadmanganianie potasu.

Z danych autorki wynika, że wakuole powstają jako pęcherzyki z retikulum endoplazmatycznego. Błona tych pęcherzyków wykazuje aktywność fosfatazy kwaśnej, natomiast aktywności takiej nie obserwuje się w błonach cystern, od których one się oddzielają. Następnie wakuola zostaje otoczona cysterną retikulum. Do takiego układu zostają włączone pęcherzyki Golgiego, po czym wakuole pęcznieją. Autorka tłumaczy to zjawisko wzrostem ciśnienia osmotycznego wewnątrz wakuol, spowodowanym rozpuszczeniem substancji w nich obecnych. W miarę rozwoju wakuole stawały się głównym, jeżeli nie jedynym miejscem występowania aktywności fosfatazy kwaśnej.

Obecność jednego z enzymów lizosomalnych — fosfatazy kwaśnej w strukturach odpowiadających wyglądem sferosomom — wykryto w bielmie u *Iris* [72] oraz w strzępkach grzyba *Ceratocystis* [62].

W komórkach roślinnych wielokrotnie opisano ciała przypominające wtórne lizosomy zwierzęce, którym przypisywano związek z endocytozą. Występują w normalnych komórkach stożków wzrostu [73–76], w ryzoidach *Chara* [77], w komórce apikalnej pąków *Chara* [78] pojawiają się w związku z procesami patologicznymi [74–79], a także w związku z innymi procesami wymagającymi wydzielenia pewnych obszarów cytoplazmy i usunięcia ich [80].

Ciała te powstają w procesie sekwestracji przez otoczenie pojedynczą lub podwójną błoną pewnych terenów cytoplazmy. W obszarach tych mogą występować różne organelle komórkowe lub pęcherzyki i ciała mielinowe, co jest uzależnione od stadium degradacji. Wewnątrz takich cytolisomów została stwierdzona aktywność fosfatazy kwaśnej (rys. 10).

Marty [82] opisuje pęcherzyki autofagowe kanałów mlecznych u *Euphorbia*. Pęcherzyki zawierające wydzielinę związków politerpenowych są transportowane z części zewnętrznej komórki do kanału wydzielniczego. W określonym obszarze, otoczonym błoną izolującą i zawierającym cząstki wydzieliny, występuje reakcja pozytywna na fosfatazę kwaśną. Jest to według autora przykład autofagii kierowanej — cytoplazma uwolniona w ten sposób od składników paraplazmatycznych „odmładza się”.

Znane są u niektórych roślin etapy rozwojowe, podczas których pewne obszary w cytoplazmie ulegają strawieniu. Jednym z przykładów takiego stadium w morfogenezie jest różnicowanie się sporangium u niektórych grzybów, np. *Achlya*, w wyniku którego w maczugowatej części terminalnej strzępki następuje podział protoplastu na zoospory. W sporangium w okresie przedpodziałowym widoczne są liczne wakuole z produktem reakcji na fosfatazę kwaśną (rys. 11). Obecnie nie wiadomo jak powstają tego rodzaju struktury. Na mikrofotografiach elektronowych sporangiów,

znajdujących się w tym stadium obserwuje się proliferację retikulum endoplazmatycznego i prawdopodobne jest przypuszczenie, że wakuole te powstają z retikulum.

Rozpatrywano także w kilku przypadkach procesy starzenia się [61, 82, 83] komórek w związku z funkcją lizosomów i enzymów lizosomalnych. Podczas starzenia się płatków korony *Ipomea purpurea*, stwierdzono za pomocą metod biochemicznych aktywność dezoksyrybonukleazy, rybonukleazy i β -glukozydazy; aktywność innych enzymów hydrolitycznych wzrasta nieznacznie. Morfologicznym wyrazem starzenia się jest rozrzedzenie cytoplazmy, inwaginacja retikulum endoplazmatycznego do wakuoli. W końcu następuje rozerwanie tonoplastu. Wtedy produkty reakcji enzymatycznych są wykrywane w cytoplazmie.

Z przedstawionych danych wynika, że podobnie jak w komórce zwierzęcej lizosomy roślinne pełnią rolę w procesach morfogenezy i trawienia wewnątrzkomórkowego.

LITERATURA

- [1] PERNER E. S., 1952 — Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in *Allium*-Epidermiszellen, Biol. Zbl., **71**: 43–69.
- [2] PERNER E. S., 1953 — Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen, Protoplasma, **42**: 457–481.
- [3] OLSZEWSKA M. J., 1967 — Sferosomy w świetle nowych badań, Wiad. Bot., **11**: 9–31.
- [4] SOROKIN H. P., 1955 — Mitochondria and spherosomes in the living epidermal cells, Amer. J. Bot., **42**: 225–231.
- [5] BAUTZ E., 1955 — Zytologische Untersuchungen an höheren Pilzen, Ber. Dtsch. Bot. Ges., **68**: 197–204.
- [6] BAUTZ E., 1956 — Mitochondrien und Sphärosomen der Pflanzenzelle, Ztschr. f. Bot., **44**: 109–136.
- [7] WAŁEK-CZERNECKA A., KWIATKOWSKA M., 1961 — Elajoplasty ślazowatych, Acta Soc. Bot. Pol., **30**: 345–365.
- [8] PALCZEWSKA I., 1964 — Badania cytomorfologiczne i cytochemiczne grzybni *Polyporus sulphureus* Bull. et Fr., Zeszyty Naukowe Uniw. Łódzkiego, seria II, nr 16: 151–161.
- [9] HOLCOMB G. E., HILDEBRANDT A. C., EVERT R. F., 1967 — Staining and acid phosphatase reactions of spherosomes in plant tissue cells, Amer. J. Bot., **54**: 1204–1209.
- [10] WAŁEK-CZERNECKA A., 1962 — Mise en évidence de la phosphatase acide dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, Acta Soc. Bot. Pol., **31**: 539–543.
- [11] WAŁEK-CZARNECKA A., 1965 — The histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in spherosomes of plant cells, Acta Soc. Bot. Pol., **34**: 573–588.
- [12] GÓRSKA-BRYLASS A., 1965 — Hydrolases in pollen grains and pollen tubes, Acta Soc. Bot. Pol., **34**: 589–604.

- [13] KWIATKOWSKA M., 1966 — Z badań nad elajoplastami. *Ornithogalum umbellatum*. Cz. I Obserwacje morfologiczne, cytochemiczne i cytoenzymatyczne, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **35**: 7-16.
- [14] OLSZEWSKA M. J., WAŁEK-CZERNECKA A., KWIATKOWSKA M., GABARA B., 1965 — Hétérogénéité enzymatique des sphérosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**: 339-401.
- [15] SOROKIN H. P., SOROKIN S., 1968 — Fluctuations in the acid phosphatase activity of spherosomes in guard cells of *Campanula persicifolia*, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 791-802.
- [16] PALCZEWSKA I., 1965 — Über die Lokalisierung der Thiaminpyrophosphatase in den Hyphen von *Achlya* sp., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**: 754-756.
- [17] PITT D., WALKER R. J., 1967 — Particulate localisation of acid phosphatase in fungi, *Nature, Lond.*, **215**: 783-784.
- [18] PITT D., 1968 — Histochemical demonstration of certain hydrolytic enzymes within cytoplasmic particles of *Botrytis cinerea* Fr. *J. Gen. Microbiol.*, **52**: 67-75.
- [19] PITT D., COOMBES C., 1968 — The disruption of lysosome-like particles of *Solanum tuberosum* cells during infection by *Phytophthora erythroseptica* Pet-hybr., *J. Gen. Microbiol.*, **53**: 197-204.
- [20] ARMENTROUT V. A., SMITH G. G., WILSON CH. L., 1968 — Spherosomes and mitochondria in the living fungal cell, *Amer. J. Bot.*, **55**: 1062-1067.
- [21] REISS J., 1969 — Nachweis von Hydrolasen in Pilzzellen, *Histochemie*, **18**: 12-23.
- [22] PALCZEWSKA I., 1972 — Cytochemical localization of certain hydrolytic enzymes at various stages of development of *Achlya flagellata* mycelium, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **41**: 265-282.
- [23] DRAWERT H., MIX M., 1962 — Die Sphärosomen im elektronenmikroskopischen Bild, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **75**: 128-134.
- [24] FREY-WYSSLING A., GRIESHABER E., MÜHLETHALER K., 1963 — Origin of spherosomes in plant cells, *J. Ultrastr. Res.*, **8**: 506-516.
- [25] FREY-WYSSLING A., MÜHLETHALER K., 1965 — Ultrastructural plant cytology, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam.
- [26] YATSU L. J., 1965 — The ultrastructure of cotyledonary tissue from *Gossypium hirsutum* L. seeds, *J. Cell Biol.*, **25**: 193-199.
- [27] SOROKIN H. P., SOROKIN S., 1966 — The spherosomes of *Campanula persicifolia* L., *Protoplasma*, **62**: 216-236.
- [28] MATILE PH. BALZ J. P., SEMADENI E., JOST M., 1965 — Isolation of spherosomes with lysosome characteristics from seedlings, *Ztsch. f. Naturforsch.*, **20B**: 693-698.
- [29] BALZ H. P., 1966 — Intrazelluläre Lokalisation und Funktion von hydrolytischen Enzymen bei Tabak, *Planta*, **70**: 207-236.
- [30] SEMADENI E. G., 1967 — Enzymatische Charakterisierung der Lysosomen-äquivalente (Sphärosomen) von Maiskeimlingen, *Planta*, **72**: 91-118.
- [31] MATILE Ph., 1968 — Lysosomes of root tip cells in corn seedlings, *Planta*, **79**: 181-196.
- [32] JACKS T. J., YATSU L. Y., ALTSCHUL A. M., 1967 — Isolation and characterisation of peanut spherosomes, *Plant Physiol.*, **42**: 585-597.
- [33] ORY L. R., YATSU L. Y., KIRCHER H. W., 1968 — Association of lipase activity with spherosomes of *Ricinus communis*, *Archiv Biochem. Biophys.*, **123**: 255-264.

- [34] MATILE Ph., SPICHIGER J., 1968 — Lysosomal enzymes in spherosomes (oil droplets) of tobacco endosperm, *Ztsch. f. Pflanzenphysiol* 58: 277-280.
- [35] SPICHIGER J., 1969 — Isolation und Charakterisierung von Sphärosomen und Glyoxysomen aus Tabakendosperm, *Planta*, 89: 56-75.
- [36] YATSU L. Y., JACKS T. J., 1968 — Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds, *Archiv Biochem. Biophys.*, 124: 466-471.
- [37] MATILE Ph., 1968 — Aleurone vacuoles as lysosomes, *Z. Pflanzenphysiol.*, 58: 365-368.
- [38] MATILE Ph., WIEMKEN A., 1967 — The vacuole as the lysosome of the yeast cell, *Archiv f. Mikrobiol.*, 56: 148-157.
- [39] ITEN W., MATILE Ph., 1970 — Role of chitinase and other lysosomal enzymes of *Coprinus lagopus* in the autolysis of fruiting bodies, *J. Gen. Microbiol.*, 61: 301-309.
- [40] MATILE Ph., 1971 — Vacuoles, lysosomes of *Neurospora*, *Cytobiologie*, 3: 324-330.
- [41] MATILE Ph., MOOR H., 1968 — Vacuolation: origin and development of the lysosomal apparatus in root tip cells, *Planta*, 80: 159-175.
- [42] MATILE Ph., 1969 — Vacuoles as lysosomes of plant cells, *Biochem. J.*, 111: 26P-27P.
- [43] MATILE Ph., 1965 — Intrazelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von *Neurospora crassa*. I. Funktion und subzelluläre Verteilung proteolytischer Enzyme, *Z. f. Zellforsch.*, 65: 884-896.
- [44] MATILE Ph., JOST M., MOOR H., 1965 — Intrazelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von *Neurospora crassa*. II. Identifikation von proteasehaltigen Zellstrukturen, *Z. Zellforsch.*, 68: 205-216.
- [45] YATSU L. Y., JACKS T. J., HENSARLING T. P., 1971 — Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage and cottonseed tissues, *Plant Physiol.*, 48: 675-682.
- [46] SCHWARZENBACH A. M., 1971 — Observations on spherosomal membranes, *Cytobiologie*, 4: 145-147.
- [47] YATSU L. Y., JACKS T. J., 1972 — Spherosome membranes. Half unit-membranes, *Plant Physiol.*, 49: 937-943.
- [48] GRUBER R. J., TRELEASE R. N., BECKER W. M., NEWCOMB E. H., 1970 — A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fat-storing seeds, *Planta*, 93: 269-288.
- [49] TRELEASE R. N., BECKER W. M., GRUBER R. J., NEWCOMB E. H., 1971 — Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons, *Plant Physiol.*, 48: 461-475.
- [50] FREY-WYSSLING A., 1973 — Comparative organellography of cytoplasm, Springer Verlag, Wien.
- [51] POUX N., 1963 — Localisation des phosphates et de la phosphatase acide dans les cellules des embryons de blé (*Triticum vulgare* Vill.) lors de la germination, *J. Microscopie*, 2: 557-568.
- [52] POUX N., 1965 — Localisation de l'activité phosphatasique acide et des phosphates dans les grains d'aleurone. I. Grains d'aleurone renferment a lt fois globoides, et cristallcides, *J. Microscopie*, 4: 771-782.
- [53] POUX N., 1967 — Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radriculaire de *Cucumis sativus* L., I. Activités phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme, *J. Microscopie*, 6: 1043-1058.

- [54] POUX N., 1967 — Ultrastructural localisation of aryl sulphatase activity in plant meristematic cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 932-933.
- [55] POUX N., 1970 — Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. III. Activité phosphatasique acide, *J. Microscopie*, **9**: 407-434.
- [56] MIKULSKA E., GABARA B., 1968 — Mise en évidence de l'activité phosphatasique acide en microscopie électronique dans les cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **37**: 197-200.
- [57] DAUWALDER M., WHALEY W. G., KEPHART J. E., 1969 — Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus, *J. Cell Sci.*, **4**: 455-497.
- [58] GAHAN P. B., MCLEAN J., 1969 — Subcellular localisation and possible functions of acid β -glycerophosphatases and naphthol esterases in plant cells, *Planta*, **89**: 126-135.
- [59] HALPERIN W., 1969 — Ultrastructural localisation of acid phosphatase in cultured cells of *Daucus carota*, *Planta*, **88**: 91-102.
- [60] BERJAK P., 1972 — Lysosomal compartmentation: ultrastructural aspects of the origin, development and function of vacuoles in root cells of *Lepidium sativum*, *Ann. Bot.*, **36**: 73-81.
- [61] BERJAK P., VILLIERS T. A., 1970 — Ageing in plant embryos. I. The establishment of the sequence of development and senescence in the root cap during germination, *New Phytol.*, **65**: 929-938.
- [62] WILSON Ch. L., STIERS D. L., SMITH G. S., 1970 — Fungal lysosomes or spherosomes?, *Phytopathology*, **61**: 216-227.
- [63] COULOMB P., COULOMB C., 1971 — Formation des phytolysomes. Mise en évidence de relations entre réticulum endoplasmique, les dictyosomes et les phytolysomes dans le méristème racinaire de la Courge, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272D**: 1634-1637.
- [64] COULOMB P., 1969 — Détection de l'aryl-sulphatase dans des particules analogues aux lysosomes des cellules du méristème racinaire de jeunes Courges, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **269D**: 1400-1401.
- [65] COULOMB P., 1969 — Localisation de l'estérase thiolacétique dans le méristème racinaire de la Courge (*Cucurbita pepo* L. Cucurbitacée), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **268 D**: 656-659.
- [66] COULOMB P., 1969 — Localisation de la déoxyribonucléase acide dans le méristème racinaire de la Courge, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **269 D**: 1514-1516.
- [67] COULOMB P., 1971 — Phytolysomes dans le méristème racinaire de la Courge (*Cucurbita pepo*). Activité phosphatasique acide et activité peroxydase, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272 D**: 48-51.
- [68] TRUCHET G., COULOMB P., 1971 — Localisation de la phosphatase acide et de la peroxydase dans les cellules de nodules racinaires de Pois (*Pisum sativum*). Relations entre la cellule hôte et la bactérie, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272 D**: 1499-1502.
- [69] COULOMB P. 1971 — Sur la présence des phytolysomes dans les cellules de tumeurs de la plantule de Pois (*Pisum sativum* L.) induites par l'*Agrobacterium tumefaciens*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272 D**: 1229-1231.
- [70] POUX N., 1972 — Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. IV. Réactions avec la diaminobenzidine, mise en évidence de peroxysomes, *J. Microscop.* **14**: 183-218.

- [71] MARTY F., 1971 — Peroxysomes et compartiment lysosomal dans les cellules du méristème racinaire d'*Euphorbia characias* L.: une étude cytochimique, C. R. Acad. Sci. Paris, 273 D: 2504-2507.
- [72] GABARA B., KONOPSKA L., OLSZEWSKA M., 1972 — Activity and localization of some hydrolytic enzymes during the development of *Iris pseudoacorus* endosperm, Acta Soc. Bot. Pol., 41: 223-233.
- [73] BUVAT R., 1968 — Diversité des vacuoles dans les cellules de la racine d'Orge, C. R. Acad. Sci. Paris, 267 D: 296-298.
- [74] DEYSSON G., BENBADIS M. C., 1968 — Sur la formation de cytolysomes dans les cellules méristématiques racinaires d'*Allium sativum* L., C. R., Soc. Biol., 162: 329-331.
- [75] BOWES B. G., 1969 — Electron microscopic observations on myelin-like bodies and related membrane elements in *Glechoma hederacea* L., Z. Pflanzenphysiol., 60: 414-417.
- [76] MESQUITA J. F., 1972 — Ultrastructure de formations comparables aux vacuoles autophagiques dans les cellules des racines de l'*Allium cepa* L. et du *Lupinus albus* L., Cytologia, 37: 95-110.
- [77] SIEVERS A., 1966 — Lysosomenähnliche Kompartimente in Pflanzenzellen, Naturwissenschaften, 53: 334-335.
- [78] DUCREUX G., 1968 — Sur l'ultrastructure des apex des bourgeons principal et axillaire de *Chara vulgaris*, C. R. Acad. Sci. Paris, 267 D: 163-166.
- [79] VILLIER T. A., 1967 — Cytolysomes in long-dormant plant embryo cells, Nature, 214: 1356-1357.
- [80] KAZAMA F., 1973 — Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores. III. Cytolosomes and acid phosphatase distribution, Arch. Mikrobiol., 89: 95-104.
- [81] MARTY F., 1971 — Vésicules autophagiques des laticifères différenciés d'*Euphorbia characias* L., C. R. Acad. Sci. Paris, 272 D: 399-402.
- [82] COULOMB C., BUVAT R., 1968 — Processus de dégénérescence cytoplasmique partielle dans les cellules de jeunes racines de *Cucurbita pepo*, C. R. Acad. Sci. Paris, 267 D: 843-844.
- [83] MATILE P., WINKENBACH F., 1971 — Function of lysosomes and lysosomal enzymes in senescing corolla of the morning glory (*Ipomea purpurea*), J. Exp. Bot., 22: 759-771.

Otrzymano: grudzień, 1973.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autorki: ul. Nowopółdniowa 12/16, 90-237 Łódź.

MIKROTUBULE. I. BUDOWA I SKŁAD CHEMICZNY MIKROTUBUL

Maria KWIATKOWSKA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Mikrotubule (Mt) są rurkami o średnicy 18–30 nm. Ściankę Mt tworzą kuliste podjednostki połączone w koralikowate makromolekuły (protofilamenty) o układzie linearnym lub helikalnym. Na poprzecznym przekroju Mt wyróżnia się zwykle 13 podjednostek. Możliwy jest polimorfizm strukturalny różnych typów Mt. Białko Mt — tubulinę (stała sedimentacji 6S) rozdzielono na tubulinę α (masa cząsteczkowa 56 000) i tubulinę β (masa cząsteczkowa 53 000). Przyjmuje się, że podjednostki α i β związane są w heterodimer stanowiący element strukturalny Mt. Z Mt związane są mosty i ramiona zbudowane z dyneiny o właściwościach ATPazy (stała sedimentacji 14S, masa cząsteczkowa 600 000).

Mikrotubule są strukturami komórkowymi dostrzegalnymi jedynie w mikroskopie elektronowym, dlatego nie mają własnej historii z epoki cytologii klasycznej. W pierwszym okresie badań mikroskopowo-elektronowych stosowano powszechnie utrwalanie komórek nadmanganianem potasu i czterotlenkiem osmu. W tych warunkach Mt również nie mogły być uwidocznione, ponieważ KMnO_4 niszczy je całkowicie, a OsO_4 zachowuje tylko nieliczne kategorie Mt. Chociaż już w latach pięćdziesiątych donoszono sporadycznie o ujawnieniu utworów opisywanych jako elementy nitkowate, kanaliki, rurki, które dziś zaliczamy do Mt, inicjacja niezwykle aktywnych badań nad Mt została dokonana dopiero w 1963 r. przez dwie klasyczne prace — Slautterbacka oraz Ledbettera i Portera [90, 58]*. Slautterback opisał w komórkach stułbi rurkowate utwory i wprowadził dla nich nazwę „mikrotubule”. Ledbetter i Porter dzięki zastosowaniu aldehydu glutarowego ujawnili Mt w cytoplazmie inter-

* Piśmiennictwo na temat Mt jest bardzo obszerne i nie mogło być przedstawione w całości w niniejszym przeglądzie. Dalsze informacje Czytelnik może odnaleźć w licznych przeglądowych artykułach i monografiach (m.in. Newcomb [74], Bajer i Molè-Bajer [2], Dustin [28], Frey-Wyssling [32], Bardele [3], Margulis [65], Gadowska [33]).

kinetycznych komórek roślinnych, scharakteryzowali ich strukturę i wysunęli wiele przypuszczeń co do ich funkcji.

Powszechne zastosowanie przez cytologów utrwalaczy zawierających aldehyd glutarowy pozwoliło w krótkim czasie wykazać, że Mt są powszechnie występującym składnikiem komórek Prokariota i Eukariota.

Mt niewątpliwie nie są artefaktem. Dowodem realności ich istnienia stało się bowiem ujawnienie Mt w preparatach uzyskiwanych metodą „freeze-etching” z komórek drożdży [70] oraz z korzeni grochu [75].

Wygląd Mt pochodzących z różnych tkanek i organizmów jest bardzo typowy. Są to stosunkowo proste, nierozgałęzione rurki o przeciętnej średnicy 18–30 nm, chociaż opisywano także mniejsze, tzw. „minitubule” około 15 nm średnicy [31], także „makrotubule”, średnica 34–40 nm [24].

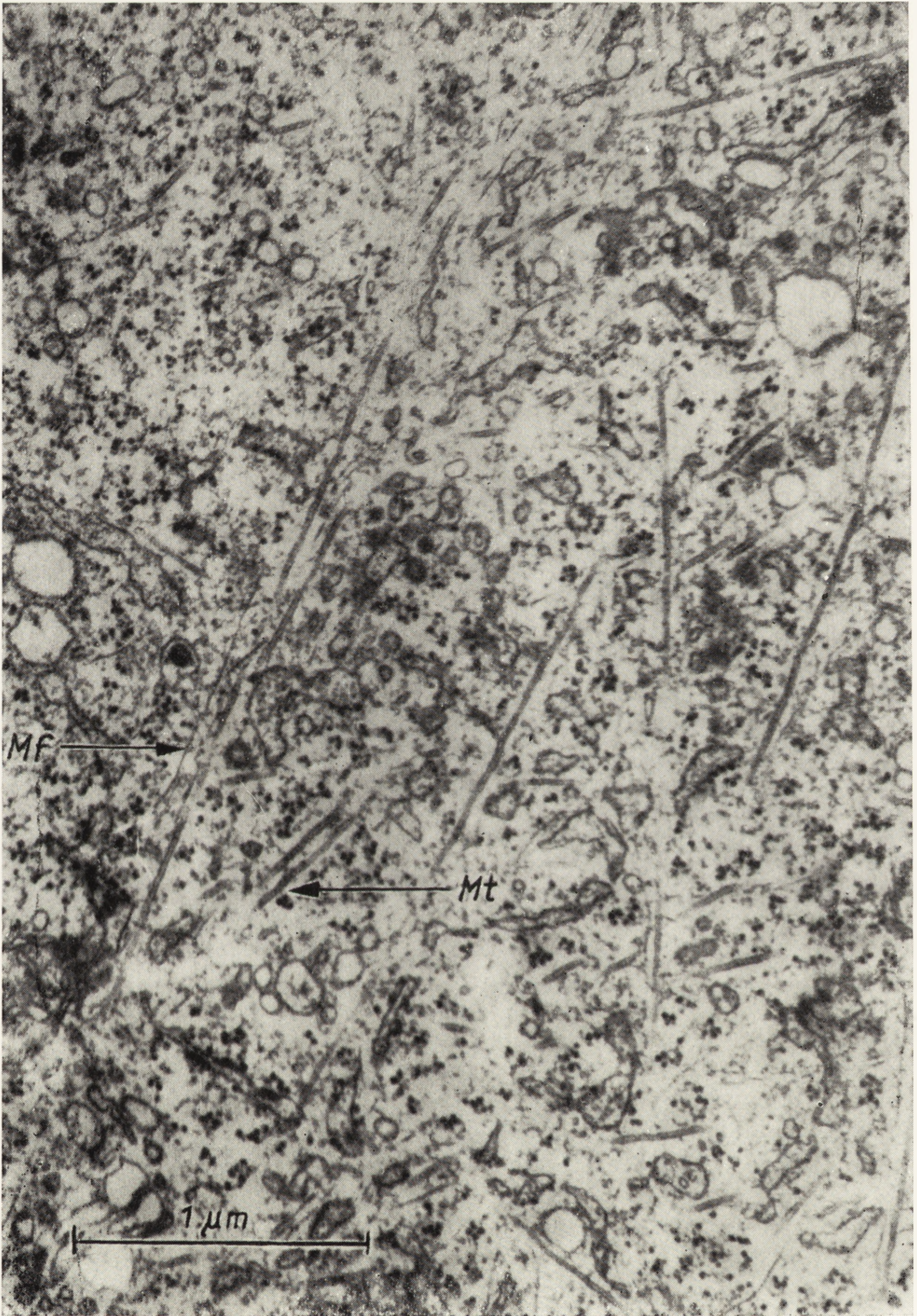
Długość Mt jest trudna do określenia na skrawkach; wynosi ona często kilka do kilkudziesięciu μm , a w neurytach prawdopodobnie może nawet przekraczać 1 metr [28].

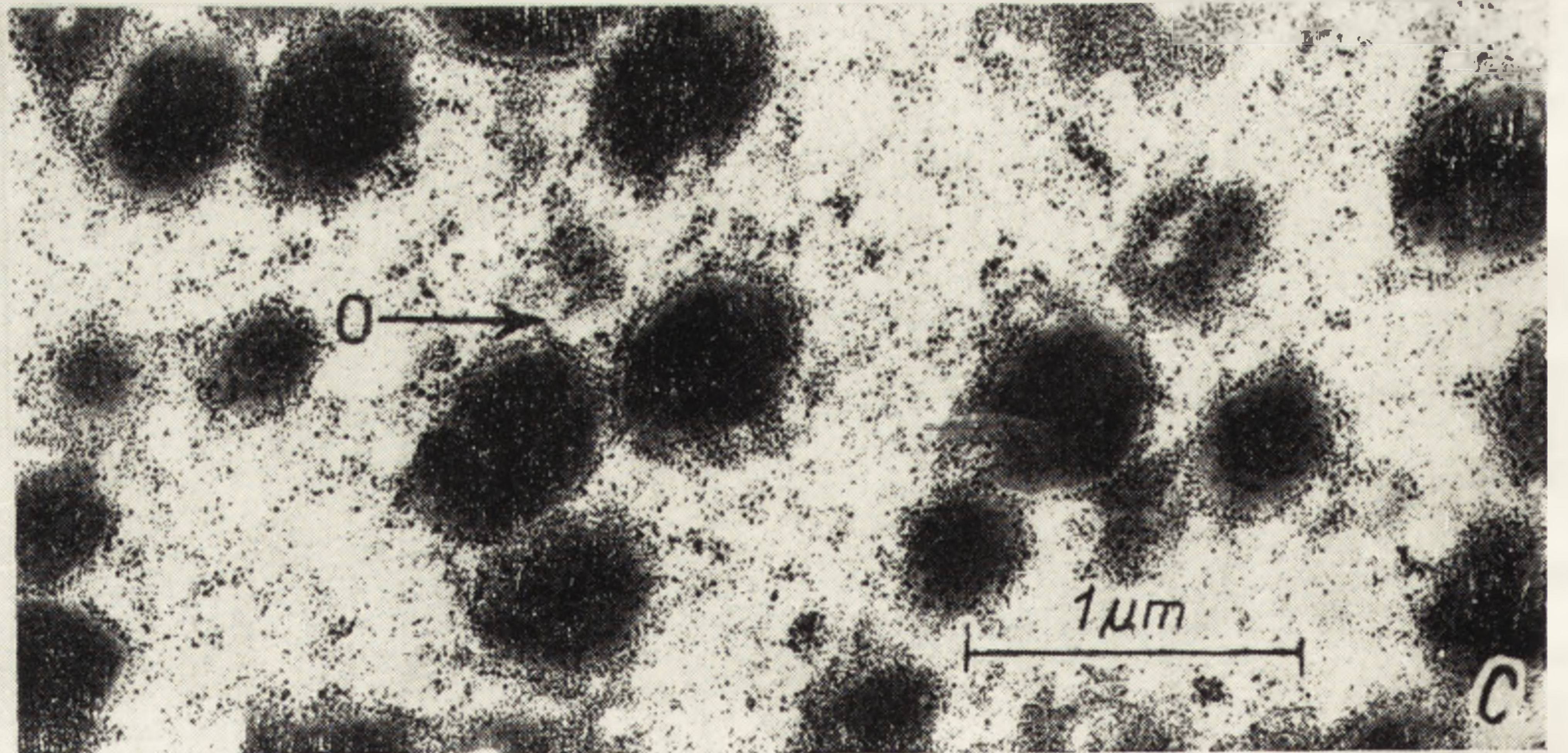
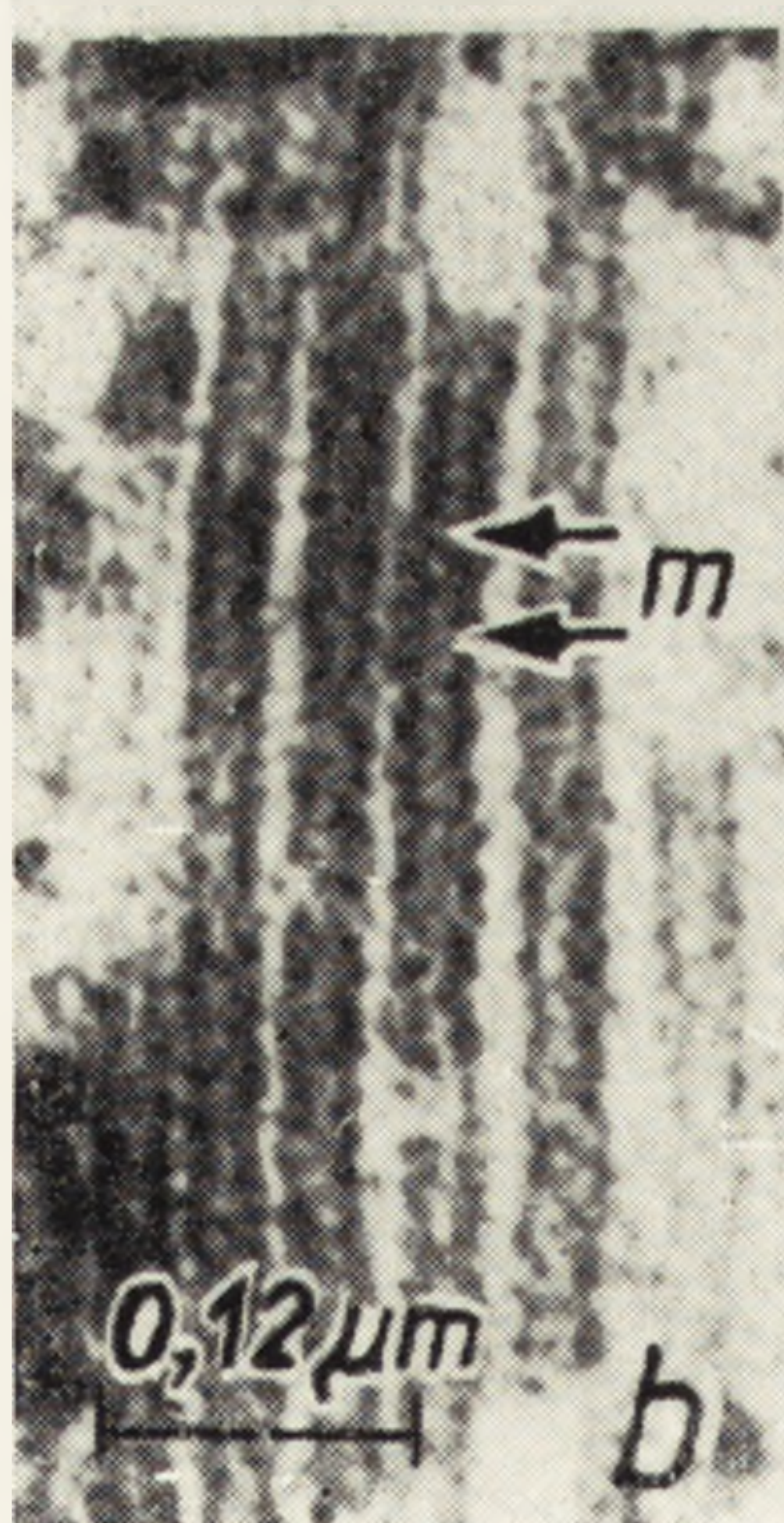
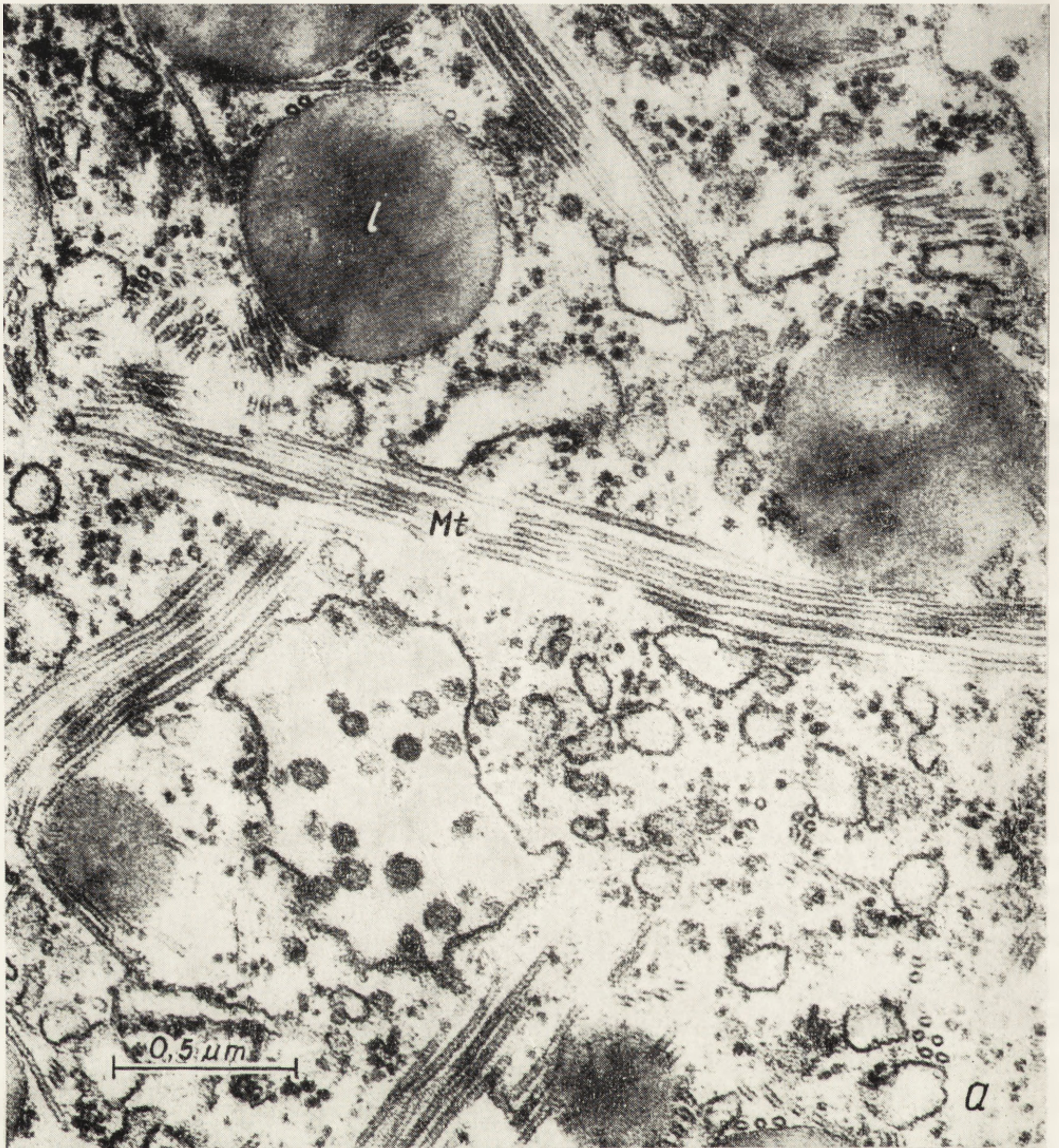
Mt występują bezpośrednio w cytoplazmie, zgrupowane niekiedy w wyspecjalizowanych regionach komórki. Okresowo pojawiają się również w jądrze, np. podczas mitozy wewnątrzjądrowej lub w specjalnych stacjach fizjologicznych komórki [72]. Rurkowate struktury ujawnione na terenie diktiosomów [17] i plastydów [79] nie są jednoznacznie identyfikowane jako Mt.

Mt rozmieszczone są niekiedy pojedynczo (rys. 1), częściej tworzą pasma lub wiązki (rys. 2), w których poszczególne Mt nie przylegają do siebie bezpośrednio, tworząc układy mniej lub bardziej uporządkowane. Szczególnie uporządkowany system stanowią Mt wrzeciona podziałowego. Ogromne, zadziwiająco prawidłowe, charakterystyczne dla gatunku układy występują u pierwotniaków, tworząc aksostyl (rys. 4 b) lub wewnętrzny szkielet aksopodiów promienic, słonecznic (rys. 4 c) i sisydlaczków [3]. Znany charakterystyczny układ „9 + 2” wykazują Mt wici i rzęsek oraz witki spermatozoidów organizmów roślinnych i zwierzęcych; z 9 tripletów składają się ciała bazalne i centriole. Zarówno w dubletach, jak w tripletach Mt przylegają do siebie i mają wspólną ścianę (rys. 4d, e).

Rys. 1. Mt cytoplazmatyczne transformowanej komórki F 5,1 chomika; utrwalano aldehydem glutarowym i czterotlenkiem osmu. Mt — mikrotubule; Mf — mikrofilamenty (B. Gabara, dzięki uprzejmości Autorki)

Rys. 2. Mt cytoplazmatyczne lipotubuloidu ze skórki zalążni *Ornithogalum umbellatum*; utrwalano mieszaniną aldehydu glutarowego z czterotlenkiem osmu; a) Fragment lipotubuloidu; l — kula lipidowa; b) wiązka Mt połączonych mostami (m); c) wynik reakcji heksamino-srebrowej na polisacharydy. Osad produktu reakcji (o) zlokalizowany w miejscach występowania Mt

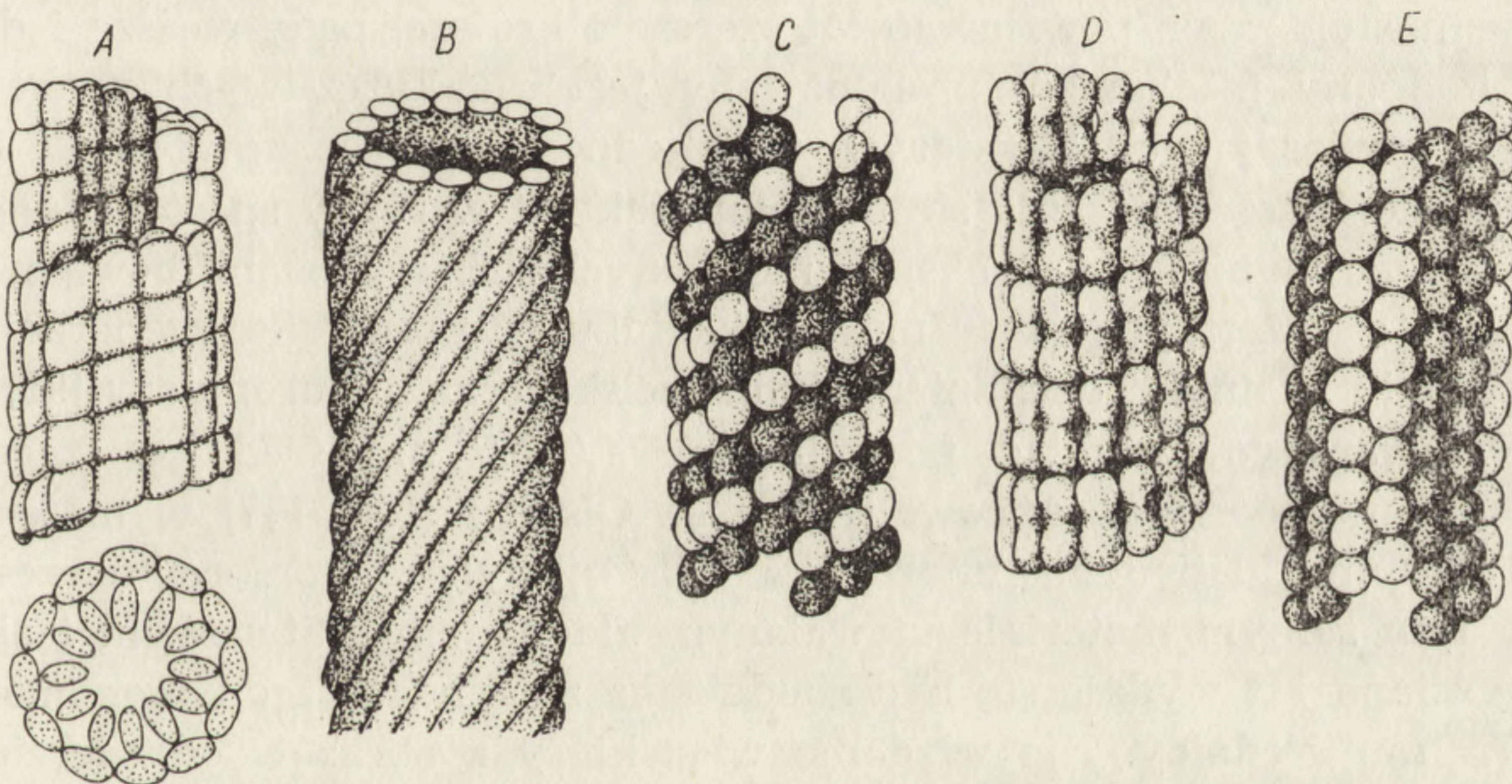




STRUKTURA Mt

Pierwsze dane dotyczące ultrastruktury Mt zostały przedstawione przez Ledbettera i Portera [59]. Obrazy uzyskane na podstawie analizy ultracienkich skrawków kontrastowanych techniką negatywową sugerowały, że Mt są pustym cylindrem, którego ściany utworzone są z 12–13 protofilamentów ułożonych linearnie lub śrubowo wokół osi Mt. Na przekroju poprzecznym protofilamenty mają wygląd kulistych podjednostek o średnicy około 4,5 nm (rys. 3 B).

Badania oparte na metodzie negatywowego kontrastowania Mt izolowanych wici i rzęsek wykazały, że protofilamenty tworzące ściany Mt mają wygląd koralikowatych włókien i są utworzone z globularnych podjednostek. Układ tych włókien w ścianie Mt nie jest jednak w pełni jasny, ponieważ w uzyskanych tą techniką obrazach może być interpretowany zarówno jako helikalny [21–23, 40, 41], jak linearny [4, 34, 8, 50, 100].



Rys. 3. Modele struktury Mt wg: A — Moora [70]; B — Jaroscha [48]; C — Tilneya i wsp. [73]; D — Bardele [3]; E — Witmana i wsp. [106] (zmodyfikowane)

Linearny układ protofilamentów jest wykazywany najczęściej w Mt wici i rzęsek, natomiast układ spiralny widoczny w postaci skośnych paszków na ścianie tubuli demonstrowano w Mt cytoplazmatycznych i Mt wrzeciona, szczególnie w ultracienkich skrawkach różnego typu komórek. Nie można jednak przyjąć z całą pewnością, że helikalny lub linearny układ protofilamentów związany jest z polimorfizmem strukturalnym różnych typów Mt, ponieważ obserwacje Henley'a [43] i Thomasa [96] wykazały, że uzyskane metodą negatywową wyniki muszą być interpretowane z dużą ostrożnością. Okazało się bowiem, że drobne nawet różnice metodyczne (czas kontrastowania, pH roztworu) mogą spowodować istotne

zmiany obrazów. W trakcie procesu kontrastowania konfiguracja podjednostek w tej samej Mt może ulec zmianie z helikalnej w linearną, prawdopodobnie w wyniku wzmocnienia wiązań podłużnych i osłabienia wiązań bocznych [96].

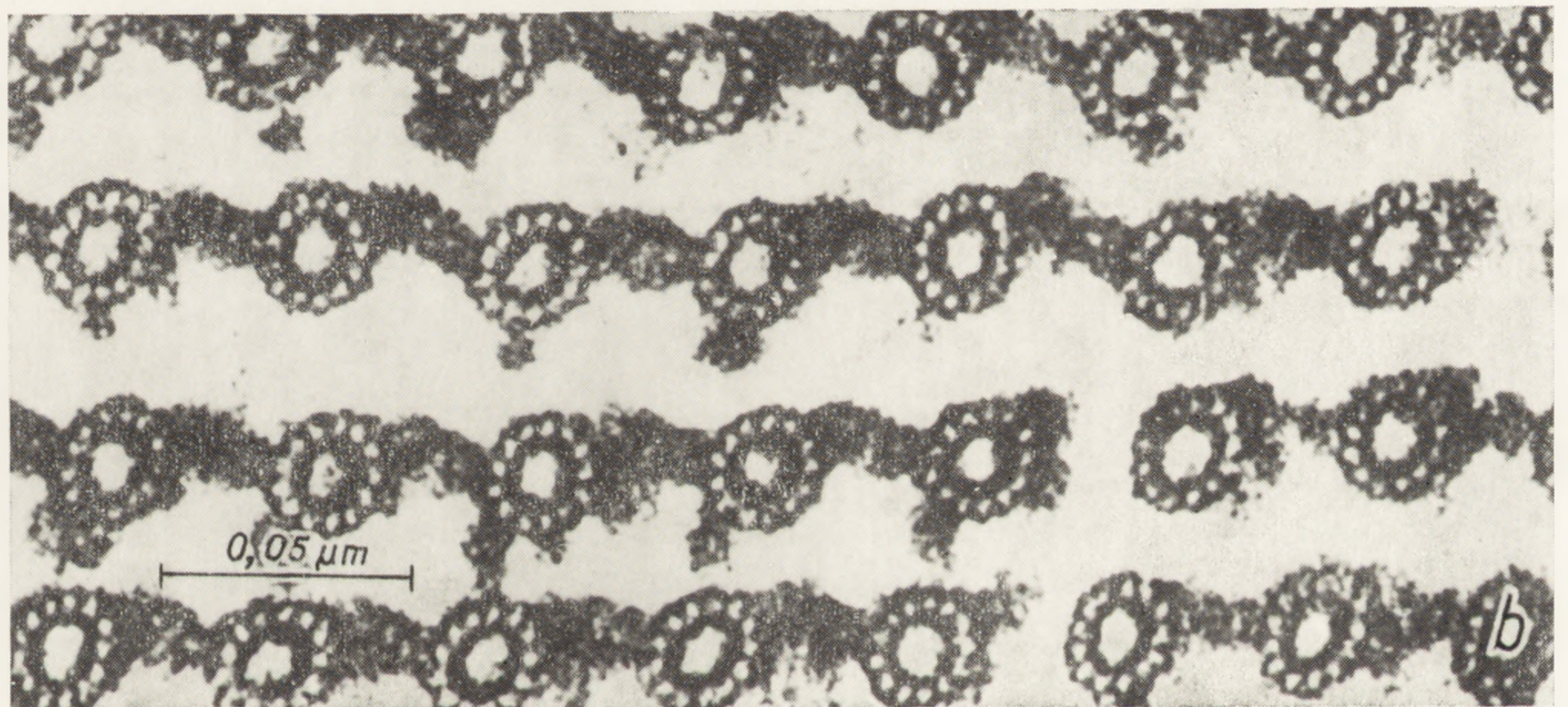
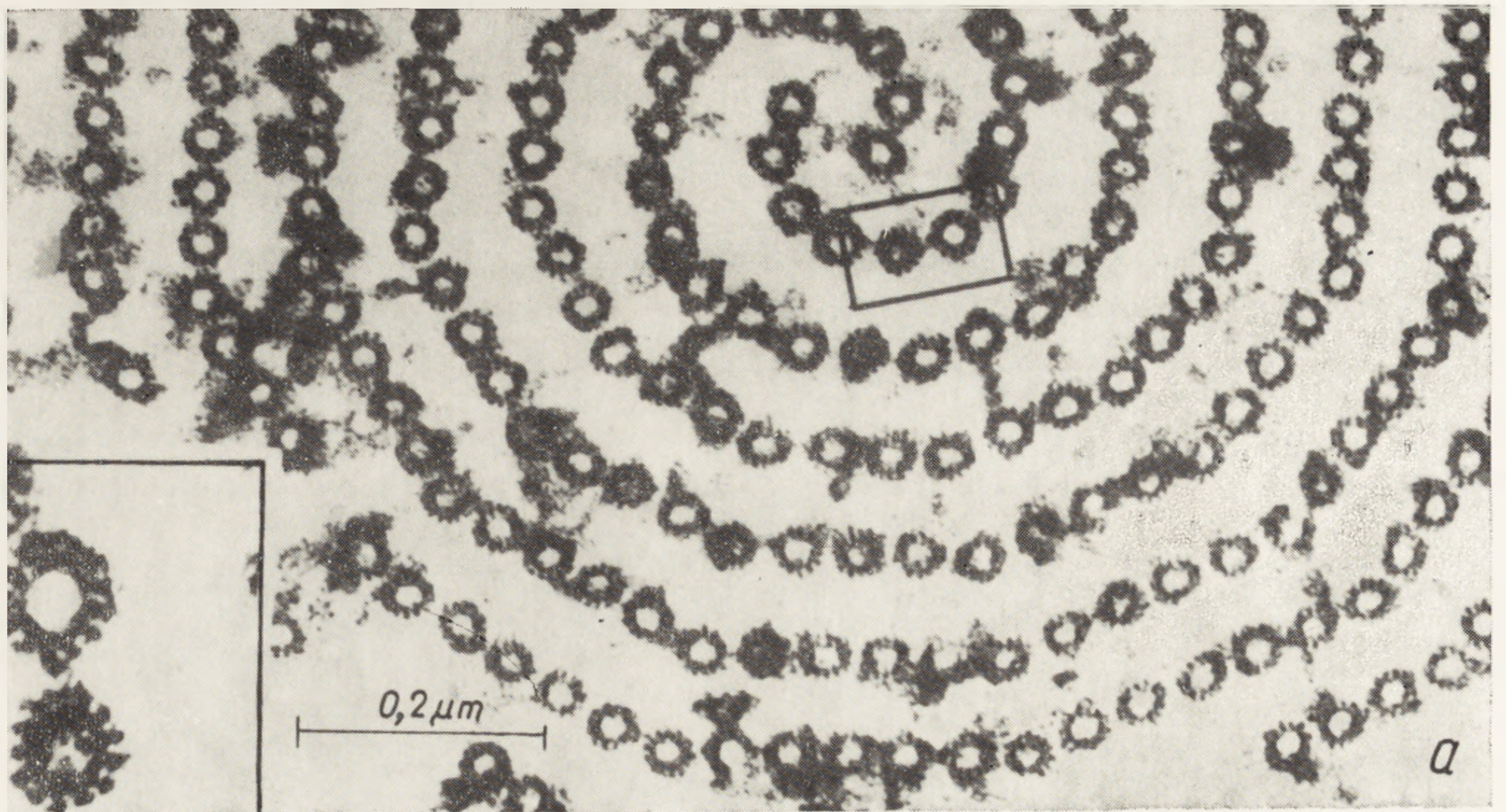
Niemal wszyscy autorzy są zgodni co do tego, że kuliste podjednostki Mt są ułożone w ścianie tubuli w jedną warstwę. Jedyne Moor [70] przedstawił bardziej złożony model struktury Mt opierając się na analizie obrazów uzyskanych metodą „freeze-etching” z komórek drożdży. Zdaniem tego autora Mt są utworzone z globularnych jednostek o średnicy 8 nm, które składają się z dwu 4-nm podjednostek. Podjednostki ułożone są w dwu warstwach, składając się na 8-nm ścianę Mt i są połączone w spiralny układ okalający światło Mt pod kątem 10–15° (ryc. 3A). Liczba monomerów przypadających na jeden obrót spirali może być różna, w rezultacie czego średnica Mt wynosi odpowiednio 21, 22,4 lub 25 nm. Moor przypuszcza, że jeden rodzaj Mt może przekształcać się w inny w drodze reorganizacji układu podjednostek, w wyniku której z tej samej liczby podjednostek mogą powstawać Mt szersze i krótsze, bądź węższe i dłuższe. Podobny mechanizm proponowany jest dla kurczliwych pochewek faga T zawierających 144 sferyczne podjednostki połączone w helisę [27].

Na możliwość wiązania się podjednostek Mt w różny sposób zdają się wskazywać wyniki badań eksperymentalnych. Obserwowano bowiem pojawianie się szerszych 34–40 nm „makrotubul” w procesie regeneracji po zniszczeniu 28 nm Mt działaniem zimna, ucisku oraz hialuronidazy [98, 24].

Dwuwarstwowy układ podjednostek 4,0–4,5 nm średnicy (zgodnie z modelem Moora) obserwowali również Olson i Heat [77] w materiale utrwalanym aldehydem glutarowym i OsO₄; wykazali oni równocześnie, że w tym samym materiale utrwalanym aldehydem glutarowym i akroleiną ściana Mt wydaje się być zbudowana z jednego rzędu monomerów 6,5–7,5 nm średnicy. Nie wiadomo więc który z obrazów odzwierciedla rzeczywisty układ podjednostek Mt.

Wspólną cechą modeli budowy Mt proponowanych przez różnych autorów jest to, że uwzględniają one jednocześnie uporządkowanie podjednostek w kierunku linearnym i helikalnym, niezależnie od tego, czy autor przyjmuje pogląd o linearnej, czy też helikalnej budowie Mt. Kąt nachylenia spirali, którą można połączyć sąsiednie podjednostki, w różnych modelach Mt jest niejednakowy (rys. 3).

Rys. 4. Ultrastruktura Mt: a. aksopodium *Echinosphaerium*, b. izolowany aksostyl, c. Mt kinetochorowa i Mt ciągła izolowanego aparatu mitotycznego, d. aksonema wici *Lytechinus*, e. triplet z ciała bazalnego spermy *Lytechinus*. Utrwalano aldehydem glutarowym z dodatkiem kwasu taninowego (wg Tilney i wsp. [99])



Ponieważ ostatnie badania biochemiczne wykazały, że jednostki budulcowe Mt są zróżnicowane, w najnowszych modelach Mt za podjednostkę strukturalną przyjmuje się nie pojedyncze monomery, a heterodimery składające się z tubuliny α i β . Nie wiadomo jednakże w jaki sposób heterodimery zorientowane są w ścianie Mt. Tilney i wsp. [99] zakładający „heterofilamentową” budowę Mt (rys. 3C) oraz Bardele [3], który przedstawia spiralną budowę Mt z heterodimerów (rys. 3D) proponują ustawienie długiej osi heterodimerów równoległe do osi Mt. Taki układ dimerów uwzględnia polarność Mt, na istnienie której wskazują liczne fakty [56].

Inny układ dimerów przedstawili Witman i wsp. [106], którzy przyjmują, że Mt zewnętrznych dubletów wici oraz Mt zbudowane z 12 podjednostek mogą składać się z „homofilamentów” zbudowanych z tubuliny 1 (oznaczona białą na rys. 3E) i tubuliny 2 (oznaczona czarno na rys. 3E).

Liczba podjednostek wyróżnianych w ścianie Mt na przekroju poprzecznym stanowi jedną z precyzyjnie analizowanych kwestii. Najczęściej podawana jest liczba 12–13 podjednostek ([59] i wielu innych autorów), jednakże Burton [21] wyodrębnił 8, zaś Kaye (1970, cyt. za [100]) — 16 podjednostek. Natomiast Moor [70], zgodnie ze swoim modelem, przyjmuje zmienną liczbę podjednostek, zależnie od szerokości Mt.

Ostatnio Tilney i wsp. [99], dzięki nowej technice utrwalania materiału z zastosowaniem aldehydu glutarowego z dodatkiem kwasu taninowego, uzyskali niezwykle przekonujące obrazy, które zdają się wskazywać, że w różnych typach Mt występuje stała liczba 13 podjednostek (rys. 4). Autorzy stwierdzili obecność 13 podjednostek w izolowanych Mt kinetochorowych i ciągłych wrzeciona, w Mt izolowanych aksostyli, centralnych tubulach wici, A-tubulach dubletów aksonemy wici, A-tubulach ciał bazalnych oraz w Mt repolimeryzowanych *in vitro* z podjednostek izolowanych z zarodka kurczęcia. 13 podjednostek znaleziono również w Mt akso-podiów słonecznicy *Echinospaerum*, których 12-promienna symetria wydawała się w pełni udowodniona [86, 97]. W niekompletnych tubulach B dubletów wici i tripletów ciał bazalnych wyróżniono 11 podjednostek. Wykazano ponadto, że skrajne podjednostki niekompletnych tubul o kształcie litery C są połączone tylko z 2 podjednostkami tubuli A w ten sposób, że wspólna dla obydwu tubul ścianka zawiera 5 podjednostek, a nie 3, jak podawano poprzednio [83, 100, 105]. W tubulach B i C tripletów ciał bazalnych jedenasta podjednostka ulega często rozpuszczeniu, pozostaje jednak po niej wolna przestrzeń (rys. 4 d, e).

Należy dodać, że na zdjęciach demonstrowanych przez Tilneya i wsp.

z Mt izolowanej aksonemy wici zorientowanych podłużnie do płaszczyzny przekroju (rys. 4 d), widoczne są wyraźnie koralikowate protofilamenty równoległe do osi Mt. Proponowany przez tych autorów model struktury Mt o linearnym układzie protofilamentów przedstawiony jest na rysunku 3 C.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, zagadnienie ultrastrukturalnej organizacji Mt nie zostało jeszcze ostatecznie rozwiązane. Dyskusja dotycząca przestrzennego układu protofilamentów (helikalnego lub linearnego), stałej lub zmiennej liczby podjednostek na przekroju Mt, odnosi się nie tylko do problemów morfologicznych, lecz wiąże się bezpośrednio z modelem funkcjonowania Mt. Zmienna liczba podjednostek w ścianie Mt, zmienna szerokość Mt, przy spiralnym układzie protofilamentów mogłaby być przejawem kurczenia się Mt w wyniku zmian konformacyjnych. Linearny układ protofilamentów i stała liczba podjednostek na przekroju poprzecznym Mt odpowiada natomiast bardziej założeniu, że Mt w procesie funkcjonowania nie zmieniają swojej długości [56].

Zdaniem Bajera i Molè-Bajer [2] założenie, że wszystkie Mt są zbudowane jednakowo jest dużym uproszczeniem. Bardzo prawdopodobny wydaje się bowiem zarówno strukturalny, jak i biochemiczny polimorfizm Mt różnego typu. Za możliwością występowania różnic między Mt przemawia już fakt, że jedne z nich utrwalają się czterotlenkiem osmu, inne zaś uwidocznia dopiero aldehyd glutarowy. Do Mt utrwalających się w OsO_4 należą Mt wici i rzęsek [29, 6], Mt spermatozoidów roślinnych [61, 62] i zwierzęcych [35, 81], niektóre neurotubule [91, 39, 78], a także Mt wrzeciona niektórych organizmów [80, 26, 51, 36] oraz nieliczne Mt cytoplazmatyczne komórek roślinnych (np. *Raphanus*, *Allium*, [36], *Ornithogalum* [52]) i zwierzęcych [90]. Ten sam typ Mt w różnych obiektach może wykazywać odmienną trwałość przy utrwalaniu [52–54]. Mt utrwalane jedynie czterotlenkiem osmu mają nieco mniejsze średnice niż te same Mt utrwalane aldehydem glutarowym.

Mt są strukturami wysoce labilnymi, wrażliwymi na działanie różnych czynników. Niszczą je: wysoka i niska temperatura, ciśnienie hydrostatyczne, kolchicina, kolcemid, alkaloidy *Vinca*, podofilina, grizeofulwina, wodzian chloralu, siarczan miedzi i siarczan niklu.

Mimo braku wyraźnych różnic w strukturze morfologicznej rozmaitych rodzajów Mt, ich wrażliwość na działanie tych czynników może być różna. Behnke i Forer [6] wyodrębnili w spermatozytach *Nephrotoma sturulis* 4 klasy Mt różniących się wrażliwością na działanie kolchicyny, pepsyny, niskiej temperatury ($0^\circ C$) i wysokiej temperatury ($50^\circ C$) (tab. 1). Różnice te umożliwiają uzyskanie czystych frakcji określonych klas Mt.

Dalsze badania Behnke [5] dotyczące płytek krwi wykazały, że Mt

TABELA 1. Klasy Mt spermatocytów *Nephrotoma sturulis* (Behnke i Forer [6])

Klasy	0°C	50°C	kolchicina	pepsyna
I Mt cytoplazmatyczne	+	+	+	+
II Centralne tubule rzęsek	-	+	-	++
III B-tubule rzęsek	-	+	-	+
IV A-tubule rzęsek	-	-	-	+++

tego samego typu, wykonujące taką samą funkcję, pochodzące z różnych organizmów, wykazują różnice w reakcji na działanie niskich temperatur, kolcemidu i innych czynników.

Wykazano także, że Mt ciągłe i kinetochorowe wrzeciona reagują niejednakowo na działanie kolcemidu i zimna. Kolcemid dezorganizuje Mt ciągłe wrzeciona, podczas gdy Mt kinetochorowe są na ten czynnik niewrażliwe [2]. Również pod wpływem zimna Mt ciągłe wrzeciona rozpadają się szybciej niż Mt kinetochorowe [14, 15].

Mt mogą mieć różny stopień trwałości wzdłuż swojej osi. Na przykład po zadziałaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego Mt rzęsek rozpadają się wcześniej w części bazalnej niż wierzchołkowej [49].

W przeciwieństwie do czynników powodujących rozpad Mt, D₂O stabilizuje Mt i zwiększa ich średnice. W tym stanie Mt są nieaktywne. D₂O blokuje np. mitozę w stadium metafazy [42], hamuje sekrecyjną działalność izolowanych wysepek Langerhansa [60], powoduje również zmniejszenie sekrecji tyroglobuliny [73].

Czynnikami stabilizującymi polimeryzację izolowanych z mózgu świnki morskiej monomerów Mt okazały się sacharoza i glicerol [89].

Próbowano wyjaśnić mechanizm różnej wrażliwości Mt na działanie trucizn, a w pierwszym rzędzie kolchicyny. Inoué i Sato [47] przypuszczają, że labilne Mt, tj. Mt cytoplazmatyczne i Mt wrzeciona, znajdują się w dynamicznej równowadze z pulą podjednostek, które nie są zorganizowane w Mt. Procesy łączenia się podjednostek i rozmontowywania Mt kontrolowane są przez komórkę. Kolchicina może być wiązana przez wolne podjednostki w miejscach (lub ich sąsiedztwie) odpowiedzialnych za łączenie się sąsiednich monomerów w procesie montowania Mt. Uniezwolnienie tworzenia się Mt zakłóca stan równowagi między pulą wolnych podjednostek i podjednostek zespolonych w Mt, co prowadzi do stopniowego zanikania Mt.

Stabilne Mt wici, rzęsek i witek spermatozoidów nie znajdują się w stanie równowagi z pulą wolnych podjednostek. Podjednostki tych Mt nie mogą wiązać kolchicyny, prawdopodobnie dlatego, że miejsce, w któ-

rym się ona przyłącza, jest zablokowane albo zmodyfikowane. Jednakże po zdepolimeryzowaniu stabilnych Mt metodą termiczną, uzyskane monomery wiążą kolchicynę w sposób identyczny, jak monomery innych Mt [104]. Kolchicina może ponadto zahamować proces regeneracji wici [84, 85] prawdopodobnie przez uniemożliwienie polimeryzacji nowo powstałych monomerów do Mt.

Założenie, iż podjednostki związane z kolchicyną nie mogą ponownie ulegać polimeryzacji, zostało poparte m. in. przez eksperymenty Browna i Boucka [16]. Stwierdzili oni, że jednokomórkowiec *Ochromonas* potraktowany kolchicyną traci swój uwarunkowany obecnością Mt kształt, który może być odtworzony po przeniesieniu organizmu do normalnego środowiska. Jeśli jednak w okresie regeneracji podawano cykloheksimid blokujący syntezę nowych białek, odtworzenie kształtu nie następowało. Gdy natomiast rozpad Mt powodowany był uciskiem — regeneracja Mt odbywała się mimo podania cykloheksimidu.

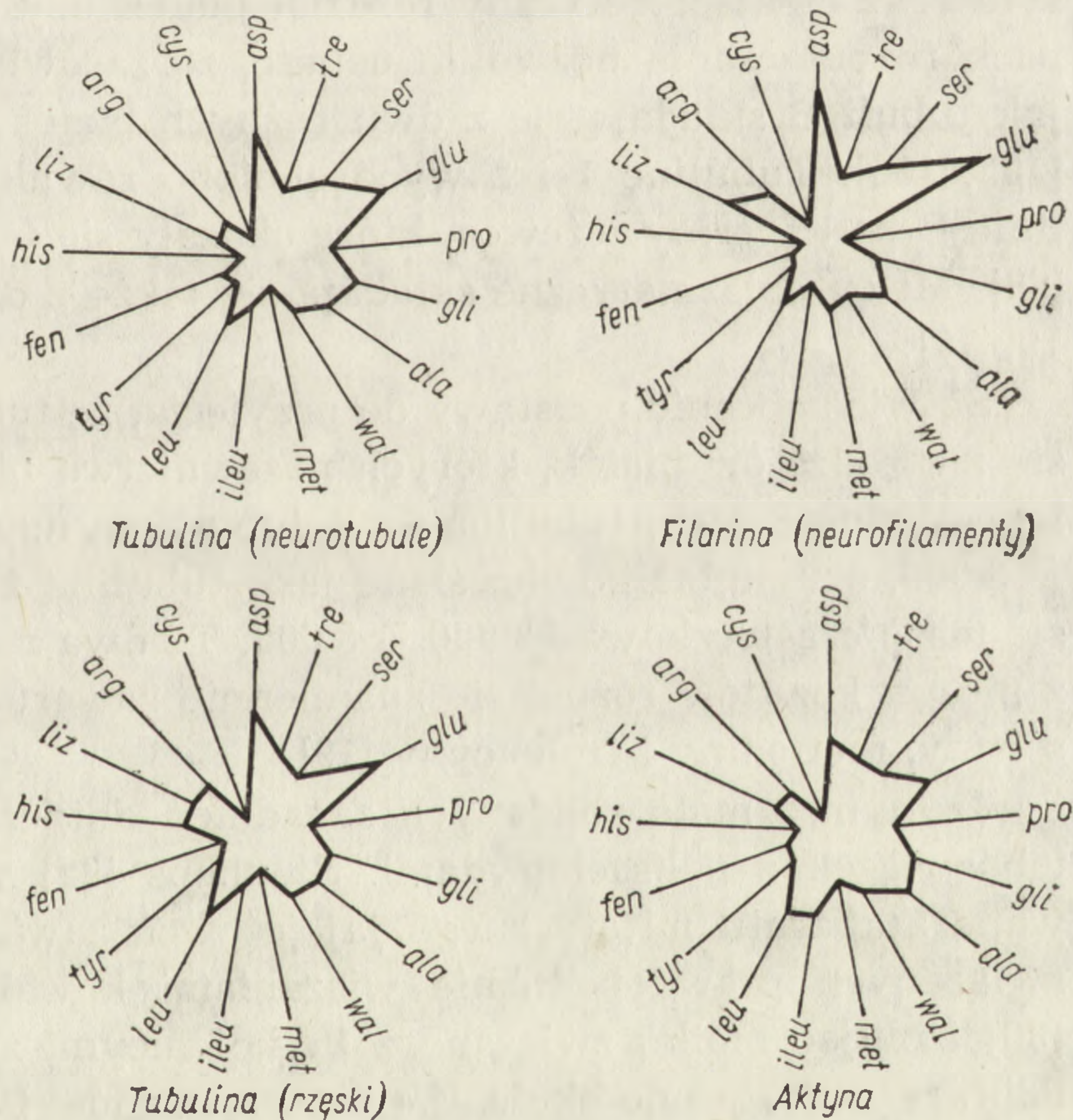
Prawdopodobnie w okresie formowania się wszystkie Mt są wrażliwe na kolchicynę. Zdaniem Margulis [65] rezultaty nielicznych badań, które zaprzeczają tej zasadzie, powinny być starannie przeanalizowane z uwzględnieniem czynników, które mogą znosić zdolność kolchicyny do wiązania się z białkami Mt. Do tego rodzaju czynników należą: bufor tris, witaminy B oraz światło, które przekształca kolchicynę w luminokolchicynę tracącą właściwość wiązania się z białkami Mt [65].

Alkaloidy Vinca (winblastyna i winkrystyna), które również niszczą Mt, łączą się prawdopodobnie w innym miejscu z podjednostkami Mt, ponieważ białka Mt związane z winblastyną zachowują nadal zdolność wiązania kolchicyny. Wilson [102] przypuszcza, że miejsce wiązania winblastyny jest identyczne z miejscem wiązania Ca^{++} . Alkaloidy Vinca wywołują in vivo i in vitro agregację białek Mt w uporządkowane parakryształy [9, 10, 63, 64]. Na ultracienkich skrawkach wyróżniono w nich ściśle upakowane heksagonalne rurki 28–36 nm średnicy (zależnie od sposobu przygotowania materiału i jego pochodzenia). Według Nagayama (1972 cyt. wg [3]) rurki tworzące parakryształy zbudowane są z dwu ściśle związanych ze sobą plektonemicznych helis utworzonych z globularnych podjednostek. Behnke i Forer [7] wykazali, że cytoplazmatyczne Mt spermatozoidów *Nephrotoma* mogą być przekształcone pod wpływem winblastyny w luźno skręcone spirale o średnicy 34–36 nm. Przypuszcza się, że alkaloidy Vinca wiążące się z podjednostkami Mt wywołują konformacyjne zmiany, nadające im właściwość łączenia w nowy sposób. Inne trucizny niszczące Mt, np. podofilina, nie mają specyficznego miejsca wiązania z podjednostkami Mt i przyłączają się prawdopodobnie w miejscu wiązania kolchicyny, lub bezpośrednim jego sąsiedztwie [18, 102].

BADANIA BIOCHEMICZNE Mt

Wykorzystanie zdolności specyficznego wiązania kolchicyny radioaktywnej przez podjednostki Mt przyczyniło się w znacznym stopniu do poznania ich składu chemicznego, umożliwiając wydzielenie czystych frakcji Mt. Kolchicina może być ponownie oddzielona z izolowanego kompleksu przez działanie etanolu absolutnego, metanolu, mocznika lub trypsyny.

Białko Mt, tzw. tubulina (termin zaproponowany przez Yanagisawa i wsp. [107]) ma skład aminokwasowy zbliżony do mięśniowej aktyny [88, 82, 107]. Tubulina izolowana z różnych obiektów wykazuje pewne indywidualne różnice (por. rys. 5).



Rys. 5. Graficzny obraz składu aminokwasowego tubuliny, filariny i aktyny. W opracowaniu Bardele [3], na podstawie [69, 46, 25]. Długość promieni „gwiazdy” odpowiada ilości aminokwasów w 100 000 g białka (zmodyfikowane)

Wbrew oczekiwaniom okazało się, że tubulina nie ma właściwości ATPazy.

Badania biochemiczne różnych Mt wykazały, że podstawową jednostką strukturalną o stałej sedymentacji 6S jest dimer o masie cząsteczkowej 110 000 do 120 000, który wiąże 1 cząsteczkę kolchicyny i 2 cząsteczki GTP (wyluczając neurotubule, których dimery wiążą 2 cząsteczki kolchi-

cyny [28]). Dimer można następnie rozczepić do monomeru o masie cząsteczkowej 55 000–60 000 [12, 13, 93]. Monomery zawierają pewną ilość cysteiny (7,5 grup sulfhydrylowych na jedną jednostkę), która może być odpowiedzialna za wiązanie S-S między nimi [32].

Początkowo sądzono, że monomery są utworzone z jednego rodzaju białka, a dimer odpowiada dwu globularnym podjednostkom o średnicy około 4 nm, wykrywalnym przy kontrastowaniu negatywowym. Jednakże wprowadzenie bardziej precyzyjnych metod stopniowego rozpuszczania Mt aksonemy spermy jeżowca umożliwiło wyodrębnienie dwu frakcji białek różniących się rozpuszczalnością i składem aminokwasowym [94]. Stephens przypuszczał, że tubula A zbudowana jest z innego rodzaju białka, niż tubula B (wprowadził dla nich nazwy tubulina A i tubulina B). Stopniowe rozpuszczanie kolejnych protofilamentów z zewnętrznych dubletów aksonemy *Chlamydomonas* z zastosowaniem różnych stężeń sarkosylu oraz elektroforetyczny rozdział białek uzyskanych w kolejnych etapach rozpuszczania pozwoliło ustalić, że zarówno podjednostki tubuli A, jak tubuli B składają się z dwu różnych białek: tubuliny 1 i tubuliny 2 [105, 106]. Tubulinę 1 i 2 wyodrębniono również w tubulinie A i tubulinie B [94] spermy jeżowca, które okazały się frakcjami niejednorodnymi [68]. Mt cytoplazmatyczne składają się także z dwu rodzajów tubulin [11, 19, 76].

Są więc obecnie podstawy do przyjęcia, że tubulina różnych Mt składa się z 2 rodzajów białek, których nazewnictwo nie zostało jednolicie ustalone. Jedno z nich, tubulina 1, X lub α , ma masę cząsteczkową $56\,000 \mp 3\,000$, drugie białko określane jako tubulina 2, Y lub β , charakteryzuje się masą cząsteczkową $53\,000 \mp 3\,000$. Te dwa rodzaje tubuliny izolowane z mózgu kogutów różnią się znamienne zawartością histydyny, cysteiny, seryny, metioniny i izoleucyny [19].

Jednym z mało zbadanych zagadnień dotyczących chemizmu Mt jest ich związek z polisacharydami. Stephens [92] wykazał, że białko izolowane z aparatu mitotycznego jaj jeżowca zawiera 5–8% węglowodanów związanych prawdopodobnie wiązaniami kowalencyjnymi. Flaxa i Gill [30] izolując białko związane z ^3H -kolchicyną z mózgu cielecego stwierdzili, że zawiera ono około 1% węglowodanów i uznali wyodrębniony glikoproteid za podjednostkę, z której tworzą się Mt. O możliwości powiązania neurotubul — Mt komórek nerwowych — z polisacharydami świadczą również badania mikroskopowo-elektronowe z zastosowaniem czerwieni rutenowej [95] i tlenku lantanu [57, 24]. Wymienieni autorzy stwierdzili, że pod wpływem barwienia pojawia się dodatkowa warstewka na zewnętrznej [24] lub zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni Mt [57, 95], powodując równocześnie pogrubienie ściany Mt. Warstewka zewnętrzna znajdowała się w miejscu jasnej strefy, tzw. „halo” wyróżnia-

nego wokół Mt przez Ledbettera i Portera [58], którzy sugerowali możliwość występowania w niej jakiejś niezidentyfikowanej substancji przezroczystej dla elektronów.

W dostępnej literaturze jedyny przykład powiązania polisacharydów z Mt komórek roślinnych stanowią Mt lipotubuloidów znajdujących się w epidermie zalążni *Ornithogalum umbellatum* [55]. W tym materiale polisacharydy ujawnione zostały na poziomie ultrastrukturalnym metodą heksamino-srebrą (rys. 2 c) oraz za pomocą czerwieni rutenowej. Pomiar grubości ścianki Mt i średnicy Mt wykazały, że warstewka polisacharydowa odkłada się na zewnętrznej powierzchni Mt.

Obecnie brak jest danych, które pozwoliłyby uznać występowanie polisacharydów związanych z Mt za zjawisko powszechne; być może jest to jeden z przejawów polimorfizmu Mt.

RAMIONA I MOSTY

Z funkcjonowaniem Mt związane są niewątpliwie tzw. ramiona (arms) i mosty (bridges), delikatne wyrostki zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni Mt. Rozmiary ramion mogą być różne. Ich grubość wynosi 2–5 nm, długość waha się w granicach 7–40 nm. Nie zostało jeszcze wyjaśnione w jaki sposób mosty i ramiona połączone są ze ścianą Mt: czy łączą się z podjednostkami, czy tkwią pomiędzy nimi. Przypuszcza się, że w procesie polimeryzacji Mt mosty przyłączają się do nich na zasadzie „samomontowania”.

Gibbons i Rowe [38] wykazali, że ramiona wici i rzęsek zawierają białko mające właściwości ATPazy o stałej sedymentacji 14S i masie cząsteczkowej 600 000, które autorzy nazwali „dyneiną”, przypisując mu rolę elementu mechanochemicznego.

Ramiona najwcześniej zostały znalezione w wiciach i rzęskach [37], ich występowanie okazało się jednak bardziej rozpowszechnione. Ujawniono je przy Mt wrzeciona [67, 101, 1, 44, 20], a także przy Mt cytoplazmatycznych ([31] i in.), aksopodiach, aksostylach i aksonach. Wzdłuż Mt ramiona i mosty mogą być ułożone mniej regularnie, w większych odstępach, lub w mniejszych od siebie odległościach, rozmieszczone bardzo prawidłowo.

Dość regularnie rozmieszczone mosty występują przy Mt profazowych [20] oraz Mt centralnego regionu wrzeciona i fragmoplastu [2]. Prawidłowe rozmieszczenie mostów decyduje o charakterystycznym dla gatunku układzie („wzorce”) Mt w aksopodiach pierwotniaków oraz o sposobie ich formowania się i regeneracji [86, 3]. Dużą regularnością układu cechują się mosty aksostyli [71, 66] oraz pasm Mt *Stentor* [45].

Układ ramion i mostów zdaje się mieć duże znaczenie zarówno dla wyjaśnienia szkieletowej, jak i ruchowej funkcji Mt.

LITERATURA

- [1] BAJER A., MOLE-BAJER J., 1969 — Formation of spindle fibers, kinetochore orientation and behavior of the nuclear envelope during mitosis in endosperm. Fine structural and in vitro studies, *Chromosoma*, **27**: 448-484.
- [2] BAJER A. S., MOLE-BAJER J., 1972 — Spindle dynamics and chromosome movements, Academic Press, New York.
- [3] BARDELE Ch. F., 1973 — Struktur, Biochemie und Funktion der Mikrotubuli, *Cytobiologie*, **7**: 442-488.
- [4] BARNICOT N. A., 1966 — A note on the structure of spindle fibers, *J. Cell Sci.*, **1**: 217-222.
- [5] BEHNKE O., 1970 — A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **31**: 61-75.
- [6] BEHNKE O., FORER A., 1967 — Evidence for four classes of microtubules in individual cells, *J. Cell Sci.*, **2**: 169-192.
- [7] BEHNKE O., FORER A., 1972 — Vinblastine as a cause of direct transformation of some microtubules into helical structures, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 506-509.
- [8] BEHNKE O., ZELANDER T., 1966 — Substructure in negatively stained microtubules of mammalian blood platelets, *Exp. Cell Res.*, **43**: 236-239.
- [9] BENSCH K. G., MALAWISTA S. E., 1969 — Microtubular crystals in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **40**: 95-107.
- [10] BENSCH K. G., MARANTZ R., WISNIEWSKI H., SHELANSKI M. L., 1969 — Induction in vitro of microtubular crystals by vinca alkaloids, *Science*, **165**: 495-496.
- [11] BIRBING T., BAXANDALL J., 1971 — Selective extraction of isolated mitotic apparatus. Evidence that typical microtubule protein is extracted by organic mercurial, *J. Cell Biol.*, **48**: 324-339.
- [12] BORISY G. G., TAYLOR E. W., 1967 — The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-³H to cellular protein, *J. Cell Biol.* **34**: 525-533.
- [13] BORISY G. G., TAYLOR E. W., 1967 — The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus, *J. Cell Biol.*, **34**: 535-548.
- [14] BRINKLEY B. R., CARTWRIGHT J. Jr., 1970 — Organization of microtubules in the mitotic spindle: Differential effects of cold shock on microtubules stability, *J. Cell Biol.*, **47**: 25a.
- [15] BRINKLEY B. R., CARTWRIGHT J. Jr., 1971 — Ultrastructural analysis of mitotic spindle elongation in mammalian cells in vitro: Direct microtubule counts, *J. Cell Biol.*, **50**: 416-431.
- [16] BROWN D. L., BOUCK B. G., 1973 — Microtubule biogenesis and cell shape in *Ochromonas*. II The role of nucleating sites in shape development, *J. Cell Biol.*, **56**: 360-378.
- [17] BROWN R. M., FRANKE W. W., 1971 — A microtubular crystal associated with the golgi field of *Pleurochrysis scherffellii*, *Planta*, **96**: 354-363.
- [18] BRYAN J., 1972 — Definition of three classes of binding sites in isolated microtubule crystals, *Biochemistry*, **11**: 2611-2616.
- [19] BRYAN J., WILSON L., 1971 — Are cytoplasmic microtubules heteropolymers?, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **68**: 1762-1766.
- [20] BURGESS J., 1970 — The occurrence of cross-linked microtubules in a higher plant cell, *Planta*, **92**: 25-28.

- [21] BURTON P. R., 1966 — Substructure of certain cytoplasmic microtubules: on electron microscopic study, *Science*, **154**: 903–905.
- [22] BURTON P. R., 1967 — Fine structure of the unique central region of the axial of lung-fluke spermatozoa, *J. Ultrastruct. Res.*, **19**: 166–172.
- [23] BURTON P. R., 1970 — Optical diffraction and translational reinforcement of microtubules having a prominent helical wall structure, *J. Cell Biol.*, **44**: 693–699.
- [24] BURTON P. R., FERNANDES H. L., 1973 — Delineation by lanthanum staining of filamentous elements associated with the surface of axonal microtubules, *J. Cell Sci.*, **12**: 567–583.
- [25] DAVISON P. F., HUNNEUS F. C., 1970 — Fibrillar protein from squid axons. II. Microtubular protein, *J. Mol. Biol.*, **52**: 429–439.
- [26] De HARVEN E., BERNHARD W., 1956 — Etude au microscope électronique de l'ultrastructure du centriole chez les vertébrés, *Z. Zellforsch. u. Mikr. Anat.*, **45**: 378.
- [27] DuPRAW E. J., 1969 — Cell and molecular biology. Acad. Press, New York–London.
- [28] DUSTIN P., 1972 — Les microtubules et leurs fonctions, *Bull. l'Acad. Royale de Medicine de Belgique*, **12**: 197–226.
- [29] FAWCETT D. W., WITEBSKY F., 1964 — Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **62**: 785–806.
- [30] FLAXA M. L., GILL T. J., 1969 — III-Preparation and properties of an alkylated brain protein related to the structural subunit of microtubules, *Arch. Bioch. Bioph.*, **135**: 194.
- [31] FRANKE W. W., HERTH W., VAN DER WOUDE W. J., MORRÈ D. J. 1972 — Tubular and filamentous structures in pollen tubes: possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles, *Planta (Berl)* **105**: 317–341.
- [32] FREY-WYSSLING A., 1973 — Comparative organellography of the cytoplasm, *Protoplasmatologia III G*, Springer-Verlag, Wien New York.
- [33] GADOWSKA M., 1973 — Struktura i funkcje mikrotubul i filamentów, [w] *Ultrastruktura i Funkcja Komórki*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, Warszawa, PWN.
- [34] GALL J. G., 1966 — Microtubule fine structure, *J. Cell Biol.*, **31**: 639–643.
- [35] GATENBY J. B., DALTON A. J., 1959 — Spermiogenesis in *Lumbricus herculeus*, An electron microscope study, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **6**: 45.
- [36] GENEVÈS L., 1964 — Microtubules et invaginations ectoplasmiques dans les racines d'*Allium cepa* L. (Liliacées) et de *Raphanus sativus* L. (Crucifères), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **258 G**: 3887–3889.
- [37] GIBBONS I. R., 1963 — Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*, *Proc. Nat Acad. Sci. (Wash.)* **50**: 1002–1010.
- [38] GIBBONS I. R., ROWE A. J., 1965 — Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia, *Science*, **149**: 424–426.
- [39] GRAY E. G., 1959 — Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study, *J. Anat.*, **93**: 420.
- [40] GRIMSTONE A. V., CLEVELAND L. R., 1965 — The fine structure and function of contractile axostyles of certain flagellates, *J. Cell Biol.*, **24**: 387–400.

- [41] GRIMSTONE A. V., KLUG A., 1966 — Observations on the substructure of flagellar fibres, *J. Cell Sci.*, **1**: 351–362.
- [42] GROSS P. R., SPINDEL W., 1960 — Mitotic arrest by deuterium oxide, *Science*, **131**: 37–39.
- [43] HENLEY C., 1970 — Changes in microtubules of cilia and flagella following negative staining with phosphotungstic acid, *Biol. Bull.*, **139**: 265–276.
- [44] HEPLER P. K., MC INTOSH J. R., CLELAND S., 1970 — Intermicrotubule bridges in mitotic spindle apparatus, *J. Cell Biol.*, **45**: 438–444.
- [45] HUANG B., PITELKA D. R., 1973 — The contractile process in the ciliate *Stentor coeruleus*. I. The functional role of microtubules and filaments, *J. Cell Biol.*, **57**: 704–728.
- [46] HUNNEUS F. C., DAVISON P. F., 1970 — Fibrillar proteins from squid axons. I. Neurofilament protein, *J. Mol. Biol.*, **52**: 415–428.
- [47] INOUE S., SATO H., 1967 — Cell motility by labile association of molecules: The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 259–292.
- [48] JAROSCH R., 1966 — On the behavior of rotating helices, [w] *Intracellular transport*, Academic Press Inc., New York, London.
- [49] KENNEDY J. R., ZIMMERMAN A. M., 1970 — The effect of high hydrostatic pressure on the microtubules of *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **47**: 568–576.
- [50] KIEFER B. I., SAKAI H., SOLARI A. J., MAZIA D., 1966 — The molecular unit of the microtubules of the mitotic apparatus, *J. Mol. Biol.*, **20**: 75–79.
- [51] KUROSUMI K., 1958 — Electron microscope studies on mitosis in sea urchin blastomeres, *Protoplasma*: **49**: 116.
- [52] KWIATKOWSKA M., 1970 — Ultrastrukturalne, cytochemiczne i przyżyciowe badania elajoplastów roślin kwiatowych, Łódź, Uniwersytet Łódzki.
- [53] KWIATKOWSKA M., 1971 — Fine structure of lipotubuloids (elaioplasts) in *Ornithogalum umbellatum* L., *Acta Soc. Bot. Pol.* **40**: 451–465.
- [54] KWIATKOWSKA M., 1972 — Fine structure of lipotubuloids (elaioplasts) in *Malva neglecta* and *Althaea rosea*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **41**: 13–19.
- [55] KWIATKOWSKA M., 1973 — Polysaccharides connected with microtubules in the lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* L., *Histochemie*, **37**: 107–112.
- [56] KWIATKOWSKA M., 1974 — Mikrotubule. II. Funkcje mikrotubul, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 255–275.
- [57] LANE N. J., TREHERNE J. E., 1970 — Lanthanum staining of neurotubules in axons from cockroach ganglia, *J. Cell Sci.*, **7**: 217–231.
- [58] LEDBETTER M. C., PORTER K. R., 1963 — A „microtubule” in plant cell fine structure, *J. Cell Biol.* **19**: 239–250.
- [59] LEDBETTER M. C., PORTER K. R., 1964 — Morphology of microtubules of plant cells, *Science*, **144**: 872–874.
- [60] MALAISSE-LAGE F., GREIDER M. H., MALAISE W. J., LACY P. E., 1971 — The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. IV. The effect of vincristine and deuterium oxide on the microtubular system of the pancreatic beta cell, *J. Cell Biol.*, **49**: 530–535.
- [61] MANTON I., 1957 — Observations with the electron microscope on the cell structure of the antheridium and spermatozoid of *Sphagnum*, *J. Exptl. Bot.*, **8**: 382.
- [62] MANTON I., 1959 — Observations on the microanatomy of the spermatozoid of the bracken fern (*Pteridium aquilinum*), *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **6**: 413.

- [63] MARANTZ R., SHELANSKI M. L., 1970 — Structure of microtubular crystals induced by vinblastine in vitro, *J. Cell Biol.*, **44**: 234-238.
- [64] MARANTZ R. M., VENTILLA M., SHELANSKI M. L., 1969 — Vinblastine-induced precipitation of microtubule protein, *Science*, **165**: 498-499.
- [65] MARGULIS L., 1973 — Colchicine-sensitive microtubules, *Int. Rev. Cytol.*, **34**: 333-361.
- [66] McINTOSH, J. R., 1973 — The axostyle of *Saccinobacillus* II. Motion of the microtubule bundle and a structural comparison of straight and bent axostyles, *J. Cell Biol.* **56**: 324-339.
- [67] McINTOSH J. R., HEPLER P. K., Van WIE D. G., 1969 — Model for mitosis, *Nature (Lond.)*, **224**: 659-663.
- [68] MEZA I., HUANG B., BRYAN J., 1972 — Chemical heterogeneity of protofilaments forming the outer doublets from sea urchin flagella, *Exp. Cell Res.*, **74**: 538-540.
- [69] MOHRI H., 1968 — Amino-acid composition of „tubulin” constituting microtubules of sperm flagella, *Nature*, **217**: 1053-1054.
- [70] MOOR H., 1967 — Der Feinbau der Mikrotubuli in Hefe nach Gefrierätzung, *Protoplasma*, **64**: 89-103.
- [71] MOOSEKER M. S., TILNEY L. G., 1973 — Isolation and reactivation of the axostyle. Evidence for a dynein-like ATP-ase in the axostyle, *J. Cell Biol.*, **56**: 13-26.
- [72] NAGL W., 1973 — Intranuclear microtubules in trophocytes of *Dytiscus*, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**: 283-286.
- [73] NEVE P. C, WILLEMES C., DUMONT J. E., 1970 — Involvement of the microtubule-microfilament system in thyroid secretion, *Exp. Cell Res.* **63**: 457-460.
- [74] NEWCOMB E. H., 1969 — Plant microtubules, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**: 253-288.
- [75] NORTHCOTE D. H., LEWIS D. R., 1968 — Freeze-etched surfaces of membranes and organelles in the cells of pea root tips, *J. Cell Sci.*, **3**: 199-206.
- [76] OLMSTED J. B., WITMAN G. B., CARLSON K., ROSENBAUM J. L., 1971 — Comparison of the microtubule protein of neuroblastoma cells, brain, and *Chlamydomonas flegella*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 2273-2277.
- [77] OLSON L. W., HEATH I. B., 1971 — Observations on the ultrastructure of microtubules, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **115**: 388-395.
- [78] PALAY S. L., 1960 — The fine structure of secretory neurons in the goldfish (*Carassius auratus*), *Ant. Rec.*, **138**: 417.
- [79] PICKETT-HEAPS J. D., 1968 — Mikrotubule-like structures in the growing plastids or chloroplasts of two algae, *Planta*, **81**: 193-200.
- [80] PORTER K. R., 1954 — Changes in cell fine structure accompanying mitosis, [w] *Fine Structure of Cells, Symp. of the 8th Congress on Cell Biology*, Leiden, Gronigen, Voordhoff, Ltd., 236.
- [81] REBHUN L. I., 1957 — Nuclear changes during spermiogenesis in a pulmonate snail, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **3**: 509.
- [82] RENARD F. L., ROWE A. J., GIBBONS I. R., 1968 — Some properties of the protein forming the outer fibers of cilia, *J. Cell Biol.*, **36**: 76-90.
- [83] RINGO D. L., 1967 — The arrangement of subunits in flagellar fibers, *J. Ultrastruct. Res.*, **17**: 266-277.
- [84] ROSENBAUM J. L., CARLSON K., 1969 — Cilia regeneration in *Tetrahymena* and its inhibition by colchicine, *J. Cell Biol.*, **40**: 415-425.
- [85] ROSENBAUM J. L., MOULDER J. E., RINGO D. L., 1969 — Flagellar elonga-

- tion and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins., *J. Cell Biol.*, **41**: 600-619.
- [86] ROTH L. E., PIHLAJA D. J., SHIGENAKA Y., 1970 — Microtubules in the heliozoan axopodium. I. The gradation hypothesis of allosterism in structural proteins., *J. Ultrastruct. Res.* **30**: 7-37.
- [87] ROTH L. E., SHIGENAKA Y., 1970 — Microtubules in the heliozoan axopodium. II. Rapid degradation by cupric and nickleous ions, *J. Ultrastruct. Res.*, **31**: 356-374.
- [88] SHELANSKI M. L., TAYLOR E. W., 1968 — Properties of the protein subunit of central pair and outer doublet microtubules of sea urchin flagella, *J. Cell Biol.*, **38**: 304-315.
- [89] SHELANSKI M. L., GASKIN F., CANTOR C. R., 1973 — Microtubule assembly in the absence of added nucleotides, *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **70**: 765-768.
- [90] SLAUTTERBACK D. B., 1963 — Cytoplasmic microtubules, I. Hydra, *J. Cell Biol.*, **18**: 367-388.
- [91] SCHMITT F. O., GEREN B. B., 1950 — The fibrous structure of the nerve axon in relation to the localization of „neurotubules”, *J. Exp. Med.*, **91**: 499.
- [92] STEPHENS R. E., 1968 — Reassociation of microtubule protein, *J. Mol. Biol.*, **33**: 517-519.
- [93] STEPHENS R. E., 1970 — On the apparent homology of actin and tubulin, *Science*, **168**: 845-847.
- [94] STEPHENS R. E., 1970 — Thermal fractionation of outer fiber doublet microtubules into A- and B-subfiber components: A- and B-tubulin, *J. Mol. Biol.*, **47**: 353-363.
- [95] TANI E., AMETANI T., 1970 — Substructure of microtubules in brain nerve cells as revealed by ruthenium red, *J. Cell Biol.*, **46**: 159-165.
- [96] THOMAS M. B., 1970 — Transitions between helical and protofibrillar configurations in doublet and singlet microtubules in spermatozoa of *Stylochus zebra* (*Turbellaria, Polycladida*), *Biol. Bull.*, **138**: 219-234.
- [97] TILNEY L. G., PORTER K. R., 1965 — Studies on microtubules in *Heliozoa*. I The fine structure of *Actinosphaerium nucleofilum* Barret, with particular reference to the axial rod structure, *Protoplasma*, **60**: 317-344.
- [98] TILNEY L. G., PORTER K. R., 1967 — Studies on the microtubules in *Heliozoa*. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia, *J. Cell Biol.*, **34**: 327-343.
- [99] TILNEY L. G., BRYAN J., BUSH D. J., FUJIWARA K., MOOSEKER M. S., MURPHY D. B., SNYDER D. H., 1973 — Microtubules: Evidence for 13 protofilaments, *J. Cell Biol.*, **59**: 267-275.
- [100] WARNER F. D., SATIR P., 1973 — The structure of ciliary microtubules, *J. Cell Sci.*, **12**: 312-326.
- [101] WILSON H. J., 1969 — Arms and bridges on microtubules in the mitotic apparatus, *J. Cell Biol.*, **40**: 854-859.
- [102] WILSON L., 1970, Properties of colchicine binding protein from chick embryo brain. Interactions with vinca alkaloids and podophyllotoxin, *Biochemistry*, **9**: 4999-5007.
- [103] WILSON L., BRYAN J., RUBY A., MAZIA D., 1970 — Precipitation of proteins by vinblastine and calcium ions., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **66**: 807-814.
- [104] WILSON L., MEZA I., 1973 — The mechanism of action of colchicine. Col-

chicine binding properties of sea-urchin sperm tail outer doublet tubulin, J. Cell Biol., 58: 709-717.

- [105] WITMAN G. B., CARLSON K., BERLINGER J., ROSENBAUM J. L., 1972 — *Chlamydomonas* flagella. I. Isolation and electrophoretic analysis of microtubules, matrix, membranes and mastigonemes, J. Cell Biol. 54: 507-539.
- [106] WITMAN G. B., CARLSON K., ROSENBAUM J. L., 1972 — *Chlamydomonas* flagella. II The distribution of tubulin 1 and 2 in the outer doublet microtubules., J. Cell Biol., 54: 540-555.
- [107] YANAGISAWA T., HASEGAWA S., MOHRI H., 1968 — The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement, Exp. Cell Res., 52: 86-100.

Otrzymano: styczeń, 1974

Przyjęto: styczeń, 1974

Adres autorki: ul. Nowopółdniowa 12/16, 90-237 Łódź.

MIKROTUBULE. II. FUNKCJE MIKROTUBUL

Maria KWIATKOWSKA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Mikrotubule (Mt) jako cytoszkielet stały lub okresowy determinują kształt komórki i uczestniczą w procesach morfogenezy. Powiązane są z ukierunkowanym przemieszczaniem się organelli, produktów sekrecji, transportem cząsteczek. Mt stanowią element strukturalny systemów ruchowych: wici, rzęsek, aksostyli, wrzeciona podziałowego. Strukturalna podstawa funkcjonowania Mt w procesach ruchu w różnych układach prawdopodobnie jest odmienna. Dyskutowana jest możliwość: 1) ślizgania się Mt przy aktywnym udziale mostów; 2) interakcji Mt i mikrofilamentów; 3) kurczenia się Mt ze zmianą ich średnicy.

Mikrotubulom przypisywany jest udział w bardzo różnorodnych procesach dokonujących się na poziomie komórki lub organizmu. Jest to w pełni zrozumiałe, ponieważ Mt wraz z pulą wolnych podjednostek i systemem łączących je mostów są zwykle elementami składowymi rozmaitych, często bardzo złożonych, układów przystosowanych do pełnienia określonych funkcji. Zróżnicowanie charakteru funkcji oraz sposobu funkcjonowania Mt w różnych systemach wydaje się równie prawdopodobne, jak istnienie strukturalnego i biochemicznego polimorfizmu Mt [49]. Ogólnie jednak funkcje Mt można sprowadzić do udziału w tworzeniu okresowego bądź stałego cytoszkieletu, często związanego z morfogenezą, oraz uczestniczenia w szeroko pojętych zjawiskach ruchu.

SZKIELETOWA I MORFOGENETYCZNA FUNKCJA MT

Najbardziej prawdopodobna wydaje się szkieletowa funkcja Mt polegająca na determinowaniu kształtu komórki. Jest ona szczególnie wyraźna w organizmach jednokomórkowych i komórkach krwi. Na przykład eliptyczna forma płytek krwi jest związana z pierścieniem Mt, który jest prawdopodobnie jedną długą zwiniętą Mt [6]. Pod wpływem zimna, kol-

chicyny lub winblastyny płytki krwi przyjmują formę nieregularną z licznymi wypustkami [4, 108]. Po usunięciu czynnika destrukcyjnego kształt płytki zostaje odtworzony, a Mt pojawiają się na nowo.

Eksperymentalne dowody na szkieletową funkcję Mt zostały przedstawione również na przykładzie *Ochromonas danica* [10]. Wykazano, że zależny od Mt charakterystyczny kształt komórki *Ochromonas* zanika pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego lub kolchicyny i może być przywrócony po usunięciu tych czynników. Jeśli zniszczenie Mt spowodowane było kolchicyną odtworzenie typowego kształtu komórek mogło być zablokowane przez cykloheksimid, który hamuje syntezę nowych białek.

Charakterystyczne dla słonecznic promieniste aksopodia związane są również z obecnością Mt, których zniszczenie działaniem ucisku lub niskiej temperatury powoduje wciąganie aksopodiów do wnętrza komórki [102].

Ciekawym przykładem ilustrującym rolę Mt w formowaniu okresowego, dynamicznego szkieletu wewnętrznego są aksopodia pierwotniaków z grupy *Helioflagelida*. Na przykład u *Ciliophrys marina*, który występuje bądź w formie pływającej podobnej do wiciowca, bądź w postaci słonecznicy zaopatrzonej w 20 μm aksopodia zawierające po 3 Mt, może w bardzo krótkim czasie następować resorbcja aksopodiów połączona z demontowaniem Mt i ponowne ich wytworzenie związane z repolimeryzacją Mt [3]. Davison (cyt. wg [3]) wykazał, że wciąganie aksopodiów u *Heterophrys marine* może zachodzić w ciągu 20 milisek., przy czym w tym czasie musi dokonać się nie tylko depolimeryzacja Mt, ale również przetransportowanie podjednostek Mt i materiału membranowego do wnętrza komórki. Wrażenie statyczności Mt, które wynosi się z obserwacji w mikroskopie elektronowym powinno więc być odpowiednio zrewidowane.

W komórkach roślinnych funkcja szkieletowa Mt jest mniej ewidentna ze względu na obecność sztywnej ściany komórkowej. Jednakże udział Mt w formowaniu kształtu przejawia się np. w procesie różnicowania komórki generatywnej ziarna pyłku. Sangar i Jackson [88] wykazali, że w ziarnie pyłku *Haemanthus katherinae* w okresie, kiedy komórka generatywna jest kulista, Mt są rozmieszczone bezładnie w całej cytoplazmie. Kiedy zaś komórka generatywna się wydłuża, Mt są ułożone przy jej ścianie równoległe do długiej osi. Inkubacja pylników w roztworze kolchicyny prowadzi do rozpadu Mt i utraty wydłużonego kształtu przez komórkę generatywną.

Prawidłowy przebieg formowania się jądra w rozwoju spermatozoidów koguta [64] wydaje się także związany z występowaniem równoległe ułożonych Mt w tzw. „mankiet”, który tworzy ślizgającą się spiralę nadającą

jądru kształt wydłużony. Podobny mechanizm został przedstawiony na podstawie obserwacji spermatogenezy zwierząt bezkręgowych [23, 50].

Mikrotubule biorą też udział w rozwoju spermatozoidów u ramienic z rodzaju *Chara* [79] i *Nitella* [103]. Na przykładzie *Nitella* stwierdzono, że działanie kolchicyny zakłóca prawidłowy przebieg spermatogenezy [104]. Spermatozoidy tego glonu, które różnicują się w obecności kolchicyny, pozbawione są witek i mankietu utworzonego z Mt, a jądro, mimo iż proces kondensacji chromatyny nie został zahamowany, nie przybiera charakterystycznego kształtu zwiniętej spirali. Jeśli kolchicina podawana była przez 24 godz., a następnie umożliwiono regenerację w ciągu 4–5 dni, powstawały spermatozoidy normalne, ale zaopatrzone w rozwidlone wici, w których układ i liczba Mt była całkowicie nieprawidłowa. Mikrotubule uczestniczą więc w tych przypadkach w procesie morfogenezy.

Innym przykładem morfogenetycznej roli Mt jest ich udział w rozwoju gastruli, która traci swój typowy wydłużony kształt pod wpływem niszczących Mt czynników: kolchicyny, ucisku, niskiej temperatury. Działanie tych ostatnich może być zniesione za pomocą D_2O jako stabilizatora Mt. Efekt wywołany kolchicyną jest jednak możliwy tylko we wczesnych stadiach rozwoju [101].

Wydłużanie się komórek przy różnicowaniu soczewek ocznych jest także związane z występowaniem licznych, ułożonych równolegle do osi komórki Mt i może być zahamowane za pomocą kolchicyny [84]. Po zakończeniu różnicowania komórek ich kształt jest najczęściej niezależny od Mt.

Funkcja morfogenetyczna Mt zdawała się przejawiać w procesie asymetrycznego podziału komórek, który często poprzedza ich różnicowanie. Pickett-Heaps i Northcote [81, 82] zbadali przebieg asymetrycznych podziałów występujących w procesie różnicowania aparatu szparkowego pszenicy i wykazali, że kolejne asymetryczne podziały są poprzedzane pojawieniem się tzw. preprofazowej wiązki Mt dokładnie w tej pozycji, w której dokonuje się później podział. Przed ostatnim podziałem odbywającym się symetrycznie wiązka preprofazowa Mt jest także zlokalizowana symetrycznie. Na podstawie tych faktów autorzy doszli do wniosku, że lokalizacja wiązki preprofazowej Mt wyznacza plan podziału komórki. Jednakże Burgess i Northcote [12] wbrew oczekiwaniom stwierdzili, że w korzeniu *Phleum* preprofazowe Mt pojawiają się w położeniu symetrycznym nawet wówczas, kiedy późniejszy podział dokonuje się asymetrycznie. Na podstawie dalszych badań Pickett-Heaps [80] doszedł do wniosku, że asymetryczny układ preprofazowej wiązki Mt może być wynikiem, a nie przyczyną polaryzacji komórki. Wyraził pogląd, że pojawianie się preprofazowej wiązki Mt stanowi przejaw wstępnych przygotowań do mitozy; w dalszych stadiach Mt preprofazowe zostają wcielone

do wrzeciona mitotycznego. Pogląd ten był krytykowany przez innych autorów [13, 11], którzy wykluczają przemieszczanie się niezdemontowanych Mt i zakładają, że preprofazowe Mt przenoszone są do wrzeciona przez retikulum endoplazmatyczne w postaci monomerów. Jednakże przyżyciowe obserwacje Bajera i Molè-Bajer [1] wskazują na możliwość przemieszczania się wiązek nie zdemontowanych Mt.

Jednym z przedmiotów bardzo intensywnych badań na materiale roślinnym był związek Mt ze wzrostem i grubieniem ściany komórkowej zasugerowany przez Ledbettera i Portera [52]. Mimo licznych publikacji [70] problem ten nie został definitywnie rozwiązany do chwili obecnej.

Regularny układ Mt przypominający „setki obręczy” opasujących komórkę przy błonie komórkowej był wielokrotnie opisywany w okresie rozrastania się ściany pierwotnej w komórkach charakteryzujących się wzrostem wydłużeniowym. Kierunek ułożenia Mt (prostopadły do długiej osi komórki) pokrywał się w większości przypadków z kierunkiem układu mikrofibryli celulozy w najbardziej wewnętrznej warstwie ściany komórkowej [52, 67, 46 i in.].

Pojawianie się licznych Mt zorientowanych zgodnie z układem mikrofibryli celulozy obserwowano również w okresie grubienia ścian komórek w drewnie pierwotnym [35, 21, 77, 34] oraz w drewnie wtórnym [115, 15, 16, 96, 86].

W związku z tym wysunięta została hipoteza, że Mt mogą w nieznany bliżej sposób uczestniczyć pośrednio lub bezpośrednio w procesie orientacji mikrofibryli celulozy [56]. Według niektórych autorów funkcja Mt mogłaby polegać na bezpośrednim ich udziale w procesie syntezy polisacharydów, np. jako matrycy, na której powstawałyby makrocząsteczki celulozy [58].

Prace Pickett-Heapsa [78] nad wpływem kolchicyny na proces odkładania się wtórnych zgrubień w komórkach protoksylemu zdecydowały o przyjęciu przez wielu badaczy poglądu, że Mt nie uczestniczą bezpośrednio w syntezie polisacharydów i nie kontrolują orientacji mikrofibryli celulozy, a raczej determinują miejsce odkładania się zgrubień ściany. Zniszczenie Mt nie hamowało procesu syntezy celulozy i nie naruszało układu mikrofibryli, wywołując jedynie powstawanie nieforemnych i niekompletnych zgrubień. W swoim eksperymencie Pickett-Heaps nie uzyskał jednak całkowitego zniszczenia Mt. W związku z tym Hepler i Fosket [34] powtórzyli ponownie doświadczenie z wpływem kolchicyny na różnicowanie się komórek ksylemu w hodowli tkankowej *Coleus*. Wykazali oni, że powstające w zupełnej nieobecności Mt nieregularne zgrubienie ściany komórkowej zawierają nieprawidłowo ułożone, „zwichrzone” mikrofibryle celulozy widoczne po utrwaleniu KMnO_4 . Również Robards i Kidwai [86] podkreślają istnienie korelacji pomiędzy układem

Mt i mikrofibryli dającej się ujawnić także nawet wtedy, kiedy w komórce powstają mikrofibryle zorientowane w kilku kierunkach. Natomiast Chaff i Wardrop [14] oraz Schnepff [93] przedstawiają przykłady niezgodności układu Mt oraz mikrofibryli celulozy w warstwie ściany sąsiadującej z Mt.

Hepler i Fosket [34] wykazali ponadto, że kolchicina może całkowicie uniemożliwić różnicowanie ksylemu, jeśli podana jest we wcześniejszych stadiach wzrostu hodowli tkankowej przez blokowanie podziału, który zawsze poprzedza wejście komórki w stadium różnicowania. Autorzy doszli do wniosku, że prawidłowe odkładanie się zgrubień ściany jest kontrolowane nie tylko przez Mt. W nieobecności Mt mogą powstawać prawidłowe zgrubienia w sąsiedztwie już istniejących zgrubień występujących we wcześniej zróżnicowanych komórkach. Potwierdza to pogląd niektórych autorów [31, 93], że udział Mt w procesie wzrostu ściany komórkowej konieczny jest tylko w określonych sytuacjach morfogenetycznych. Obecności Mt nie stwierdzono w pobliżu rosnących ścian, które wykazywały nieregularny układ mikrofibryli celulozy, np. w strefie szczytowej włośników [71] i łagiewek pyłkowych [26]. We włośnikach w pewnej odległości od szczytu komórki pojawiają się Mt, a nieco później rozpoczyna się regularne odkładanie mikrofibryli celulozy zgodnie z kierunkiem układu Mt [71]. Nie wiadomo, czy podobna zależność występuje również w łagiewkach pyłkowych, o których dość długo sądzono, że nie zawierają w ogóle Mt. Badania Franke i wsp. [26] wykazały jednakże, że w łagiewkach *Clivia* sp. i *Lilium* sp. poniżej części szczytowej występują Mt korowe sąsiadujące z błoną komórkową, ułożone równolegle do osi komórki oraz Mt strefy centralnej zorientowane mniej regularnie. Stwierdzony przez Franke i wsp. zastanawiający fakt, że łagiewki pyłkowe rozwijające się w obecności kolchicyny, kontynuowały normalny wzrost mimo zniszczenia wszystkich Mt mógłby być podstawą do daleko idących wniosków, nie został jednakże przez autorów przeanalizowany pod kątem zależności układu Mt i mikrofibryli celulozy w ścianie łagiewki.

Przypuszcza się, że Mt występujące przy ścianie komórkowej pojawiają się w miejscach, w których na skutek działania auksyn, stała się ona bardziej plastyczna i mogą spełniać funkcję wzmacniającą [93, 83]. Prawdopodobne wydaje się także, że Mt uczestniczą w przemieszczaniu różnych związków z komórki do ściany. Hepler i Fosket [34] sugerują, że w tym procesie rolę elementów generujących siłę mogą spełniać mosty łączące Mt z błoną komórkową.

W okresie wydłużania się komórek duże ilości Mt pojawiają się także w pericellularnej przestrzeni pomiędzy błoną komórkową i ścianą komórkową [16, 33]. Jak się przyjmuje, Mt w tym przypadku mogą uczestniczyć w wydzielaniu pozakomórkowym.

UDZIAŁ Mt W PROCESACH RUCHU I TRANSPORTU

Obecność Mt w wiciach i rząskach oraz we wrzecionie mitotycznym nasuwała przypuszczenie o możliwości uczestniczenia Mt cytoplazmatycznych również w innych zjawiskach ruchu: ruchu cytoplazmy, przemieszczaniu się organizmów i organelli, oraz w transporcie wewnątrzkomórkowym.

Koncepcja udziału Mt w ruchu cytoplazmy wysunięta została przez Ledbettera i Portera [52] i miała początkowo wielu zwolenników. Zakładano, że Mt są elementami kurczliwymi, które mogą być siłą motoryczną ruchu [42, 20]. Inni autorzy [87] przyjmowali raczej udział Mt w wyznaczaniu szlaków, wzdłuż których ma się odbywać ruch cytoplazmy.

Możliwość generowania ruchu cytoplazmy przez Mt nie została potwierdzona eksperymentalnie. Ruch ten na ogół nie jest wrażliwy na kolchicynę, co stwierdzili, m. in., Pickett-Heaps [78], Franke i wsp. [26] i Bradley [9], chociaż nie zawsze dokumentowano to kontrolą obecności Mt.

Wielu autorów upatruje siły motorycznej ruchu cytoplazmy w tzw. mikrofilamentach, włókienkowatych strukturach 5–10 nm (ref. [29]). Mikrofilamenty występują szczególnie obficie w cytoplazmie o bardzo szybkim ruchu (plasmodia śluzowców, komórki ramienic). Włókienka te u śluzowców są zbudowane z tzw. myksomiozyny i mają zdolność rozkładania ATP [113, 114]. Stwierdzono również, że mikrofilamenty reagują z meromiozyną ciężką, tworząc kompleksy podobne do meromiozyny związanej z aktyną mięśni [41, 85]. Zastosowanie cytochalazyny B zdawało się w pełni potwierdzać znaczenie mikrofilamentów jako siły napędowej ruchu. Wielu autorów obserwowało bowiem zanikanie mikrofilamentów pod wpływem tej substancji przy jednoczesnym zahamowaniu ruchu cytoplazmy [107]. Jednakże dalsze badania wykazały, że cytochalazyna B, blokując ruch cytoplazmy, nie zawsze powoduje rozpad mikrofilamentów [26, 9]; kwestia ta w pewnym stopniu pozostaje otwarta.

Niektórzy autorzy wyrażają pogląd, że ruch cytoplazmy może być rezultatem interakcji mikrofilamentów i mikrotubul [116, 76] lub mikrofilamentów, Mt i retikulum endoplazmatycznego [26]. Na możliwość współdziałania tych elementów wskazuje obecność delikatnych mostów łączących Mt i mikrofilamenty oraz Mt i retikulum [26]. Przypuszczenie to nie zostało jeszcze poparte eksperymentalnie, ponieważ zatrzymanie ruchu cytoplazmy pod wpływem cytochalazyny B nie powodowało dostrzegalnych zmian w strukturze mostów [26].

Istnieje także pogląd podtrzymywany obecnie przez Frey-Wysslinga [28], że mikrofilamenty i Mt mogą przekształcać się jedno w drugie w sposób odwracalny. Tę sugestię wysuwali wcześniej inni autorzy.

O'Brien i Thimann [72], na podstawie badań ruchu cytoplazmy koleoptyli owsa przypuszczali, że mikrofilamenty ujawnione w komórce mogą być podjednostkami (protofilamentami) Mt, które w tej postaci partycypują w ruchu. Podobna sugestia wynikała z eksperymentów Wiśniewskiego i wsp. [109, 110], którzy wykazali, że po zniszczeniu Mt komórek nerwowych pojawiają się na ich miejscu liczne fibryle około 10 nm średnicy, uważane przez autorów za przekształcone Mt. Również po zadziałaniu kolchicyną na melanofory zaobserwowano zwiększenie się liczby mikrofilamentów [111]. Jednakże w świetle badań biochemicznych i immunochemicznych [38] ta koncepcja wydaje się mało prawdopodobna, ponieważ białko Mt — tubulina i białko mikrofilamentów — filarina izolowane z neuronu *Doidicus gigas*, nie są identyczne (rys. 5, [49]).

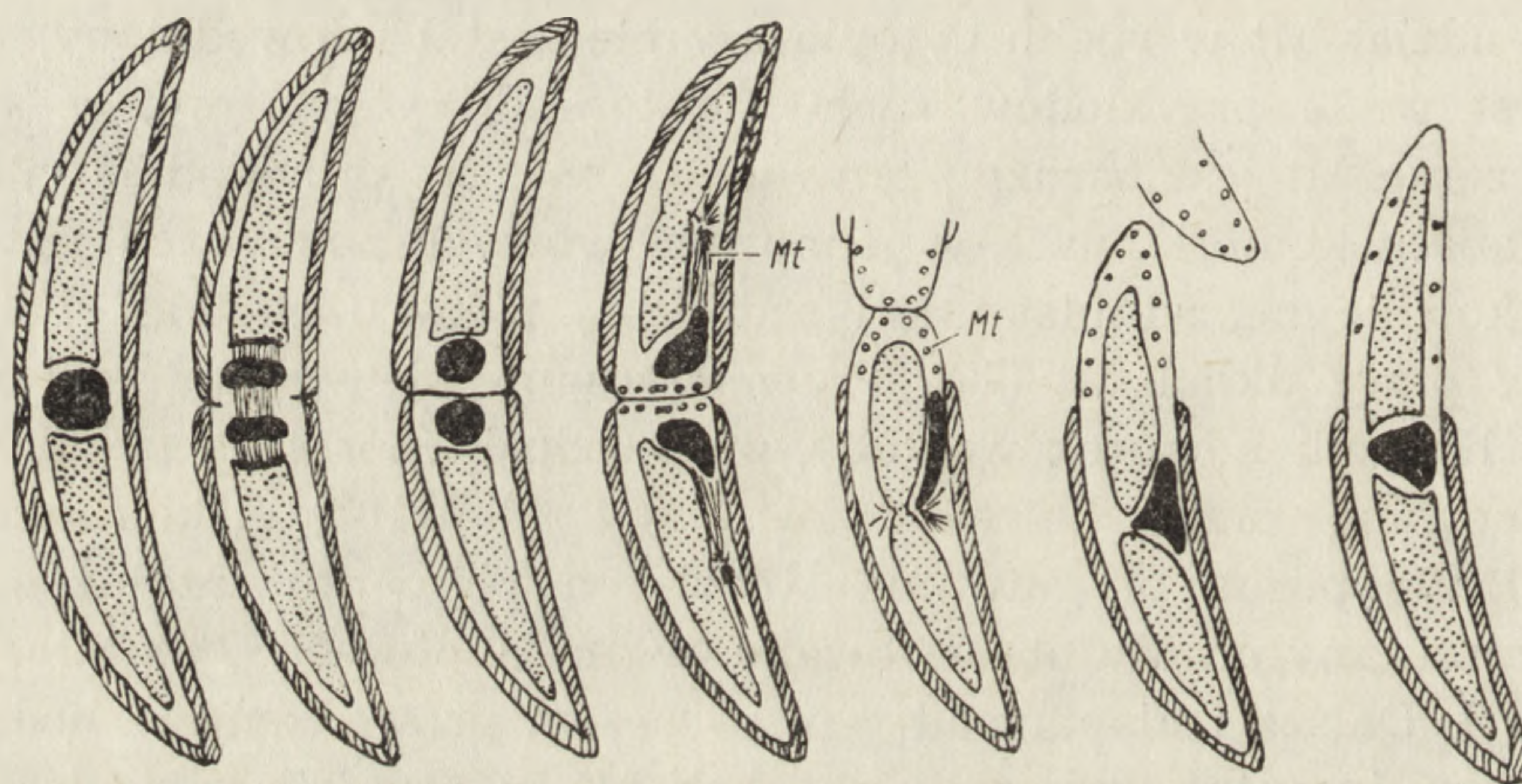
O ile udział Mt w ruchu cytoplazmy nie został udowodniony, to jednakże jest wiele przykładów ruchu na terenie cytoplazmy, w których uczestniczenie Mt jest bardziej prawdopodobne. Na przykład saltatoryjny ruch organelli komórkowych w jednowarstwowych hodowlach jest wrażliwy na kolchicynę, winblastynę i podofilinę, a kierunek tego ruchu jest określony przez układ Mt [27]. Przemieszczanie się wakuol endocytozowych, w hodowli komórek wątroby, z obwodu komórki do okolicy jądra jest hamowane przez kolcemid niszczący Mt [105]. Ukierunkowanie w określony sposób przesuwania się ziaren pigmentu wzdłuż szlaków wysłanych licznymi Mt obserwowano w melanoforach *Fundulus heteroclitus* [7]. Dalsze badania nad tym procesem prowadzone w hodowlach melanoforów *in vitro* wykazały, że obok Mt w procesie przemieszczania się ziaren pigmentu uczestniczą również mikrofilamenty. Na podstawie eksperymentów z zastosowaniem kolchicyny i cytochalazyny B przypuszcza się, że Mt wraz z mikrofilamentami biorą udział w ukierunkowanym skupieniu się ziaren pigmentu wewnątrz komórki, natomiast rozprzestrzenianie się tych ziaren odbywa się prawdopodobnie dzięki mikrofilamentom niezorientowanym w określony sposób [59, 60, 111, 3].

Liczne dane wskazują, że przy udziale Mt zachodzi transport RNA z komórek troficznych do oocytów [56, 37, 98, 97, 68]. Dowodzą tego badania autoradiograficzne z zastosowaniem urydyny-³H [97].

Związek Mt z transportem na poziomie cząsteczkowym sugerował Slautterback [94] na przykładzie stułbi. Uważał on, że system Mt otaczających rozwijającą się nematocystę jak „klepki beczkę” może na zasadzie kolumny chromatograficznej uczestniczyć w przemieszczaniu wody i zawartych w niej jonów. Wędrówkę wody i jonów wzdłuż Mt przyjmuje także Witkus i wsp. [112]. Natomiast Journey [43] oraz Boler i Arhelger [8] zakładali możliwość transportu enzymów hydrolitycznych i produktów hydrolizy przez Mt, które występowały w powiązaniu z systemem lizosomalnym.

Szczególny przykład funkcjonowania Mt cytoplazmatycznych stanowi amitoza w komórkach nadnerczy *Rana temporaria* [75]. Zrekonstruowany przez Pehlemana na podstawie ultracienkich skrawków schemat amitozy zakłada możliwość aktywnego udziału Mt i mikrofilamentów w przewężaniu jądra. Mikrofilamenty i Mt tworzą rodzaj pętli, która zaciska się wokół jądra w płaszczyźnie podziału. Na uczestniczenie Mt w procesie amitozy wskazali również inni autorzy [100, 44].

Pickett-Heaps i Fowke [83] zaobserwowali, że przeciąganie jądra po telofazie z obwodu siostrzanych asymetrycznych komórek nowika (*Closterium*) w położenie centralne odbywa się również w obecności wiązki Mt (rys. 1).



Rys. 1. Przemieszczanie się jąder po telofazie w komórkach siostrzanych *Closterium* dokonujące się przy udziale wiązki Mt. Mt znajdują się również przy ścianie dorastającej części komórki (wg Pickett-Heapsa i Fowke [83])

Jest wiele bardzo przekonujących dowodów związku Mt z tzw. ciągłym przepływem aksonalnym komórek nerwowych. Wyróżnia się wolny i szybki przepływ aksonalny, których istnienie zostało stwierdzone za pomocą techniki autoradiograficznej oraz metody przewiązywania całych nerwów. Mitochondria, granule sekrecyjne, przemieszczają się w wyniku szybkiego przepływu z prędkością 2,8–0,25 m na dzień z ciała komórki wzdłuż aksonu, wysłanego Mt i mikrofilamentami [19]. Mt zdają się mieć długość równą długości aksonu (do 1 m — [106]).

W ramach wolnego przepływu aksonalnego mogą się prawdopodobnie przemieszczać same Mt w stanie nierozmontowanym, do komórki zaś powracać w postaci monomerów [92, 51, 2].

Działanie kolchicyny, winblastyny, podofiliny prowadzi do zahamowania szybkiego i powolnego transportu aksonalnego. Obserwowano np. blokowanie przemieszczania się radioaktywnych białek [45], acetylocholiny [47] oraz katecholiny [17].

Zahamowaniu przepływu aksonalnego nie zawsze towarzyszy zani-

kanie Mt. Dustin i wsp. [24] badali metodą autoradiograficzną i mikroskopowo-elektronową proces formowania się ziaren neurosekrecyjnych i ich transport do miejsca deponowania w tylnym płacie przysadki i wykazali, że kolchicina hamuje wyraźnie transport aksonalny ziaren bez zahamowania ich syntezy w ciele komórki. Unieczynnienie transportowej roli Mt w tym przypadku dokonuje się bez ich zniszczenia [24]. Podobne zjawisko zaobserwowali i inni autorzy [12, 36, 69].

W celu wyjaśnienia mechanizmu transportu aksonalnego zaproponowano wiele modeli.

Według Schmitta [92] ślizganie się ziaren neurosekrecyjnych wzdłuż Mt odbywa się w obecności ATP dzięki specjalnym powiązaniom pomiędzy ziarnem i Mt. Za tą koncepcją zdaje się przemawiać obecność mostów pomiędzy pęcherzykami synaptycznymi i Mt (Smith i wsp. 1970 cyt. wg [3]).

Według hipotezy Ochsa [73] szybki transport aksonalny może być realizowany w obecności ATP przez neurofilamenty transportowe wzdłuż statycznych Mt (neurotubul). Elementami mechanochemicznymi w tym ruchu byłyby mosty łączące neurotubule i neurofilamenty. Ochs zakłada możliwość istnienia różnych „wagonów transportowych” dla różnych rodzajów substancji.

Zdaniem Hejnowicza [32] natomiast mechaniczną bazą ruchu w transporcie aksonalnym może być rozprzestrzenianie się fal potencjału elektrycznego wzdłuż filamentów. Transport mógłby być kontrolowany przez miejsca, w których generowane są fale elektrycznego potencjału.

Przypuszcza się również, że Mt są związane z powstawaniem bądź przekazywaniem impulsów czuciowych (ref. [3, 57]).

STRUKTURALNA PODSTAWA FUNKCJONOWANIA Mt W PROCESACH RUCHU

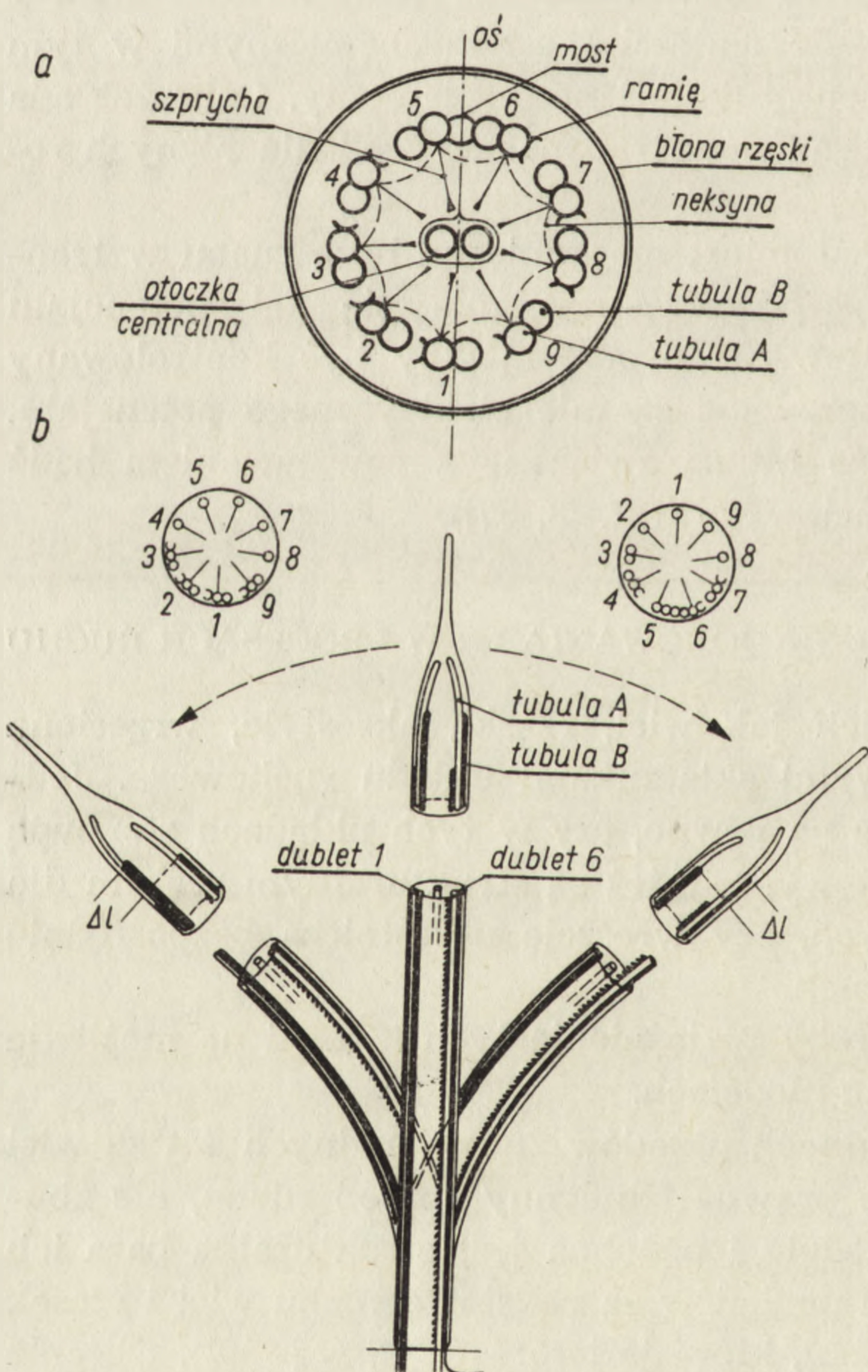
W wielu strukturach takich jak wici, rzęski, aksostyle, wrzeciona podziałowe, Mt są niewątpliwymi składnikami układu ruchowego. Jednakże nie wiadomo dotychczas na pewno, czy w tych układach stanowią one element pasywny, szkieletowy, czy też są strukturalnym zrębem dla elementów mechanochemicznych, czy wreszcie uczestniczą bezpośrednio w pracy, której efektem jest ruch.

Ostatnio dokonywane są próby wyjaśnienia tych kwestii na możliwie prostych i wygodnych do badań modelach.

Jednym z dokładniej zbadanych układów funkcjonalnych Mt są wici i rzęski. Charakteryzuje je co prawda odmienny sposób ruchu, ale zbudowane są według jednego modelu i podobna jest strukturalna baza ich ruchu. Według wcześniejszych poglądów za podstawę ruchu wici i rzęsek przyjmowano kurczenie się tubul, które je tworzą (cyt. wg [89]). Obecnie większość autorów uznaje model funkcjonowania ich na zasadzie ślizgania

się jednych tubul w stosunku do drugich. Zgodnie z modelem przedstawionym przez Satira [90, 91] zakłada się, że sama aksonema rzęski jest odpowiedzialna za ruch. Rzęski izolowane, pozbawione błony komórkowej i zewnętrznej części cytoplazmy, mogą wykonywać uderzenia i płynąć o ile w środowisku znajduje się odpowiednia ilość ATP i właściwe kationy. Funkcja błony polega na zapobieganiu wydostawaniu się ATP poza układ oraz zaopatrywaniu w jony, ewentualnie na uczestniczeniu w określaniu kierunku uderzenia rzęski.

Źródłem energii potrzebnej dla zginania jest ATP hydrolizowane przez dyneinę, która tworzy 2 rzędy ramion usytuowanych na tubulach A obwodowych 9 dubletów. W trakcie uderzania i falowania rzęsek Mt nie mogą zmieniać długości. Ruch odbywa się po osi, która przecina rzęskę w ten sposób, że przechodzi przez dublet 1 i pomiędzy dubletami 5 i 6 (rys. 2).



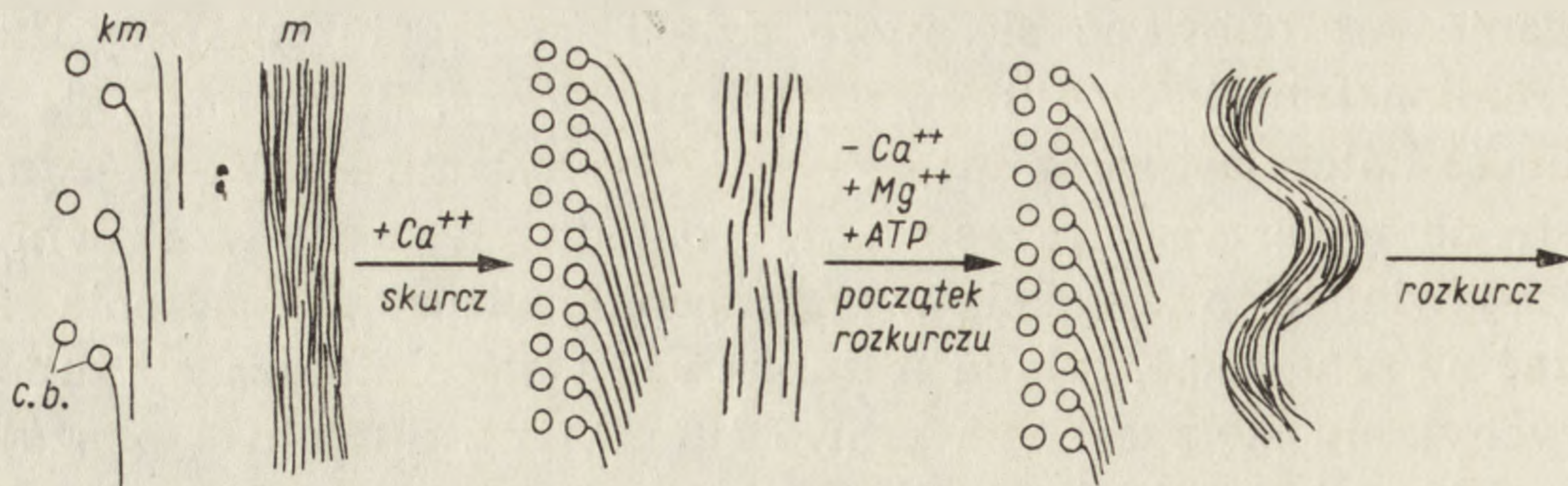
Rys. 2. a — Przekrój poprzeczny rzęski — schemat. b — Układ dubletów Mt w trakcie wychylania się rzęski w lewo lub w prawo, według modelu ślizgania Satira [91] (objaśnienia w tekście)

Ślizganie Mt odbywać się może dzięki tworzeniu niespecyficznym wiązań ramion tubuli A z tubulą B następnej pary. Ramiona mogą zmieniać długość natomiast same Mt — nie, a wychylaniu się Mt w jedną lub drugą stronę towarzyszy przesuwanie się jednych tubul względem drugich. Przejawia się to wyraźnie w zmianach struktury zakończenia rzęski. Jak widać na schemacie, tubula A dubletu jest nieco dłuższa niż tubula B. Przy wychylaniu się rzęski na prawo tubula B z dubletu 1 okazuje się krótsza od tubuli B dubletu 6. Obraz ten można rozpoznać na skrawkach poprzecznych końcowej strefy rzęsek (rys. 2). Przy wychylaniu się rzęsek w jedną stronę — na mikro fotografiach brak tubul B w okolicy dubletu 1, przy wychylaniu w drugą stronę — dubletu 6. Po usunięciu dyneiny aksonema się prostuje.

Hipoteza ślizgania się Mt została poparta przez eksperymenty prowadzone na izolowanych aksonemach wici jeżowca poddawanych działaniu trypsyny [99]. Wykazano, że w obecności ATP i Mg^{2+} zewnętrzne dublety rozplaszczonyj aksonemy przesuwają się względem siebie w kierunku podłużnym.

Funkcje innych elementów wici i rzęsek (neksyny, szprych) oraz szczegóły dotyczące transponowania ślizgowych ruchów na charakterystyczne ruchy wici i rzęsek są obecnie jeszcze nie znane. Analiza porównawcza budowy chemicznej wici i rzęsek wskazuje nie tylko na ich ogromne podobieństwo, ale także na istnienie drobnych różnic w ilości ATPazy przypadającej na jednostkę białka oraz w charakterze neksyny łączącej tubule A sąsiednich dubletów. Neksyna wici wykazuje mniejszą trwałość niż neksyna aksonemy rzęsek [52, 53].

Model ślizgania Mt znajduje także zastosowanie przy objaśnianiu skurczów ciała trąbika (*Stentor coeruleus*) [39]. Kurczenie się trąbika w warunkach eksperymentalnych było uzyskiwane przez podawanie kationów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Systemami, w obrębie których powstaje siła potrzebna dla zmiany długości organizmu są włókna „km” i „mionema”. Włókna „km” składają się z rzędów Mt połączonych ze sobą stałymi, regularnie rozmieszczonymi wzdłuż Mt mostami. Sąsiednie rzędy Mt połączone są dłuższymi mostami międzyrzędowymi, których położenie jest zmienne. System drugi — mionema — składa się z kurczliwych filamentów. Te dwa systemy funkcjonują antagonistycznie. Wydłużanie się trąbika związane jest z procesem ślizgania się sztywnych rzędów Mt względem sąsiednich rzędów dzięki, jak przypuszczają autorzy, mechanochemicznej działalności ramion międzyrzędowych, które mogą zmieniać swoje położenie. W wyniku tego procesu rzędy Mt rozsuwają się, co prowadzi do zmniejszenia się ilości Mt w poszczególnych pasmach w danym wycinku oraz oddalenia się powiązanych z nimi ciał bazalnych. Przy skurczu zaś w pasmach „km” liczba Mt zwiększa się i ciała bazalne przybliżają się do siebie (rys. 3).



Rys. 3. Układ Mt we włóknach „km” oraz filamentów w mionemie ciała *Stentor* w stanie skurczu i rozkurczu (wg Huang i Pitelka [39], objaśnienia w tekście)

Funkcjonowanie mionemy odpowiedzialne jest za skurcze ciała trąbika i morfologicznie wyraża się transformacją 4 nm filamentów do tubularnych, 10–12 nm struktur. Proces transformacji prowadzi do gwałtownego skurczu mionemy i całego organizmu. Jednakże rozkurcz mionemy nie wywołuje wydłużania się trąbika. Dla osiągnięcia stanu wydłużonego nieodzowne jest aktywne współdziałanie systemu „km”. Mt w procesie skurczu nie zmieniają swej średnicy, system Mt w tym przypadku funkcjonuje więc jako pewnego rodzaju ruchomy, aktywny szkielet.

Jedną z licznych teorii funkcjonowania wrzeciona mitotycznego opracowaną przez McIntosha i wsp. [63], opartą jest także na modelu ślizgania. Jest ona modyfikacją wcześniejszych koncepcji Östergrena i Bajera [74], Inouè i Sato [40]. Autorzy opierają swój model mitozy na istnieniu mostów łączących Mt wrzeciona, które uznają za jednostki mechanochemiczne odpowiedzialne za ruch chromosomów, podczas gdy układające się równolegle Mt stanowiłyby element podporowy wrzeciona i kierowały ruchem chromosomów. W myśl tej teorii Mt są spolaryzowane. Początek Mt to miejsca, w których zachodzi ich polimeryzacja, tzn. centriole lub kinetochory chromosomów. Mt ułożone równolegle do siebie, o kierunkach przeciwnych, mogą dzięki mostom przesuwać się względem siebie, Mt o identycznym kierunku polaryzacji — nie.

W profazie formują się Mt wokół par centrioli z podjednostek nagromadzonych w cytoplazmie. Między Mt o przeciwnych kierunkach tworzą się poprzeczne mosty, które stabilizują wrzeciono. Z chwilą zniknięcia błony jądrowej zaczynają rosnać Mt kinetochorowe; z dwu stron kinetochorów tworzą się Mt o przeciwnej polarności. W metafazie ustala się równowaga między Mt kinetochorowymi i ciągłymi wrzeciona. Anafaza rozpoczyna się załamaniem równowagi osiągniętej podczas metafazy albo na skutek zmniejszenia sił wiążących chromosomy siostrzane, albo zwiększenia siły działania mostów. Mt kinetochorowe i ciągłe ślizgają się w kierunku oddalającym je od miejsca powstawania. Zbliżanie się chromosomów do biegunów autorzy tłumaczą, zgodnie z wcześniejszą hipotezą Inouè i Sato [40], jako efekt demontowania Mt do podjednostek. Szybkość

ruchu chromosomów jest zatem określona częściowo przez kinetykę działania mostów, a częściowo — przez kinetykę demontowania Mt.

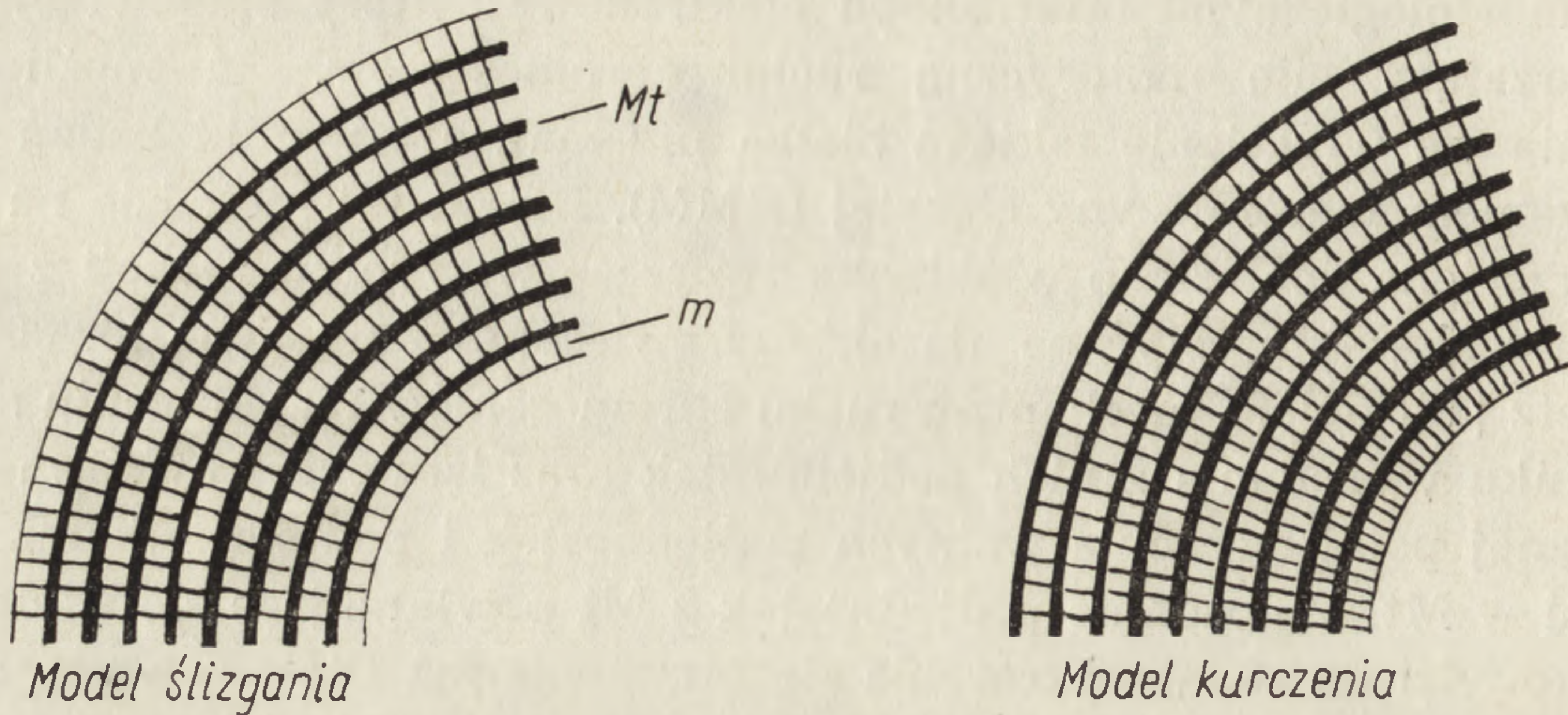
Inni autorzy [25, 55] opierają swoje modele mitozy na założeniu, że we wrzecionie istnieje przypuszczalny składnik, niewykrywalny metodami morfologicznymi mikroskopii elektronowej, który stanowi element wytwarzający siłę motoryczną ruchu chromosomów. Za możliwością istnienia we wrzecionie takiego białka przemawiają wyniki badań z zastosowaniem meromiozyny ciężkiej (HMM). Dzięki tej metodzie na terenie wrzeciona znaleziono włókienka tworzące w wyniku reakcji z HMM wyrostki charakterystyczne dla aktyny związanej z miozyną [5, 30].

Dietz [18] opiera mechanizm ruchu chromosomów na skracaniu się Mt w wyniku wypadania z nich podjednostek oraz istnieniu równowagi dynamicznej pomiędzy pulą wolnych podjednostek i podjednostkami związanymi w Mt. Wypadanie podjednostek z Mt powtarzające się wielokrotnie prowadzi do stałego skracania się Mt. Ponieważ Dietz zakłada, że Mt są zakotwiczone na biegunie wrzeciona, skracające się Mt pociągają za sobą chromosomy, na które działają również siły odpychające. Są one rezultatem wydłużania się ciągłych Mt wrzeciona w wyniku procesu odwrotnego do już opisanego. Skracanie się i wydłużanie Mt nie manifestowałyby się zmiennością średnic Mt, której brak w różnych fazach mitozy jest powszechnie uznawany.

Żaden z dotychczasowych modeli mitozy nie jest wolny od zarzutów niezgodności z obserwowanymi faktami i niejasności. Szeroka dyskusja nad tą kwestią została przeprowadzona przez Bajera i Molè-Bajer [1]. Zagadnienie ruchu chromosomów wymaga dalszych dociekań.

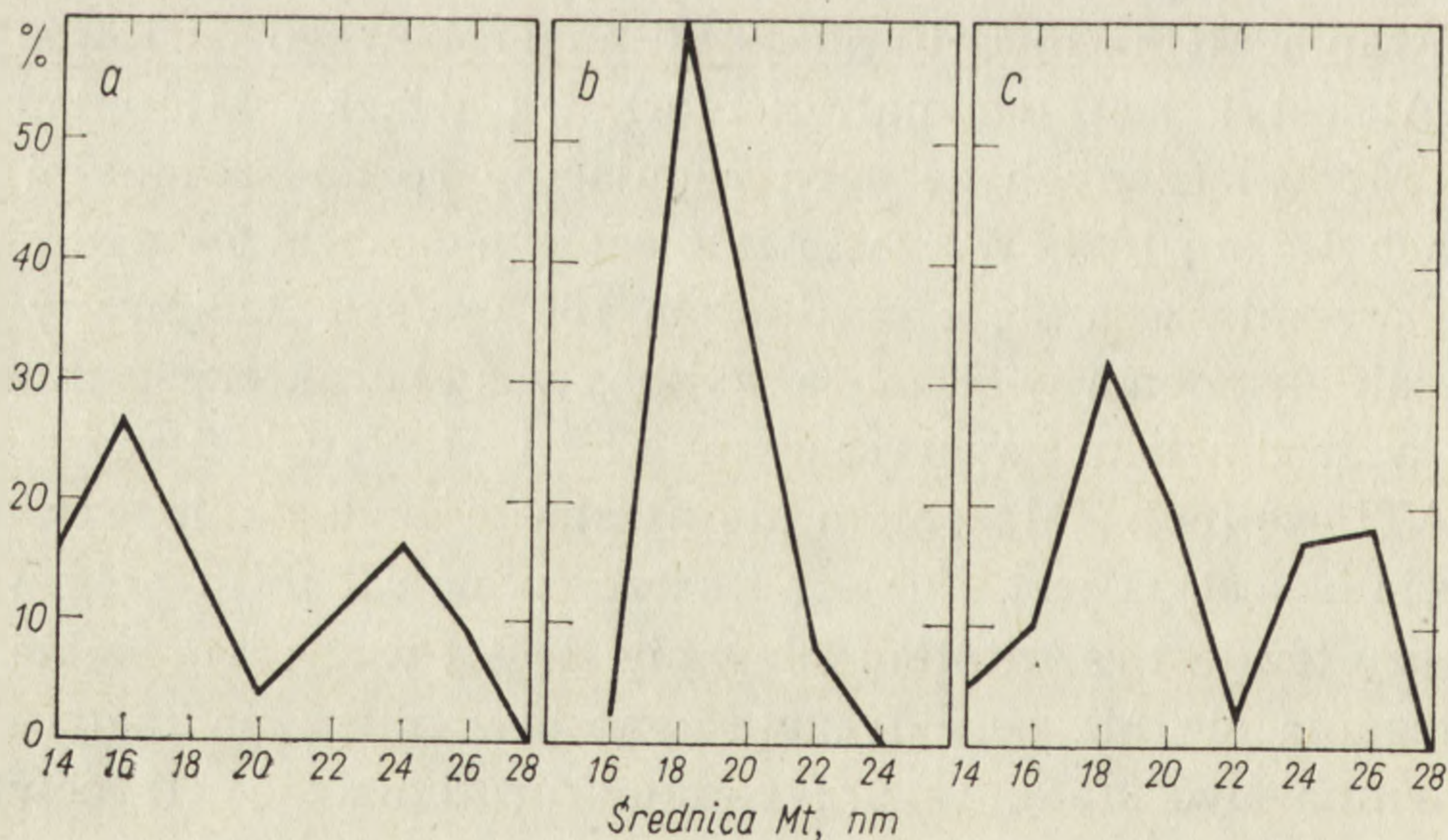
McIntosh [61] przedstawił ostatnio wyniki badań nad mechanizmem funkcjonowania Mt na modelu aksostyli anaerobowego wiciowca *Saccinobaculus*. Aksostyl jest wewnątrzkomórkową wiązką Mt składającą się z tysięcy Mt połączonych ze sobą regularnie rozmieszczonymi mostami w odstępach 15 nm [62]. W czasie falowania aksostyla tworzy się wygięcie, które przemieszcza się z prędkością 100 $\mu\text{m}/\text{sek}$. Izolowany aksostyl, podobnie jak aksonema wici, może wykonywać charakterystyczne dla niego ruchy w środowisku zawierającym ATP i Mg^{2+} dzięki mostom zawierającym ATPazę [66]. Założeniem McIntosha było zbadanie, czy tworzenie się wygięcia aksostyla jest efektem kurczenia się Mt po stronie wewnętrznej łuku, czy też jest rezultatem ślizgania się Mt względem siebie. W przypadku ślizgania się Mt periodyczność mostów mierzona metodą dyfrakcyjną powinna być stała, w przypadku kurczenia się Mt powinna ona ulegać zwiększeniu (rys. 4). Okazało się, że po stronie wewnętrznej łuku zachodzi zwiększenie periodyczności mostów. Tym sposobem wykazana została możliwość kurczenia się Mt o około 25%. Autor nie uznaje jednakże skurczu Mt aksostyla za źródło siły motorycznej jego ruchu i przyjmuje, że kurczenie się Mt może być wtórnym efektem ślizgania.

Kurczenie się Mt cytoplazmatycznych prawdopodobnie ma związek z ruchem tzw. lipotubuloidów występujących w skórcie różnych części kwiatu *Ornithogalum umbellatum* [48]. Lipotubuloidy zawierają liczne Mt powiązane ze sobą mostami (por. rys. 3 — [49]). Krzyżujące się pasma



Rys. 4. Rozmieszczenie mostów łączących Mt w wygięciu aksostyla w przypadku ślizgania oraz kurczenia się Mt (wg McIntosh [61], objaśnienia w tekście)

Mt tworzą sieć, w której tkwią kule lipidowe. Lipotubuloidy przemieszczają się w komórce ruchem złożonym, postępowo-obrotowym. Jest to częściowo ruch autonomiczny, obroty lipotubuloidów okazały się bowiem niezależne od ruchu cytoplazmy. Średnice Mt lipotubuloidu wahają się w granicach 14–28 nm. Rozkład częstotliwości występowania Mt o różnych średnicach wykazuje zmienność, w zależności od tego, w jakim stanie utrwalano lipotubuloidy. W lipotubuloidach utrwalanych (pod kontrolą



Rys. 5. Rozkład średnic Mt lipotubuloidów *Ornithogalum* utrwalanych w trakcie ruchu (a), bezruchu wywołanego działaniem dwunitrofenolu (b) oraz po ponownym przywróceniu ruchu przez usunięcie dwunitrofenolu (c) (wg Kwiatkowskiej [48] — zmodyfikowane. Objaśnienia w tekście)

mikroskopu świetlnego) w trakcie intensywnego ruchu występowały dwie populacje Mt o średnicach 14–22 nm i 22–28 nm. W preparatach pochodzących z lipotubuloidów, które przestały się poruszać po zadziałaniu dwunitrofenolem blokującym syntezę ATP, występowała natomiast jedna populacja Mt 16–24 nm. Usunięcie dwunitrofenolu powodowało przywrócenie normalnego ruchu lipotubuloidów i ponowne pojawienie się Mt dwu populacji (rys. 5). Średnice Mt ulegają więc zmianom; zróżnicowanie ich na dwie populacje wymaga obecności ATP. Wydaje się prawdopodobne, że zmiany średnic Mt mogą być przejawem ich kurczenia się i wydłużania w drodze zmian konformacyjnych (zgodnie z modelem kurczenia się pochewek faga T20) i źródłem siły motorycznej ruchów obrotowych lipotubuloidów.

Występowanie na terenie tej samej komórki Mt cytoplazmatycznych o zróżnicowanych średnicach notowało wielu autorów [65, 75, 83, 26], jednakże nie próbowano wyświetlić bliżej tego zjawiska. Wyniki sugerujące możliwość funkcjonowania Mt w rezultacie ich kurczenia się są obecnie odosobnione, co uniemożliwia uogólnienie wniosków.

Dotychczasowe obserwacje pozwalają sądzić, że w różnych układach ruchowych istnieją prawdopodobnie odmienne sposoby funkcjonowania Mt. Problem udziału Mt w procesach ruchu wymaga jednak dalszych badań.

LITERATURA

- [1] BAJER A. S., MOLE-BAJER J., 1972 — Spindle dynamics and chromosome movements, Int. Rev. Cytology, Academic Press, New York.
- [2] BARONDES S. H., 1971 — Slow and rapid transport of protein to nerve endings in mouse brain, Acta neuropath., Suppl. 5: 97–103.
- [3] BARDELE Ch. F., 1973 — Struktur, Biochemie und Funktion der Mikrotubuli, Cytobiologie, 7: 422–488.
- [4] BEHNKE O., 1967 — Incomplete microtubules observed in mammalian blood platelets during microtubule polymerization, J. Cell. Biol., 34: 697–701.
- [5] BEHNKE O., FORER A., EMMERSEN J., 1971 — Actin in sperm tails and meiotic spindles, Nature, 234: 408–410.
- [6] BEHNKE O., ZELANDER T., 1967 — Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets, J. Ultrastruct. Res., 19: 147–165.
- [7] BIKLE D., TILNEY L. G., PORTER K. P., 1966 — Microtubules and pigment migration in the melanophores of *Fundulus heteroclitus* L., Protoplasma, 61: 323–345.
- [8] BOLER R. K., ARHELGER R. B., 1966 — Microtubules in cytosomes and cytosomes of rabbit proximal tubule epithelium, Lab. Invest., 15: 302–311.
- [9] BRADLEY M. O., 1973 — Microfilaments and cytoplasmic streaming: inhibition of streaming with cytochalasin, J. Cell Sci., 12: 327–343.
- [10] BROWN D. L., BOUCK B. G., 1973 — Microtubule biogenesis and cell shape

- in *Ochromonas*, II The role of nucleating sites in shape development, *J. Cell Biol.*, **56**: 360-378.
- [11] BURGESS J., 1970 — Microtubules and cell division in the microspore of *dactylorhiza fuschii*, *Protoplasma*, **70**: 253-264.
- [12] BURGESS J., NORTHCOTE D. H., 1967 — A function of the preprohase band of microtubules in *Phleum pratense*, *Planta*, **75**: 319-326.
- [13] BURGESS J., NORTHCOTE D. H., 1968 — The relationship between the endoplasmic reticulum and microtubular aggregation and disaggregation, *Planta*, **80**: 1-14.
- [14] CHAFE S. C., WARDROP A. B., 1970 — Microfibril orientation in plant cell walls, *Planta*, **92**: 13-24.
- [15] CRONSHAW J., 1965 — The organization of cytoplasmic components during the phase of cell wall thickening in differentiating cambal derivatives of *Acer rubrum*, *Canad. J. Bot.*, **43**: 1401-1407.
- [16] CRONSHAW J., BOUCK G. B., 1965 — The fine structure of differentiating xylem elements, *J. Cell Biol.*, **24**: 415-431.
- [17] DAHLSTRÖM A., 1968 — Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat, *J. Pharmacol.* **5**: 111-113.
- [18] DIETZ R., 1972 — Die Assembly-Hypothese der Chromosomen-bewegung und die Veränderungen der Spindellänge während der Anaphase I in Spermatozyten von *Pales ferrugineu* (*Tipulidea*, *Diptera*), *Chromosoma*, **38**: 11-76.
- [19] DUSTIN P., 1972 — Les microtubules et leurs fonctions, *Bull. de l'Acad. Royale Med.*, **12**: 197-226.
- [20] DuPRAW E. J., 1969 — Cell and molecular biology, Acad. Press, New York-London.
- [21] ESAU K., CHEDLE V. I., GILL R. H., 1966 — Cytology of differentiating tracheary elements. I. Organelles and membrane systems, *Amer. J. Bot.*, **53**: 756-764.
- [22] FERNANDEZ H. L., BURTON H. L., SAMSON F. E., 1971 — Axoplasmic transport in the cryfish nerve cord. The role of fibrillar constituents of neurons, *J. Cell Biol.* **51**: 176-192.
- [23] FERRAGUTI M., LANZAVECCHIA, 1971 — Morphogenetic effects of microtubules. I. Spermogenesis in *Annelida Tubificidae*, *J. submicr. Cytol.*, **3**: 121-138.
- [24] FLAMENT-DURAND J., DUSTIN P., 1972 — Studies on the transport of secretory granules in the magnocellular hypothalamic neurons. I. Action of colchicine on axonal flow and neurotubules in the paraventricular nuclei, *Z. Zellforsch.*, **130**: 440-454.
- [25] FORER A., 1969 — Chromosome movements during cell division, *Handbook of Molecular Cytology*, North-Holland Publ., Amsterdam.
- [26] FRANKE W. W., HERTH W., VAN DER WOUDE W. J., MORRÉ D. J., 1972 — Tubular and filamentous structures in pollen tubes: possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles, *Planta*, **105**: 317-341.
- [27] FREED J. J., LEBOWITZ M. M., 1970 — The association of a class of saltatory movements with microtubules in cultured cells, *J. Cell Biol.* **45**: 334-354.
- [28] FREY-WYSSLING A., 1973 — Comparative organellography of the cytoplasm, *Protoplasmatologia III G*, Springer-Verlag, Wien-New York.

- [29] GADOWSKA M., 1973 — Struktura i funkcje mikrotubul i filamentów, [w] Ultrastruktura i funkcja komórki, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, PWN, Warszawa.
- [30] GAWADI N., 1971 — Actin in the mitotic spindle, *Nature*, **234**: 410.
- [31] GREEN P. B., 1969 — Cell morphogenesis, *Ann. Rev. of Plant Physiol*, **20**: 365-394.
- [32] HEJNOWICZ Z., 1970 — Propagated disturbances of transverse potential gradient in intracellular fibrils as the source, *Protoplasma*, **71**: 343-364.
- [33] HEYN A. N. J., 1972 — Intra- and extra-cytoplasmic microtubules in coleoptiles of *Avena*, *J. Ultrastruct. Res.*, **40**: 433.
- [34] HEPLER P. K., FOSKET D. E., 1971 — The role of microtubules in vessel member differentiation in *Coleus*, *Protoplasma*, **72**: 213-236.
- [35] HEPLER P. K., NEWCOMB E. H., 1964 — Microtubules and fibrils in the cytoplasm of *Coleus* cells undergoing secondary wall deposition, *J. Cell Biol.*, **20**: 529-534.
- [36] HÖKFELT T., DAHLSTRÖM A., 1971 — Effects of two mitosis inhibitors (colchicine and vinblastine) on the distribution and axonal transport of noradrenaline storage particles, studied by fluorescence and electronmicroscopy. *Z. Zellforsch.*, **119**: 460-482.
- [37] HUEBNER E., ANDERSON E., 1970 — The effects of vinblastine sulfate on the microtubular organization of the ovary of *Rhodnius prolixus*, *J. Cell Biol.*, **46**: 191-198.
- [38] HUNEEUS F. C., DAVISON P. F., 1970 — Fibrillar proteins from squid axons. I. Neurofilament protein., *J. Mol. Biol.*, **52**: 415-428.
- [39] HUANG B., PITELKA D. R., 1973 — The contractile process in the ciliate, *Stentor coeruleus*, *J. Cell Biol.*, **57**: 704-728.
- [40] INOUÉ S., SATO H., 1967 — Cell motility by labile association of molecules: The nature of mitotic spindle fibres and their role in chromosome movement, *J. Gen. Physiol.* **50**: 259-292.
- [41] ISHIKAWA H. R., BISCHOFF R., HOLTZER H., 1969 — Formation of arrow-head complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types, *J. Cell Biol.*, **43**: 312-328.
- [42] JAROSCH R., 1966 — On the behavior of rotating helices, [w] *Intracellular transport*, Ocad. Press Inc., New York, London.
- [43] JOURNEY L. J., 1964 — Cytoplasmic microtubules in mouse peritoneal macrophages during rejection of MCIM ascites tumor cells, *Cancer Research*, **24**: 1391-1405.
- [44] JURAND A., SELMAN G. G., 1970 — Ultrastructure of the nuclei and intranuclear microtubules of *Paramecium aurelia*, *J. Gen. Microbiol.*, **60**: 357-364.
- [45] KARLSSON J. O., SJÖSTRAND J., 1969 — The effect of colchicine on the axonal transport of protein in the optic nerve and tract of the rabbit, *Brain Res.*, **13**: 617-619.
- [46] KIERMAYER O., 1968 — The distribution of microtubules in differentiating cells of *Micrasterias denticulata* Bréb. *Planta*, **83**: 233-236.
- [47] KREUTZBERG G. W., 1969 — Neuronal dynamic and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **62**: 722-728.
- [48] KWIATKOWSKA M., 1972 — Changes in the diameter of microtubules con-

- nected with the autonomus rotary motion of the lipotubuloids (elaioplasts), *Protoplasma*, **75**: 345-357.
- [49] KWIATKOWSKA M., 1974 — Mikrotubule, I. Budowa i skład chemiczny mikrotubul, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 237-253.
- [50] LANZAVECCHIA G., DONIN C. L. L., 1972 — Morphogenetic effects of microtubules, *J. Submicr. Cytol.*, **4**: 247-260.
- [51] LASEK R., 1970 — Protein transport in neurons, *Int. Rev. Neurobiol.*, **13**: 289-324.
- [52] LEDBETTER M. C., PORTER K. R., 1963 — A „microtubule” in plant cell fine structure, *J. Cell Biol.*, **19**: 239-250.
- [53] LINCK R. W., 1973 — Comparative isolation of cilia and flagella from the lamellibranch mollusc, *Aequipecten irradians*, *J. Cell Sci.*, **12**: 345-367.
- [54] LINCK R. W., 1973 — Chemical and structural differences between cilia and flagella from the Lamellibranch mollusc, *Aequipecten irradians*, *J. Cell Sci.*, **12**: 951-981.
- [55] LUYKX P., 1970 — Cellular Mechanisms of Chromosome Distribution, *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 2, Academic Press, New-York.
- [56] MacGREGOR H. C., STEBBINGS H., 1970 — A massive system of microtubules associated with cytoplasmic movement in telotrophic ovarioles, *J. Cell Sci.*, **6**: 431-449.
- [57] MARGULIS L., 1973 — Colchicine-sensitive microtubules, *Int. Rev. Cytol.*, **34**: 333-361.
- [58] MARX-FIGINI M., SCHULZ G. V., 1966 — Über die Kinetik und den Mechanismus der Biosynthese der Cellulose in den Höhern Pflanzen (Nach versuchen an den samenhaaren der Baumwolle), *Biochim. Biophys. Acta*, **112**: 81-101.
- [59] McGUIRE J., MOELLMANN G., 1972 — Cytochalasin B: Effects on microfilaments and movement of melanin granules within melanocytes, *Science* **175**: 642-644.
- [60] McGUIRE J., MOELLMANN G., McKEON F., 1972 — Cytochalasin B and pigment granule translocation. Cytochalasin B reverses and prevents pigment granule dispersion caused by dibutyryl cyclic AMP and theophylline in *Rana pipens* melanocytes., *J. Cell Biol.* **52**: 754-758.
- [61] McINTOSH J. R., 1973 — The axostyle of *Saccinobacillus*. II. Motion of the microtubule bundle and a structural comparison of straight and bent axostyles, *J. Cell Biol.*, **56**: 324-339.
- [62] McINTOSH J. R., OGATA E. S., LANDIS S. C., 1973 — The axostyle of *Saccinobacillus*. I. Structure of the organism and its microtubule bundle, *J. Cell Biol.* **56**: 304-323.
- [63] McINTOSH J. R., HEPLER P. H., VAN WIE D. G., 1969 — Model for mitosis, *Nature*, **224**: 659-663.
- [64] McINTOSH J. R., PORTER K. R., 1967 — Microtubules in the spermatids of the domestic fowl., *J. Cell Biol.* **35**: 153-173.
- [65] MOOR H., 1967 — Der Feinbau der Mikrotubuli in Hefe nach Gefrierätzung, *Protoplasma*, **64**: 89-103.
- [66] MOOSEKER M. S., TILNEY L. G., 1973 — Isolation and reactivation of the axostyle. Evidence for a dynein-like ATP-ase in the axostyle, *J. Cell Biol.*, **56**: 13-26.
- [67] NAGAI R., REBHUN L. I., 1966 — Cytoplasmic microfilaments in streaming *Nitella* cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **14**: 571-589.

- [68] NAGL W., 1973 — Intranuclear microtubules in trophocytes of *Dytiscus*, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**: 283-286.
- [69] NORSTRÖM A. H., HANSSON A., SJÖSTRAND J., 1971 — Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo neurohypophyseal system of the rat, *Z. Zellforsch.*, **113**: 271-293.
- [70] NEWCOMB E. H., 1969 — Plant microtubules, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**: 253-288.
- [71] NEWCOMB E. H., BONNETT H. T., 1965 — Cytoplasmic microtubule and wall microfibril orientation in root hairs of radish, *J. Cell Biol.*, **27**: 575-589.
- [72] O'BRIEN T. P., THIMANN K. V., 1966 — Intracellular fibres in oat coleoptile cells and their possible significance in cytoplasmic streaming, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**: 888-894.
- [73] OCHS S., 1972 — Fast transport of materials in mammalian nerve fibers, *Science*, **176**: 252-260.
- [74] ÖSTERGREN G., BAJER A., 1960 — La mitose dans les cellules traitées par le méthanol, *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.*, **88**: 199-207.
- [75] PEHLEMAN F. W., 1968 — Die amitotische Zellteilung. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung an Interrenalzellen von *Rana temporaria* L., *Z. Zellforsch.*, **84**: 516-548.
- [76] PICHICHERO M. E., AVERS C. J., 1973 — The evolution of cellular movement in eukaryotes: the role of microfilament and microtubules, *Sub.-Cell. Biochem.*, **2**: 97-105.
- [77] PICKETT-HEAPS J. D., 1966 — Incorporation of radioactivity into wheat xylem walls, *Planta*, **71**: 1-14.
- [78] PICKETT-HEAPS J. D., 1967 — The effect of colchicine on microtubule distribution and wall differentiation in wheat xylem cells, *Develop. Biol.*, **15**: 206-236.
- [79] PICKETT-HEAPS J. D., 1968 — Ultrastructure and differentiation in *Chara* (fibrosa). IV. Spermatogenesis, *Austr. J. Biol. Sci.*, **21**: 655-690.
- [80] PICKETT-HEAPS J. D., 1969 — Preprophase microtubules and stomatal differentiation; some effects of centrifugation of symmetrical cell division, *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 24-44.
- [81] PICKETT-HEAPS J. D., NORTHCOTE D. H., 1966 — Relationship of cellular organelles to the formation and development of the plant cell wall, *J. Exp. Bot.*, **17**: 20-26.
- [82] PICKETT-HEAPS J. D., NORTHCOTE D. H., 1966 — Cell division in the formation of the stomatal complex of the young leaves of wheat, *J. Cell Sci.*, **1**: 121-128.
- [83] PICKETT-HEAPS J. D., FOWKE L. C., 1970 — Mitosis, cytokinesis, and cell elongation in the desmid, *Closterium littorale*, *J. Phycology*, **6**: 189-215.
- [84] PITAGORSKY H., WEBSTER F., WOLLBERG M., 1972 — Cell elongation in cultured embryonic lens epithelium with and without protein synthesis, Involvement of microtubules, *J. Cell Biol.*, **55**: 582-592.
- [85] POLLARD T. D., KORN E. I., 1971 — Filaments of *Amoeba proteus*. II. Binding of heavy meromyosin by thin filaments in motile cytoplasmic extracts, *J. Cell Biol.*, **48**: 216-218.
- [86] ROBARDS W. A., KIDWAI P., 1972 — Microtubules and microfibrils in xylem fibres during secondary cell wall formation, *Cytobiol.* **6**: 1-21.
- [87] SABNIS D. D., JACOBS W. P., 1967 — Cytoplasmic streaming and micro-

- tubules in the coenocytic marine alga *Caulerpa prolifera*, *J. Cell Sci.* **2**: 465-472.
- [88] SANGER J. M., JACKSON W. T., 1971 — Fine structure study of pollen development in *Haemanthus katherinae* Baker. II. Microtubules and elongation of the generative cells, *J. Cell Sci.*, **8**: 303-315.
- [89] SATIR P., 1965 — Structure and function in cilia and flagella, *Protoplasmatologia*, Bd 3 E, Sringer-Verlag, Wien, New York.
- [90] SATIR P., 1968 — Studies on cilia III. *J. Cell Biol.*, **39**: 77-94.
- [91] SATIR P., 1972 — The sliding microtubule hypothesis of ciliary motion, *Acta Protozoologica*, **11**: 279-286 (przedst. na Sympozjum „Motile Systems of Cells”, Kraków, 1971).
- [92] SCHMITT F. O., 1969 — Fibrous proteins and neuronal dynamics, [w] *Cellular Dynamics of the Neuron*, Symp. Intern. Soc. Cell Biol. **8**: 95-111.
- [93] SCHNEPF E., 1973 — Mikrotubules-Anordnung und Umordnung Wandbildung und Zellmorphogenese in jungen Sphagnum-Blättern, *Protoplasma*, **78**: 145-173.
- [94] SLAUTTERBACK D. B., 1963 — Cytoplasmic microtubules. I. Hydra, *J. Cell Biol.*, **18**: 367-388.
- [95] SPOONER B. S., YAMADA K. M., WESSELLS N. K., 1971 — Microfilaments and cell locomotion, *J. Cell Biol.*, **46**: 595-613.
- [96] SRIVASTAVA L. M., O'BRIEN, T. P., 1966 — On the ultrastructure of cambium and its derivatives I. Cambium of *Pinus strobus* L., *Protoplasma*, **61**: 257-276.
- [97] STEBBINGS H., RATCLIFFE N. A., 1973 — Maintenance of insect ovarian microtubular structure and function in vitro, *Nature, New Biol.* **242**: 253-254.
- [98] STEBBINGS H., WILLISON J. H. M., 1973 — Structure of Microtubules: A study of freeze-etched and negatively stained microtubules from the ovaries *Notonecta*, *Z. Zellforsch.*, **138**: 387-396.
- [99] SUMMERS K. E., GIBBONS I. R., 1971 — Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm, *Pro. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 3092-3096.
- [100] TAMURA S., TSURUHARA T., WATANABE Y., 1969 — Function of nuclear microtubules in macronuclear division of *Tetrahymena pyriformis*, *Exp. Cell Res.*, **55**: 351-358.
- [101] TILNEY L. G., GIBBINS J. R., 1969 — Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in *Arbacia punctulata*. II An experimental analysis of their role in development and maintenance of cell shape, *J. Cell Biol.*, **41**: 227-250.
- [102] TILNEY L. G., PORTER K. R., 1967 — Studies on the microtubules in *Heliozoa*. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia, *J. Cell Biol.*, **34**: 327-343.
- [103] TURNER F. R., 1968 — An ultrastructural study of plant spermatogenesis: Spermatogenesis in *Nitella*, *J. Cell Biol.*, **37**: 370-394.
- [104] TURNER F. R., 1971 — The effects of colchicine on spermatogenesis in *Nitella*, *J. Cell Biol.* **46**: 220-234.
- [105] WAGNER R. C., ROSENBERG M. D., 1973 — Endocytosis in chang liver cells: the role of microtubules in vacuole orientation and movement, *Cytobiologie*, **7**: 20-27.
- [106] WEISS P. A., MAYR R., 1971 — Neuronal organelles in neuroplasmic (axonal) flow. II. Neurotubules, *Acta neuropath.*, Suppl. **5**: 198-206.

- [107] WESSELLS N. K., SPOONER B. S., BRADLEY M. O., LUDUENA M. A., TAYLOR E. L., WRENN J. T., YAMADA K. M., 1971 — Microfilaments in cellular and developmental processes, *Science*, **171**: 135-143.
- [108] WHITE J. G., 1969 — Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. III. Influence on primary internal contraction and secondary aggregation, *Amer. J. Pathol.* **54**: 467-478.
- [109] WIŚNIEWSKI H., SHELANSKI M. L., TERRY R. D., 1968 — Effects of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments in anterior horn cells, *J. Cell Biol.*, **38**: 224-229.
- [110] WIŚNIEWSKI H., TERRY R. D., SHELANSKI M. L., 1969 — Neurofibrillary degeneration of nerve cells after subarachnoid injection of mitotic spindle inhibitors, *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **28**: 168-169.
- [111] WIKSWO M. A., NOVALES R. R., 1972 — Effect of colchicine on microtubules in the melanophores of *Fundulus heteroclitus*, *J. Ultrastruct. Res.*, **41**: 189-201.
- [112] WITKUS E. R., GRILLO R. S., SMITH W. J., 1969 — Microtubule bundles in the hindgut epithelium of the woodlouse *Oniscus asellus*, *J. Ultrastruct. Res.*, **29**: 182-190.
- [113] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., 1964 — Cell structures and their significance for ameboid movement, *Intern Rev. Cyt.* **16**: 61-131.
- [114] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., STOCKEM W., 1972 — Comparative studies on actomyosin-thread models of muscles and of myxomycete plasmodia. Their significance in the contractile mechanism of primitive motile systems, *Acta Protozool.*, **11**: 39-51.
- [115] WOODING F. B. P., NORTHCOTE D. H., 1964 — The development of the secondary wall of the xylem in *Acer pseudoplatanus*, *J. Cell Biol.*, **23**: 237-337.
- [116] YAMADA K. M., SPOONER B. S., WESSELLS N. K., 1971 — Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells, *J. Cell Biol.*, **49**: 614-635.

Otrzymano: styczeń, 1974.

Przyjęto: styczeń, 1974.

Adres autorki: ul. Nowopółdniowa 12/16, 90-237 Łódź.

1. Kierownik Zakładu - dr hab. inż. Józef Kowalski
2. Zastępca kierownika - inż. Jan Nowak
3. Starszy inżynier - inż. Andrzej Zieliński
4. Inżynier - inż. Piotr Wójcik
5. Starszy technik - inż. Marek Szymański
6. Technik - inż. Tomasz Kowalski
7. Technik - inż. Krzysztof Lech
8. Technik - inż. Szymon Duda
9. Technik - inż. Michał Jędrzejak
10. Technik - inż. Adam Krawiec
11. Technik - inż. Jakub Krawiec
12. Technik - inż. Marcin Krawiec
13. Technik - inż. Michał Krawiec
14. Technik - inż. Piotr Krawiec
15. Technik - inż. Szymon Krawiec
16. Technik - inż. Tomasz Krawiec
17. Technik - inż. Jakub Krawiec
18. Technik - inż. Marcin Krawiec
19. Technik - inż. Michał Krawiec
20. Technik - inż. Piotr Krawiec
21. Technik - inż. Szymon Krawiec
22. Technik - inż. Tomasz Krawiec
23. Technik - inż. Jakub Krawiec
24. Technik - inż. Marcin Krawiec
25. Technik - inż. Michał Krawiec
26. Technik - inż. Piotr Krawiec
27. Technik - inż. Szymon Krawiec
28. Technik - inż. Tomasz Krawiec
29. Technik - inż. Jakub Krawiec
30. Technik - inż. Marcin Krawiec
31. Technik - inż. Michał Krawiec
32. Technik - inż. Piotr Krawiec
33. Technik - inż. Szymon Krawiec
34. Technik - inż. Tomasz Krawiec
35. Technik - inż. Jakub Krawiec
36. Technik - inż. Marcin Krawiec
37. Technik - inż. Michał Krawiec
38. Technik - inż. Piotr Krawiec
39. Technik - inż. Szymon Krawiec
40. Technik - inż. Tomasz Krawiec
41. Technik - inż. Jakub Krawiec
42. Technik - inż. Marcin Krawiec
43. Technik - inż. Michał Krawiec
44. Technik - inż. Piotr Krawiec
45. Technik - inż. Szymon Krawiec
46. Technik - inż. Tomasz Krawiec
47. Technik - inż. Jakub Krawiec
48. Technik - inż. Marcin Krawiec
49. Technik - inż. Michał Krawiec
50. Technik - inż. Piotr Krawiec
51. Technik - inż. Szymon Krawiec
52. Technik - inż. Tomasz Krawiec
53. Technik - inż. Jakub Krawiec
54. Technik - inż. Marcin Krawiec
55. Technik - inż. Michał Krawiec
56. Technik - inż. Piotr Krawiec
57. Technik - inż. Szymon Krawiec
58. Technik - inż. Tomasz Krawiec
59. Technik - inż. Jakub Krawiec
60. Technik - inż. Marcin Krawiec
61. Technik - inż. Michał Krawiec
62. Technik - inż. Piotr Krawiec
63. Technik - inż. Szymon Krawiec
64. Technik - inż. Tomasz Krawiec
65. Technik - inż. Jakub Krawiec
66. Technik - inż. Marcin Krawiec
67. Technik - inż. Michał Krawiec
68. Technik - inż. Piotr Krawiec
69. Technik - inż. Szymon Krawiec
70. Technik - inż. Tomasz Krawiec
71. Technik - inż. Jakub Krawiec
72. Technik - inż. Marcin Krawiec
73. Technik - inż. Michał Krawiec
74. Technik - inż. Piotr Krawiec
75. Technik - inż. Szymon Krawiec
76. Technik - inż. Tomasz Krawiec
77. Technik - inż. Jakub Krawiec
78. Technik - inż. Marcin Krawiec
79. Technik - inż. Michał Krawiec
80. Technik - inż. Piotr Krawiec
81. Technik - inż. Szymon Krawiec
82. Technik - inż. Tomasz Krawiec
83. Technik - inż. Jakub Krawiec
84. Technik - inż. Marcin Krawiec
85. Technik - inż. Michał Krawiec
86. Technik - inż. Piotr Krawiec
87. Technik - inż. Szymon Krawiec
88. Technik - inż. Tomasz Krawiec
89. Technik - inż. Jakub Krawiec
90. Technik - inż. Marcin Krawiec
91. Technik - inż. Michał Krawiec
92. Technik - inż. Piotr Krawiec
93. Technik - inż. Szymon Krawiec
94. Technik - inż. Tomasz Krawiec
95. Technik - inż. Jakub Krawiec
96. Technik - inż. Marcin Krawiec
97. Technik - inż. Michał Krawiec
98. Technik - inż. Piotr Krawiec
99. Technik - inż. Szymon Krawiec
100. Technik - inż. Tomasz Krawiec

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron. Maszynopis powinien być jednostronny, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz numeracją stron. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie, ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony). Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, rys. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner, R., 1972 — Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 41-48.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., 1971 — Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press, London. New York, 60-64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać objaśnienia lub uwagę „objaśnienia w tekście”. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów nie wpływających na treść pracy.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są wg ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 odbitek artykułu bezpłatnie.

Zamówienie na egzemplarze POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI przyjmuje ORWN PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki.

ERRATA

Str. Wiersz	Jest	Powinno być
107 ¹	74	7.4
126 ³	równoległej	równoległe
159 ¹	rezerw drogą	rezerw kwasów tłuszczowych drogą
między 170 a 171, podpis pod Rys. 10	<i>soulangenana</i>	<i>soulangeana</i>
188 ⁴	f-Met-tRNA,	f-Met-tRNA _F
223 ¹⁸	wakuoli retikulum	wakuoli i retikulum
227 ³	nasilenia	nasienia

Postępy Biologii Komórki, t. 1, nr 2, 1974

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Instytucje państwowe, społeczne, zakłady pracy, szkoły itp., mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Prenumeratory indywidualni mogą opłacać w urzędach pocztowych i u listonoszy lub dokonywać wpłat na konto NBP I OM Nr 1641-6-1025, RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 4% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, ul. Wronia 23, 00-840 W-wa, konto PKO Nr 1-6-100024.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Egzemplarze zdezaktualizowane można również nabyć w RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław, konto NBP I OM Nr 1641-6-1025.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 7 Krakowskie Przedmieście, 00-068 Warszawa, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S.A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

Indeks 38703

SPIS TREŚCI

J. W. MICHEJDA, Mitochondrialny DNA i zakres jego działania	99
J. ZURZYCKI, Peroksysomy, ich struktura i funkcje metaboliczne	143
B. GABARA, Struktury Gołgiego w świecie roślin	163
A. KOJ, Cykl rybosomowy w komórkach bakterii, roślin i zwierząt	177
K. STRZAŁKA i S. WIĘCKOWSKI, Autonomia genetyczna chloroplastów w świetle badań biochemicznych	193
I. PALCZEWSKA, Struktura i funkcje lizosomów (sferosomów) w komór- kach roślinnych	221
M. KWIATKOWSKA, Mikrotubule. I. Budowa i skład chemiczny mikrotubul	237
M. KWIATKOWSKA, Mikrotubule. II. Funkcje mikrotubul	255