

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 1 · NR 1**

1974 (1-98)

# Postępy Biologii Komórki

PWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik

Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydany z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, 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 294 + 136 egz. Ark. wyd. 7,5. Ark. druk.  $6\frac{1}{8}$  + 4 wkł. Papier druk. sat. IV kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 5 XII 1973. Podpisano do druku w kwietniu. Druk ukończono w kwietniu 1974. Zam. 1410/73 — P-8. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław ul. Lelewela 4

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
Warszawa 40, ul. Freta 16

## ULTRASTRUKTURA CHROMATYNY I CHROMOSOMÓW

Maria J. OLSZEWSKA

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

*Streszczenie.* Wyniki badań biochemicznych, biofizycznych i ultrastrukturalnych chromatyny wskazują, że podstawową jej jednostką strukturalną jest fibryla o średnicy około 100 Å, zwana fibryłą elementarną chromatyny. Osiową część fibryli chromatynowej stanowi jedna, wtórnie spiralnie zwinięta cząsteczka DNA połączona z histonami bogatymi w argininę (nić dezoksynukleohistonowa — DNH). Histony bogate w lizynę stanowią wiązania poprzeczne między niektórymi miejscami tej samej cząsteczki DNA, bądź łączące odrębne cząsteczki DNA. Dzięki wtórnej spiralizacji cząsteczki DNA, fibryla chromatynowa jest o 40% krótsza, niż wchodząca w jej skład cząsteczka DNA. Aktywna genetycznie chromatyna (chromatyna luźna, euchromatyna) występuje w jądrze interfazowym w postaci luźno ułożonych fibryli. Chromatyna nieaktywna genetycznie (chromatyna zwarta, heterochromatyna) skupiona jest w zwarte kompleksy, przy czym wchodzące w ich skład fibryle są szersze, niż w chromatynie luźnej. Formowanie chromosomu mitotycznego polega na stopniowej kondensacji fibryli chromatynowej zachodzącej przez spiralizację poszczególnych jej odcinków. Procesowi temu towarzyszą zmiany chemiczne chromatyny, polegające na zwiększeniu zawartości kwasorozpuszczalnego białka niehistonowego i utlenianiu białkowych grup —SH chromatyny do S—S.

Chromatyna jest interfazową formą chromosomów mitotycznych bądź mejotycznych. Z niej, drogą spiralizacji i kondensacji, powstają chromosomy w profazie; z kolei w telofazie, przez proces odwrotny, tj. despiralizację, chromosomy podziałowe przekształcają się w struktury chromatynowe jądra interfazowego. Odcinki chromosomów podziałowych, które nie ulegają despiralizacji podczas telofazy, widoczne są w jądrze interfazowym w postaci grudek chromatynowych, zwanych heterochromatyną. Ilość i rozmiary odcinków heterochromatynowych są charakterystyczne dla gatunku i stanu funkcjonalnego jądra. Heterochromatyna jest ostatnio nazywana chromatyną zwartą; w nazwie tej mieści się przeciwstawienie chromatynie, która powstaje w wyniku całkowitej despiralizacji chro-

chromosomów podczas telofazy, zwanej euchromatyną czyli chromatyną luźną.

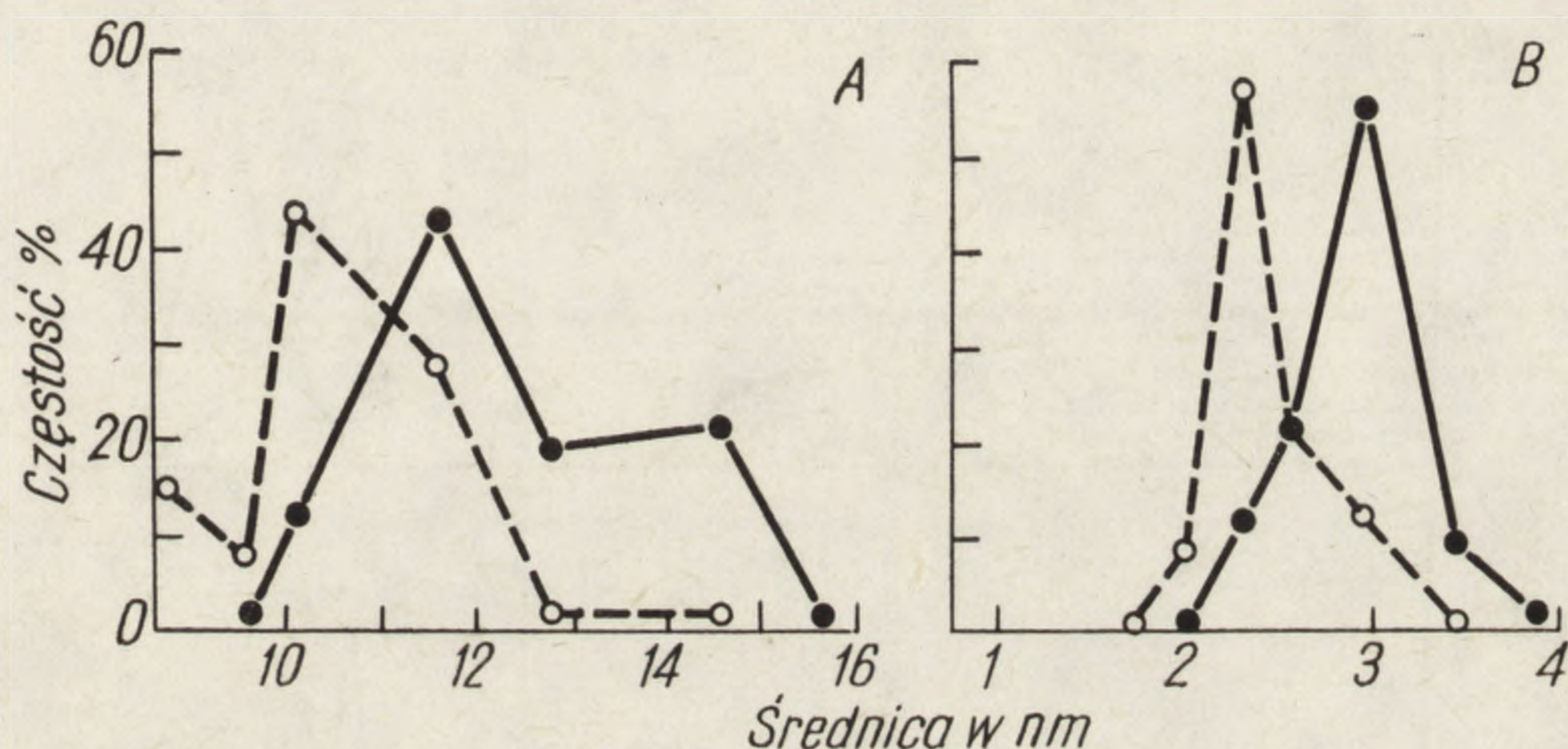
Długość chromosomów podziałowych, która u Eukariota waha się w znacznych granicach — od 0,5 do kilkudziesięciu mikronów — zdeterminowana jest przez długość cząsteczki DNA wchodzącej w skład każdego chromosomu. Długość tę można ocenić m.in. w autoradiogramach po oznakowaniu DNA  $^3\text{H}$ -tymidyną. Jeżeli tymidyna radioaktywna była dostępna przez cały okres syntezy DNA, wówczas długość wyekstrahowanych pasm radioaktywnego DNA odpowiada długości poszczególnych cząsteczek DNA danego genomu (jest to metoda Cairnsa wprowadzona dla pomiarów długości chromosomu u bakterii). U chomika chińskiego cząsteczki DNA mierzone tą metodą mają długość 100–1900  $\mu$  [3], podczas gdy długość chromosomów metafazowych wynosi 6–20  $\mu$ . Powstaje więc pytanie, w jaki sposób tak długa cząsteczka jest upakowana w około 100 razy krótszym chromosomie metafazowym.

U Eukariota chromatyna — poza DNA — zawiera dwa rodzaje białek: histonowe, w których dominują aminokwasy zasadowe oraz białka nie-histonowe, o charakterze kwaśnym, zawierające duże ilości aminokwasów dwukarboksylowych oraz tryptofan. Ponadto w chromatynie znajduje się RNA, którego ilość zależy od aktywności metabolicznej jąder. W odniesieniu do DNA, zawartość histonów w chromatynie jest bliska 1, natomiast zawartość białek niehistonowych waha się od 0,63 (wątroba szczura) do 1,00 (rak wysiękowy szczura). Zawartość RNA u podanych obiektów wynosi odpowiednio 0,043 i 0,13 [15]. Wśród białek histonowych wyróżnia się dwie ich główne frakcje: bogate w lizynę i bogate w argininę.

Towarzyszące DNA składniki chemiczne, a przede wszystkim białka histonowe, są z nim połączone w sposób trwały, wskutek czego podstawową strukturą chromatyny jest nić DNH, której oś stanowi DNA. Jak wspomniano, ilość histonów jest proporcjonalna do zawartości DNA u danego gatunku, a replikacji DNA zachodzącej w fazie S okresu intermitotycznego, towarzyszy synteza tych białek [19, 28].

W modelu budowy nici DNH zaproponowanym przez Fredericq'a [15], zakłada się na podstawie wyników badań biochemicznych i biofizycznych, że część osiową takiej nici stanowi cząsteczka DNA. Bezpośrednio z nią — przez reszty fosforanowe nukleotydów — połączone są za pośrednictwem wolnych grup aminowych argininy białka histonowe bogate w argininę lub o umiarkowanej zawartości tego aminokwasu. Histon ten od strony grup zasadowych ściśle przylegałby do podwójnej spirali DNA natomiast jego niepolarne grupy wystawałyby na zewnątrz w formie łańcuchów, które mogłyby być ułożone równoległe do osi DNA. Z drugiej strony wykazano [11], że histony bogate w lizynę są raczej

związane z tymi fragmentami cząsteczki DNA, w których obecna jest adenina i tymina, podczas gdy histony bogate w argininę są połączone z odcinkami DNA zawierającymi guaninę i cytozynę. Jest prawdopodobne, że DNA nie jest połączony z histonami na całej długości cząsteczki, lecz że pewne jego odcinki są wolne. Do takiego wniosku prowadzą badania stabilności termicznej, lepkości i wyglądu w mikroskopie elektronowym zarówno tworzonych *in vitro* kompleksów DNA-histony, jak i natywnej chromatyny [39]. Istotnie, pewna nieznaczna zresztą część populacji nici DNH widoczna na mikrofotografiach elektronowych ma średnicę około 2 nm (rys. 1).



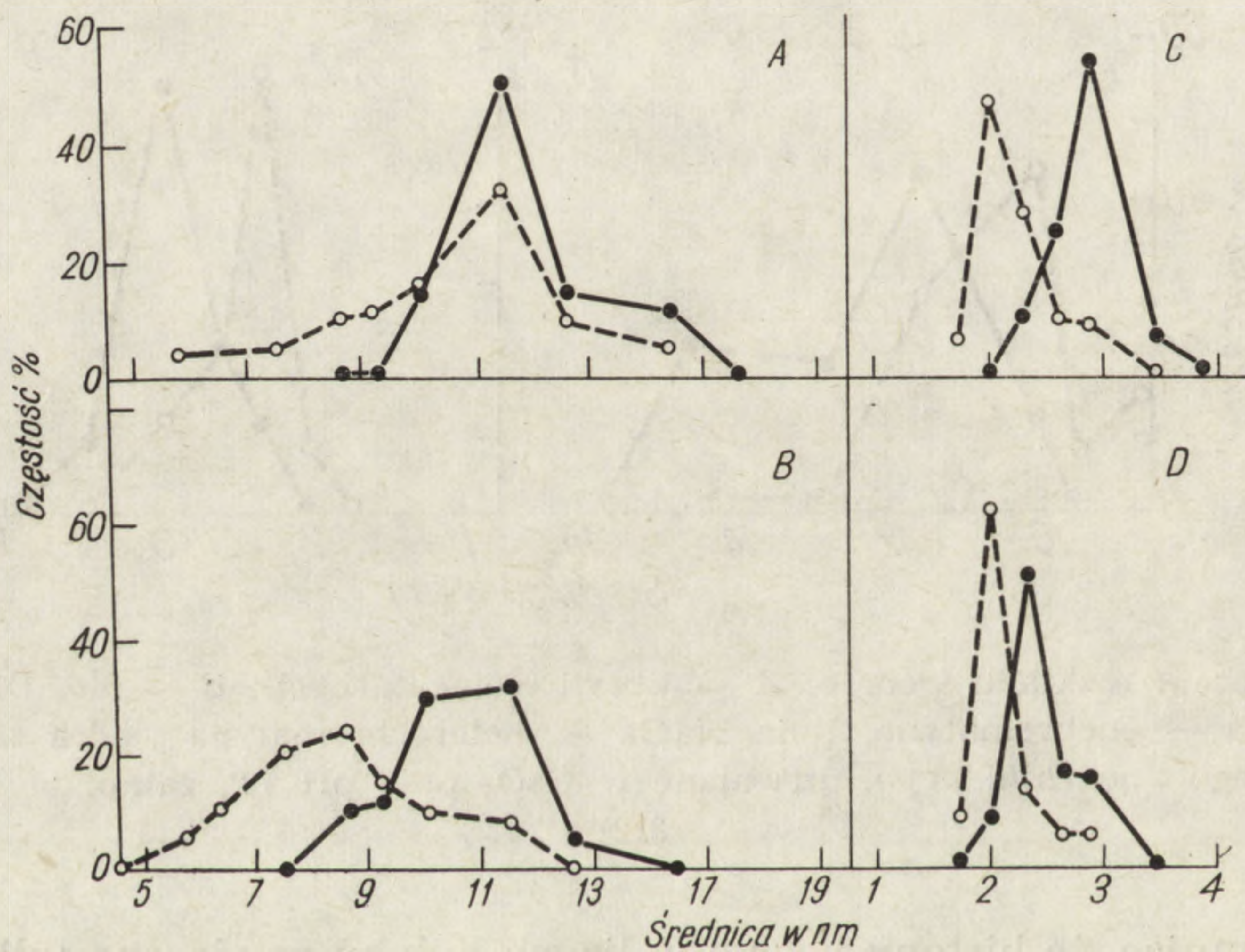
Rys. 1. Procent rozkładu średnio: A — fibryli elementarnych; B — nici DNH. Linia przerywana — euchromatyna, linia ciągła — heterochromatyna (jądra merystemu korzeniowego *Cucurbita pepo*, utrwalane w  $\text{OsO}_4$  przy pH 7,2, zatapiane w Eponie 812)

Przyjmując, że histony bogate w lizynę byłyby powiązane tylko z niektórymi grupami fosforanowymi DNA można przypuszczać, że łańcuchy tych białek stanowiłyby bądź wiązania poprzeczne między różnymi cząsteczkami DNA, bądź łączyłyby niektóre miejsca tej samej cząsteczki DNA [15]. Dzięki takiemu układowi główna oś zbudowana z DNA i histonów bogatych w argininę jest spiralnie zwinięta, tworząc z histonami bogatymi w lizynę tzw. fibryłę elementarną chromatyny (tabl. I, 4). W tworzeniu tego rodzaju poprzecznych wiązań mogłyby brać udział również białka kwaśne.

Koncepcja ta, w myśl której cząsteczka DNA jest spiralnie skrecona wewnątrz fibryli elementarnej, została potwierdzona eksperymentalnie przez pomiary kierunku i wielkości polaryzacji fluorescencji po oranżu akrydynowym u różnych obiektów [13]. Do podobnych wniosków, na podstawie badań dyfrakcji promieni X, doszli Pardon i Wilkins [35]. Zdaniem tych autorów cząsteczka DNA w połączeniu z histonami sta-

nowi nić szerokości 3 nm. Nić ta jest zwinięta w spiralę o skoku 11 nm i średnicy 10-13 nm. Jest to właśnie wspomniana uprzednio fibryla elementarna chromatyny.

Stabilizacja przestrzenna fibryli elementarnej, czyli spirali wytworzonej przez nić DNH jest zapewniona przez białka, których rodzaj i ilość wpływa na szerokość tego podstawowego elementu strukturalnego chromatyny. Usunięcie białka z chromatyny, np. za pomocą trawienia enzymatycznego proteazami, powoduje zmniejszenie średnicy fibryli elementarnych przez rozluźnienie spirali, w jaką skręcona jest nić DNH (rys. 2 i 3). W podtrzymywaniu struktury fibryli elementarnych główną rolę,



Rys. 2. Wpływ pronazy na procent rozkładu średnio: A, B — fibryli elementarnych; C, D, nici DNH. A i C — kontrola w buforze fosforanowym 6 godzin; B i D — pronaza w buforze fosforanowym, 6 godzin. Linia przerywana — euchromatyna, linia ciągła — heterochromatyna (jądra merystemu korzeniowego *Cucurbita pepo*, utrwalane w  $\text{OsO}_4$  przy pH 7, 2, zatapiane w Eponie 812)

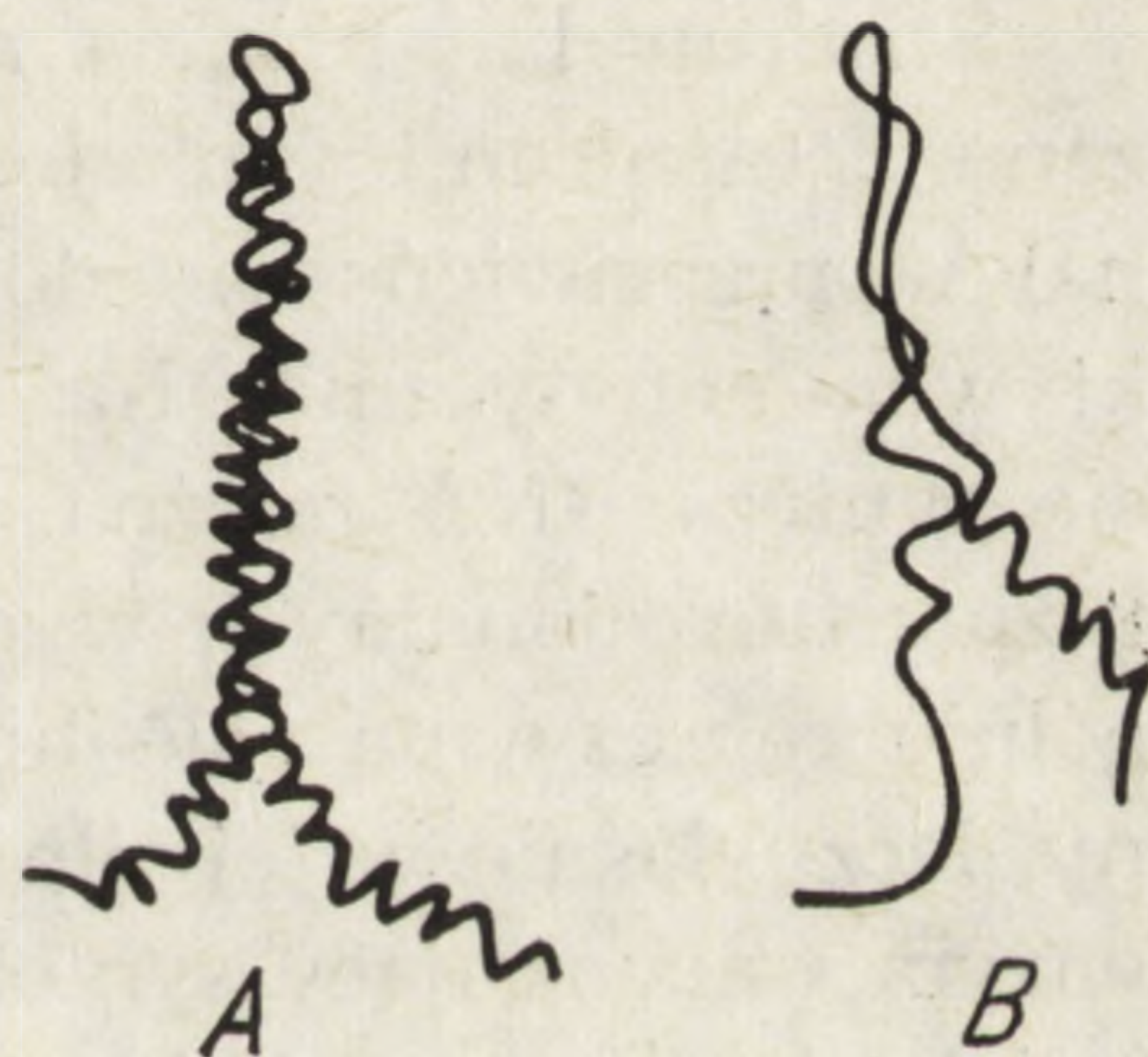
zgodnie z hipotezą Fredericq'a [15], grają białka bogate w lizynę. Specyficzna ekstrakcja tej frakcji histonów powoduje rozluźnienie sieci fibryli chromatynowych zarówno w jądrach interfazowych, jak i w chromosomach metafazowych. Po usunięciu wszystkich histonów, dodanie frakcji histonów bogatych w lizynę powoduje powrót chromatyny do normalnej struktury, natomiast takiego skutku nie wywiera dodanie frakcji histonów bogatych w argininę [26, 27].

W takim modelu, fibryla elementarna jest o 40% krótsza, niż wcho-

dzająca w jej skład cząsteczka DNA, dzięki spiralnemu zwinięciu nici DNH.

Przedstawiony model budowy nici DNH i fibryli elementarnych chromatyny jest zgodny z wynikami obserwacji utrwalonych chemicznie ultracienkich skrawków z jąder i chromosomów [31–33, 42]. Podstawowym składnikiem zarówno chromatyny, jak i chromosomów metafazowych jest nić o średnicy — w zależności od rodzaju chromatyny — 2,3–4 nm. Nić ta jest zwinięta spiralnie, dzięki czemu jej całkowita szerokość wynosi około 10 nm (rys. 1, tabl. I, 4). Po wytrawieniu pronazą, tj. po usunięciu jej składnika białkowego, średnica nici wynosi około 2 nm, a więc jest zbliżona do średnicy cząsteczki DNA (rys. 2). Ponadto pod wpływem pronazy następuje częściowe wyprostowanie normalnie spiralnie zwiniętej nici DNH, a tym samym zmniejszenie średnicy fibryli elementarnej chromatyny utworzonej przez nić DNH i otaczającą ją białka (rys. 3).

Rys. 3. Model układu nici DNH w fibrylach elementarnych chromatyny zwartej i luźnej. A — dwie niezależne spirale tej samej nici DNH są w chromatynie zwartej połączone razem (górną część modelu), chromatyna luźna składa się z fibryli elementarnych zawierających pojedynczą nić DNH (dolną część modelu); B — pod wpływem enzymów proteolitycznych następuje rozsuniecie 2 spirali nici DNH tworzących fibrylę elementarną w chromatynie zwartej, ponadto następuje zmniejszenie średnicy fibryli elementarnych przez rozluźnienie spirali nici DNH



Stwierdzana w mikroskopie elektronowym szerokość fibryli elementarnej zależy przede wszystkim od sposobu przygotowania materiału, a także od rodzaju chromatyny. W materiale utrwalonym chemicznie, w ultracienkich skrawkach, szerokość fibryli elementarnej chromatyny luźnej wynosi 10–11,5 nm (rys. 1 B). Przez większość autorów jest ona oceniana na około 10 nm [17, 20, 38], chociaż niekiedy obserwowane szersze fibryle chromatynowe — o średnicy 16–17 nm. Zwiększenie szerokości fibryli chromatynowych wydaje się być związane ze stanem funkcjonalnym chromatyny, bowiem następuje ono głównie w zwartej chromatynie, nieaktywnej genetycznie (rys. 1 A) — w spermatozoidach [44], w heterochromatynie [10, 31–33]. Interpretację tego faktu można przeprowadzić na podstawie analizy ultrastruktury chromatyny u dyni (*Cucurbita pepo*). W jądrach tej rośliny łatwo można odróżnić chromatynę zwartą — heterochromatynę i chromatynę luźną — euchromatynę (tabl. I 1 i 2). Fibryle elementarne heterochromatyny zbudowane są

z dwóch równolegle ułożonych i niezależnie od siebie skręconych nici DNH, połączonych w jedną fibryłę za pośrednictwem białek (tabl. I 3). Pod wpływem enzymów proteolitycznych, fibryła elementarna heterochromatyny ulega rozdzieleniu na dwie fibryle, z których każda zawiera jedną nić DNH, przy czym w wielu wypadkach można stwierdzić, że dwunitkowa fibryła powstaje wskutek lokalnego połączenia tej samej nici DNH (rys. 3), [33].

Fibryle elementarne nie utrwalone, wyciśnięte na powierzchnię wody, następnie wysuszone i odpowiednio skonstrastowane, wykazują średnicę około 25 nm. Zdaniem Risa [38] bufor weronalowy, a szczególnie fosforanowy, zawarte w utrwalaczach stosowanych w mikroskopii elektronowej, działają jako czynniki chelatujące. Usunięcie jonów Mg względnie Ca powoduje rozłączenie dwóch równolegle ułożonych fibryli, z których każda ma średnicę 10 nm. Odwracalny efekt rozszczepienia fibryli 20 nm na dwie fibryle o średnicy 7,5 nm uzyskano [5] przenosząc chromatynę izolowaną z jąder erytrocytów kurczęcia z wody do roztworów soli.

Strukturalne różnice między eu- a heterochromatyną są ściśle związane z różnicami funkcjonalnymi. Chromatyna zwarta (heterochromatyna) w przeciwieństwie do chromatyny luźnej (euchromatyny) jest nieaktywna genetycznie. Na obszarach heterochromatynowych nie odbywa się synteza RNA zależna od DNA [16, 25]. Bezpośrednia przyczyna tych różnic funkcjonalnych wydaje się być spowodowana nie tyle przez szczególnie represywną rolę histonów wchodzących w skład heterochromatyny, lecz właśnie w jej silnie skondensowanej strukturze. Polimeraza RNA, enzym warunkujący syntezę mRNA, przyłącza się z jednakową intensywnością do sztucznych kompleksów DNA-histony, jak i do wolnego DNA. Penetracja enzymu do DNA jest zahamowana w wypadku znacznego zagęszczenia i skręcenia nici DNH i w tej sytuacji następuje zahamowanie syntezy mRNA. Jest więc możliwe, że *in vivo* histony tworzące dodatkowe połączenia między nićmi DNH sprawiają, że polimeraza nie ma dostępu do DNA [11].

Zróznicowanie na eu- i heterochromatynę, występujące wzdłuż tego samego chromosomu, może być związane z obecnością w poszczególnych rodzajach chromatyny odmiennych rodzajów DNA. W ostatnich latach wykryto DNA o często powtarzających się sekwencjach nukleotydów [6, 7]. Część tego DNA jest aktywna genetycznie i wybiórczo koduje rybosomowy RNA (rRNA), wobec czego należy się spodziewać obecności tego rodzaju DNA w chromosomach jąderkotwórczych. Część DNA o najwyższej częstotliwości powtarzających się sekwencji nukleotydów, zwany satelitarnym DNA, jest nieaktywny genetycznie, tzn. zawarta w nim informacja genetyczna nie ulega transkrypcji. Satelitarny DNA może



stanowiąc znaczną część genomu, np. myszy — 10% [41]. W świetle danych o nieaktywności genetycznej chromatyny interesujący wydaje się fakt, że satelitarny DNA był znaleziony u kilku gatunków zwierząt właśnie w tej kategorii chromatyny [1, 18, 23]. U śluzowca *Physarum polycephalum* obecność satelitarnego DNA, stanowiącego około 2% genomu i identyfikowanego na podstawie zdolności hybrydyzacji z rRNA, jest raczej przypisywana chromatynie jąderkotwórczej [43] (autorzy, być może, mało precyzyjnie używają terminu „satelitarny DNA”). O ograniczonym znaczeniu genetycznym heterochromatyny świadczy również fakt, że w chromosomach politenicznych przechodzi ona mniej cykli replikacyjnych, niż euchromatyna. Mimo ciągłości cząsteczki DNA wzdłuż takiego chromosomu, DNA w puffach może replikować się niezależnie od reszty genomu [3]. Być może, heterochromatyna, która u *Drosophila* zawiera satelitarny, nieaktywny genetycznie DNA, przedziela geny zawarte w częściach euchromatynowych [23].

Z danych tych wynika, że brak aktywności genetycznej w heterochromatynie może z jednej strony zdeteminowany przez rodzaj DNA (satelitarny, nie transkrybowany), jest więc właściwością stałą heterochromatyny, niezależną od stopnia jej kondensacji, z drugiej strony — brak aktywności genetycznej heterochromatyny bywa okresowy, ponieważ przez przemiany strukturalne chromatyna zwarta może przekształcić się w luźną — i odwrotnie.

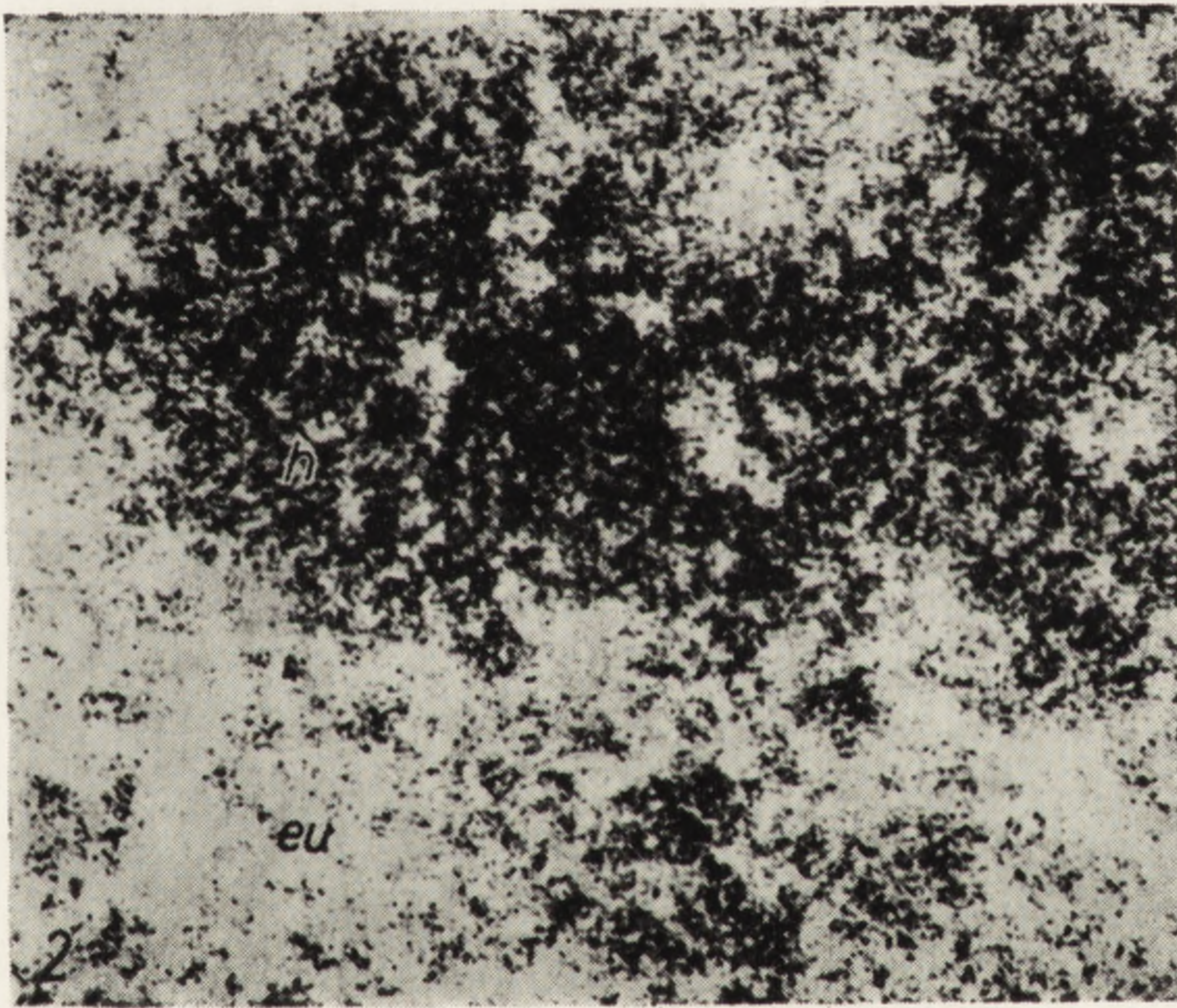
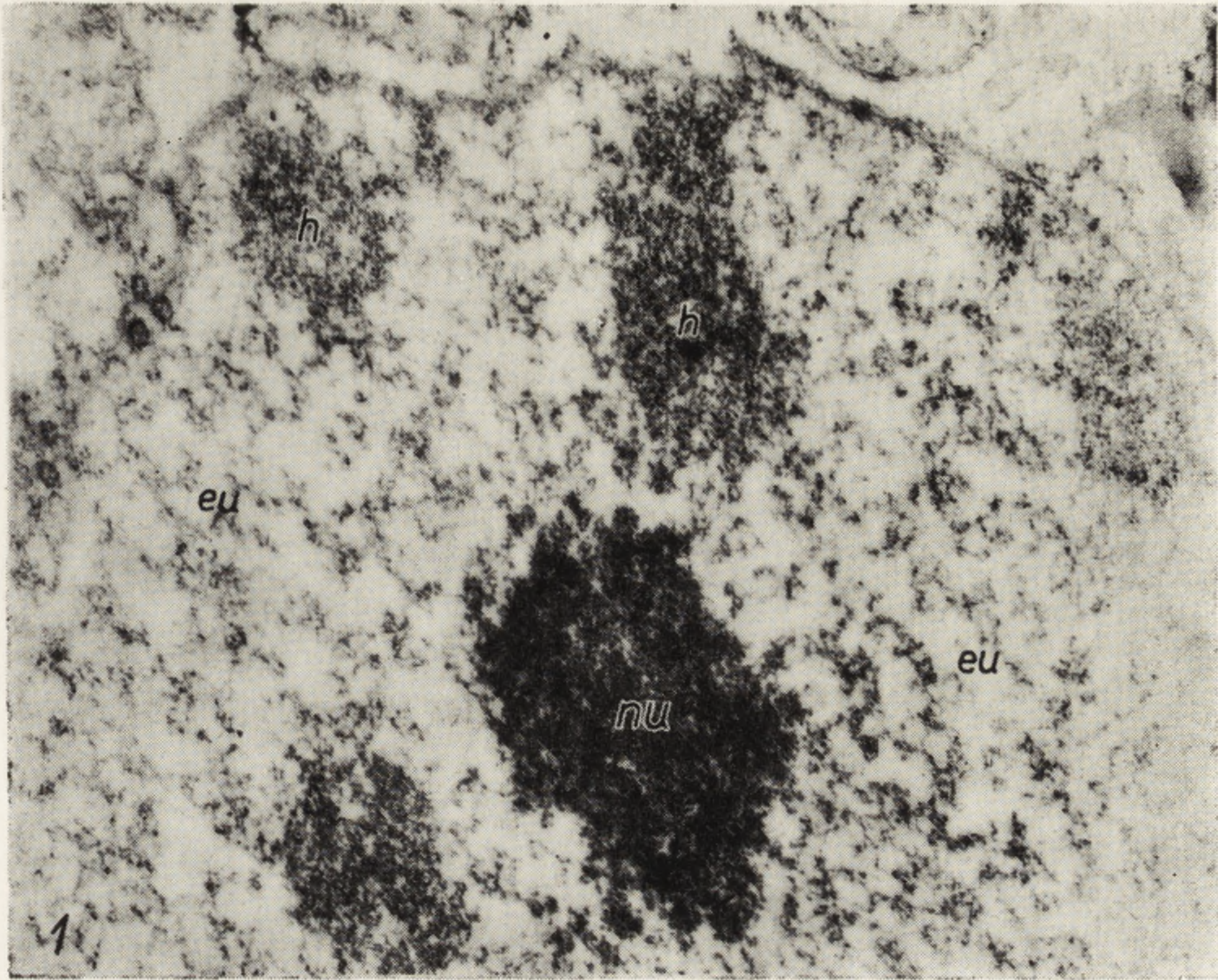
Układ fibryli chromatynowych wewnątrz jądra wydaje się być ustalony przez połączenie ich z błoną jądrową. Połączenie to przypomina anologiczny układ u bakterii, u których chromosom jest przyłączony do błony komórkowej w miejscu, gdzie tworzy ono wpuklenie zwane mezosomem. Od tego właśnie miejsca u bakterii zaczyna się replikacja DNA. Wydaje się, że podobna prawidłowość może występować u Eukariota, a mianowicie replikacja DNA rozpoczyna się w tych odcinkach DNA, które przylegają do błony jądrowej [29]. Według koncepcji Hearsta i Botchana [17] fibryla elementarna chromatyny, zawierająca pojedynczą cząsteczkę DNA, jest przyczepiona do błony jądrowej w miejscach oddalonych od siebie o 7-60  $\mu$ . Synteza DNA jest inicjowana w tych właśnie miejscach i postępuje w obu kierunkach, przesuując się ku oddalonym od błony jądrowej odcinkom macierzystej cząsteczki DNA. Zakończenie replikacji następuje w najbardziej oddalonych od błony jądrowej odcinkach fibryli elementarnej chromatyny, w których spotykają się dwie fale replikacji, nadchodzące z przeciwnych kierunków. Alternatywny wariant hipotezy tych samych autorów przewiduje, że inicjacja syntezy DNA ma miejsce w co drugim punkcie przyczepienia fibryli elementarnej chromatyny do błony jądrowej; co drugi punkt natomiast stanowi miejsce, w którym zbiegają się dwie fale replikacji nad-

chodzące z przeciwnych kierunków. Hipoteza ta, w obu wariantach, w pewnym stopniu zaspokaja postulat Taylora [40] dotyczący podziału cząsteczki DNA na niezależnie replikujące się odcinki.

Kontakt fibryli elementarnych chromatyny z błoną jądrową istnieje również w okresie, kiedy synteza DNA nie zachodzi. W wielu przypadkach można wykazać, że miejscem przyłączenia fibryli chromatynowych są okolice pory błony jądrowej [9, 12], (tabl. III 2, strzałki). Układ ten jest ważny dla kontroli stosunków przestrzennych między fibrylami chromatynowymi, zapewniającej ich kondensację podczas formowania się chromosomów podziałowych. Wielokrotne połączenie poszczególnych fibryli chromatynowych z błoną jądrową podczas interfazy determinuje pozycję i zabezpiecza odpowiednią spiralizację (kondensację) fibryli chromatynowych podczas przekształcania ich w chromosomy podziałowe zarówno przed mitozą, jak i przed mejozą [14].

Przekształcenie formy interfazowej chromosomów, tj. despiralizowanej fibryli elementarnej w chromosomy podziałowe wiąże się z kondensacją fibryli, zachodzącą przez tworzenie zwojów kolejnych rzędów. Wskutek tego ultrastruktura chromosomu metafazowego przypomina ultrastrukturę chromatyny zwartej jądra interfazowego (tabl. II). Przemianom strukturalnym zachodzącym podczas formowania chromosomów podziałowych towarzyszą zmiany chemiczne chromatyny. Wniosek taki nasuwa się z badań porównawczych składu chemicznego chromatyny interfazowej i chromosomów metafazowych komórek HeLa [17]. Stosunek histonów do DNA w chromosomach metafazowych jest taki sam, jak w chromatynie (0,82). W chromosomach metafazowych następuje natomiast znaczne zwiększenie zawartości kwasorozpuszczalnego białka nie-histonowego. Ponadto w chromosomach metafazowych białkowe grupy —SH chromatyny są utlenione do grup S—S, co sugeruje, że wiązania S—S odgrywają rolę przy kondensacji fibryli chromatynowych w chromosomy podziałowe. Następne różnice chemiczne między chromatyną a chromosomami dotyczą RNA, którego chromosomy zawierają około 3 razy więcej. Znaczna ilość tego RNA wykazuje własności rRNA [17]. Stwierdzenie tego sugeruje zanieczyszczenie frakcji izolowanych chromosomów przez rybosomy, obficie występujące na terenie wrzeciona podziałowego lub przez rybosomy pochodzące z dezintegrującego się pod koniec profazy jąderka. Wobec tego rodzaju wątpliwości, sprawę ilości RNA w chromosomach podziałowych należy uważać za otwartą.

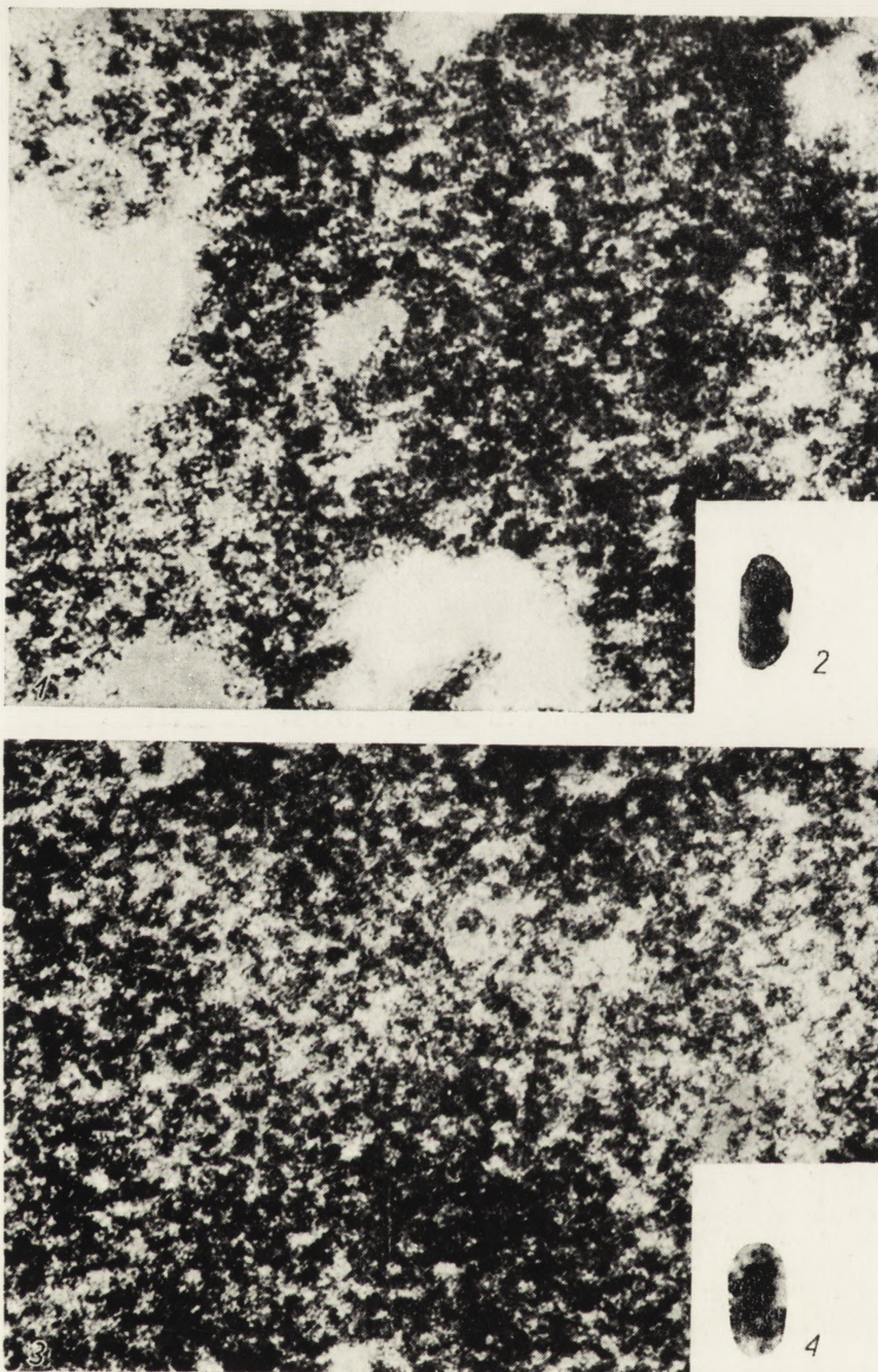
Kontrowersje dotyczące szerokości fibryli elementarnej chromatyny, spowodowane przez różne metody przygotowania materiału do badań w mikroskopie elektronowym (ultracienkie skrawki z materiału utrwalonego lub chromatyna nie utrwalona, oglądana w całości — por. wyżej) dotyczą również ultrastruktury chromosomów podziałowych [12, 17, 21,



TABLICA I

Jądro z merystemu korzeniowego *Cucurbita pepo*

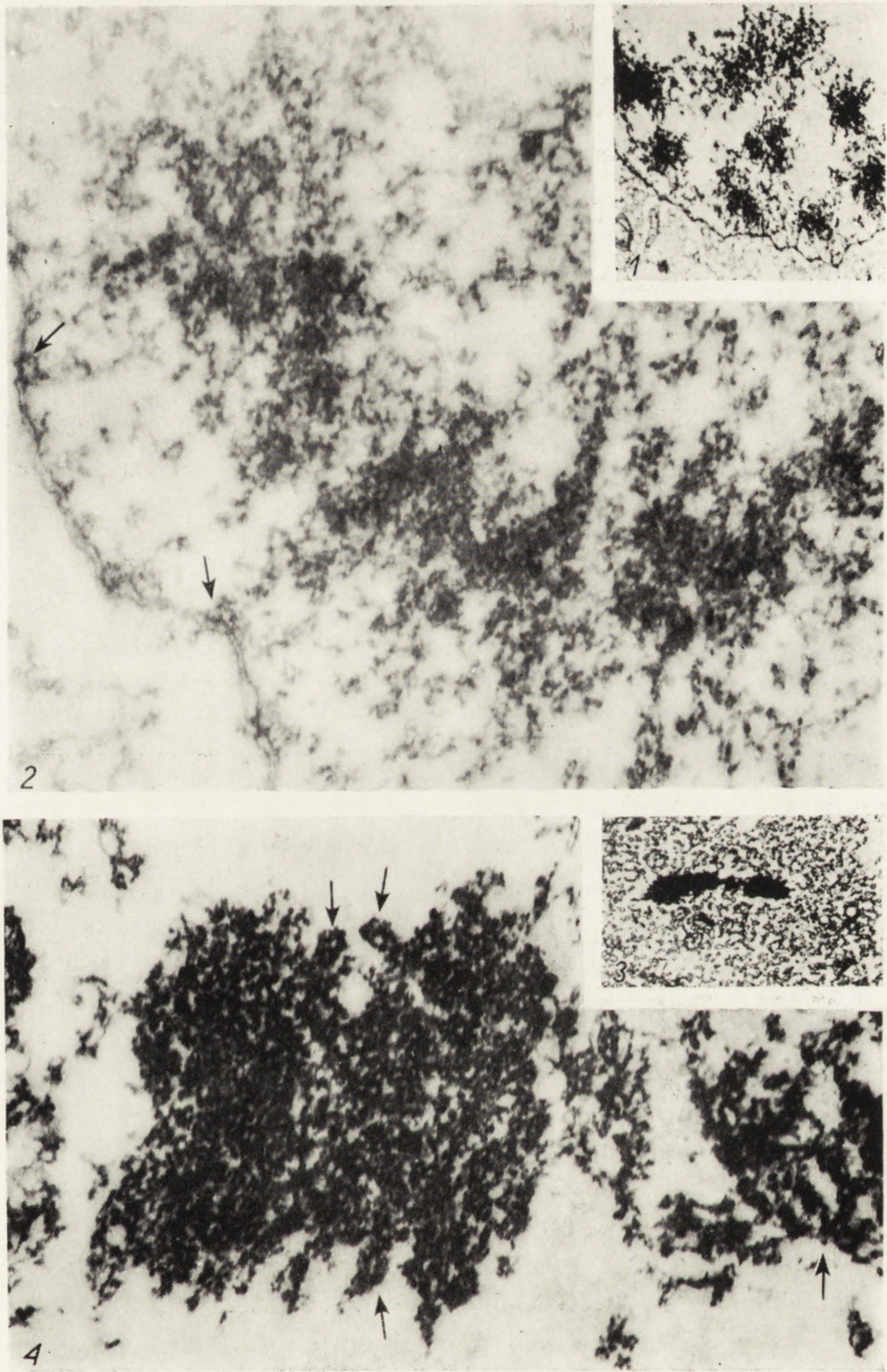
1 — z ultracienkiego skrawka materiału utrwalonego w  $\text{OsO}_4$ , pH 7,2 i zatopionego w metakrylanie,  $\times 22\ 400$ ; 2 — z ultracienkiego skrawka materiału utrwalonego w aldehydzie glutarowym i zatopionego w Eponie 812,  $\times 175\ 000$ ; 3 — fragment dwunitkowej fibryli elementarnej z chromatyny zwartej (heterochromatyny),  $\times 490\ 000$ ; 4 — fragment jednonitkowej fibryli elementarnej z chromatyny luźnej (euchromatyny),  $\times 490\ 000$ ; *h* — heterochromatyna, *eu* — euchromatyna; *nu* — jąderko (Olszewska [33])



TABLICA II

Fragment jądra i chromosomu metafazowego z merystemu korzeniowego *Haemanthus katharinae* utrwalonego w aldehydzie glutarowym i zatopionego w Eponie 812

1 — chromatyna zwarta z jądra interfazowego,  $\times 175\ 000$ ; 2 — fragment dwunitkowej fibryli elementarnej z chromatyny zwartej jądra interfazowego,  $\times 490\ 000$ ; 3 — fragment chromosomu metafazowego,  $\times 175\ 000$ ; 4 — fragment fibryli dwunitkowej z chromosomu metafazowego,  $\times 490\ 000$  (Olszewska [33])



TABLICA III

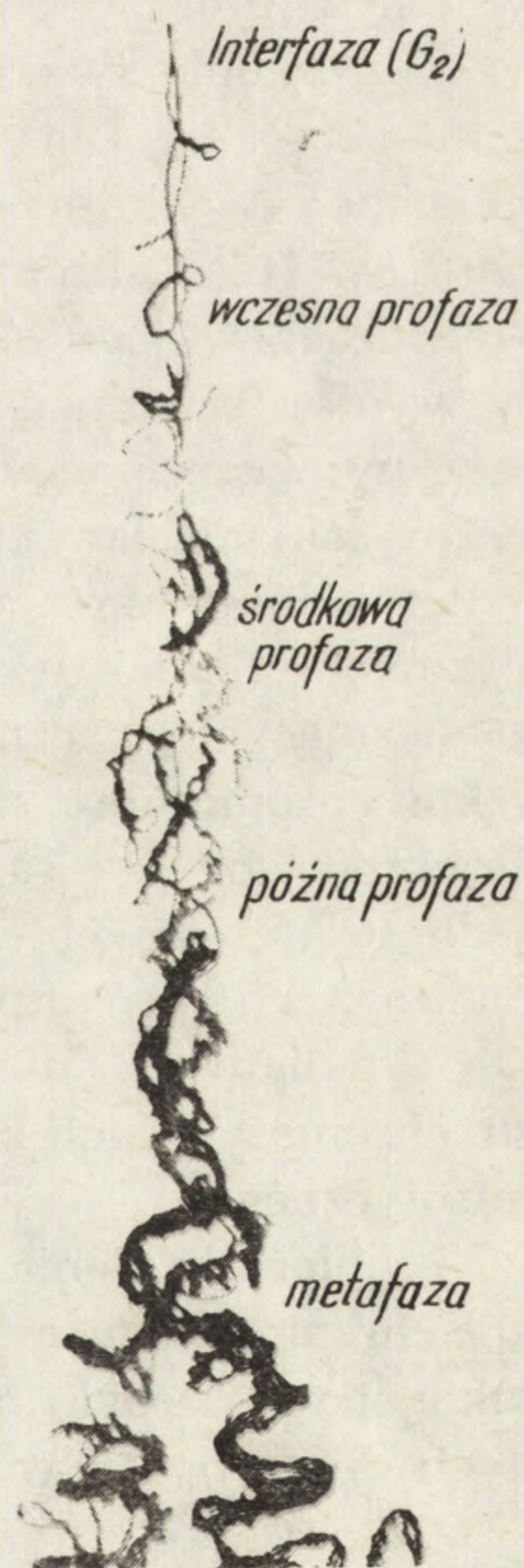
Chromosomy w profazie i w metafazie w bielmie *Iris pseudoacorus* (materiał utrwalony w  $\text{OsO}_4$  i zatopiony w metakrylanie)

1 — profaza,  $\times 4\ 800$ ; 2 — profaza, strzałki wskazują połączenie fibryli chromatynowych z porami błony jądrowej,  $\times 56\ 100$ ; 3 — chromosom metafazowy,  $\times 4\ 800$ ; 4 — fragment chromosomu metafazowego, strzałki wskazują pętle powstałe z kilkakrotnego zwinięcia fibryli elementarnej,  $\times 56\ 600$  (Olszewska i Gabara [34])



38]. Metoda obserwacji w mikroskopie elektronowym izolowanych i niepokrojonych chromosomów ma tę ujemną stronę, że nie pozwala wnikać w ultrastrukturę fibryli chromatynowych, których średnica przy tej technice wynosi 20-30 nm, a podczas gdy w ultracienkich skrawkach chromosomów metafazowych średnica fibryli chromatynowych wynosi około 11,5-15 nm [2, 33, 34], (tabl. II 3, III 4). Należy sądzić, że fibryle 20-30 nm, obserwowane w materiale nie utrwalonym i nie pokrojonym, składają się z 2-4 skręconych spiralnie 10 nm fibryli elementarnych [34], (tabl. III 4, strzałki).

Wychodząc z założenia, że podstawowym elementem strukturalnym chromatyny jest fibryla elementarna zawierająca jedną spiralnie skręconą nić DNH oraz że w skład każdego chromosomu wchodzi tylko jedna w ten sposób zwinięta cząsteczka DNA, można przyjąć że formowanie chromosomu we wczesnej profazie rozpoczyna się od lokalnej spiralizacji I rzędu, w wyniku czego powstają pasma zawierające dwie nici DNH, a więc takie, jak w chromatynie zwartej jądra interfazowego (rys. 4). Fibryla zawierająca 2 nici DNH wydaje się być najbardziej typową for-



Rys. 4. Model obrazujący formowanie się dwu siostrzanych chromosomów (Olszewska i Gabora [34])

mą dla chromosomów metafazowych [22, 33], (tabl. II 4). W dalszym ciągu profazy następowałyby kolejne skrócenie podwójnej spirali I rzędu, w wyniku czego powstają spirale II rzędu, złożone z 4 fibryli elementarnych i spirale III rzędu, zawierające 8 fibryli elementarnych (rys. 4, środkowa profaza). Skrócone kolejno spirale stanowiłyby pętle boczne, układające się wzdłuż głównej osi chromosomu, która nie ulega tego rodzaju spiralizacji (rys. 4). Interpretacja analogiczna została podana [24] dla kondensacji chromosomów w profazie mejozy.

W przeciwieństwie do trwałych kompleksów zawierających dwie nici DNH, zwoje wyższych rzędów wydają się być bardziej luźne i dlatego nie zawsze są dostrzegalne w mikroskopie elektronowym.

Na terenie centromeru spiralizacja fibryli elementarnej nie jest tak daleko posunięta (tabl. III 3), jak w obrębie ramion chromosomów i dlatego teren centromeru, wskutek niskiej koncentracji DNA, wydaje się być przy obserwacji w mikroskopie świetlnym pozbawiony tego składnika; to samo dotyczy przewężeń wtórnych.

Proces spiralizacji i kondensacji zachodzi jednocześnie w obu owiniętych wokół siebie siostrzanych fibrylach elementarnych, wobec czego w czasie profazy obie siostrzane chromatydy, zgodnie z obserwacjami w mikroskopie świetlnym, są wokół siebie owinięte. Niezależnie od sposobu skręcania fibryli elementarnej w chromosomie metafazowym (regularnie — jak przedstawiono wyżej, lub nieregularnie, jak postuluje DuPraw [12]), chromosom metafazowy jest około 100 razy krótszy, niż wchodząca w jego skład cząsteczka DNA; 40% skrócenie następuje już w wyniku spiralnego skrócenia nici DNH w fibryli elementarnej chromatyny. Zaproponowany model ultrastruktury chromosomu metafazowego zakłada tzw. jednopasmowość chromosomu, tj. obecność w nim tylko jednej cząsteczki DNA, co jest zgodne z wynikami badań genetycznych. Jednak u wielu organizmów, a szczególnie u roślin wyższych zawierających znaczne ilości DNA jądrowego i odpowiednio długie i szerokie chromosomy mitotyczne, w mikroskopie świetlnym stwierdzono, że chromosomy te są zbudowane z 2 lub 4 skręconych wokół siebie podjednostek, zwanych subchromatydami [30]. Ponieważ budowa fibryli elementarnych chromatyny jest jednakowa i niezależna od ilości jądrowego DNA u danego gatunku [33], nie można obecnie wyjaśnić pochodzenia subchromatyd i ich związku z jedno- lub wielopasmowością chromosomu mitotycznego.

Problem istnienia niechromatynowej powłoki (matriks, kalymna) wokół chromosomów mitotycznych nie jest obecnie rozstrzygnięty. Istnienie takiej powłoki było postulowane na podstawie dwóch przesłanek uzyskanych drogą badań w mikroskopie świetlnym: 1) gładkiego konturu chro-



mosomów metafazowych w materiale utrwalonym i zabarwionym, 2) zbieżności w czasie między zanikiem jąderka (koniec profazy) a ostatecznym uformowaniem chromosomów; przypuszczano, że substancja jąderkowa (niezidentyfikowana) przemieszcza się na chromosomy, powlekając ich powierzchnię. W świetle badań w mikroskopie elektronowym ta druga koncepcja całkowicie upada [8]. Badania w mikroskopie elektronowym, wykluczając jąderkowe pochodzenie matriks, nie rozwiązały dotąd jednoznacznie tego zagadnienia. Najczęściej na powierzchni chromosomów metafazowych widoczne są pętle, powstałe z wielokrotnie zwiniętej fibryli elementarnej (tabl. III 3 i 4). Niektórzy autorzy [36, 37] widzieli na powierzchni chromosomów powłokę odpowiadającą matriks. Sprawa ta wymaga dalszych badań, ponieważ obecność tej niezidentyfikowanej chemicznie substancji wydaje się zależeć od sposobu utrwalenia materiału [4].

## LITERATURA

- [1] ARRIGHI F. E., HSU T. C., SAUNDERS P. i SAUNDERS G. F., 1970 — Localization of repetitive DNA in chromosomes of *Microtus agrestis* by means of in situ hybridization, *Chromosoma*, **32**: 224–236.
- [2] ASHTON F. T. i SCHULTZ J., 1971 — The three-dimensional fine structure of chromosomes in a prophase *Drosophila* nucleus, *Chromosoma*, **35**: 383–392.
- [3] BERENDES H. D. i BEERMAN W., 1969 — Biochemical activity of interphase chromosomes (polytene chromosomes), [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London.
- [4] BOBÁK M. i HERICH R., 1969/70 — The Use of AgNO<sub>3</sub> and glutar(di) aldehyde in electron microscopic studies of chromosomic matrix, *Mikroskopie*, **24**: 270–273.
- [5] BRASCH K., SELIGY V. L. i SETTERFIELD S., 1971 — Effects of low salt concentration on structural organization and template activity of chromatin in chicken erythrocyte nuclei, *Exptl. Cell Res.*, **65**: 61–72.
- [6] BRITTEN R. J. i KOHNE D. E., 1969 — Repetition of nucleotide sequences in chromosomal DNA, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London.
- [7] BRITTEN R. J. i KOHNE D. E., 1969 — Implication of nucleotide sequences. *Ibid.*
- [8] CHOUINARD L. A., 1971 — Behavior of the structural components of the nucleolus during mitosis in *Allium cepa*, [w] *Advances in Cytopharmacology*, Vo. 1, red. F. Clementi i B. Ceccarelli, Raven Press Publ., New York.
- [9] COMINGS D. E. i OKADA T. A., 1970 — Association of chromatin fibers with the anuli of nuclear membrane, *Exptl. Cell Res.*, **62**: 293–302.
- [10] DAVIES H. G., 1968 — Electron microscope observations on the organization of heterochromatin in certain cells, *J. Cell Sci.*, **3**: 129–138.
- [11] DELANGE R. J. i SMITH E. L., 1971 — Histones: Structure and function, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 279–314.

- [12] DUPRAW E. J., 1968. Cell and Molecular Biology, Academic Press, New York and London.
- [13] DUSENBERG D. B. i URETZ R. B., 1972 — The orientation of DNA within 80-Angström chromatin fibers, *J. Cell Biol.*, **52**: 639–647.
- [14] FORD J. H. i WILSON L. S., 1972 — Spatial organization of nuclear components and the relevance to cell division, *Cytobios*, **5**: 35–42.
- [15] FREDERICQ E., 1971 — The chemical and physical properties of nucleohistones, [w] *Histones and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press, London and New York.
- [16] FRENSTER J. H., 1969 — Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam–New York.
- [17] HEARST J. E. i BOTCHAN M., 1970 — The eucaryotic chromosome, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 151–182.
- [18] HENNING W., HENNING I. i STEIN H., 1970 — Repeated sequences in the DNA of *Drosophila* and their localization in giant chromosomes, *Chromosoma*, **32**: 31–63.
- [19] HNILICA L. S., McCLURE M. E. i SPELSBERG T. C., 1971 — Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histones and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press, London and New York.
- [20] JACOB J. i SIRLIN J. L., 1963 — Electron microscope studies on salivary gland cell. I. The nucleus of *Brandysia mycorum* Frey (*Sciaridae*), with special reference to the nucleolus, *J. Cell Biol.*, **17**: 153–165.
- [21] JOHN B. i LEWIS K. R., 1969 — The chromosome cycle. *Protoplasmatologia VI B*, Springer-Verlag, New York–Wien.
- [22] KEYL H. G. i GÖLTENBOTH F., 1972 — Problematik der Chromosomenstruktur von *Mesostoma*, *Chromosoma*, **36**: 292–304.
- [23] KRAM R., BOTCHAN M. i HEARST J. E., 1972 — Arrangement of the highly reiterated DNA sequences in the centric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. Evidence for interspersed spacer DNA, *J. Mol. Biol.*, **64**: 103–118.
- [24] LaCOUR L. F. i WELLS B., 1970 — Meiotic prophase in anthers of asynaptic wheat. A light and electron microscopical study, *Chromosoma*, **29**: 419–427.
- [25] LITTAU V. C., ALLFREV V. G., FRENSTER J. H. i MIRSKV A. E., 1964 — Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscopy autoradiography, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **52**: 93–100.
- [26] LITTAU V. C., BURDICK C. J., ALLFREY V. G. i MIRSKV A. E., 1965 — The role of histones in the maintenance of chromatin structure, *Ibid.*, **54**: 1204–1212.
- [27] MIRSKY A. E., BURDICK C. J., DAVIDSON E. M. i LITTAU V. C., 1968 — The role of lysine-rich histones in the maintenance of chromatin structure in metaphase chromosomes, *Ibid.*, **61**: 592–597.
- [28] MONESI V., 1969 — DNA, RNA and protein synthesis during the mitotic cell cycle, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam–London.
- [29] O'BRIEN R. L., SANYAL A. B. i STANTON R. H., 1972 — Association of DNA replication with the nuclear membrane of HeLa cells, *Exptl. Cell Res.*, **70**: 106–112.
- [30] OLSZEWSKA M. J., 1971 — *Cytologia roślin*, PWN, Warszawa.
- [31] OLSZEWSKA M. J., 1973 — Ultrastructure of different kinds of chromatin, *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **18**: 119–121.

- [32] OLSZEWSKA M. J., 1973 — The effect of some proteolytic enzymes on chromatin ultrastructure, *Folia Histochem. Cytol.* **11**: 345–346.
- [33] OLSZEWSKA M. J., 1973 — Ultrastructure of the elementary fibrils in eu- and heterochromatin and in the metaphase chromosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.* **42**: 265–279.
- [34] OLSZEWSKA M. J. i GABARA B., 1972 — Ultrastructure of mitotic chromosomes in endosperm of *Iris pseudoacorus*, *Bull. Soc. Sc. et Lettres de Łódź*, **22**, 2: 1–6.
- [35] PARDON J. F. i WILKINS M. H. F., 1972 — A supercoiled model for nucleohistone, *J. Mol. Biol.* **68**: 115–124.
- [36] PEVELING E., 1968 — Elektronenoptische Untersuchungen zum Problem der Chromosomenmatrix, *Öster. Bot. Zeit.*, **115**: 84–92.
- [37] POLAKOV V. Yu. i CHENTSOV S. Yu., 1969 — Electron microscopic study of the chromonemata in the interphase and dividing cells of *Crepis capillaris*, *Citologija*, **11**, 1079–1085.
- [38] RIS H., 1969 — The molecular organization of chromosomes [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam–London.
- [39] RUBIN R. L. MOUDRIANAKIS E. N., 1972 — Cooperative binding of histones to DNA, *J. Mol. Biol.*, **67**: 361–374.
- [40] TAYLOR J. H., 1963 — Replication and organization of DNA in chromosomes [w] *Molecular Genetics, Part I*, Academic Press, New York and London.
- [41] WALKER P. M. B., FLAMM W. G. i McLAREN A., 1969 — Highly repetitive DNA in rodents [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam–London.
- [42] WOLFE S. L., 1965 — The fine structure of isolated chromosomes, *J. Ultrastr. Res.*, **12**: 104–112.
- [43] ZELLWEGER A., RYSER U. i BRAUN R., 1972 — Ribosomal genes of *Physarum*: their isolation and replication in the mitotic cycle, *J. Mol. Biol.*, **64**: 681–692.
- [44] ZIRKIN B. R., 1971 — The fine structure of nuclei in mature sperm. I. Application of the Langmuir through-critical point method to histone containing sperm nuclei, *J. Ultrastr. Res.*, **36**: 237–248.

Otrzymano: październik, 1972.

Przyjęto: marzec, 1973.

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



## HISTONY

Andrzej MYŚLIWSKI

Zakład Histologii, Instytut Biologii Medycznej  
Akademia Medyczna, Gdańsk

*Streszczenie.* Histony występują w jądrach wszystkich komórek eukariotycznych, zwykle w pięciu równoilościowych frakcjach. Frakcje te różnią się między sobą m.in. masą cząsteczkową oraz stosunkiem ilości lizyny do argininy. Poznano sekwencje aminokwasów trzech frakcji, stwierdzając wysoce nierównomierne rozmieszczenie reszt aminokwasów zasadowych. Łańcuchy boczne histonów mogą ulegać modyfikacjom: acetylacji i metylacji ulegają  $\epsilon$ -aminowe grupy lizyny głównie w histonach bogatych w argininę, fosforylacji reszty serynowe głównie w histonach bogatych w lizynę.

Histony w chromatynie są związane z DNA, z jego szerokim rowkiem przez część drobiny bogatą w reszty aminokwasów zasadowych. Frakcje histonowe różnią się między sobą w wiązaniu się z DNA, a fragmenty drobin histonów w kompleksach z DNA tworzą strukturę drugorzędową w formie  $\alpha$ -spirali. Histony wywierają wpływ na strukturę drugorzędową DNA determinując tworzenie przez niego „superheliks”. Mają one zasadnicze znaczenie dla struktury chromatyny odgrywając istotną rolę w procesie jej kondensacji. Miejscem syntezy histonów, która przebiega równolegle z replikacją DNA jest cytoplazma. Rola czynnościowa histonów ma polegać na nieswoistej represji DNA, przy czym mechanizm depresji jest dotąd nie znany.

Białka zasadowe stanowią szeroko rozpowszechnioną w komórce rodzinę białek [95], głównym ich przedstawicielem w jądrze, a jednocześnie jedynym w chromatynie są histony. Ponieważ były one, w ciągu ostatnich paru lat tematem kilku szczegółowych opracowań [15, 23, 49, 59, 87, 105] przedstawiony referat jest zestawieniem zasadniczych danych i poglądów zawartych w tych opracowaniach, a także zestawieniem wyników badań ostatnio publikowanych.

Zasadnicze daty w historii badań białek zasadniczych jądra komórkowego to 1869 r. — data wykrycia przez Mieschera protamin, 1884 r. — wykrycie histonów przez Kossela oraz 1893 r., kiedy Lilienfeld zasto-

sował po raz pierwszy jako źródło otrzymania histonów grasicę cielęcia (daty wg Buscha, [12]) — materiał, jak się okazało, bardzo bogaty w ten rodzaj białka. Dla współczesnych badań nad histonami zasadnicze znaczenie miało wysunięcie przez Stedmanów w 1950 r. hipotezy o roli histonów jako regulatora aktywności genów. Dzięki tej hipotezie uwaga wielu badaczy zwróciła się ku histonom.

#### CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Histony to zasadowe białka chromatyny zawierające w wysokich proporcjach lizynę i argininę a pozbawione tryptofanu, dające się uwolnić z chromatyny za pomocą rozcieńczonych kwasów lub stężonych roztworów soli. Definicja ta obejmuje również protaminy, które są ogólnie traktowane jako specyficzny rodzaj histonów [105].

Obecność histonów stwierdzono w jądrach wszystkich komórek eukariotycznych z wyjątkiem grzybów [63]. Natomiast nie stwierdzono obecności histonów w organizmach prokaryotycznych [68, 116, 118]. Ostatnio jednak doniesiono [60] o istnieniu u bakterii białka zasadowego, o wysokiej zawartości lizyny i argininy, pełniącego rolę tzw. czynnika II koniecznego do inicjacji replikacji  $Q\beta$  RNA bakteriofaga, które może być zastąpione przez histony, chociaż poli-L-lizyna nie jest w stanie go zastąpić. Jest to więc białko zbliżone do histonów, ale pełniące inną niż histony funkcję.

Wspomniana już hipoteza Stedmanów, zakładając rolę histonów jako regulatora aktywności genów, sugerowała jednocześnie dużą ich heterogenność. Chociaż wyniki pierwszych badań wydawały się wskazywać na istnienie takiej heterogenności, to dalsze badania wykazały, że w rzeczywistości liczba typów histonów jest bardzo ograniczona biorąc pod uwagę niezwykle duże rozpowszechnienie tych białek. Obecnie przyjmuje się, że istnieje 5 zasadniczych typów histonów, a łącznie z wykrytymi dotąd podtypami daje to nie więcej niż kilkanaście rodzajów histonów, często różniących się między sobą bardzo nieznacznie.

Badania wykonane na różnych obiektach wykazały brak różnic w składzie frakcyjnym histonów między różnymi gatunkami [37], narządami [38], a także między tkankami zarodkowymi i organizmów dojrzałych [41] oraz nowotworowymi i normalnymi [39]. Stwierdzono jednak wyjątki, znajdując w plemnikach niektórych ryb i ptaków protaminy [105], a w jądrach erytrocytów ryb, płazów, gadów oraz w wątrobie żaby [74] dodatkową frakcję histonową. Zwraca uwagę fakt, że te nietypowe postacie histonów występują w komórkach charakteryzujących się znacznym stopniem zrepresorowania chromatyny. Ponadto stwierdzono w ramach frakcji bogatej w lizynę (fl) obecność bardzo zbliżonych do siebie

subfrakcji [13, 54, 55]. Ponieważ istnienie tych subfrakcji stwierdza się w warunkach uniemożliwiających tworzenie artefaktów przez proteolizę i agregację, przyjmuje się, że frakcja ta wykazuje istnienie mikroheterogenności, która jak następnie wykazano, ulega zmianie w zależności od stanu czynnościowego komórki [83].

Badano stosunki ilościowe między pięcioma głównymi frakcjami histonów i stwierdzono, że występują one w prawie dokładnie równych ilościach, stanowiąc w ten sposób 20% całkowitych histonów każda [49]. Stosując do tych badań różny materiał stwierdzono takie same stosunki ilościowe między frakcjami u różnych gatunków zwierząt, w różnych stanach czynnościowych i na różnych stopniach zróżnicowania [26, 56], jak również w aktywnej i nieaktywnej chromatynie [17, 82].

#### CHARAKTERYSTYKA FRAKCJI HISTONOWYCH

Uzyskanie homogennych lub względnie homogennych frakcji histonów umożliwiło badania ich struktury pierwszorzędowej.

Tabela 1 przedstawia ogólną charakterystykę histonów grasicy cielęcia. Podzielone są one na trzy zasadnicze klasy: histony bogate w lizynę, średniobogate w lizynę i bogate w argininę, zależnie od stosunku

TABELA 1. Charakterystyka frakcji histonów grasicy cielęcia wg De Lange'a i Smitha [23]

Klasa	Frakcja		Stosunek lizyny do argininy	Liczba reszt aminokwasowych	Masa cząsteczkowa	Koniec aminowy	Koniec karboksylowy
	A*	B**					
Bogate w lizynę I	f1		20	212	19 500-21 000	acetylo-seryna	lizyna
Średnio bogate w lizynę	I Ib2	f2b	2,5	125	13 774	prolina	lizyna
	I Ib1	f2a2	1,0-1,2	136-157	13 000-17 000	acetylo-seryna	lizyna
Bogate w argininę	III	f3	0,7-0,8	135	15 324	alanina	alanina
	IV	f2a1	0,79	102	11 282	acetylo-seryna	glicyna

\* Nomenklatura wg Lucke'a i Rasmusseo [67]. \*\* Nomenklatura wg Johnsa [49].

lizyny do argininy, oraz pięć frakcji. Niestety jak dotąd nie udało się ujednoczyć nomenklatury frakcji histonowych. Najczęściej używane są: nomenklatura wprowadzona przez Lucke'a i Rasmussena [67] oraz nomenklatura Johnsa [49] (tab. 1).

Histony bogate w lizynę reprezentuje tylko jedna frakcja (I lub f1) zawierająca 3-4 subfrakcje [13, 54, 55], stosunek lizyny do argininy

równy jest 20, a ogólna liczba reszt aminokwasowych w przybliżeniu wynosi 212 [13], masa cząsteczkowa 19 500–21 000 [36, 40, 110] — są to największe z wszystkich histonów. Aminokońcowym aminokwasem jest acetyloseryna [86] a karboksylońcowym lizyna [67], są więc wspólne dla wszystkich subfrakcji.

Histony średniobogate w lizynę reprezentują dwie frakcje: IIb2 (f2b) i IIb1 (f2 a2). Frakcja IIb2 (f2b) wg Panyima i Chalkleya [83] nie zawiera subfrakcji, wg Hnilicy [40] — dwie subfrakcje. Stosunek lizyny do argininy równy 2,5 [41], ilość reszt aminokwasowych równa 125, a masa cząsteczkowa 13 774. Zostały one dokładnie poznane dzięki określeniu sekwencji aminokwasów [42, 46], aminokońcowym i karboksylkońcowym aminokwasem są odpowiednio prolina i lizyna. Frakcja IIb1 (f2a2) zwana jest również, dla odróżnienia od poprzedniej frakcją bogatą w lizynę i argininę, ponieważ stosunek tych aminokwasów do siebie jest bliski 1 (1,0–1,2). Przybliżona liczba reszt aminokwasowych 136–157, a masa cząsteczkowa 13 000–17 000. Aminokońcowym aminokwasem jest acetylowana seryna, a karboksylkońcowym lizyna.

Klasę histonów bogatych w argininę stanowią dwie frakcje: frakcja III (f3) ma stosunek lizyny do argininy 0,9 [15]. W bieżącym roku podano [24] sekwencję aminokwasów i dzięki temu wiadomo, że zawiera ona 135 reszt aminokwasowych a masa cząsteczkowa wynosi 15 324, z alaniną na obu końcach łańcucha polipeptydowego. Frakcja IV (f2a1) uważana za homogenną [22], ma stosunek lizyny do argininy równy 0,79 ilość reszt aminokwasowych 102, masa cząsteczkowa 11 282, aminokwasem aminokońcowym jest acetyloseryna, a karboksylkońcowym glicyna.

#### SKŁAD AMINOKWASOWY FRAKCJI

Badania składu aminokwasowego pięciu zasadniczych frakcji histonów grasicy cielęcia wykazały, że frakcje histonowe znacznie się różnią zawartością poszczególnych aminokwasów, każda z nich wykazuje jednak podobny odsetek aminokwasów zasadniczych, w przybliżeniu 25% (lizyna + arginina + histydyna), [15].

Frakcję I (f1) charakteryzuje bardzo wysoka zawartość lizyny i alaniny, oraz proliny. Ten ostatni aminokwas ma, jak wiadomo, istotne znaczenie dla struktury drugorzędowej białek, ponieważ uniemożliwia tworzenie  $\alpha$ -spirałi. Natomiast ładunek (netto) wynosi + 25 i jest największy.

Frakcja IIb2 (f2b) ma największy odsetek seryny, jak również metioniny i tyrozyny. Stosunek lizyny do argininy na korzyść lizyny 2,0, ale



różnica znacznie mniejsza niż we frakcji f1, zwanej niekiedy bardzo bogatą w lizynę.

Frakcja IIb1 (f2a2) ma najwyższy z wszystkich frakcji odsetek kwasu asparaginowego oraz leucyny i histydyny. Stosunek lizyny do argininy bliski 1,0, ładunek (netto) równy +13 jest najniższy ze wszystkich frakcji.

Frakcja IV (f2a1) wykazuje wysoką zawartość glicyny i waliny. Ze względu na zawartość tego pierwszego aminokwasu zwana jest frakcją bogatą w glicynę i argininę, w skrócie GAR (glycine arginine rich). Obok frakcji f3 wykazuje obecność  $\epsilon$ -N-metylolizyny. Stosunek lizyny do argininy nieco na korzyść argininy (0,9) a ładunek (netto) +19.

Frakcja III (f3) ma największy ze wszystkich frakcji odsetek argininy i kwasu glutaminowego, dlatego też zwana jest niekiedy frakcją bogatą w argininę i kwas glutaminowy. Frakcja ta jest jedyną zawierającą cysteinę, w związku z tym łatwo agreguje w di- i polimery.

#### SEKWENCJE AMINOKWASOWE FRAKCJI

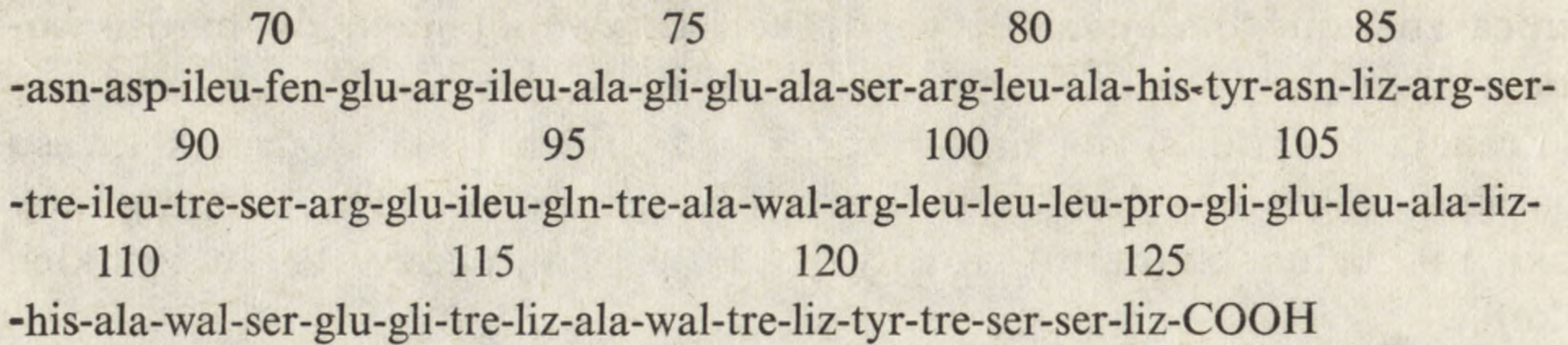
Jak już wspomniano, udało się określić sekwencję aminokwasów trzech spośród pięciu frakcji (f2b, f2a1, f3). Sekwencja frakcji I (f1) została poznana częściowo. Stwierdzono, że rozmieszczenie w drobinie reszt lizynowych jest asymetryczne — połówka od końca karboksylowego zawiera ich znacznie więcej niż od końca aminowego [14].

Porównanie sekwencji aminokwasów końca aminowego (pozycje 1-72) dwóch podfrakcji (3 i 4) frakcji I histonów grasicy królika oraz podfrakcję 1 frakcji I grasicy cielęcia ukazuje znaczne podobieństwo między tymi histonami, zarówno między subfrakcjami, jak i histonami różnogatunkowymi [86]. Stwierdzono również grupowanie się aminokwasów zasadowych w histonach I obu gatunków.

#### Frakcja IIb2(f2b)

Sekwencja tej frakcji średnio bogatej w lizynę została podana przez Hnilica i wsp. [42] oraz Iwai i wsp. [46]. Przedstawia się następująco:

	5	10	15	20
H <sub>2</sub> N-pro-gln-pro-ala-liz-ser-ala-pro-ala-pro-liz-liz-gli-ser-liz-liz-ala-wal-tre-liz-ala-				
25	30	35	40	
-gln-liz-liz-asp-gli-liz-liz-arg-liz-arg-ser-arg-liz-glu-ser-tyr-ser-wal-tyr-wal-tyr-liz-wal-				
45	50	55	60	65
-leu-liz-gln-wal-his-pro-asp-tre-gli-ileu-ser-ser-liz-ala-met-gli-ileu-met-asn-ser-fen-wal-				



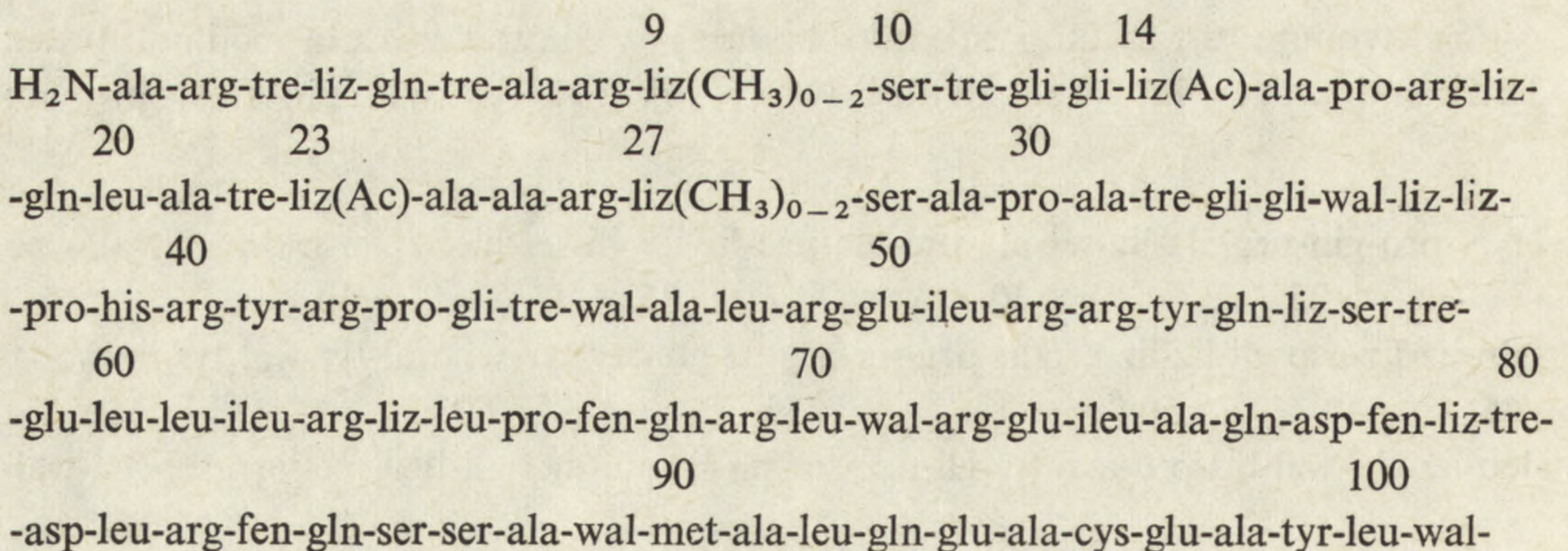
Zwraca uwagę, podobnie jak i w poprzedniej frakcji, bardzo nierównomierne rozmieszczenie reszt zasadowych. Rejon końca aminowego zawiera 15 reszt zasadowych na 35, podczas gdy rejon środkowy — 6 reszt na 45, a rejon końca karboksylowego 10 reszt zasadowych na 46 reszt. Odwrotnie zgrupowane są reszty kwaśne. Jak z tego wynika, koniec aminowy ma duży ładunek dodatni, zawiera ponadto 4 spośród 6 reszt prolinowych oraz najniższą zawartość reszt hydrofobowych i hydroksyaminowych, przypomina więc koniec karboksylowy frakcji I. Podobnie też do frakcji I reszty zasadowe występują w grupach.

#### Frakcja IIbl(f2a2)

Sekwencja histonów tej frakcji z grasicy cielęcia została poznana tylko częściowo [84]. Najbardziej uderzające jest, że sekwencja od końca aminowego jest, przynajmniej dla 5 początkowych reszt, identyczna jak frakcji IV (f2a1). Stwierdzono również [107] identyczność sekwencji pierwszych 6 reszt frakcji f2a1 i f2a2 w jądrach pstrąga i grasicy cielęcia, jak i grupowanie się reszt zasadowych. Ostatnio [106] poznano sekwencję 48 reszt aminokwasowych od końca karboksylowego. Jest wśród nich 11 reszt zasadowych (7 liz + 1 arg + 3 his).

#### Frakcja III(f3)

Sekwencja aminokwasów tej bogatej w argininę frakcji z grasicy cielęcia została podana ostatnio przez De Lange i wsp. [24]. Przedstawia się następująco:



110120

-gli-leu-fen-glu-asp-tre-asn-leu-cys-ala-ileu-his-ala-liz-arg-wal-tre-ileu-met-pro-

130135

-liz-asp-ileu-gln-leu-ala-arg-arg-ileu-arg-gli-glu-arg-ala-COOH

Koniec aminowy (pozycje 1–53) jest silnie zasadowy (ładunek + 18) i zawiera lizynę w pozycji 14 i 23 N-acetylowane w niektórych drobinach, jak również reszty lizylowe w pozycji 9 i 27 częściowo N-metylowane. Koniec karboksylowy jest słabo zasadowy (ładunek + 4), zawiera większość reszt hydrofobowych i ma sekwencję 29 reszt bez reszty zasadowej. Dwie cysteiny są w rejonie niezasadowym w pozycji 96 i 110. Stwierdzono także parę podobieństw sekwencyjnych z innymi histonami głównie frakcji IV (f2a1).

#### Fracja IV(f2a1)

Sekwencja histonów tej frakcji została poznana najwcześniej [20, 21]. Przedstawia się następująco:

101620

Ac-ser-gli-arg-gli-liz-gli-gli-liz-gli-leu-gli-liz-gli-gli-ala-liz(Ac)-arg-his-arg-liz(Me)<sub>1,2</sub>

3040

-wal-leu-arg-asp-asn-ileu-gln-gli-ileu-tre-liz-pro-ala-ileu-arg-arg-leu-ala-arg-arg-gli-

5060

-gli-wal-liz-arg-ileu-ser-gli-leu-ileu-tyr-glu-glu-tre-arg-gli-wal-leu-liz-wal-fen-leu-

707780

galu-asn-wal-ileu-arg-asp-ala-wal-tre-tyr-tre-glu-his-ala-liz-arg-liz-tre-wal-tre-ala-

90100e

met-asp-wal-tyr-ala-leu-liz-arg-gln-gli-arg-tre-leu-tyr-gli-fen-gli-gli-COOH

Podobnie jak i w innych frakcjach, rozmieszczenie reszt zasadowych jest nierównomierne. Rejon końca aminowego (45 reszt) ma ładunek +16, podczas gdy rejon końca karboksylowego (57 reszt) +3. Ponadto rejon końca karboksylowego zawiera większość reszt hydrofobowych oraz reszt zawierających grupy hydroksylowe. Stwierdzono także, że znajdowane uprzednio w tych histonach N-metyllizyna i N-dimetyllizyna, są obie w tej samej pozycji, tj. 20, mimo obecności 10 innych reszt lizynowych. W histonach grochu tych pochodnych metylowych lizyny nie stwierdzono [23]. Mimo tej różnicy, porównanie sekwencji histonów frakcji IV (f2a1 lub GAR) grasicy cielęcia i grochu wykazuje uderzającą niezmiennosc ewolucyjną tych histonów. Na 102 reszty tylko dwie są różne w pozycji (60 i 77), przy czym w jednej z nich lizyna zastępuje argininę. Wydaje się więc, że wszelkie ewentualne mutacje były letalne, co z kolei wskazywałoby na niezbędnosc czynnościową całej drobin.

Przedstawione wyniki badań sekwencji aminokwasów drobin histonowych wykazywały więc przede wszystkim wybitnie nierównomierne rozmieszczenie reszt zasadowych, przy czym stwierdzono, że silnie zasadowy w histonach bogatych w lizynę (fl) jest rejon końca karboksylowego, a w histonach średnio bogatych w lizynę i bogatych w argininę — rejon końca aminowego.

We wszystkich frakcjach stwierdzono także grupowanie się reszt zasadowych. Wyniki badań sekwencji wykazały również homogenność frakcji histonowych, a nawet podobieństwa sekwencyjne, co wydaje się ostatecznie potwierdzać przekonanie o niezwykle ograniczonej heterogenności histonów.

### MODYFIKACJE ŁAŃCUCHÓW BOCZNYCH

Wystarczająco czuła metoda, taka jak elektroforeza w żelu wykazuje istnienie kilkunastu, a nawet 20 frakcji. Przyczyną istnienia przynajmniej niektórych z tych frakcji jest proteoliza, której ulegają histony bogate w lizynę lub agregacja, której ulegają histony bogate w argininę (f3). Jednak mimo zastosowania warunków wykluczających zarówno proteolizę jak i agregację, poddając elektroforezie w żelu poliakrylamidowym histony tkanek cielęcia uzyskano 12 frakcji [83]. Analiza wyników wykazała, że liczba ta jest spowodowana obecnością subfrakcji w ramach zasadniczych 5 frakcji histonów. Porównanie tych subfrakcji wykazało, że są one identyczne lub bardzo podobne jeśli chodzi o budowę pierwszorzędową, natomiast przyczyną zróżnicowania są modyfikacje łańcuchów bocznych. Jedynie histony bogate w lizynę (fl) wydają się wykazywać prawdziwą heterogenność [13, 54, 55].

Jak wykazano, modyfikacje te polegają na acetylowaniu i metylowaniu reszt lizylowych i arginilowych, fosforylowaniu reszt serylowych oraz oksydacji i redukcji reszt cysteinylowych i cystynylowych.

### ACETYLACJE I METYLACJE

Pochodne acetylowe lizyny N-acetylolizyna zostały po raz pierwszy stwierdzone w histonach grasicy cielęcia IV a potem III [21, 33, 113]. Wykazano również ich obecność w histonach III i IV z komórek HeLa [114, 115], oraz w histonach IV kielków grochu [22] i jądra pstrąga [107]. Jak dotąd N-acetylolizynę znaleziono jedynie w histonach bogatych w argininę, przy czym histony IV grasicy cielęcia mają jedną resztę lizylową (pozycja 16) acetylowaną, a III dwie (pozycje 14 i 23) [24]. Stwier-

dzono także, że nie wszystkie drobiny danej frakcji są acetylowane w jednakowym stopniu [107], stąd różnice widoczne w elektroforezie.

$\epsilon$ -N-acetylowe grupy lizyny wykazują dość znaczną wymianę (turn over) [4, 33], a tworzone są przez enzymatyczne przenoszenie grup acetylowych z acetylo-CoA na  $\epsilon$ -aminowe grupy lizyny, już po zakończeniu syntezy łańcucha polipeptydowego histonu.

Na różnych układach stwierdzono wyraźną zależność między stopniem zacetylowania histonów a aktywnością chromatyny, z której one pochodzą. Obserwowano wzrost acetylowania histonów w chromatynie limfocytów transformowanych PHA [72, 85], w komórkach wątrobowych w odpowiedzi na działanie kortyzolu [4]. Zwiększenie zacetylowania histonów jest nie tylko wynikiem zwiększonej acetylacji, ale może być wynikiem zahamowanej deacetylacji [4]. Obserwuje się również proces zmniejszania zacetylowania histonów w chromatynie jąder komórkowych zmniejszających aktywność, jak dojrzewające krwinki czerwone ptaków [4].

W histonach były znalezione metylowe pochodne lizyny [23], przy czym późniejsze badania wykazały istnienie zarówno mono- jak i dimetylowych pochodnych. Podobnie jak acetylacja, tak i metylacja lizyny zachodzi jedynie w histonach bogatych w argininę. Histony frakcji III grasicy cielęcia mają metylowane dwie reszty lizylowe (pozycja 9 i 27), a frakcja IV jedną (pozycja 20), natomiast w histonach kielku grochu tylko frakcja III podlega metylacji [23]. Po przeprowadzeniu analizy sekwencji aminokwasów otaczających reszty lizylowe podlegające acetylacji i metylacji w histonach frakcji III i IV grasicy cielęcia stwierdzono [24], że acetylacji podlega reszta lizylowa umieszczona w kierunku końca aminowego od sekwencji arg-liz, oddzielonej od niej przez dwie reszty, przy czym w dwu przypadkach na trzy lizyna z sekwencji arg-liz jest również metylowa. Jednakże histony frakcji IV kielków grochu [22] i jąder pstrąga [107] są acetylowane w innych miejscach, co wskazuje, że albo istnieją enzymy acetylujące o różnej specyficzności, albo że podobieństwo sekwencyjne jest przypadkowe.

W przeciwieństwie do acetylacji metylacja histonów nie wykazuje, jak się wydaje, związku z procesami syntezy DNA, RNA, histonów i białka. Dawcą grup metylowych jest S-adenozylometionina.

Jednak nie tylko reszty lizylowe podlegają w histonach acetylowaniu i metylowaniu. Stwierdzono metylację reszt arginylowych (N-metylarginina) w komórkach wątroby szczura oraz acetylowe pochodne seryny. Te drugie są szczególnie interesujące, ponieważ łańcuchy polipeptydowe trzech spośród pięciu głównych frakcji histonów (I, IIb1 i IV) (tab. 1) rozpoczynają się od acetyloseryny. Ponieważ Allfreyowi [4] udało się

wykazać, że seryna podlega acetylowaniu przed rozpoczęciem syntezy histonów frakcji IV, sugeruje on, że właśnie acetyloseryna spełnia rolę aminokwasu inicjującego syntezę histonu frakcji IV, a być może i innych histonów.

#### FOSFORYLACJA

Fosforylowanie histonów zostało po raz pierwszy stwierdzone w 1966 r. [58, 78]. Fosforylowaniu podlegają głównie histony bogate w lizynę (f1), chociaż inne frakcje, nawet V (2c) z erytrocytów ptaków również mogą podlegać fosforylowaniu. Dawcą grup fosforanowych jest ATP z udziałem kinaz histonowych szeroko rozpowszechnionych w różnych tkankach [23]. W wyniku fosforylacji powstaje O-fosfoseryna. Stwierdzono także istnienie enzymów defosforylujących fosfohistony [69].

Grupy fosforanowe podlegają wymianie, a jej tempo, podobnie jak stopień ufosforylowania histonów, wykazuje zależność od stanu fizjologicznego komórki [62, 107].

Podobnie jak acetylacja histonów bogatych w argininę, fosforylacja histonów bogatych w lizynę (I) poprzedza wzrost syntezy RNA w limfocytach transformowanych PHA [18]. Podobnie glukagon w dawce wystarczającej do indukowania syntezy enzymów powoduje wzrost 15–25 razy fosforylacji specyficznych reszt seryny histonów I [62], przy czym fosforylacji podlega nie więcej niż 10% frakcji.

Interesujące zjawisko stwierdzono w końcowym stadium spermatogenezy w jądrach pstrąga tęczowego [107], kiedy histony zastępowane są przez nowo zsyntetyzowane protaminy, histony podlegają intensywnej fosforylacji i acetylacji. Stwierdzono przy tym, że w histonach IIb1 i IV fosforylacji podlega acetyloseryna rozpoczynająca łańcuch polipeptydowy. Autorzy przypuszczają, że fosforylacja tej właśnie acetyloseryny może mieć istotne znaczenie dla procesu odłączania się histonów poprzedzającego zastępowanie ich przez protaminy.

Stwierdzono także, że wzrost fosforylacji histonów przez kinazy może powodować cykliczny AMP [61], co wiązałoby stopień ufosforylowania histonów z działaniem hormonów, o których wiadomo, że powodują wzrost poziomu cAMP.

#### TWORZENIE MOSTKÓW DWUSIARCZKOWYCH

Modyfikacja histonów polegać także może na tworzeniu z grup tiolowych grup (mostków) dwusiarczkowych. Modyfikacji tej podlegają jedynie histony III (f2a1), ponieważ tylko one zawierają cysteinę. Kiedy cząsteczka histonu frakcji III zawiera 2 drobiny cysteiny (tak jak w grasicy cielęcia) mogą tworzyć się di- i polimery, natomiast gdy drobina histonu

zawiera tylko jedną cząsteczkę cysteiny, jak w kielku grochu, mogą tworzyć się jedynie dimery [23]. Stosunek grupy tiolowe/grupy tiolowe + dwusiarczkowe wykazuje zależność od stopnia aktywności chromatyny — jest niski w chromosomach metafazalnych, a w chromatynie rozproszonej, aktywnej wysoki [89, 90].

Omówione modyfikacje łańcuchów bocznych cząsteczek histonowych wykazują, z wyjątkiem jak się obecnie wydaje metylacji, wyraźny związek ze stanem aktywności chromatyny, podczas gdy ilość histonów oraz stosunek poszczególnych frakcji do siebie związku takiego nie wykazują.

Stanom podwyższonej aktywności chromatyny towarzyszy zwiększony stopień zmodyfikowania histonów. Chociaż acetylacja i fosforylacja pociąga za sobą zmniejszenie ładunku dodatniego cząsteczek histonowych, to ze względu na niewielką ilość reszt aminokwasowych, które ulegają tym reakcjom, jak również specyficzność w stosunku do określonych reszt aminokwasowych wskazuje, że nie zmiany elektrostatyczne odgrywają rolę, a raczej zmiany konformacji cząsteczek histonowych [1], wskazuje na to również znaczenie powstawania mostków dwusiarczkowych. Aby jednak móc omówić dokładniej związek między aktywnością chromatyny z histonami, należy najpierw zestawić dane dotyczące interakcji między histonami a DNA.

#### INTERAKCJA HISTONÓW Z DNA

Jest ogólnie przyjęte, że histony są w chromatynie związane z DNA [23]. Wiązanie to ma charakter elektrostatyczny, zasadowe grupy histonów wiążą się z fosforanowymi DNA. Czynnikiem dodatkowym są prawdopodobnie wiązania wodorowe i siły hydrofobowe. Stosunek ilości reszt zasadowych do fosforanowych w nukleohistonach jest jak 1:1 [112]. Nie oznacza to jednak, że wszystkie grupy fosforanowe są zneutralizowane, wydaje się, że dość znaczna część pozostaje niezneutralizowana [45, 70, 75]. Wskazuje na to wynik doświadczenia, w którym stwierdzono, że ponad 40% grup fosforanowych DNA w chromatynie jest w stanie wiązać dodaną polilizynę o masie cząsteczkowej 14 000.

Wydaje się również, że histony wiążą się z DNA w jednym z rowów podwójnej spirali DNA będącego w konfiguracji B [75, 87]. Wskazuje na to większe powinowactwo histonów do dwuniciowego DNA niż jednociowego [23]. Ponadto specyficzne powinowactwo poli-L-lizyny do rejonów DNA bogatych w pary zasad A-T [48, 64], oraz powinowactwo poli-L-argininy do rejonów bogatych w pary zasad G-C [64], wskazują, że przynajmniej część drobin histonu jest w pobliżu zasad DNA [23].

Przedmiotem kontrowersji pozostaje problem, z którym rowkiem spirali DNA — szerokim, czy wąskim — związane są histony. Na podstawie

badania nad kompleksami histonów bogatych w lizynę (f1) a natywnym DNA grasicy cielęcia tworzonymi metodą „salt gradient dialysis” stwierdzono [75], że histony wiążą się z szerokim rowkiem DNA. Uważa się, że histony IV (f2a1) również wiążą się z szerokim rowem DNA [87]. Do podobnych wniosków prowadzą badania nad wiązaniem się aktynomycyny D do chromatyny grasicy cielęcia [57]. Istnieją również sugestie [23], że histony mogą wiązać się z wąskim rowkiem.

Asymetryczne rozmieszczenie reszt zasadowych w drobinie histonowej sugeruje różny stopień (siłę) wiązania się z DNA części drobiny z przewagą reszt zasadowych i połówki o mniejszym ładunku dodatnim. Słuszność tego poglądu wykazano eksperymentalnie [65] w badaniach nad wpływem połówek „zasadowych” i „niezasadowych” histonów frakcji IIb2 na stabilizację termiczną DNA. Kompleksy DNA z połówkami „niezasadowymi” miały temperaturę topnienia  $+57^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy z połówkami „zasadowymi”  $T_m$  równa była  $+70^{\circ}\text{C}$ . Natomiast w wyniku badań stopnia precypitacji i ograniczenie zdolności wzorcowej DNA przez połówki histonów f2b stwierdzono [51], że „zasadowe” precypitują DNA przy stosunku histony/DNA = 0,8 i całkowicie ograniczają zdolność wzorcową, a połówki „niezasadowe” precypitują przy stosunku 2,0 tylko w 30% i nie mają wpływu na zdolność wzorcową. Z rezultatów tych można wnioskować [51, 75], że histony w nukleohistonach przyłączone są do DNA przez „zasadowe” części drobiny, podczas gdy część o małym ładunku dodatnim pozostaje dostępna dla innych niż DNA substancji, a więc takich jak RNA, białka niehistonowe oraz sąsiednie cząsteczki histonowe. Ostatnie badania [88] wskazują na istnienie i znaczenie interakcji pomiędzy histonami, przynajmniej w rekonstruowanych nukleohistonach.

Badania nad zdolnością histonów do precypitowania DNA wykazały zależność zdolności do precypitowania od siły jonowej środowiska oraz różnice pomiędzy frakcjami. Najefektywniejszymi precypitantami są histony bogate w lizynę (f1), dalej f2a1 i f2b, f2a2 i f3 [49]. Natomiast odszczepianie od DNA histonów bogatych w lizynę odbywa się już przy stężeniu chlorku sodu 0,6 M, histonów frakcji II przy stężeniu 0,8–1,8 M, a frakcji III i IV przy 0,9–2,0 [9]. Tak więc najszybciej precypitującym DNA histony bogate w lizynę odszczepione są od DNA najniższym stężeniem chlorku sodu, przeciwnie niż histony bogate w argininę.

Interesujące są wyniki badań [6] nad działaniem proteaz, które wykazały, że enzymy te mogą degradować histony I i III w nukleohistonach, podczas gdy histony II i IV były w kompleksach z DNA odporne na działanie tych enzymów. Natomiast po odszczepieniu z kompleksu nukleohistonowego degradacji uległy histony II, IV oraz III, podczas gdy histony I w tych warunkach nie uległy degradacji.



Badania nad blokowaniem przez histony dostępności do DNA w chromatynie dla DNAazy wykazały również różnice między frakcjami. Stwierdzono, że histony bogate w lizynę (f1) blokują efektywniej dostęp do DNA dla tego enzymu niż histony III [70].

Wyniki te, jak i wyniki badań nad zdolnościami precypitacyjnymi poszczególnych frakcji histonów oraz nad ich selektywną ekstrakcją wskazują, że frakcje te różnią się między sobą w wiązaniu z DNA. Ma to niewątpliwie związek z tym, że poszczególne frakcje histonów różnią się znacznie budową drugo- i trzeciorzędową, a wynika to z różnic w ich budowie pierwszorzędowej.

### STRUKTURA DRUGORZĘDOWA HISTONÓW

Stwierdzono, że struktura drugo- i trzeciorzędowa histonów ulega zmianie pod wpływem środowiska oraz pod wpływem DNA. Za pomocą metod optycznych (dyspersja skręcalności, dichroizm kołowy, spektrografia w podczerwieni) oraz innych metod fizycznych (jądrowy rezonans magnetyczny) stwierdzono mianowicie, że w miarę wzrostu siły jonowej środowiska wzrastają proporcje struktury uporządkowanej, w formie  $\alpha$ -spirali, jak również  $\beta$  struktury w przypadku histonów bogatych w lizynę [11].

Badając histony frakcji IV za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego [10] oraz stosując zasadę Prothero do znanej już sekwencji, określono odcinki łańcucha polipeptydowego tego histonu wykazując wysoki potencjał do tworzenia struktury  $\alpha$ -spirali. Stwierdzono przy tym, że głównie część końca karboksylowego (o niskiej w tym histonie zasadowości) izolowanych drobin histonu IV tworzy  $\alpha$ -spirale. Wynika z tego, że w izolowanych histonach część drobin o wyższej zasadowości nie ma tendencji do tworzenia  $\alpha$ -spirali. Jednak sytuacja ulega zmianie kiedy grupy zasadowe histonu zostają zneutralizowane przez reszty fosforanowe DNA. Stwierdzono nawet [96, 107], że spiralna konfiguracja aminokońcowej części histonu frakcji IV (o wyższej zasadowości) stwarza przestrzenne warunki korzystne dla reagowania reszt zasadowych z grupami fosforanowymi DNA.

Pomiary zawartości struktury uporządkowanej ( $\alpha$ -spirala) histonów w nukleohistonach wahają się od 18% do 41%, przy czym dla histonów II aż 59%, a dla histonów frakcji I tylko 13% [11], co w przybliżeniu odpowiada wartościom dla histonów w środowisku o dużej sile jonowej. Tak więc DNA wpływa w znacznym stopniu na konfigurację histonów łącznie z możliwością tworzenia  $\alpha$ -spirali w rejonach drobin o bardzo dużej zasadowości.

Jednak zależność jest obustronna ponieważ wykazano, że struktura

drugorzędowa DNA ulega zmianie pod wpływem histonów [87, 111]. Zmiany te obejmują kilka poziomów organizacji, od nukleohistonu tworzącego „superheliks” [80, 81, 111] aż do chromatyny (chromosomu). „Superheliks”, której obecność stwierdzono za pomocą dyfrakcji promieni X ma mieć skok 12 nm a średnicę 10 nm, a dla jej powstania mają największe znaczenie frakcja f2a2 i f3 [111], natomiast usunięcie frakcji bogatej w lizynę nie ma mieć wpływu na konformację DNA w nukleohistonach. Różnice w oddziaływaniu na DNA przez poszczególne frakcje powodują, że kompleksy utworzone przez ten sam DNA (T7) z różnymi frakcjami histonowymi (I i IV) różnią się znacznie właściwościami fizycznymi oraz ultrastrukturą [76]. Badania nad rozmieszczeniem histonów wzdłuż łańcucha DNA [73] za pomocą stopniowego usuwania histonów z natywnych DNP wykazały, że typy histonów są wymieszane, tzn. brak długich odcinków pokrytych jednym typem histonów, ale spotkano odcinki, gdzie identyczne cząstki sąsiadowały ze sobą. Natomiast badania nad utworzonymi przez asocjację kompleksami DNA–histony wykazały [88] istnienie obok fragmentów silnie zwartych, termicznie stabilnych — fragmenty, które były podobne do nie związanego DNA.

#### BIOSYNTETA HISTONÓW

Jak już stwierdzono, histony zawsze towarzyszą DNA w komórkach eukariotycznych. Jednak zależność ta dotyczy nie tylko lokalizacji, ale również procesów syntezy obu tych substancji. Stwierdzono mianowicie, że synteza histonów przebiega równolegle z replikacją DNA [19, 31, 91, 109]. W niedojrzałych i wolno dzielących się komórkach istnieje ścisła zależność, natomiast w dzielących się, wysoko zróżnicowanych komórkach, jak np. krwinki czerwone kurczęcia może zachodzić synteza histonów bogatych w argininę (III) bez towarzyszącej syntezy DNA i innych frakcji histonowych. W szybko dzielących się komórkach HeLa i dojrzewających erytrocytach kurczęcia stwierdzono również istnienie syntezy histonów bez współprzebiegającej replikacji DNA [91, 92].

Miejscem syntezy histonów jest cytoplazma [8, 31, 117]. Udało się nawet izolować histonowy mRNA o współczynniku sedymentacji 7-9S, który pojawił się w czasie replikacji DNA oraz przechodził bardzo szybko do cytoplazmy tworząc małe polisomy (mniejsze niż 8) [93]. Ostatecznego dowodu, że histony są syntetyzowane w cytoplazmie oraz że histony są syntetyzowane na 7-9 S RNA dostarczono przez zsyntetyzowanie histonów w układzie wolnokomórkowym za pomocą 7-9 S RNA [47].

Stwierdzono także, że histony wykazują podobnie do RNA bardzo niską wymianę [16, 34], a wszelkie modyfikacje łańcuchów bocznych zachodzą po zakończeniu ich syntezy.

## ROLA CZYNNOŚCIOWA HISTONÓW

Zarówno istnienie kompleksów histonów z DNA, jak i ścisły związek procesów syntetycznych tych substancji oraz podobna stałość metaboliczna wskazują na ścisłą zależność czynnościową między nimi. Na istnienie takiej zależności wskazywała, ciągle jeszcze przynajmniej częściowo aktualna wspomniana już hipoteza Stedmanów [104], zakładająca dla histonów rolę swoistych receptorów DNA.

Od roku 1950, w którym ta hipoteza została wysunięta, wykonano wiele doświadczeń świadczących o tym, że istotnie histony mogą pełnić rolę represora DNA [25, 43]. Wskazują na to doświadczenia, w których dodanie różnych frakcji histonowych, frakcji peptydowych, jak również syntetycznych polipeptydów zasadowych powodowało zmniejszenie lub całkowite zniesienie syntezy DNA-zależnego RNA, a także doświadczenia, w których usuwanie histonów z kompleksów nukleohistonowych lub chromatyny powodowało znaczny wzrost aktywności wzorcowej DNA [2, 23, 49, 105]. Wyniki tych doświadczeń wykazały jednocześnie brak swoistości w działaniu histonów na DNA, przynajmniej w stosowanych warunkach [49]. Biorąc pod uwagę, że znaczna część genomu komórki jest stale w stanie zrepresorowanym wydaje się prawdopodobne, że również w warunkach *in vivo* represja (histonowa) ma charakter nieswoisty podczas gdy derepresja swoisty.

Histony wywierają represorujący wpływ na transkrypcję przez wytworzenie silnych kompleksów z DNA. DNA w tych kompleksach wykazuje większą stabilność niż w stanie nie związanym, co objawia się podwyższoną temperaturą topnienia ( $T_m$ ) [9, 43]. Jednak samo skompleksowanie z histonami nie wystarcza dla represji DNA [49], warunkiem koniecznym ma być istnienie „superheliks”, której powstanie zależne jest od histonów. Obecność superhelisy miałaby uniemożliwić przesuwanie się drobiny polimerazy RNA wzdłuż transkrybowanego łańcucha nukleohistonowego. Zakłada się również [49], że transkrypcja może zachodzić bez rozszczepienia kompleksów nukleohistonowych. Jednak wyniki badań uzyskane przez wielu badaczy [7, 30, 52] wskazują, że w aktywnej chromatynie w przeciwieństwie do nieaktywnej można wykazać istnienie dysocjacji kompleksów nukleohistonowych, objawiające się spadkiem odporności na denaturację cieplną oraz zwiększoną zdolność wiązania aktynowycyny D, a także zmianą widma fluorescencji kompleksów DNA-AO (oranż akrydynowy).

Histony wywierają represoryczne działanie nie tylko przez wiązanie się z DNA, ale również przez wiązanie się z polimerazą RNA [100, 101]. Stwierdzono przy tym zasadniczą różnicę w działaniu między histonami bogatymi w lizynę, które wywierały działanie represoryczne jedynie przez wiązanie się z DNA, a histonami bogatymi w argininę, które miały zdol-

ność wiązania się i przez to inhibowania polimerazy RNA. Histony bogate w lizynę mogą także reagować z tym enzymem, ale bez oddziaływania na jego aktywność. W badaniach tych stwierdzono także, że histony zarówno bogate w lizynę, jak i argininę nie wywierały inhibującego działania na polimerazę DNA.

W innych badaniach [23] stwierdzono, że usunięcie histonów frakcji I z kompleksów z DNA nie wpływa wyraźnie na wzorcowe jego właściwości, podczas gdy usunięcie frakcji III — znaczne. Natomiast histony bogate w lizynę (I) miałyby odgrywać zasadniczą rolę w kondensowaniu chromatyny przez tworzenie wiązań poprzecznych tzw. crosslinks [66]. Ponieważ stwierdzono także, że wraz ze wzrostem stopnia skondensowania chromatyny zmniejsza się jej aktywność transkrypcyjna, wydawało się, że histony frakcji I wywierają działanie represoryczne przez tworzenie wiązań poprzecznych, czyli kondensowanie chromatyny. Ostatnio jednak wykazano [99], że nie tylko histony frakcji I są potrzebne do tworzenia wiązań poprzecznych w chromatynie. Wydaje się jednakże niewątpliwe, że właśnie histony odgrywają istotną rolę w procesie kondensowania chromatyny, chociaż niekoniecznie przez tworzenie wiązań poprzecznych. Ostatnio zaproponowany model [108] tłumaczący mechanizm upakowania chromatyny oraz rolę powtarzalnych sekwencji DNA zakłada, że histony spełniają rolę neutralizatora ujemnego ładunku łańcucha DNA umożliwiając odcinkom nukleohistonu o identycznej konformacji tworzenie trójwymiarowych kryształów, co w konsekwencji prowadziłoby do zrepresorowania DNA. Niewątpliwie jednak również inne niż histony białka odgrywają rolę w strukturze chromatyny i należy rozpatrywać je łącznie.

Jak już wspomniano, histony wywierają inne działanie na DNA-polimerazę niż na polimerazę RNA. Nie jest to jednak jedyna różnica między procesami replikacji i transkrypcji DNA, jeśli chodzi o zachowanie się histonów. Przede wszystkim o ile w nukleohistonach tylko bardzo ograniczona część DNA służyć może jako wzorzec do transkrypcji, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [70], to nukleohistony w reakcji z DNA-polimerazą są prawie tak wydajne jak odbiałczony DNA [94]. Wydaje się więc, że replikacja w przeciwieństwie do transkrypcji może zachodzić bez dysocjacji kompleksów DNA-histony. Różnice uwidoczniają się również na wyższych poziomach organizacji, ponieważ skondensowana chromatyna, która wykazuje bardzo ograniczoną aktywność transkrypcyjną [27, 97] może replikować DNA (np. heterochromatyna X) [17], chociaż z wyraźnym opóźnieniem w stosunku do chromatyny rozproszonej [35]. Różnice te próbowano tłumaczyć tym, że histony związane są z węższym rowem spirali DNA, pozostawiając szeroki wolny dla ewentualnej replika-

cji [17]. Tłumaczenie to wykluczają wspomniane wcześniej wyniki badań świadczące o lokalizacji histonów w szerokim rowku DNA [87]. Wydaje się jednak, że histony odgrywają istotną rolę w procesie replikacji, ponieważ wykazano wyraźny związek tego procesu ze wzrostem fosforylacji histonów [79].

Jak więc wynika z tego co powiedziano, histony są istotnie represorami chociaż nieswoistymi. Natomiast w jaki sposób odbywa się derepresja, dokładnie nie wiadomo. Wydaje się niewątpliwe, że istotną rolę odgrywają modyfikacje łańcuchów bocznych histonów wykazujące wyraźną korelację ze zmianami stanu aktywności chromatyny [3]. Podobną zależność wykazuje ilość kwaśnych białek chromatyny, co obok ich dość znacznej heterogenności predysponuje je do roli derepresora [5]. Propozowano do tej roli również RNA wskazując na jego znaczną heterogenność oraz, że byłby on w stanie rozpoznać sekwencję nukleotydów DNA [28, 29]. Jednak wykazano niezdolność RNA do rozdzielenia kompleksów DNA-histony, co czyni mało prawdopodobną ich rolę jako derepresora [102]. Pozostaje więc ciągle nie wytłumaczony mechanizm swoistej derepresji.

W podsumowaniu referatu pozwolę sobie zacytować stwierdzenie Johnsa [51] z jego ostatnio publikowanej pracy, które brzmi:

„Histony są strukturalnymi białkami, które funkcjonują przez przyczepienie częścią drobiny ściśle do DNA, będąc pozostałą częścią dostępną dla innych histonów lub jądrowych makrocząsteczek i kontrolują fizyczny stan chromatyny oraz syntezę RNA”.

#### LITERATURA

- [1] ADLER A., SCHAFFHAUSEN B., LANGAN, T. i FASMAN G., 1971 — Altered conformational effects of phosphorylated lysine-rich histone (f-1) in f-1-deoxyribonucleic acid complexes, Circular dichroism and immunological studies, *Biochem.*, **10**: 909.
- [2] ALLFREY V., LITTAU V. i MIRSKY A., 1963 — On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**: 414.
- [3] ALLFREY V., FAULKNER R. i MIRSKY A., 1964 — Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis, *Ibid.* **51**: 786.
- [4] ALLFREY V. 1970 — Changes in chromosomal proteins at times of gene activation, *Fed. Proc.*, **29**: 1447.
- [5] ALLFREY V., TENG C. i TENG C., 1971 — Changes in chromosomal proteins associated with gene activation, [w] *Nucleic acid-protein interactions*, s. 144. North-Holland, London.
- [6] BARTLEY J. i CHALKLEY R., 1970 — Further studies of a thymus nucleohistone associated protease, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4286.

- [7] BERLOWITZ L., PALLOTA D. i SIBLEY, G., 1969 — Chromatin and histones: binding of tritiated actinomycin D to heterochromatin in Mealy Bugs, *Science*, **164**: 1527.
- [8] BLOCH D. i BRACK, S., 1964 — Evidence for cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermatogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata* (de Geer), *J. Cell Biol.*, **22**: 327.
- [9] BONNER J. i HUANG R., 1963 — Properties of chromosomal nucleohistone, *J. Mol. Biol.* **6**: 169.
- [10] BOUBLIK M., BRADBURY E., CRANE-ROBINSON C. i RATTLE H., 1970 — Optical rotatory dispersion and nuclear magnetic resonance, *Europ. J. Biochem.*, **12**: 258.
- [11] BRADBURY E., CRANE-ROBINSON C., PHILIPS D., JOHNS E. i MURRAY K., 1965 — Conformational investigations of histones, *Nature*, **205**: 1315.
- [12] BUSCH H., 1965 — Histones and other nuclear proteins, Academic Press, New York and London.
- [13] BUSTIN M. i COLE R., 1968 — Species and organ specificity in very lysine-rich histones, *J. Biol. Chem.*, **243**: 4500.
- [14] BUSTIN M., RALL S., STELLWAGEN R. i COLE R. 1969 — Histone structure: asymmetric distribution of lysine residues in lysine-rich histones, *Science*, **163**: 391.
- [15] BUTLER J., JOHNS E. i PHILLIPS D., 1968 — Recent investigation on histones and their functions, *Progr. in Bioph. and Mol. Biol.*, **18**: 209.
- [16] BYVOET P., 1966 — Metabolic integrity of deoxyribonucleohistones, *J. Mol. Biol.*, **17**: 311.
- [17] COMINGS D., 1967 — Histones of genetically active and inactive chromatin, *J. Cell Biol.*, **35**: 699.
- [18] CROSS M. i ORD M., 1970 — Changes in the phosphorylation and thiol content of histones in phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes, *Biochem. J.*, **118**: 191.
- [19] DAS N. i ALFERT M., 1968 — Cytochemical studies on the concurrent synthesis of DNA and histone in primary spermatocytes of *Urechis caupo*, *Exptl. Cell Res.*, **49**: 51.
- [20] De LANGE R. i FAMBROUGH D., 1968 — Identical COOH-terminal sequences of an arginine-rich histone from calf and pea, *Fed. Proc.*, **27**: 392.
- [21] De LANGE R., SMITH E., FAMBROUGH D. i BONNER J., 1968 — Amino acid sequence of histone IV: presence of  $\epsilon$ -N-acetyllysine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **61**: 1145.
- [22] De LANGE R., FAMBROUGH D., SMITH E. i BONNER J., 1969 — Calf and pea histone IV. II The complete aminoacid sequence of calf thymus histone IV; presence of  $\epsilon$ -N-acetyllysine, *J. Biol. Chem.* **244**: 319.
- [23] De LANGE R. i SMITH E., 1971 — Histones: structure and function, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 279.
- [24] De LANGE R., HOOPER J. i SMITH E., 1972 — Complete aminoacid sequence of calf-thymus histone III. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 882.
- [25] DULBECCO R., 1964 — The histones as candidates for a role in genetic repression, [w] *The Nucleohistones*, s. 362, Holden-Day, San Francisco, London.
- [26] FAMBROUGH D. i BONNER J., 1966 — On the similarity of plant and animal histones, *Biochem.*, **5**: 2563.
- [27] FRENSTER J., ALLFREY V. i MIRSKY A., 1963 — Repressed and active

- chromatin isolated from interphase lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50**: 1026.
- [28] FRENSTER J., 1965 — Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid, *Nature*, **206**: 680.
- [29] FRENSTER J., 1965 — A model of specific de-repression within interphase chromatin, *Ibid.*, **206**: 1269.
- [30] FRENSTER J., 1972 — Ultrastructural probes of chromatin within living human lymphocytes, *Nature New Biol.*, **236**: 175.
- [31] GALLWITZ D. i MUELLER C., 1969 — Histone synthesis in vitro by cytoplasmic microsomes from HeLa cells, *Science*, **163**: 1351.
- [32] GALLWITZ D., 1970 — Structure, function and synthesis of histones, *Hoppe-Seyler's Zeitsch. Physiol. Chemie*, **351**: 778.
- [33] GERSHEY E., VIDALI G. i ALLFREY V., 1968 — Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of  $\epsilon$ -N-acetyllysine in the f2a1 histone, *J. Biol. Chem.*, **243**: 5018.
- [34] HANCOCK R., 1969 — Conservation of histones in chromatin during growth and mitosis in vitro, *J. Mol. Biol.*, **40**: 457.
- [35] HAY E. i REVEL J., 1963 — The fine structure of the DNA component of the nucleus — an electron microscopic study utilizing autoradiography to localize DNA synthesis, *J. Cell Biol.*, **16**: 29.
- [36] HAYDON A. i PEACOCKE A., 1968 — Sedimentation equilibrium and other physicochemical studies on the lysine-rich fraction of calf thymus histones, *Biochem. J.* **110**: 243.
- [37] HNILICA L., JOHNS E. i BUTLER J., 1962 — Observations on the species and tissue specificity of histones, *Biochem. J.* **82**: 123.
- [38] HNILICA L., TAYLOR C. i BUSCH H., 1963 — Analysis of peptydes of the moderately lysine rich histone fraction, f2b, of the Walker tumor and other tissue, *Exptl. Cell Res.*, **Suppl. 9**: 367.
- [39] HNILICA L., EDWARDS L. i HEY A., 1966 — Studies on nuclear proteins. III Quantitative distribution of histone fractions in various tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **124**: 109.
- [40] HNILICA L., 1967 — Proteins in the cell nucleus, [w] *Progr. in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **7**: 25.
- [41] HNILICA L. i JOHNSON A., 1970 — Fractionation and analysis of nuclear proteins in sea urchin embryos, *Exptl. Cell Res.*, **63**: 261.
- [42] HNILICA L., KAPPLER H. i JORDAN J., 1970 — Asymmetry in the distribution of basic aminoacid sides in the moderately lysine-rich histone F2b from calf thymus, *Experientia*, **26**: 353.
- [43] HUANG R. i BONNER J., Histone, a suppressor of chromosomal DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**: 1216.
- [44] INOUE A. FUJIMOTO D., 1969 — Enzymatic deacetylation of histone, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **36**: 146.
- [45] ITZHAKI R. i COOPER H., 1971 — Binding of polylysine to chromatin extracted from variuos tissues, *Biochem. J.*, **125**: 101 P.
- [46] IWAI K., ISHIKAWA K. i HAYASHI H., 1970 — Aminoacid sequence of slightly lysine-rich histone, *Nature* **226**: 1056.
- [47] JACOBS-LORENA M., BAGLIONI i BORUN T., 1972 — Translation of messenger RNA for histones from HeLa cells by cell-free extract from mouse ascites tumor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2095.

- [48] JOHNS E., 1964 — Studies on histones. Preparative methods for histone fractions from calf thymus, *Biochem. J.* **92**: 55.
- [49] JOHNS E., 1969 — The histones, their interactions with DNA, and some aspects of gene control, [w] *Homeostatic Regulators*, Ciba Found. Symp. **6**: 128.
- [50] JOHNS E., 1970 — Histones and gene control, *Nature* **226**: 651.
- [51] JOHNS E., 1972 — Histones, chromatin structure and RNA synthesis, *Nature New Biol.* **237**: 87.
- [52] KILLANDER D. i RIGLER R., 1969 — Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohaemagglutinin. I Kinetics of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein, *Expl. Cell Res.* **54**: 163.
- [53] KIM S. i PAIK W., 1965 — Studies on the origin of  $\epsilon$ -N-methyl-L-lysine in protein, *J. Biol. Chem.* **240**: 4629.
- [54] KIKNADE J. i COLE R., 1966 — The resolution of four lysine-rich histones derived from calf thymus, *Ibid.*, **241**: 5790.
- [55] KIKNADE J. i COLE R., 1966 — A structural comparison of different lysine-rich histones of calf thymus, *Ibid.*, **241**: 5798.
- [56] KISCHER C. i HNILICA L. 1967 — Analysis of histones during organogenesis, *Exptl. Cell Res.*, **48**: 424.
- [57] KLEIMAN L. i HUANG R., 1971 — Binding of actinomycin D to calf thymus chromatin, *J. Mol. Biol.*, **55**: 503.
- [58] KLEINSMITH L., ALLFREY V. i MIRSKY A., 1966 — Phosphorylation of nuclear protein early in the course of gene activation in lymphocytes, *Science*, **154**: 780.
- [59] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. i BARTKOWIAK J., 1970 — Biologiczna aktywność histonów, *Post. Biochem.*, **16**: 347.
- [60] KUO C. i AUGUST J., 1972 — Histone or bacterial basic protein required for replication of bacteriophage RNA, *Nature New Biol.*, **237**: 105.
- [61] LANGAN T., 1968 — Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5' — monophosphate, *Science*, **162**: 579.
- [62] LANGAN T., 1969 — Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **64**: 1276.
- [63] LEIGHTON T., DILL B., STOCK J. i PHILLIPS C., 1971 — Absence of histones from the chromosomal proteins of fungi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 677.
- [64] LANG M. FELSENFELD G., 1966 — The preferential interaction of polylysine and polyarginine with specific base sequences in DNA, *Ibid.*, **56**: 1325.
- [65] Li H. i BONNER J., 1971 — Interaction of histone half-molecules with deoxyribonucleic acid, *Biochem.*, **10**: 1461.
- [66] LITTAU V., BURDICK C., ALLFREY V. i MIRSKY A., 1965 — The role of histones in the maintenance of chromatin structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**: 1024.
- [67] LUCK J., RASMUSSEN P., SATAKE K. i TSVETIKOV A., 1958 — Further studies on the fractionation of calf thymus histone, *J. Biol. Chem.*, **233**: 1407.
- [68] MAKINO F. i TSUZUKI J., 1971 — Absence of histone in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, *Nature*, **231**: 446.
- [69] MEISLER M. i LANGAN T., 1966 — Characterization of a phosphatase specific for phosphorylated histones and protamine, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4961.
- [70] MIRSKY A. i SILVERMAN B., 1972 — Blocking by histones of accessibility to DNA in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 2115.



- [71] MIURA A. i OHBA Y., 1967 — Structure of nucleohistone. III Interaction with toluidine blue, *Biochim. Biophys. Acta*, **145**: 436.
- [72] MUKHERJEE A. i COHEN M., 1969 — Histone acetylation: cytological evidence in human lymphocytes, *Exptl. Cell Res.*, **54**: 257.
- [73] MURRAY K., 1969 — Stepwise removal of histones from native deoxyribonucleoprotein by titration with acid at low temperature and some properties of the resulting partial nucleoproteins, *J. Mol. Biol.*, **39**: 125.
- [74] NELSON R. i YUNIS J., 1969 — Species and tissues specificity of very lysine-rich and serine-rich histones, *Exptl. Cell Res.*, **57**: 311.
- [75] OLINS D., 1969 — Interaction of lysine-rich histones and DNA, *J. Mol. Biol.*, **43**: 439.
- [76] OLINS D. i OLINS A., 1971 — Model nucleohistones: the interaction of F1 and F2a1 histones with native T7 DNA, *Ibid.* **57**: 437.
- [77] PAIK W. i KIM S., 1970 —  $\epsilon$ -N-methylarginine in protein, *J. Biol. Chem.*, **245**: 88.
- [78] ORD M. i STOCKEN L., 1967 — Phosphate and thiol groups in histone f3 from rat liver and thymus nuclei, *Biochem. J.*, **102**: 631.
- [79] ORD M. i L. STOCKEN L., 1970 — Temporal relationships between changes in the microstructure of histones and the biochemical events in the cell cycle, *Hope-Seyler's Zeit. Physiol. Chem.*, **351**: 728.
- [80] PARDON J. WILKINS M. i RICHARDS B., 1967 — Super-helical model for nucleohistone, *Nature*, **215**: 508.
- [81] PARDON J. i WILKINS M., 1972 — A super-coil model for nucleohistone, *J. Mol. Biol.*, **68**: 115.
- [82] PALLOTA D., BERLOWITZ L. i RODRIGUEZ L., 1970 — Histones of genetically active and inactive chromatin in mealy bugs, *Exptl. Cell Res.*, **60**: 474.
- [83] PANYIM S. i CHALKLEY R., 1969 — The heterogeneity of histones. I A quantitative analysis of calf histones in very long polyacryamide gel, *Biochem.*, **8**: 3878.
- [84] PHILLIPS D. i SIMSON P., 1969 — The C terminal aminoacids and sequences of calf and rat thymus histones, *Biochim. Biophys. Acta*, **181**: 154.
- [85] POGO B., ALLERY V. i MIRSKY A., 1966 — RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**: 805.
- [86] RALL S. i COLE R., 1970 — Sequence of N-terminal region of a lysine-rich histone from rabbit thymus, *Fed. Proc.*, **29**: 534.
- [87] RICHARDS B. i PARDON J., 1970 — The molecular structure of nucleohistone (DNH), *Exptl. Cell Res.*, **62**: 184.
- [88] RUBIN R. i MOUDRIANAKIS E., 1972 — Co-operative binding of histones to DNA, *J. Mol. Biol.*, **67**: 361.
- [89] SADGOPAL A. i BONNER J., 1969 — The relationship between histone and DNA synthesis in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**: 349.
- [90] SADGOPAL A. i KABAT D., 1969 — Synthesis of chromosomal proteins during the maturation of chicken erythrocytes, *Ibid.*, **190**: 486.
- [91] SADGOPAL A. i BONNER J., 1970 — Proteins of interphase and metaphase chromosomes, *Ibid.*, **207**: 206.
- [92] SADGOPAL A. i BONNER J., 1970 — Proteins of interphase and metaphase chromosomes compared, *Ibid.*, **207**: 227.
- [93] SCHOCHETMAN G. i PERRY R., 1972 — Early appearance of histone messenger RNA in polyribosomes of cultured L cells, *J. Mol. Biol.*, **63**: 591.

- [94] SCHWIMMER S. i BONNER J., 1965 — Nucleohistone as template for the replication of DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **108**: 67.
- [95] SHEPHARD G. i NOLAND B., 1968 — The intracellular distribution of basic proteins in the chinese hamster ovary cells, *Exptl. Cell Res.*, **49**: 238.
- [96] SHIH T. i BONNER J., 1970 — Thermal denaturation and template properties of DNA complexes with purified histone fractions, *J. Mol. Biol.*, **48**: 469.
- [97] SIEGER M., PERA F. i SCHWARZACHER H., 1970 — Differential RNA synthesis of eu- and heterochromatin in *Microtus agrestis*, *Experientia*, **26**: 103.
- [98] SIMPSON R. i SOBER H., 1970 — Circular dichroism of calf liver nucleohistone, *Biochem.*, **9**: 3103.
- [99] SMART J. i BONNER J., 1971 — Studies on the role of histones in the structure of chromatin, *J. Mol. Biol.*, **58**: 661.
- [100] SPELSBERG T. i HNILICA L., 1968 — Interaction of histones with DNA and RNA polymerase, *Fed. Proc.*, **27**: 336.
- [101] SPELSBERG T., TANKERSBY S. i HNILICA L., 1969 — The interaction of RNA polymerase with histones, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **62**: 1218.
- [102] SPELSBERG T., KIZER P. i HNILICA L., 1970 — Dissociation of RNA-histone complexes by DNA, *Experientia*, **26**: 136.
- [103] STARBUCK W., MAURITZEN Ch., TAYLOR Ch., SAROJA I. i BUSCH H., 1968 — A large scale procedure for isolation of the glycine-rich, arginine-rich histone and the arginine-rich, lysine-rich histone in a highly purified form, *J. Biol. Chem.*, **243**: 2038.
- [104] STEDMAN, E. i STEDMAN E., 1950 — Cell specificity of histones, *Nature*, **166**: 780.
- [105] STELLWAGEN R. i COLE R., 1969 — Chromosomal proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**: 951.
- [106] SUGANO N., OLSON M., YEOMAN L., JOHNSON B., TAYLOR C., STARBUCK W. i BUSCH H., 1972 — Aminoacid sequence of the COOH-terminal portion of the arginine-lysine rich histone of calf thymus, *J. Biol. Chem.*, **247**: 3589.
- [107] SUNG M. i DIXON G., 1970 — Modification of histones during spermatogenesis in trout: a moderator mechanism for altering histone binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **67**: 1616.
- [108] SUTTON W., 1972 — Chromatin packing, repeated DNA sequences and gene control, *Nature New Biol.*, **237**: 70.
- [109] TAKAI S., BORUN T., MUCHOMOSE J. i LIBERMAN L., 1968 — Concurrent synthesis of histone and deoxyribonucleic acid in liver after partial hepatectomy, *Nature*, **219**: 860.
- [110] TELLER D., KIKNADE J. i COLE R., 1965 — The molecular weight of lysine-rich histone, *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **20**: 739.
- [111] TUAN D. i BONNER J., 1969 — Optical absorbance and optical rotatory dispersion studies on calf thymus nucleohistones, *J. Mol. Biol.*, **45**: 59.
- [112] VENDRELY R. i VENDRELY C., 1966 — The function of the histones, *Protoplasmatologia* **5/3a**, 39.
- [113] VIDALI G., GERSHEY E. i ALLFREY V., 1968 — Chemical studies of histone acetylation, *J. Biol. Chem.*, **243**: 6361.
- [114] WILHELM J. i McCARTY K., 1970 — Partial characterization of the histones and histone acetylation in cell cultures, *Can. Res.*, **30**: 409.
- [115] WILHELM J. i McCARTY K., 1970 — The uptake and turnover acetate in HeLa cell histone fraction, *Can. Res.*, **30**: 418.

- [116] WILKINS M. i ZUBAY G., 1959 — The absence of histone in the bacterium *E. coli*, *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 5: 55.
- [117] Wu R. i WARNER J., 1971 — Cytoplasmic synthesis of nuclear proteins kinetics of accumulation of radioactive proteins in various cell fractions after pulses, *J. Cell Biol.*, 51: 643.
- [118] ZUBAY G. i WATSON M., 1959 — The absence of histone in the bacterium *E. coli*, *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 5: 51.

*Otrzymano: styczeń, 1973.*

*Przyjęto: kwiecień, 1973.*

*Adres autora: ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk.*



## POSTĘPY CYTOGENETYKI LEKARSKIEJ

Leszek CIECIURA

Katedra Histologii, Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź

*Streszczenie.* Lata siedemdziesiąte bieżącego stulecia cechuje istotny postęp w cytogenetyce ze względu na wprowadzenie nowych technik, mianowicie fluorescencji i zmodyfikowanego barwienia Giemsa. Wprowadzenie tych metod przyniosło w sferze poznawczej nowe dane do naszej wiedzy o substrukturze chromosomu, a zwłaszcza heterochromatyny w kontekście z badaniami biochemicznymi nad powtarzalnymi sekwencjami DNA. Fluorescencja ciała Y umożliwiła wykrywanie sekschromatyny męskiej co znalazło zastosowanie praktyczne w określaniu płci w komórkach interfazalnych. Zarówno metody fluorescencyjne, jak i wzory prążkowe uzyskiwane metodami różnicowego barwienia Giemsa umożliwiają dokładną identyfikację chromosomów i ich aberracji. Ma to duże znaczenie praktyczne w rozwoju diagnostyki prenatalnej. Dalszym udoskonaleniem tych metod jest wprowadzenie do diagnostyki chromosomalnej metod pomiarów widma fluorescencyjnego techniką fotoelektryczną.

Burzliwy rozwój genetyki stworzył podwaliny teoretyczne dla biologii i medycyny. Genetyka ożywiła również cytologię i spowodowała powstanie wyodrębnionej dziedziny — cytogenetyki. Cytogenetyka zaczęła rozwijać się dopiero po 1956 r., kiedy to Tijo i Levan po raz pierwszy opisali metodę pozwalającą zbadać chromosomy ludzkie. Już w 1959 r. Lejeune wykrył w mongolizmie aberrację liczby pod postacią trisomii 21. Lata sześćdziesiąte przynoszą cały potok informacji o najrozmaitszych aberracjach liczby i kształtu zarówno w chromosomach autosomalnych, jak i płciowych.

W ostatnich dwu latach zaznaczył się, po okresie pewnej stagnacji, ogromny postęp w cytogenetyce, dzięki wprowadzeniu nowych technik, mianowicie fluorescencji i zmodyfikowanego barwienia Giemsa [1, 8-10, 14, 20, 22, 23, 27].

Zaletą tych nowych metod jest precyzyjna diagnostyka poszczególnych chromosomów homologicznych, pozwalająca w sposób stosunkowo prosty ułożyć bezbłędnie kariogram. Stosowanie wyżej wymienionych

technik pozwala na wykazanie istnienia 24 specyficznych wzorców barwnych mogących służyć nie tylko do identyfikacji chromosomu metafazalnego, ale w miarę doskonalenia metod do wykrywania aberracji na poziomie substruktury chromosomu [21].

Aby zrozumieć przyczyny zachodzenia reakcji zarówno z fluorochromem, jak i w różnych modyfikacjach barwienia Giemśą dla uzyskania wzorów prążkowych, aby wyjaśnić różnice chemiczne w różnych odcinkach chromosomu wydaje się celowe krótkie przypomnienie naszych, niestety mocno niekompletnych, wiadomości o budowie chromosomu.

### BUDOWA CHROMOSOMU

Chromosomy komórki różnią się między sobą pod względem zawartości informacji genetycznej, wielkości i kształtu. Chromosomy zróżnicowane są pod względem morfologicznym podłużnie i poprzecznie.

#### ZRÓZNICOWANIE PODŁUŻNE CHROMOSOMU

a) Centromer (kinetochor) — przewężenie pierwotne czynnościowo związane z ruchem chromosomu, do jego strefy środkowej przyczepione są nici wrzeciona kariokinetycznego. Każda chromatyda oddaje nić biegnącą wzdłuż przewężenia pierwotnego i przechodzi na chromatydę leżącą po drugiej stronie centromeru. Stopień spiralizacji tego odcinka jest nieznaczny.

b) Przewężenie wtórne jąderkowe — odcinek chromosomu z cienką, mało zspiralizowaną nicią chromatynową, w profazie łączy się z tym odcinkiem jąderko, uważane za organizatora jąderkowego. Liczba organizatorów jąderka jest stała dla danego gatunku, u człowieka występuje 5 takich satelitarnych chromosomów.

c) Satelita (trabant) — oznaczamy symbolem SAT — jest to dystalny odcinek chromosomu leżący poza przewężeniem wtórnym. Rozmiary satelitów są różne w obrębie jednego gatunku.

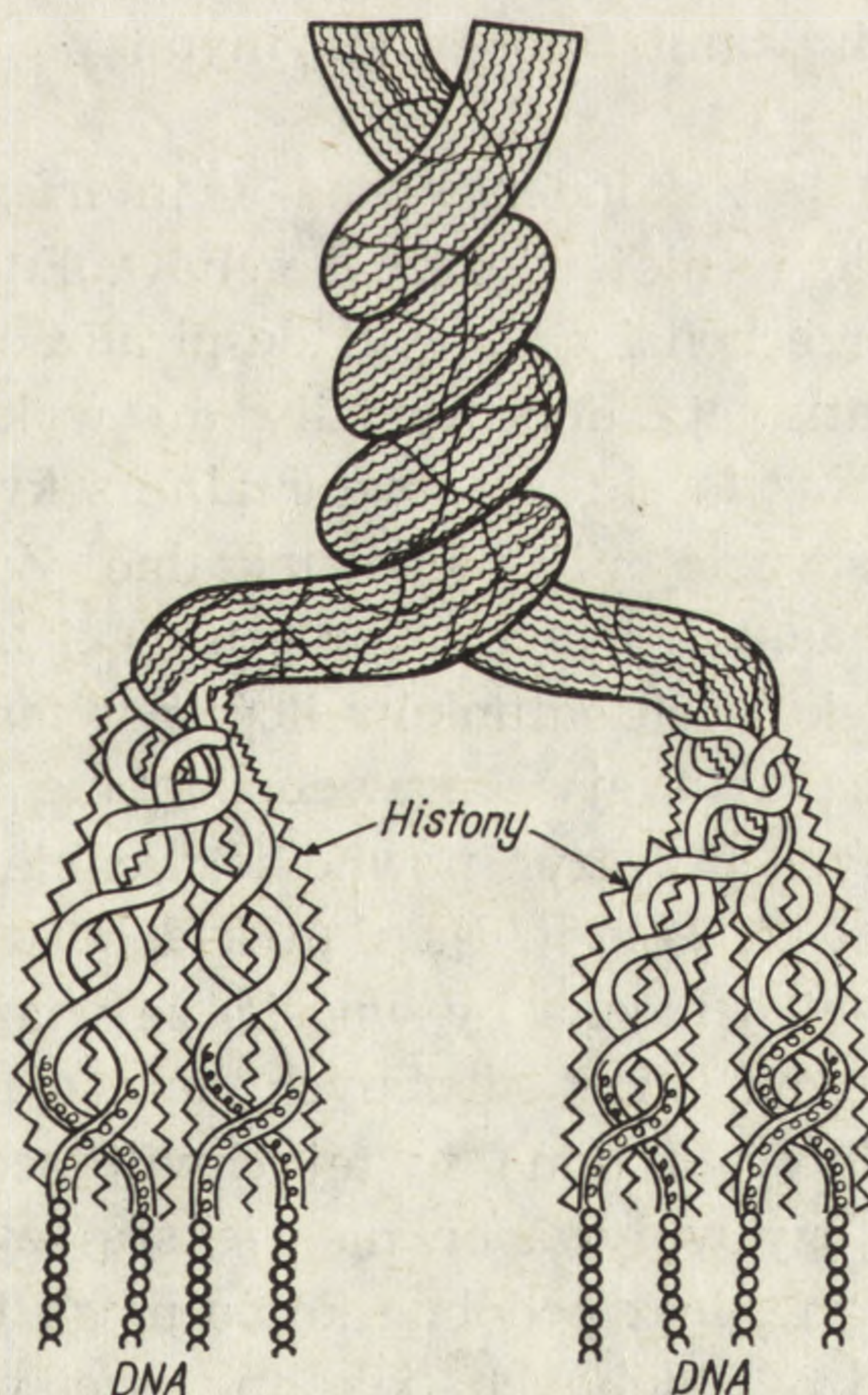
d) Chromomery — są to odcinki szczególnie silnie zspiralizowanej chromonemy, są to elementy stałe o powtarzalnej lokalizacji w poszczególnych chromatydach. Większość badaczy uważa dzisiaj, że chromomery są to po prostu nałożone na siebie sploty spiral (krzyżujących się i nakładających się na siebie w rzucie prostopadłym).

Odcinki chromomerów można odnieść do opisanego przez Craig-Holmes i Shaw [6] obszaru globularnego DNA w odróżnieniu od formy włókniastej fibrylarnego DNA odpowiadającego chromonemie w dawnym ujęciu.

Problem wieloniciowej budowy chromosomów u zwierząt wyższych

jest jak dotąd sprawą otwartą. Badanie seryjnych skrawków w mikroskopie elektronowym wykazuje, że cały chromosom złożony jest z 8 łańcuchów elementarnych (rys. 1), które mogą być skrócone splotem paranemicznym o luźno ułożonych, łatwych do rozdzielenia filamentach lub splotem plektonemicznym o cechach zwoju spiralnego. Spirale te mogą wykazywać niezależnie od zwojów pierwszorzędowych dodatkowo jeszcze spiralizację wtórną lub drugorzędową ustawioną prostopadle do poprzedniej. Spiralizacja chromonemy jest zjawiskiem zmiennym, cyklicznym i charakterystycznym zarówno dla mitozy, jak i mejozy. Maksimum kondensacji skrętów osiąga chromosom w stadium metafazy. Oglądany w kariogramach ludzkich różny stopień spiralizacji jest ilustracją różnych stadiów tego procesu. W interfazie heterochromatyna wykazuje miejsca niezupełnej despiralizacji, natomiast euchromatyna jest przejawem pełnego rozkręcenia spirali.

Największa trudność w zrozumieniu ultrastruktury chromosomu polega na wytłumaczeniu możliwości upakowania w chromosomie cząsteczki DNA, której długość spirali jest rzędu kilku centymetrów do 1 metra. Stąd też większość badaczy przyjmuje, że chromatydy i chromonemy mają ultrastrukturę włókienkową, a grubość włókna 3 nm, co może być uważane za cząsteczki nukleoproteidów [25]. Najczęściej przyjmowany model substruktury chromosomu przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Model struktury chromosomu złożony z 8 łańcuchów elementarnych DNA

## ZRÓŻNICOWANIE POPRZECZNE CHROMOSOMU

Na podstawie rekombinacji, badań nad genami sprzężonymi, ekspresją fenotypową i innych można stwierdzić, że geny ułożone są w chromosomie liniowo. Substratem chemicznym informacji genetycznej jest DNA.

Jednym z nie rozstrzygniętych do końca zagadnień jest problem czy DNA przebiega wzdłuż chromosomu w postaci cząsteczki „ciągłej”, czy też składa się z odrębnych bloków biopolimeru powiązanych ze sobą za pomocą „łączników”. Badania enzymatyczne przemawiały za koncepcją ciągłą, autoradiograficzne przeciwnie wykazały, że np. u *Drosophila melanogaster* w chromosomie X istnieje około 50 punktów replikacyjnych. Za koncepcją bloków przemawia również fakt, że teoretyczny czas rozwinięcia spirali DNA powinien być znacznie większy niż faktyczny, który jak wiadomo wynosi około 6 godzin [25].

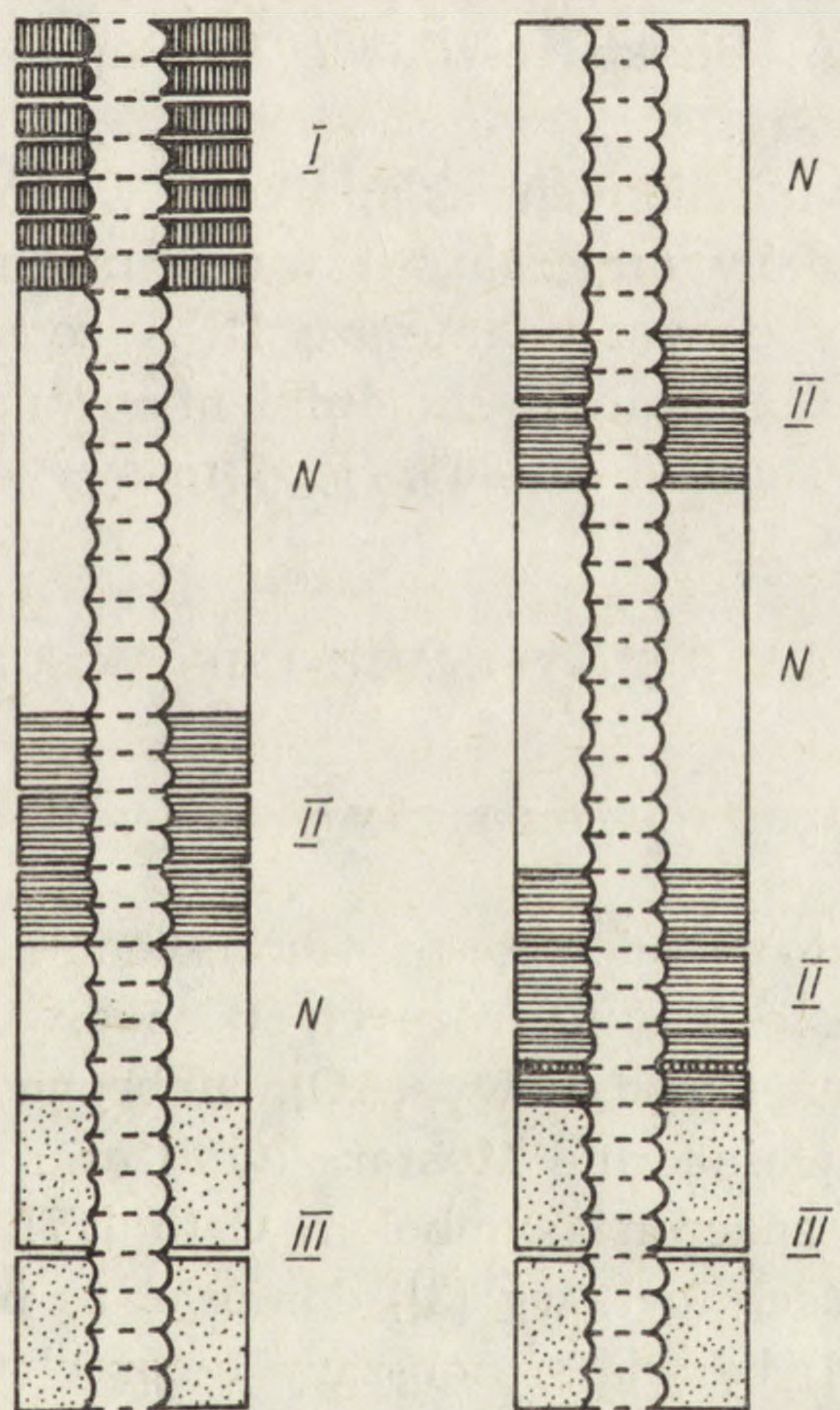
Chromatyna chromosomalna w interfazie może zachowywać się różnie i jeżeli przyjmuje formę skondensowaną nazywamy ją heterochromatyną. W świetle współczesnych poglądów wydaje się, że jest ona nieczynna genetycznie, replikuje w późnej interfazie i tworzy chromocentra i bloki okołocentrometryczne. W komórkach somatycznych heterochromatyna ma inny cykl spiralizacji niż euchromatyna i inny czas replikacji [5]. Chromosomy płciowe są zwykle heterochromatyczne i tworzą w procesie lionizacji ciało X (ciało Barra) lub ciało Y dające się łatwo uwidocznic technikami fluorescencyjnymi po zabarwieniu pochodnymi atebryny.

Euchromatyna nie jest skondensowana w interfazie i jest czynna genetycznie, znajduje się w niej większość genów. Euchromatyna w cyklu życiowym komórki przechodzi cały cykl despiralizacji i kondensacji.

Badania nad renaturacją doprowadziły do wykrycia powtarzalnych sekwencji w DNA. Okazało się, że powtarzalne sekwencje renaturują po denaturacji o wiele szybciej niż niepowtarzalne. Zaistniała więc możliwość określenia w badanym genomie procentowej zawartości powtarzalnych sekwencji. U niektórych gatunków ilość powtarzalnych jest znaczna i może sięgać 50%, są to miejsca prawdopodobnie nieczynne genetycznie. Wskutek nieznanych przyczyn pewne sekwencje DNA ulegają wielokrotnemu powtórzeniu [7, 24, 26]. Na skutek doboru naturalnego wzrasta ich częstość w populacji i można by wnosić, że wiążą się one korzystnie z efektem genetycznym. Przy drobnych mutacjach i translokacjach wzrasta ich różnorodność. Trudno w tej chwili ocenić biologiczną rolę powtarzalnego DNA, czy wpływa on na większą szybkość syntezy, bądź też liczne nie identyczne, lecz podobne kopie mogą tworzyć klasy związków białkowych bardzo podobnych, jak np. przeciwciała (rys. 2).



Powtarzalne sekwencje DNA występują w obszarach o większym zagęszczeniu (DNA globularny wg Craig-Holmes i Shaw [6] odpowiadają one heterochromatynie występującej w niektórych odcinkach chromosomów i wspomnianych już prążków w chromosomach politenicznych. Ogólnie można przyjąć, że charakterystyczna III-rzędowa konfiguracja DNA tworząca formy kłębkowe (superheliks) zawiera geny regulatory kontrolujące biosyntezę przez sprzężenie zwrotne z użyciem przenośników w postaci metabolitów. Sutton [24] przypisuje powtarzalnym sekwencjom rolę uwarunkowania czynnych genetycznie „wstawek” w DNA globularnym. DNA fibrylarny jest nośnikiem informacji o sekwencji aminokwasów, czyli zawiera geny strukturalne. Oczywiście 2 konformacje DNA nie wykluczają obecności mechanizmów kontroli genetycznej na poziomie molekularnym [6].



Rys. 2. Powtarzalne sekwencje w genomie. Cyfry rzymskie — sekwencje powtarzalne; N — sekwencje niepowtarzalne

Głównym składnikiem chromosomu jest kompleks DNA–histony. Ułożenie histonów może być różne, są one zwinięte spiralnie i tworzą bloki łączące ze sobą przylegające nici DNA, ponieważ leżą prostopadłe do zwojów (rys. 1). Prawdopodobnie histony ułożone są w dużej bruździe,

wewnątrz spirali DNA, stąd też mogą one odgrywać istotną rolę w procesie kondensacji chromosomu. Uważa się obecnie, że histony w rozwiniętej euchromatynie są słabiej związane z DNA niż w heterochromatynie [13]. Niektórzy autorzy wiążą to z zawartością grup-SH w euchromatynie i S-S w heterochromatynie (cyt. wg [18]).

Histony, jak wiadomo, dzielimy na dwie grupy — bogate w lizynę lub argininę — te pierwsze łatwo ulegają trawieniu trypsyną i tworzą słabsze wiązanie z DNA niż histony bogate w argininę. W chromosomie obok białek zasadowych — histonów znajduje się drugi rodzaj białek kwaśnych — tzw. resztkowych. Funkcja białek resztkowych, które mają liczbę obrotów zbliżoną do RNA, nie została ostatecznie wyjaśniona. Białka resztkowe mogą być związane podobnie jak histony z kontrolą kondensacji chromosomów (w czasie metafazy wzrost 8-krotny białek resztkowych) lub też stanowić element konkurujący z histonami jeżeli chodzi o łączenie się z DNA. Białka resztkowe tworzą z RNA podobne kompleksy jak DNA-histony.

Oprócz wyżej wymienionych składników w chromosomie znajdują się lipidy, ze składników mineralnych wapń, magnez i żelazo. Magnez prawdopodobnie łączy enzym polimerazę DNA ze szkieletem chromosomu. Najliczniej reprezentowanym składnikiem chromosomu jest kompleks DNA-histony, który stanowi 60–80% jego masy.

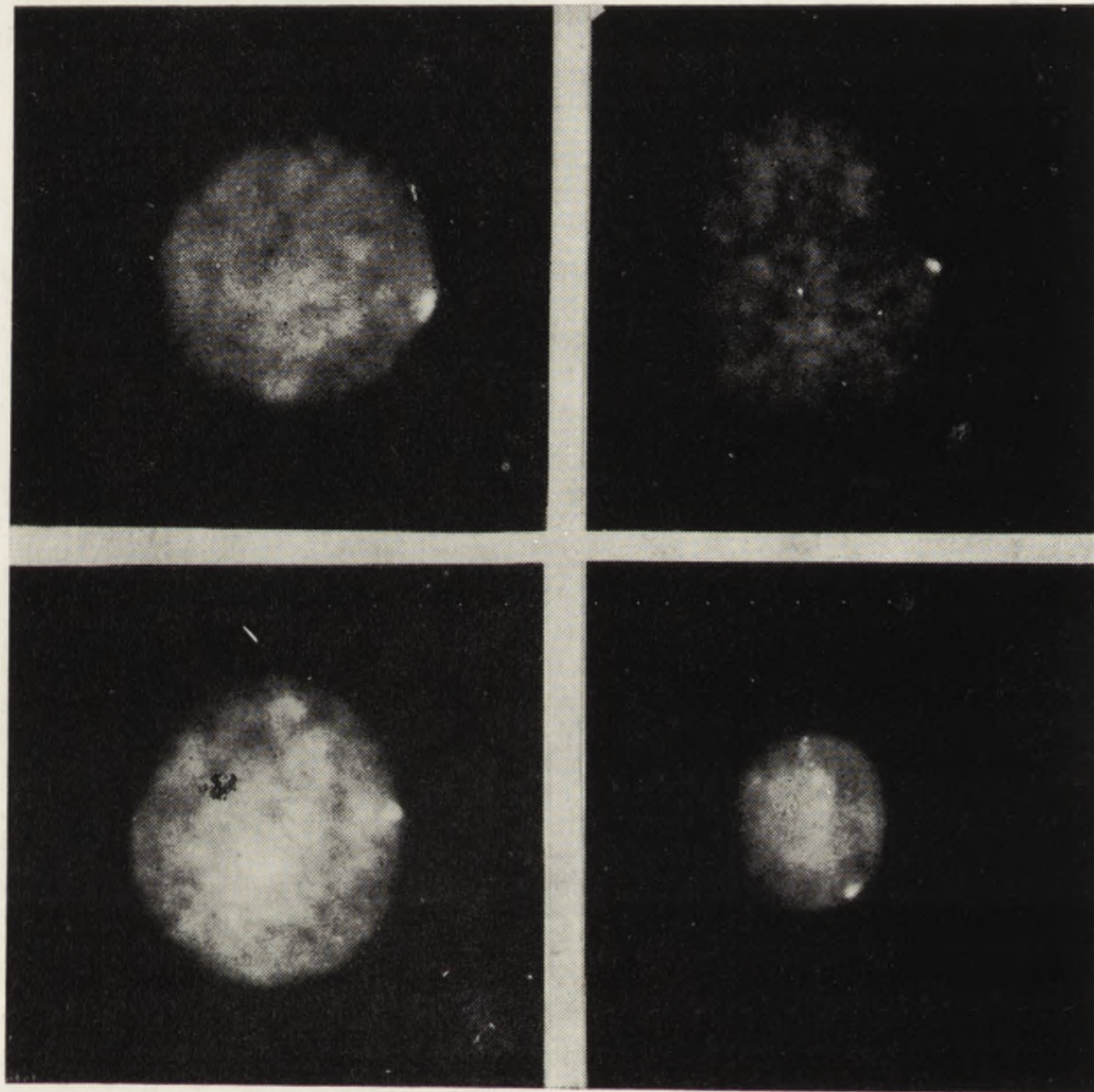
## METODY IDENTYFIKACJI CHROMOSOMÓW

### FLUORESCENCJA CIAŁKA Y

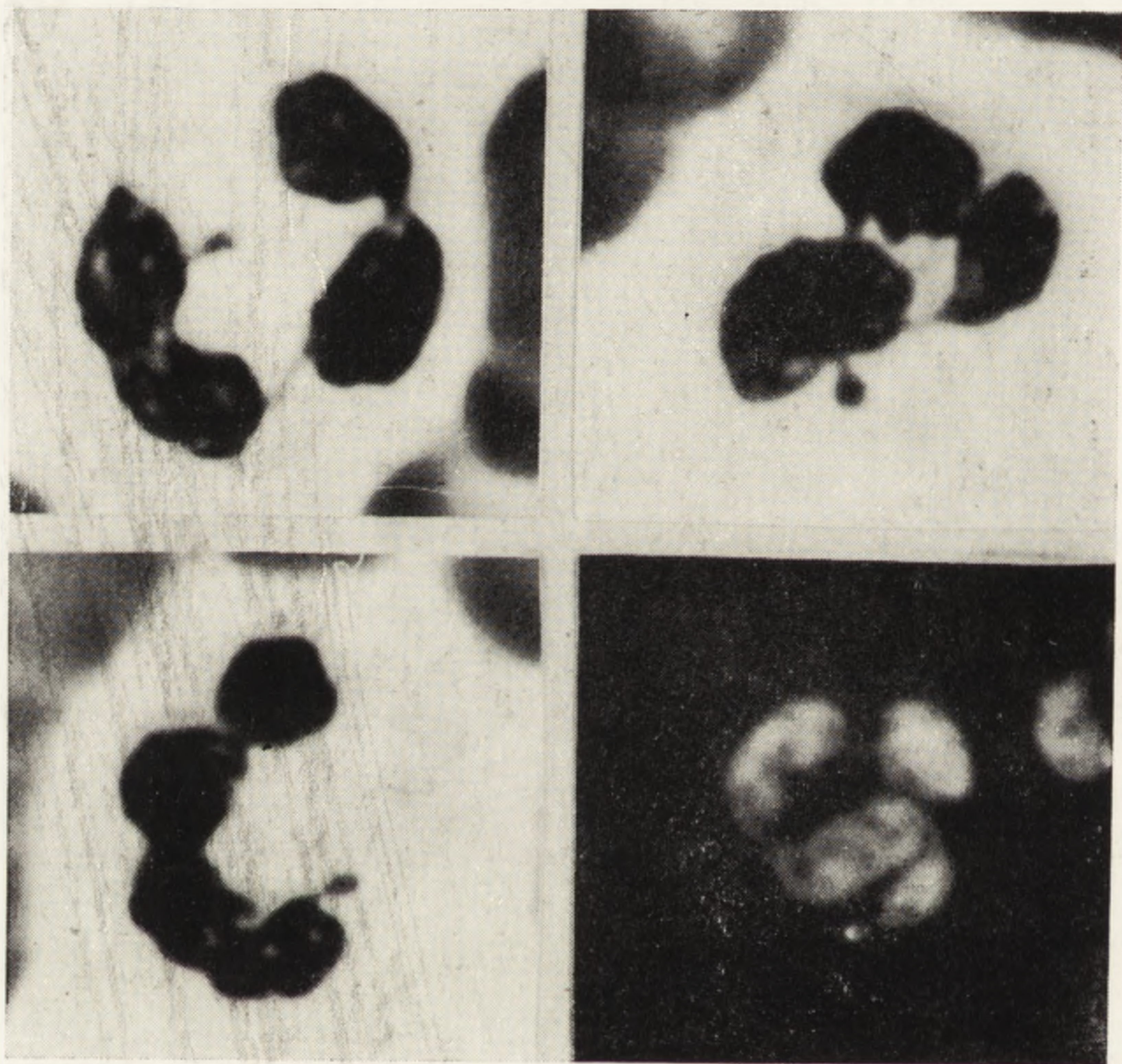
Od wielu lat było wiadomo, że fluorescencję struktur jądrowych można uzyskać po stosowaniu różnych pochodnych akrydyny, takich jak: proflawina, oranż akrydynowy (AO), atebryna (Quinacrine-Q) i jej pochodna iperytowa Quinacrine Mustara (QM) oraz ostatnio zastosowana w Polsce pochodna oznaczona symbolem C-15 [17].

W roku 1969 L. Zech (cyt. wg [3]) doniosła, że pod wpływem iperytu akrichininowego (QM) barwią się obszary heterochromatyny w chromosomach *Vicia faba* i *Trillium erectum*, jak również w płytkach metafazalnych limfocytów krwi ludzkiej. Jak się okazało po identyfikacji są to części ramion długich chromosomu Y. W ten sposób uzyskaliśmy metodę pozwalającą w jądrze interfazalnym na wykrycie sekschromatyny męskiej analogicznie zlokalizowanej jak ciałka Barra (rys. 3).

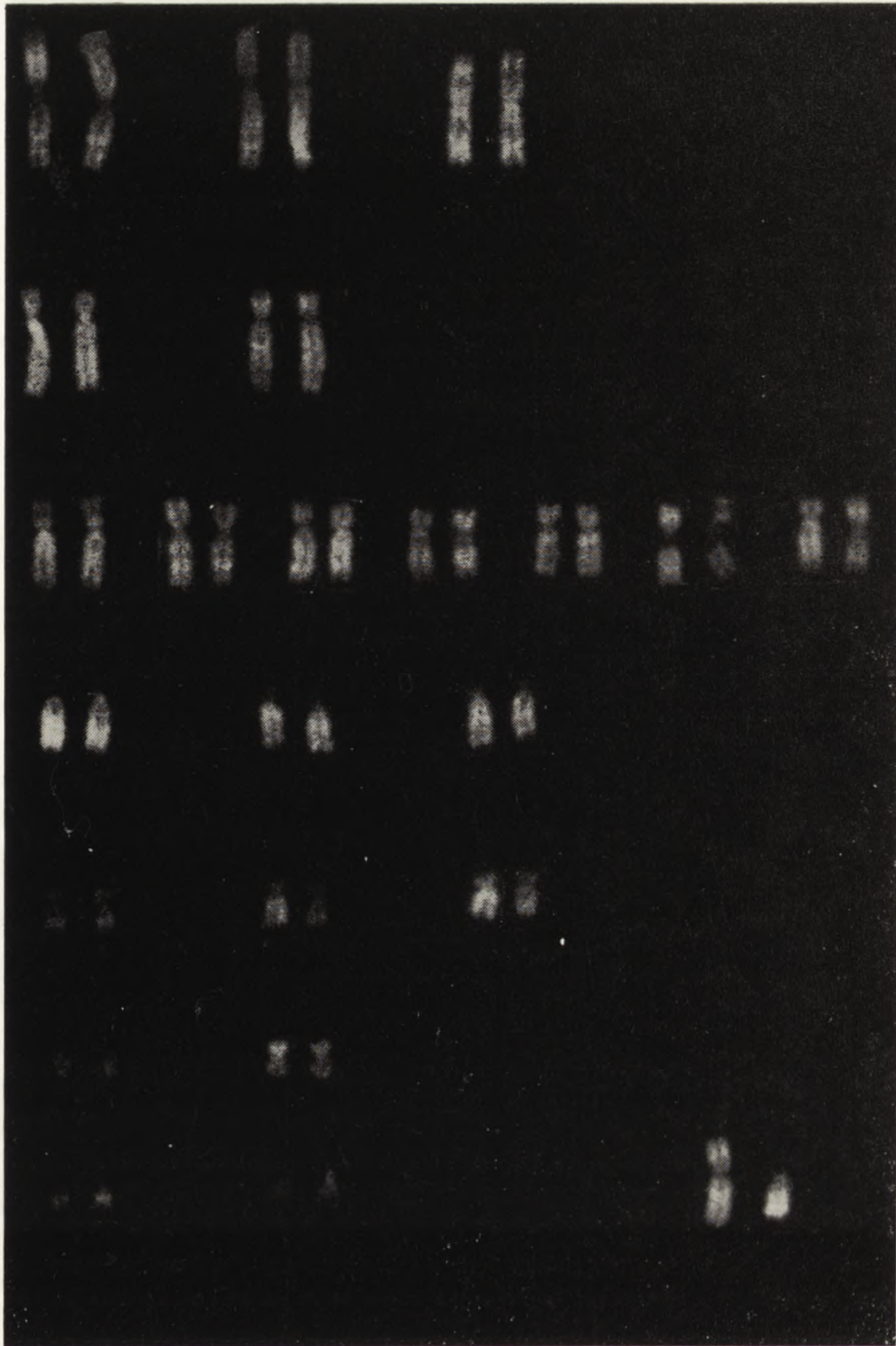
Metoda ta została przystosowana również do wybarwienia fluorochromem, tzw. pałeczek dobosza w granulocytach obojętnochłonnych pochodzących z krwi osobników męskich (rys. 4).



Rys. 3. Ciało płciowe Y w jądrach interfazalnych obserwowane po wybarwieniu QM



Rys. 4. Pałeczki dobosza barwione metodami rutynowymi i fluorescencyjnymi (QM)



Rys. 5. Kariogram ułożony wg 24 wzorców chromosomowych uzyskanych po wybarwieniu C-15 w mikroskopie fluorescencyjnym

<http://rcin.org.pl>

## IDENTYFIKACJA CHROMOSOMÓW METODĄ FLUORESCENCJI

Zastosowanie dobrych fluorochromów, jak np. iperytu akrichinowego (QM) lub C-15 pozwoliło ustalić, stałe powtarzalne widma fluorescencyjne charakterystyczne dla każdej pary chromosomów. Stwierdzono, że zachodzi daleko idąca zgodność między obiema chromatydami siostrzanymi, co więcej wykazano również dużą zgodność między chromosomami homologicznymi, leżącymi nawet daleko od siebie w płytce metafazalnej. Chromosomy metafazalne wykazują obszary bądź silniej, bądź słabiej fluoryzujące i w ten sposób tworzą charakterystyczne dla każdego chromosomu układy poprzecznych prążków (rys. 5). U człowieka pewne części chromosomów autosomalnych niezależnie od chromosomu Y wykazują silną fluorescencję, są to: okolica centromeru chromosomu nr 3 oraz satelity chromosomów z grupy D i G. Malonov i wsp. [19] podają, że w kariotypie ludzkim obszary prążków wykazujących silną fluorescencję wynoszą 64%, natomiast pozostałe 36% to miejsca w chromosomie ciemne. W ten sposób powstał zestaw 24 wzorców, o dużym stopniu powtarzalności, umożliwiający ułożenie prawidłowego kariogramu z fotografii za pomocą wzrokowego wyboru. Jak wykazała kontrola fluorymetryczna, błąd w metodzie wizualnej dotyczy 1 lub 2 chromosomów w kariogramie. Należy więc stwierdzić, że jest to olbrzymi postęp, w porównaniu z klasycznymi metodami, umożliwiający ułożenie prawidłowego kariogramu w sposób mniej skomplikowany niż w autoradiografii [2, 3, 4, 18 19].

Technika barwienia QM umożliwiła również identyfikację wszystkich biwalentów człowieka w komórkach płciowych uzyskanych drogą biopsji jąder. Stwarza to warunki do bardziej dokładnego badania chiazm w poszczególnych biwalentach, co jest warunkiem ustalenia ich długości mapowej. Wstępne obserwacje wskazują, że przynajmniej niektóre chiazmy nie są rozmieszczone przypadkowo.

## METODY FOTOELEKTRYCZNE IDENTYFIKACJI CHROMOSOMÓW

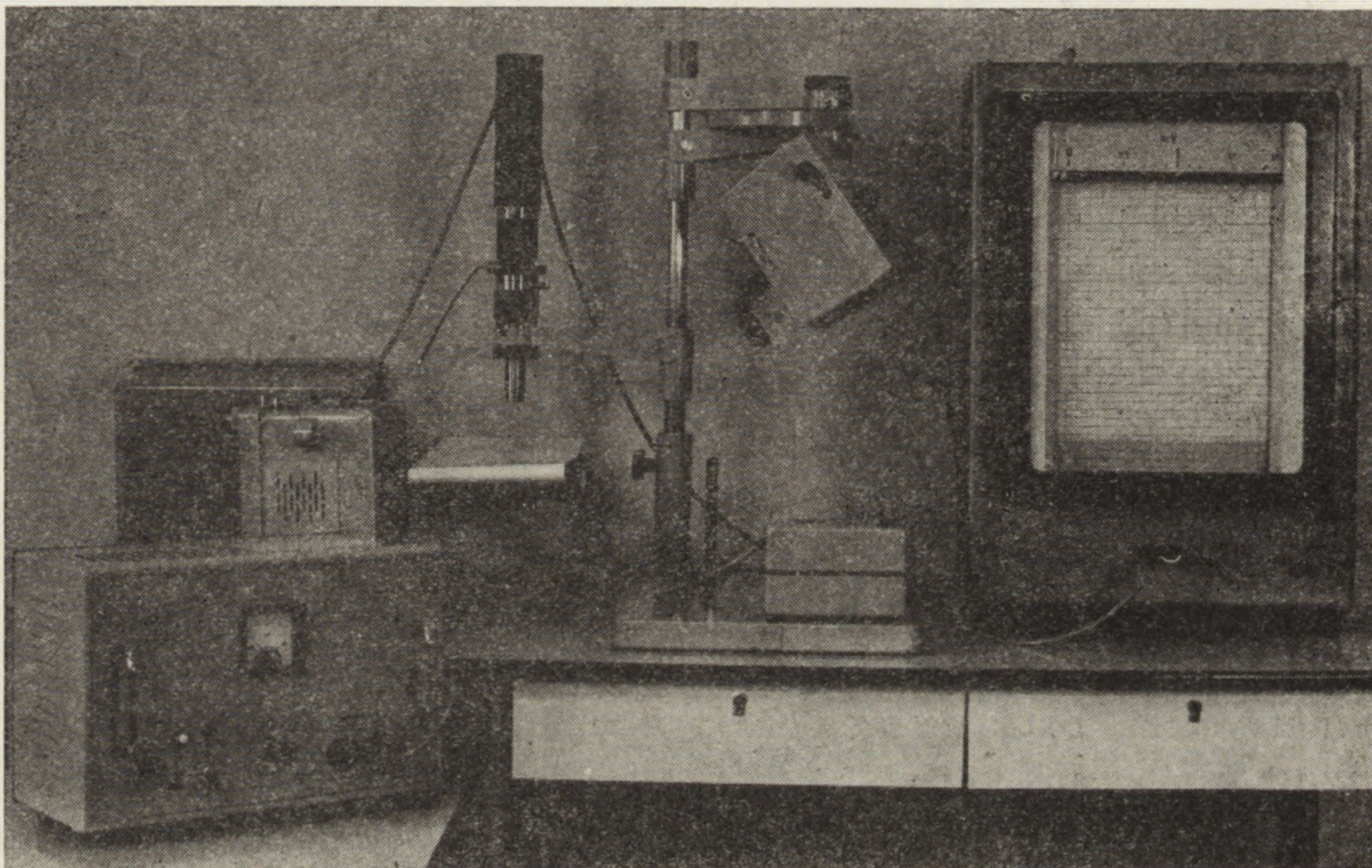
Aparatura fluorymetryczna opisana została przez Casperssona i wsp. (cyt. wg [12]); ma ona wystarczająco dużą zdolność rozdzielczą, aby zmierzyć intensywność fluorescencji w poszczególnych częściach chromosomu. Tą drogą uzyskano charakterystyczne krzywe, gdzie rzędna reprezentuje natężenie fluorescencji w jednostkach bezwzględnych jako funkcję długości mierzonego chromosomu.

W celu identyfikacji i innych potrzeb można dokonywać pomiarów dwoma sposobami, najlepiej pomiarem punktowym wzdłuż długiej osi chromatydy

a) metoda bezpośrednia na płytce metafazalnej. Ujemną stroną tej

techniki jest zjawisko szybkiego wygasania fluorescencji QM — już po 4 minutach świecenie wygasa w 50%, po 12 minutach fluorescencja ma tylko 25% intensywności wyjściowej,

b) metoda pośrednia za pomocą mierzenia fluorescencji sfotografowanej uprzednio na błonie lub papierze fotograficznym. Błędy w tej



Rys. 6. Aparatura fotometryczna do pomiarów wzorów prążkowych

metodzie można odnieść do warunków ekspozycji i obróbki fotograficznej, podważają one rzetelność wartości bezwzględnych, natomiast wartość względna jest rejestrowana dostatecznie dokładnie. Znaczy to, że możemy dla danej chromatydy wykazać położenie charakterystycznych dla krzywej maksimów i minimów oraz punktów przegięcia krzywej.

W naszym zakładzie skonstruowano stosunkowo prostą aparaturę umożliwiającą badanie wzorów prążkowych chromosomów metafazalnych [12]. Składa się ona z następujących elementów:

1) Skład fotometru — ftopowielacz M 12 75 35 firmy Zeiss + zasilacz sieciowy ftopowielacza. Pole mierzone przez fotometr ma kształt koła o średnicy 0,3 mm. Fotometr umocowany jest nieruchomo i połączony z zasilaczem sieciowym oraz urządzeniem zapisującym.

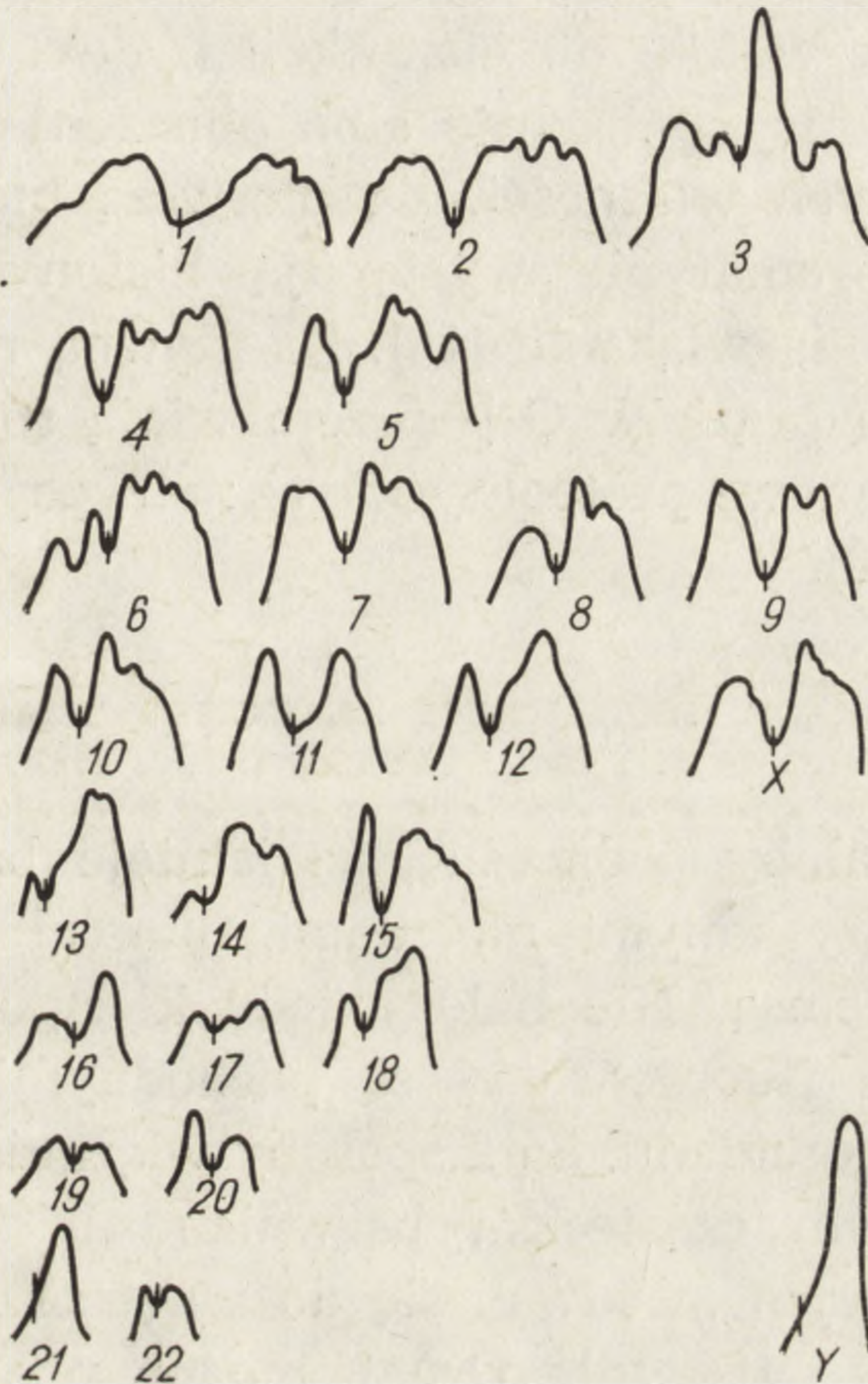
2) Oświetlenie: żarówka 100 W 12 V z płaskim żarnikiem, z kondensorem. Lampa zasilana jest przez stabilizator napięcia SpK 100/220 (Zeiss) oraz transformator.

3) Urządzenie przesuwające obiekt mierzony jest to przystosowany kimograf elektryczny dwubębnowy (Zimmermann) ze zmniejszonymi średnicami bębna do 2 cm napędzającymi pas płócienny.



4) Urządzenie zapisujące — rekorder (prod. Willy Giede, Type c KBT EM 1961). Zapis dokonuje się automatycznie na taśmie papierowej.

Aparatura zapewnia wysoką jakość pomiarów oraz pełną powtarzalność wyników (rys. 6, 7).



Rys. 7. Fotometryczny zapis widma fluorescencyjnego 24 wzorów prążkowych garnituru chromosomalnego

#### BARWIENIE CHROMOSOMÓW ZMODYFIKOWANĄ METODĄ GIEMSY

Metody te zostały zapoczątkowane w 1971 r. i było to właściwie przystosowanie wcześniej znanych technik denaturacji i renaturacji DNA. Zasadniczo można je podzielić na metody blokowe — w których wybarwiają się przede wszystkim okołocentromerowe bloki heterochromatyny oraz metody prążkowe — ujawniające pasma silniej barwiące się Giemśą (G+). Ogółem w chwili obecnej opisano kilkanaście różnych metod opartych na różnych procedurach przygotowawczych przed stosowaniem barwienia Giemśą [1, 8–10, 14, 20, 22, 23, 27].

Heterochromatyna zawiera jak wiadomo powtarzalne sekwencje DNA, które szybciej renaturują i są G+, można by wnosić, że metody zmodyfikowanego barwienia Giemśą wykazują w chromosomie miejsca powtarzalnego DNA. I tutaj występuje niezgodność, bowiem jak wykazały badania Corneo i wsp. (cyt. wg [18]) u człowieka wysoce powtarzalne

DNA występuje zaledwie w 2,5%, a średnio powtarzalne w 15% zlokalizowane głównie w okolicach centromerowych, natomiast pasma G+ zajmują około 50% genomu. Przemawia to za tym, że są i inne mechanizmy u podłoża tego zjawiska.

Rozwój innych metod oparty był na stosowaniu różnych roztworów solanek służących pierwotnie do ekstrakcji białek. Prawdopodobnie stosowanie takiej procedury powoduje albo obnażenie DNA z białek, albo zmianę ich chemicznych własności. Za pierwszą możliwością przemawia fakt, że w heterochromatynie występują histony bogate w argininę i tworzą silniejsze z nią wiązanie [13]. Za główną rolę składnika białkowego w powstawaniu prążków G+ przemawiają również metody oparte na stosowaniu enzymów proteolitycznych: trypsyny, ficyny, papainy i pronazy [9] (rys. 8).

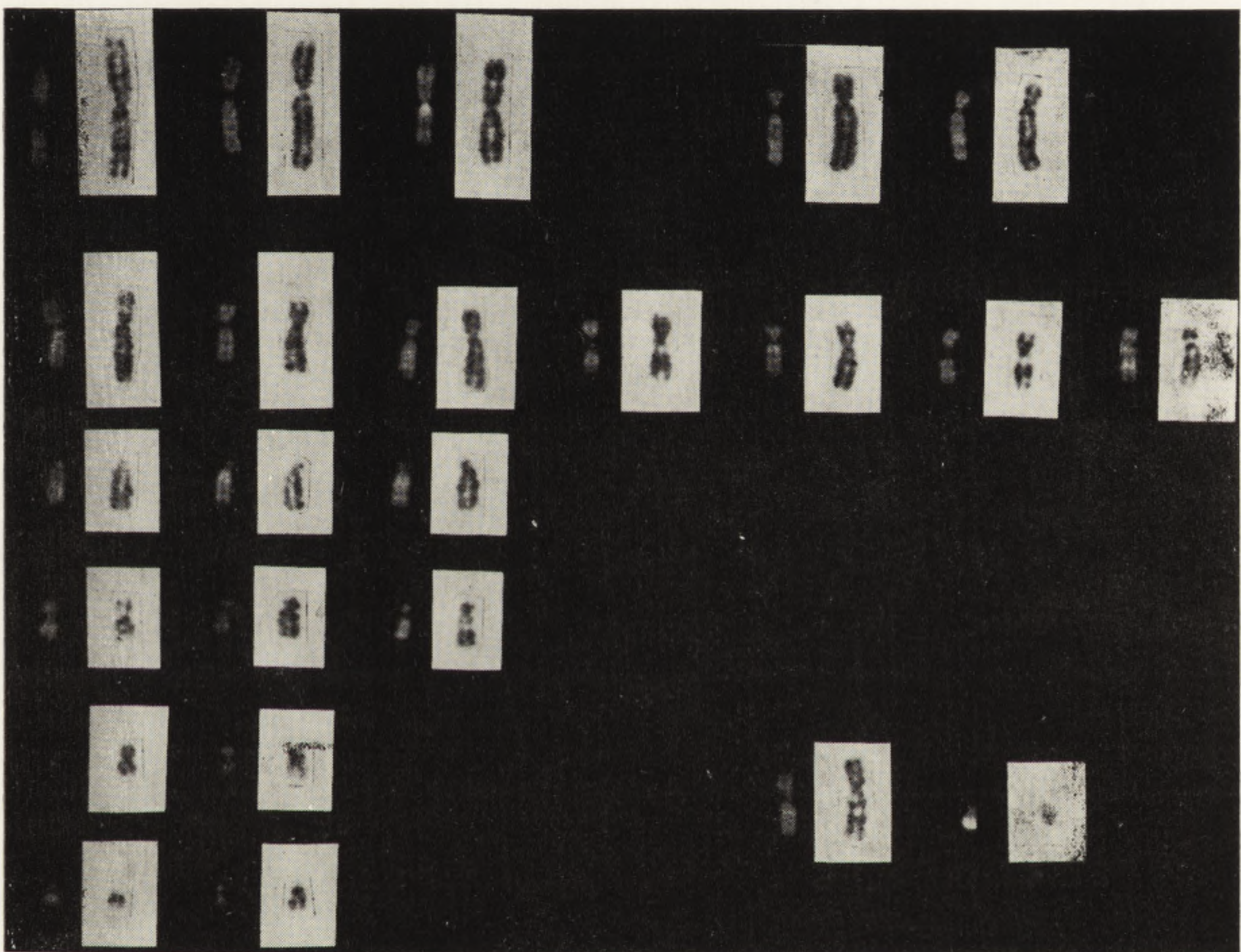
TEORIE TLUMACZĄCE MECHANIZMY REAKCJI W TRAKCIE BARWIENIA  
FLUOROCHROMAMI I ZMODYFIKOWANĄ METODĄ GIEMSY

Na wstępie należałoby podkreślić, że istnieje bardzo duża zbieżność między wynikami, uzyskanymi metodami fluorochromowymi i różnicowym barwieniem Giemsa. Nie należy jednak zapominać o istniejących różnicach. Stosowane fluorochromy są pochodnymi akrydyny i tworzą kompleksy z nukleoproteidami. Są 2 sposoby wiązania się akrydyn z DNA. W sposobie pierwszym cząsteczka barwnika elektrostatycznie wiązana z anionem fosforanowym „wsuwa” się do wnętrza spirali DNA, tworząc tzw. interkalację [11, 15, 16]. Drugi model polega na powstawaniu wiązań zewnętrznych do grup  $PO_4$  — jest to interkalacja częściowa tworząca kompleksy w konformacjach kłębkowych. Jest to niesłychanie ważne w kontekście z formami globularnego DNA [6].

Wbrew pierwotnym sugestiom uważa się dzisiaj, że wygaszanie fluorescencji zależy od obecności guaniny w parach komplementarnych zasad azotowych DNA, natomiast wzrost intensywności fluorescencji powstaje w tych miejscach gdzie występują pary A-T. Tak więc zjawisko fluorescencji DNA zależy od składu zasad komplementarnych.

Wszystkie wspomniane techniki preparowania chromosomów przed barwieniem Giemsa po użyciu roztworów solanek i enzymów proteolitycznych przemawiają za współdziałaniem komponentu białkowego w powstawaniu prążków G+, przy czym należy brać pod uwagę zarówno białka histonowe, jak i resztkowe.

W materiale roślinnym analiza obrazów fluorescencyjnych po QM lokalizowała świecenie głównie w obszarach heterochromatyny, a ściślej mówiąc z jej stanem spiralizacji. W chromosomach bobu rozmieszczenie DNA wzdłuż chromosomu jest zaskakująco jednolite, natomiast w profazie na skutek struktury chromomerycznej uzyskuje się zróżnicowane pasma fluorescencyjne. Badania nasze (w druku) nad politenicznymi chromoso-



Rys. 8. Zestawienie w kariogramie ludzkim homologicznych chromosomów, w każdej parze jeden chromosom wybarwiony jest metodą fluorescencyjną, drugi — zmodyfikowaną metodą Giemsy

<http://rcin.org.pl>

mami olbrzymimi wykazały również, że pasma chromomeryczne tych chromosomów pokrywają się w barwieniach klasycznych z prążkami fluorescencyjnymi (QM) oraz z różnicowym barwieniem Giemśa (G+).

Jeżeli powrócimy do naszych rozważań, że chromomery są konfiguracją kłębkową (DNA globularny) możemy mieć do czynienia z efektem sumowania się miejscowego kompleksów akrydynowych z DNA wzmocnionych dodatkowo zjawiskiem interkalacji częściowej. Wydaje się że w wytłumaczeniu mechanizmu zjawiska powstawania wzorców prążkowych chromosomów należy brać pod uwagę wiele reakcji, a otrzymane wyniki mogą być sumą i wypadkową powinowactwa chemicznego fluorochromów i Giemsy do substratu jakim jest złożony w swej budowie chromosom.

Z praktycznego punktu widzenia należałoby porównać metody fluorescencyjne i zmodyfikowanego barwienia Giemśa i wypowiedzieć się, która z nich jest lepsza. Metody różnicowego barwienia Giemśa cechuje:

- a) prostota techniki i trwałość preparatu;
- b) wyraźniejsze i bardziej szczegółowe prążki;
- c) wzory widoczne w większym odsetku metafaz, nawet w chromosomach o dużym stopniu kondensacji;
- d) że do barwienia i diagnostyki wystarcza rutynowe wyposażenie pracowni.

Dalszy rozwój metod, być może umożliwi wprowadzenie technik specyficznych.

Mimo tych wszystkich zalet są jeszcze w chwili obecnej poważne zastrzeżenia. Metody te dają nie zawsze powtarzalne wyniki, nawet w polu jednego preparatu. Fakt, że jest kilkanaście receptur, świadczy o tym, że jesteśmy na etapie nie zakończonych poszukiwań rutynowej metody diagnostycznej. Metody fluorochromowe mają znacznie wyższy współczynnik powtarzalności, co umożliwia stosowanie metod fotometrycznych, a tym samym większą obiektywizację w ocenie wyników. Można więc powiedzieć, że obie metody, jak dotąd, spełniają bardzo ważną rolę w następujących kierunkach:

- 1) w sferze poznawczej wzbogacają naszą wiedzę o substrukturze chromosomu,

- 2) w sferze praktycznej udoskonalają diagnostykę cytogenetyczną i być może pozwolą na wykrywanie subtelnych aberracji struktury subchromosomowej, co jest zagadnieniem niesłychanie ważnym w dobie coraz szerzej stosowanej diagnostyki prenatalnej.

Istotny postęp w cytogenetyce w latach siedemdziesiątych przybiera tak gwałtowne tempo, że trudno dzisiaj nawet przewidzieć kierunki dalszego rozwoju w erze automatyzacji i komputeryzacji.

## LITERATURA

- [1] ARRIGHI F. E., HSU T. C., 1971 — Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81.
- [2] CRICK F., 1971 — General model for the chromosomes of higher organismus, *Nature*, **234**: 25.
- [3] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSEN C., 1970 — Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes, *Expt. Cell. Res.*, **60**: 315.
- [4] CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. I., FOLEY G. E., WAGH U., SIMONSSON E., 1969 — DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of metaphase nucleus, *Expt. Cell. Res.*, **58**: 141.
- [5] CASPERSSON T., LOKMAKKA G., ZECH L., 1971 — The 24 fluorescence pattern of human metaphase chromosomes distinguishing characters and variability, *Hereditas*, **67**: 89.
- [6] CRAIG-HOLMES A., SHAW A., 1971 — Polymorphism of human constitutive heterochromatin, *Science*, **174**: 702.
- [7] De la CHAPELLE A., SCHRÖDER J., RITVA-KAJSA SOLANDER, 1971 — Repetitions DNA in mammalian chromosomes, *Hereditas*, **69**: 149.
- [8] DRETS M. E., SHAW M., 1971 — Specific banding patterns of human chromosomes, *Proc. Acad. Sci. USA*, **68**: 2073.
- [9] DUTRILLAUX B., GRONCHY I., de FIANZ C., LEJEUNE J., 1969 — Cytogenetique humaine mise en evidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **44**: 201.
- [10] GAGNE R., TANGUAY R., LABORGE C., 1971 — Differential staining pattern of heterochromatin in man. *Nature, New Biol. (Lowd)*, **232**: 29.
- [11] GERSCH N. F., JORDAN D. C., 1965 — Interaction of DNA with aminoacridines *J. Mol. Biol.*, **13**: 138.
- [12] HÜBNER H., POJDA Z. — Fotoanalizator przystosowany do badań fluorescencji chromosomu (w druku).
- [13] JOHNS E. W., 1972 — Histones, chromatin structure and RNA synthesis, *Nature, New Biology*, **237**: 87.
- [14] KORSAK E. — Metody różnicowego barwienia chromosomów barwnikiem Giemsa (w druku).
- [15] LEVMAN L. S., 1961 — Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, **3**: 18.
- [16] LEVMAN L. S., 1963 — The structure of the DNA — acridine complex, *Proc. W.A.S.* **49**: 94.
- [17] LIMON J., HÜBNER H., LEDÓCHOWSKI A. — The use of 3-bromo-7-methoksy-9/4-dimethyloaminobutyloamino-acridine — 2 HCl (Preparation C-15) for fluorescence analysis of human metaphasyl chromosomes, *Bull. Acad. Pol. Sci.* (w druku).
- [18] LIMON I., KOŁDEJ K. — Zjawisko różnicowej fluorescencji chromosomów wybarwionych barwnikami akrydynowymi (w druku).
- [19] MANOLOW G., MALONOV Y., LEVAN A., 1971 — The fluorescence pattern of the human karyotype, *Hereditas*, **33**: 273.
- [20] PATIL S. R., MERRICH S., LUBS H., 1971 — Identification of each human chromosome with a modified Giemsa Stain. *Science*, **173**: 821.
- [21] RIDLER M. A. C., 1971 — Banding patterns of metaphase chromosomes in Downs syndrome, *Lancet*, **II**: 354.

- [22] SEABRIGHT M., 1972 — The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man, *Chromosoma* (Berlin), **36**: 204.
- [23] SUMMER A. T., EVANS H. I., BUCKLAND R. A., 1971 — New technique for distinguishing between human chromosomes, *Nature New Biology*, **231**: 31.
- [24] SUTTON W. D., 1972 — Chromatin packing, repeated DNA sequences and gene control, *Nature New Biology*, **237**: 70.
- [25] SWANSON C. P., MERZ T., YOUNG W., 1970 — *Cytogenetyka*, PWN, Warszawa.
- [26] SZALA S., CHORAŻY M., 1972 — Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów. Monografie biochemiczne. PWN, Warszawa.
- [27] YUNIS I. J., ROLDAN L., YASMINEK W. G., LEC I. C., 1971 — Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes, *Nature*, **231**: 532.

*Otrzymano: styczeń, 1973.*

*Przyjęto: kwiecień, 1973.*

*Adres autora: ul. Szmaragdowa 9, 91-528 Łódź.*

Faint, illegible text, likely a list of names and titles, possibly a staff directory or index.



## WIRUSY ONKOGENNE RNA

Teresa ŻAK i Czesław RADZIKOWSKI

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda,  
Polska Akademia Nauk, Wrocław

*Streszczenie.* W artykule omówiono przyczynową rolę wirusów onkogennych RNA (wirusów onkorna) w występujących naturalnie mięsakach i białaczkach u kręgowców. Przedstawiono morfologię wirusów onkorna, ich podział, skład chemiczny i cechy antygenowe. Omówiono udział polimerazy DNA kierowanej przez RNA w replikacji tych wirusów. Przytoczono aktualne poglądy na mechanizm onkogenezy pod wpływem onkogennych wirusów RNA: hipotezy „prowirusa”, „onkogenu i wirowirusa” oraz „protowirusa”.

Wirusy onkogenne RNA, które przyjęto nazywać wirusami onkorna, są przyczyną naturalnie występujących mięsaków i białaczek u kur i myszy, a jak można spodziewać się, ich udział w białaczkach występujących u innych przedstawicieli kręgowców mimo, że dotąd nie udowodniony wydaje się bardzo prawdopodobny [18].

Po raz pierwszy rolę przyczynową wirusów w białaczkach u kur wykazał Ellerman w 1908 r. [11], a w trzy lata później Rous [23] w podobny sposób wykazał, że bezkomórkowym przesączem uzyskanym z mięsaka kur można wywołać u innych zaszczepionych osobników danego gatunku wzrost nowotworowy.

Od czasu tych pierwszych odkryć poznano wiele różnych typów wirusów onkorna wywołujących mięsaki i białaczki, które wprawdzie noszą w swym mianie nazwiska odkrywców, jednak należą, ze względu na wspólne cechy budowy i obecność niektórych wspólnych antygenów, do grupy wirusów białaczkotwórczych i mięsakotwórczych typu C.

Odkrycie przez Bittnera w roku 1930 tzw. czynnika mleka, będącego wirusem odpowiedzialnym za naturalnie występujące raki gruczołu mlekowego u myszy, wyodrębniło ten różny pod względem ultrastruktury i cech antygenowych typ B wirusa od wirusa typu C. Dopiero jednak

prace ostatnich kilku lat pozwoliły wnikać głębiej i zrozumieć mechanizm powstawania nowotworów u zwierząt naturalnie zakażonych wirusami onkorna. Poza wieloma zbadanymi cechami ultrastruktury, budowy antygenowej i składu chemicznego istotnym odkryciem było udowodnienie przenoszenia się pionowego wirusów onkorna typu C, których wzorcem są wirusy białaczkotwórcze i mięsakotwórcze ptaków i myszy, oraz wirusów onkorna typu B, wykrytych w mleku i gruczole sutkowym myszy. Oznacza to, że wirusy względnie ich informacja genetyczna jest przenoszona z komórki macierzystej na potomne wraz z materiałem genetycznym, jak to wykazano dla wirusów onkorna typu C [18, 22]. Natomiast wirusy typu B przekazywane są potomstwu wraz z mlekiem karmiącej matki lub, jak w szczepie myszy GR, mogą być także przekazywane z materiałem genetycznym ojca [4].

Wirusy mięsaków ptaków i myszy w większości przypadków są defektywne, co oznacza, że genom wirusa w zakażonej komórce jest wprawdzie zdolny do przemiany nowotworowej komórki i produkcji antygenów wirusowych, nie posiada jednak informacji dla kodowania wytwarzania elementów otoczki i reprezentowanych na niej antygenów, jak się wydaje niezbędnych dla zapewnienia infekcyjności cząstek wirusowych [14]. Natomiast wirusy białaczkotwórcze nie są defektywne i mogą wprowadzać brakującą informację. Jeżeli są obecne w tych samych komórkach co wirus mięsaka mogą uzupełnić brakującą informację dla wytwarzania materiału otoczki wirusowej i kompletować w ten sposób powstanie infekcyjnych cząstek wirusa mięsakotwórczego. Powstałe w ten sposób, w warunkach hodowli komórkowej *in vitro*, pseudotypy wirusowe mają swoistość antygenową otoczki wirusa determinowaną przez wirusa białaczkotwórczego [14–16]. Inną poznana ważną cechą charakterystyczną tych wirusów jest stałe namnażanie cząstek wirusowych w komórkach nowotworowych — z błon powierzchni pączkują cząstki wirusowe stając się w pewnym okresie integralną częścią powierzchni komórkowej [7]. Cecha ta różni wirusy onkorna od onkogennych wirusów DNA, które z zasady w zakażonej komórce albo namnażają się doprowadzając komórkę do zniszczenia (cykl lityczny zakażenia), albo też następuje integracja ich materiału genetycznego w transformowanej komórce, do której wirus wprowadził swą informację genetyczną (cykl transformacyjny), [1].

#### CHARAKTERYSTYKA WIRUSÓW ONKORNA

Dojrzałe cząstki wirusa typu B i C składają się z części wewnętrznej nukleoidu czyli rdzenia wirusa oraz z otoczek, z których zewnętrzne otoczki determinują infekcyjność wirusów. Na rysunku 1 przedstawione

są schematy cząstek typu B i C. Cząstki typu A powszechnie uznawane są za prekursorów dojrzałych cząstek wirusowych. Według klasyfikacji Bernharda [5] oraz Dmochowskiego [7, 8], cząstki typu A ułożone wewnątrz cytoplazmatycznie są prekursorami cząstek typu B (rys. 2, 3).



Rys. 1. Typy cząstek wirusa onkorna

W tabeli 1 przedstawiono cechy pozwalające odróżnić cząstki typu B od C, jak również podano rodzaje wywoływanych przez nie, w warunkach naturalnego zakażenia, nowotworów.

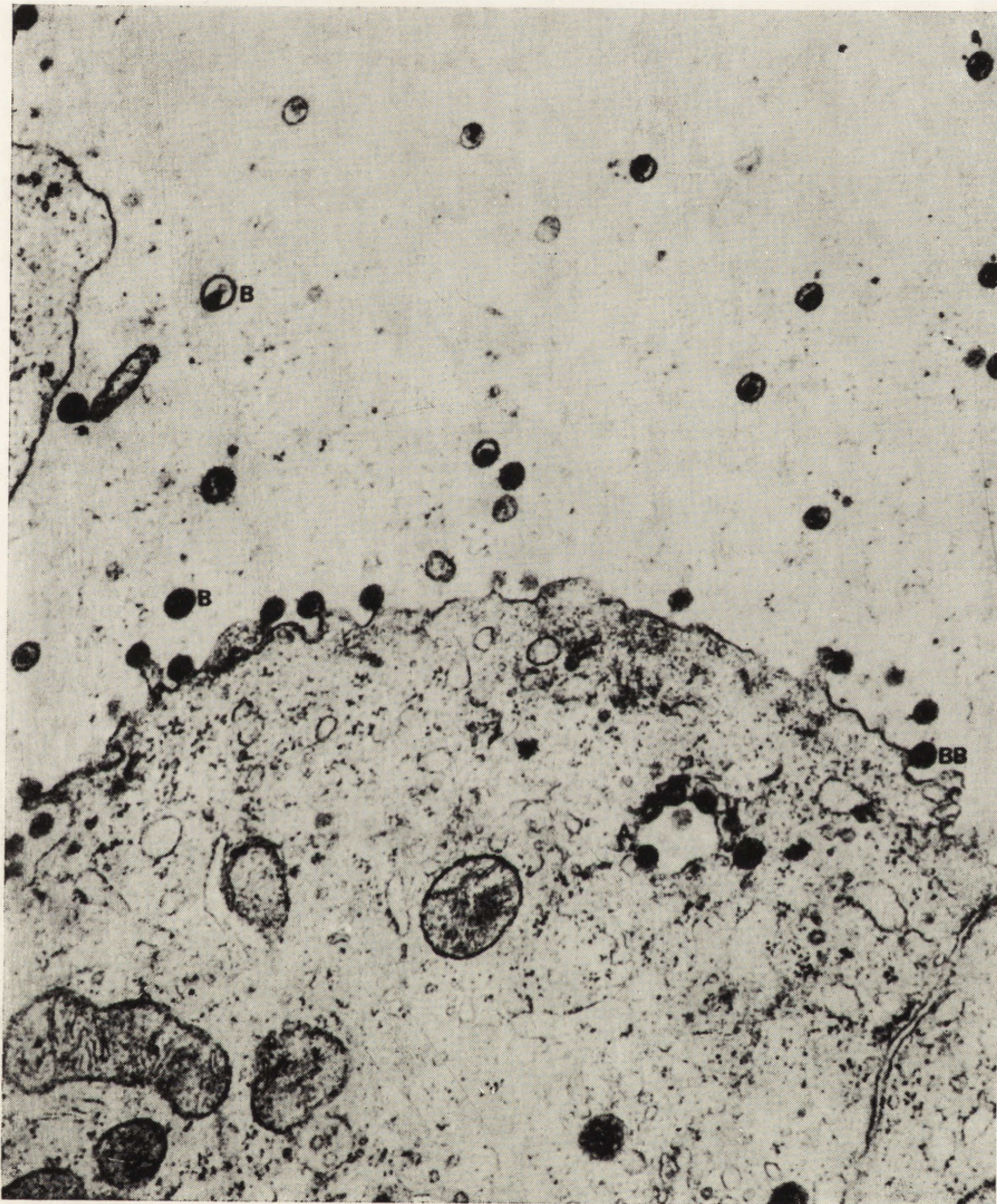
TABELA 1. Cechy charakterystyczne wirusów onkorna

Cecha	Typy cząstek	
	B	C
Średnica cząstki (nm)	130	110
Otoczka zewnętrzna	kolce	gładka
Umieszczenie rdzenia	ekscentryczne	centryczne
Produkcja infekcyjnych cząstek w hodowlach in vitro	—	+
Wywoływany nowotwór	rak sutka	białaczki, mięsaki

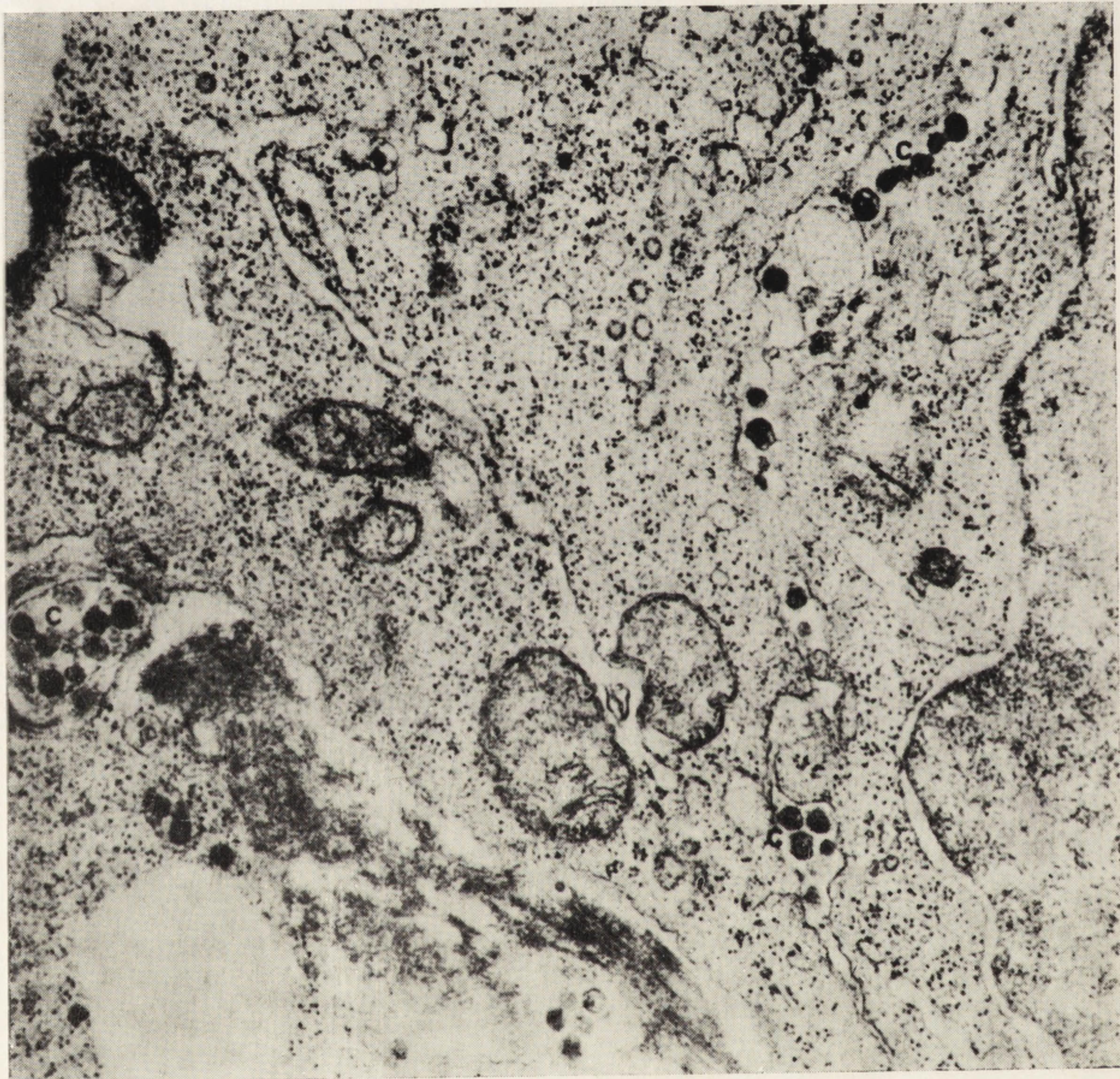
Otoczka zewnętrzna cząstek C jest gładka, natomiast cząstka B ma regularnie rozmieszczone kolce. W obu typach cząstek otoczki zbudowane są z gliko- i lipoproteidów. Zawarte w niej lipoproteidy częściowo pochodzą z błony komórkowej gospodarza, są do niej przyłączone w czasie pączkowania (rys. 2). Gęsty elektronowo nukleoid wirusów o średnicy około 50  $\mu$ m zbudowany jest z białek i kwasu rybonukleinowego. W cząstkach C nukleoid ułożony jest centrycznie, podczas gdy w cząstkach typu B ekscentrycznie. Z uwagi na dużą zawartość lipidów wirusy onkorna mają małą gęstość właściwą, wynosi ona 1,16 g/ml. Wirusy onkorna mają bardzo podobny skład chemiczny [9]. Zawierają one 1–2% RNA, 60–70% białek, 30–40% lipidów i mniej niż 1% węglowodanów. Genom wszystkich wirusów onkorna zbudowany jest z pojedynczej nici RNA o masie cząsteczkowej około  $12 \times 10^6$  d, współczynnika sedymentacji 70S. Współ-

ną cechą wyizolowanego kwasu rybonukleinowego wirusów onkorna jest degradacja 70S RNA pod wpływem podwyższonej temperatury do kilku podjednostek, z których największa ma współczynnik sedymentacji 36S. Inną cechą ich RNA jest obecność odcinków poli rA, które stanowią 1–3% RNA. Na ogólną liczbę 30 000 nukleotydów w 70S RNA przypada więc 300–900 nukleotydów adenilowych. Stwierdzono [12], że RNA wirusów onkorna jest 25 razy bogatszy w poli rA od RNA innych wirusów. W nukleoidzie wirusów występują białka, które mają cechy antygenowe pozwalające rozróżnić cząstki B od C, a poza tym w obrębie cząstek C przynależność do określonego gatunku (antygeny grupowo swoiste, gatunkowe). Wykazano, że wirusy typu C myszy, chomików, szczurów i kotów posiadają wspólną cechę antygenową nazwaną antygenem grupowo swoistym międzygatunkowym, na której podstawie można odróżnić te wirusy od wirusów typu C białaczek i mięsaków ptasich. Antygeny grupowo swoiste stanowią 60–80% wszystkich białek wirusa. Są to zasadowe białka o masie cząsteczkowej 25–50 000 [21]. Prócz białek antygenowych wewnątrz rdzenia wirusa zawarte są enzymy takie jak: RNA-zależna polimeraza DNA, ATPaza, fosfataza, zasadowe ligazy oraz endo- i egzonukleazy. Oprócz antygenów grupowo swoistych rdzenia wirusa występują antygeny typowo swoiste zlokalizowane na powierzchni otoczki wirusa. Na podstawie tych antygenów można określić wśród grupy wirusów onkorna typu C przynależność do podgrup i szczepów wirusowych.

Jak wspomniano we wstępie, wirusy mięsaków są defektywne, to znaczy są niezdolne do produkcji infekcyjnych cząstek. Wykazano, że wprowadzenie jako pomocników wirusów białaczkotwórczych uzupełnia brakujące informacje do produkcji białek otoczki, co pozwala na wytworzenie infekcyjnych cząstek. Należy podkreślić, że w takich przypadkach swoistość antygenów otoczki (antygeny typowo swoiste dla wirusa) zależy od wirusa białaczkotwórczego. Wirusy onkorna różnią się między sobą nie tylko antygenami gatunkowo i typowo swoistymi, ale także komórkami docelowymi dla transformacji i rodzajem wywoływanego nowotworu. Terminem transformacji określa się tu przemianę komórek prawidłowych w nowotworowe. Przemiana nowotworowa w ustroju naturalnie zakażonym wirusem onkorna charakteryzuje się przede wszystkim tym, że w komórce nowotworowej, oprócz wszystkich cech charakterystycznych dla każdej przemiany nowotworowej ma miejsce namnażanie się cząstek wirusowych. W cyklu dojrzewania pączkowanie przez błonę komórkową jest cechą stałą i przynajmniej w pewnym okresie wirus staje się integralną częścią błony komórkowej. W transformowanej komórce można wykazać również antygeny komórkowe indukowane wirusem, których swoistość określona jest przez genom wirusa. Oprócz tego w komórkach tych wy-



Rys. 2. Fragment komórki raka sutka myszy DBA/2 z pączkującymi cząstkami wirusowymi z powierzchni. Typowe cząstki B wirusa MTV widoczne są w przestrzeni pozakomórkowej. Cząstki wirusowe A znajdują się wewnątrzcytoplazmatycznie.  $\times 32\ 000$  (Ze zbiorów Zakładu Immunologii Nowotworów I.I.T.D. we Wrocławiu)



Rys. 3. Fragment komórki białaczki L1210V z widocznymi dojrzałymi cząstkami wirusowymi typu C.  $\times 32\,000$  (Ze zbiorów Zakładu Immunologii Nowotworów I.I.T.D. we Wrocławiu)

kazać można obecność antygenów grupowo swoistych, które są produkowane w nadmiarze w transformowanych komórkach.

Wrażliwość komórek na infekcję wirusami onkorna określona jest przez geny komórkowe, kodujące specyficzne receptory błony komórkowej.

Po wnikięciu wirusa do komórki okres latencji trwa około 8 godzin. Czas natomiast od chwili rozpoczęcia syntezy wirusa do jego uwolnienia z komórki wynosi około 70 minut [2]. W odróżnieniu od innych wirusów RNA produkcja cząsteczek wirusów onkorna jest hamowana przez aktywność D [25]. Fakt ten wskazuje na niezbędny udział RNA w replikacji tych wirusów. Już w roku 1964 Temin [26] zaproponował hipotezę „prowirusa” opierając się na prowadzonych przez siebie badaniach nad replikacją wirusa Rousa (RSV) wywołującego mięsaki u kur. Stwierdził on, że RSV ma inny mechanizm odtwarzania niż pozostałe wirusy typu RNA. Zdaniem Temina, informacja zawarta w genomie wirusa jest przenoszona na DNA i ten nowo powstały DNA jest wbudowywany do genomu komórki gospodarza. Odcinek DNA noszący informację genetyczną wirusa nazwał prowirusem. Hipoteza prowirusa zakłada, że wirusy onkorna dla zapoczątkowania replikacji wymagają syntezy DNA. Przed wykryciem RNA-zależnej polimerazy DNA nie wyobrażano sobie, jak informacja genetyczna wirusa zapisana w pojedynczym łańcuchu RNA może być przeniesiona na DNA, aby móc wprowadzić do genomu komórki nowe dla niej informacje, które są dziedziczone przez komórki potomne. Działanie onkogenne wirusa polega więc na dodaniu komórce nowej informacji genetycznej. W momencie ogłoszenia przez Temina w 1964 r. hipoteza ta przyjmowana była z wielką rezerwą aż do czasu równoczesnego odkrycia przez Temina i wsp. [27] i Baltimore’a [3] enzymu, który zdolny jest do syntetyzowania DNA na matrycy RNA. Odkrycie to wzbudziło zrozumiałe zainteresowanie i ożywioną dyskusję. Temin jako najtrafniejszą nazwę dla tego enzymu proponuje: „kierowana przez RNA polimeraza DNA”, wbrew jednak temu, enzym najczęściej nazywany jest „odwrotną transkryptazą”. Odkrycie RNA-zależnej polimerazy DNA jest największym wkładem dla zrozumienia mechanizmu replikacji i onkogenezy przez wirusy onkorna.

#### RNA-ZALEŻNA POLIMERAZA DNA

Aktywność odwrotnej transkryptazy zlokalizowana jest w nukleoidzie wirusa [27, 3]. Enzym ten został wyizolowany i oczyszczony [10, 20]. Stwierdzono, że białko enzymu stanowi 20% całkowitego białka wirusowego. Masa cząsteczkowa oczyszczonej polimerazy z wirusa ptasiej białaczki

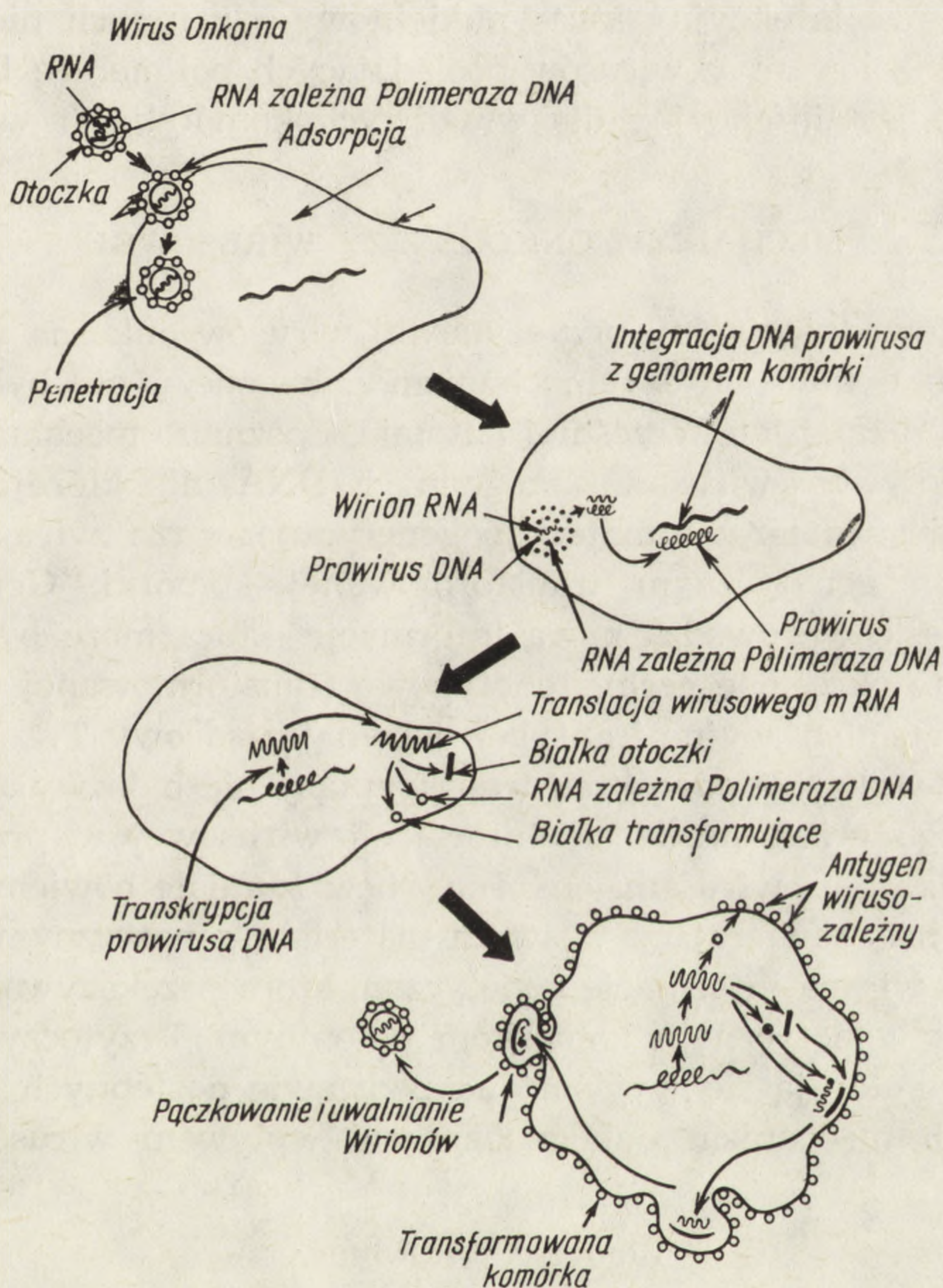
szpikowej wynosi 179 000, cząsteczka enzymu składa się z dwóch podjednostek o masach 110 000 i 69 000 d. Jedna cząstka wirusa zawiera 5-17 cząsteczek enzymu. Scharakteryzowano i oczyszczono ten enzym także z innych wirusów onkogenicznych. Stwierdzono, że polimeraza może kierować syntezą DNA wykorzystując jako matryce: RNA, DNA i hybrydy kwasów nukleinowych, matryce mogą być naturalne lub syntetyczne. DNA syntetyzowany na matrycy wirusowego 70S RNA jest podwójną nicią DNA o masie cząsteczkowej około 200 000 d. Pośrednim produktem reakcji są hybrydy RNA  $\times$  DNA. Jak wynika z tych badań tylko mała część wirusowego genomu, bo zaledwie 2-7% jest przepisana na DNA. Nie wiadomo dotąd czy synteza krótkich odcinków DNA jest prawdziwą funkcją polimerazy, czy też reakcja taka zachodzi jedynie w warunkach *in vitro*. Początkowo sądzono, że aktywność RNA-zależnej polimerazy DNA jest charakterystyczna wyłącznie dla wirusów onkogenicznych. Wykryto jednak jej obecność w dwóch wirusach RNA nie zaliczanych do tej grupy, mianowicie w wirusie wisna oraz tzw. wirusie pianistym [24].

Aktywność RNA-zależnej polimerazy DNA wykazano nie tylko w komórkach nowotworowych lecz także w komórkach prawidłowych. Do chwili obecnej aktywność tę stwierdzono: w ludzkich limfocytach białaczkowych, w hodowli komórek HeLa, w ludzkich komórkach retinoblastoma oraz w mysich i ludzkich prawidłowych fibroblastach, w komórkach szczurzych zarodków, mitochondriach szczura, oocytach żaby i w hodowanych *in vitro* ludzkich komórkach zarodkowych. Funkcja enzymu w normalnych komórkach jest na razie nie znana. Temin [29], odkrywca polimerazy DNA zależnej od RNA uważa, że odgrywa ona ważną rolę w normalnym różnicowaniu komórek w embriogenezie, a także w syntezie przeciwciał i w kancerogenezie. Poświęcono wiele wysiłku, aby znaleźć sposób umożliwiający odróżnienie aktywności polimerazy obecnej w normalnych komórkach od polimerazy pochodzącej z wirusów onkogenicznych. Stwierdzono [13], że jest to możliwe dzięki różnemu powinowactwu enzymów do syntetycznych matryc, a także na podstawie wyniku reakcji z 70S RNA. Naturalna matryca wykorzystywana jest jedynie przez enzymy wirusów onkogenicznych. Używając syntetycznych hybrydów składających się z poli rA i oligo dT (12-18), w którym to rolę matrycy spełnia poli rA, a primeru oligo dT i innego hybrydu poli dA  $\times$  oligo dT (12-18), stwierdzono, że stopień wykorzystywania tych syntetycznych kompleksów pozwala na rozróżnienie odwrotnej transkryptazy pochodzącej z wirusów onkogenicznych, od aktywności tego enzymu obecnego w normalnych komórkach.

Od czasu odkrycia polimerazy DNA zależnej od RNA w wirusach onkogenicznych rozpoczęto poszukiwania specyficznych inhibitorów tego enzymu wiążąc z nimi nadzieje terapeutyczne. Dotychczas przebadano bardzo wiele związków, z których tylko nieliczne mają niewielki wpływ na aktywność



komórkowych polimeraz DNA, znacznie przy tym hamując reakcję katalizowaną przez wirusową odwrotną transkryptazę. Do nich należą niektóre pochodne rifamicyny i streptowaricyny oraz najspecyficzniej działający bis-DEAE-fluorenon [19, 6]. Z chwilą wykazania w wirusach onkorna RNA-zależnej polimerazy DNA stała się bardziej zrozumiała interakcja między wirusem onkorna i komórką docelową (rys. 4). Można ją przedsta-



Rys. 4. Mechanizm transformacji nowotworowej przez wirusy RNA (wg schematu Allena i Cole [1])

wić w kilku etapach. Pierwszy z nich to wniknięcie wirusa do wnętrza wrażliwej komórki, następnie wirus pozbawiony zostaje otoczek w wyniku czego enzymy wirusa zlokalizowane w jego nukleoidzie zostają uwolnione. Od tego momentu rozpoczyna się tworzenie prowirusa. Na wirusowym RNA jako matrycy z udziałem RNA-zależnej polimerazy DNA syntetyzowany jest prowirus DNA, który następnie jest wbudowywany do ge-

nomu komórki. Od tego momentu rozpoczyna się transkrypcja z prowirusa na mRNA, który kieruje syntezą białek wirusa. Z chwilą gdy poszczególne składniki wirusa zostały wytworzone, grupują się one w pobliżu błony komórkowej i wraz z jej fragmentami w procesie pączkowania wirusa są uwalniane do środowiska [1].

Odkrycie RNA-zależnej polimerazy DNA w cząstkach wirusów wyjaśniło dotychczas niezrozumiały problem, dlaczego można z jednych wirusów otrzymać infekcyjny kwas nukleinowy a z innych nie. Kwas nukleinowy wyizolowany z wirusów posiadających polimerazę DNA zależną od RNA nie jest infekcyjny dla wrażliwych komórek.

### MECHANIZM ONKOGENEZY WIRUSOWEJ

Mimo udowodnienia roli przyczynowej wirusów onkorna w mięsakach i białaczkach u kur i myszy mechanizm onkogenezy nie był zrozumiały do ostatnich niemal lat. Wcześniej natomiast poznano mechanizm onkogenezy pod wpływem wirusów onkogennych DNA, dla której niezbędnym warunkiem jest integracja materiału genetycznego, tzn. wirusowego DNA z materiałem genetycznym transformowanej komórki. Genom wirusa w tym procesie wprowadza nową informację, która może być powielana i determinuje określone cechy fenotypowe transformowanej komórki jak antygeny transplantacyjne i antygen wewnątrzjądrowy T.

Do czasu wykrycia odwrotnej transkryptazy nie była wyjaśniona sprawa pionowego przenoszenia się informacji wirusowej w przypadku naturalnego zakażenia wirusami onkorna. Niezrozumiałe bowiem było, w jaki sposób wirus zawierający w swym materiale genetycznym RNA może wprowadzać własną informację genetyczną, która przekazywana jest wraz z materiałem genetycznym komórkom potomnym. Przytoczymy trzy hipotezy, które starają się wyjaśnić na podstawie dostępnych danych doświadczalnych mechanizm onkogenezy pod wpływem wirusów onkorna.

#### HIPOTEZA „PROWIRUSA”

Według hipotezy prowirusa [28] informacja niezbędna dla przekształcenia komórki prawidłowej w nowotworową dostaje się do niej jako wynik infekcji wirusem onkorna. Dzięki obecności enzymu odwrotnej transkryptazy zostaje wytworzona własna matryca DNA, która jest zintegrowana z materiałem genetycznym komórki. Ten DNA wirusowy stanowi źródło informacji dla produkcji RNA i białek wirusowych, jak również dla przemiany nowotworowej. Informacja genetyczna wirusa i determinowane przez nią cechy fenotypowe są przekazywane komórkom potomnym.

## HIPOTEZA „ONKOGENU” I „WIROGENU”

W 1969 r. Huebner i wsp. [17] zaproponowali hipotezę onkogenu i wi-ro genu — czynników uwarunkowanych genetycznie, determinujących pow-stawanie nowotworów. Autorzy ci uporządkowali wiele nagromadzonych informacji i dowodów doświadczalnych, na podstawie których uważają, że z wyjątkiem wirusa onkorna typu B wywołującego raka sutka u myszy i niektórych wirusów onkogennych DNA, wirusy onkorna typu C stano-wią jedyną grupę onkogennych wirusów, które mogą być rozważane jako rzeczywista przyczyna większości naturalnie występujących nowotworów. Zdaniem autorów tej hipotezy, komórki wielu, o ile nie wszystkich krę-gowców (komórki somatyczne i płciowe) są nosicielami przenoszonych pionowo genów onkogennych wirusów RNA. Ze względu na to, że infor-macja genetyczna wirusa jest obecna u wszystkich kręgowców powinna być traktowana jako naturalna część ich wyposażenia genetycznego nabyta w czasie ewolucji. Endogeniczna informacja wirusowa, nazwana przez autorów „wirogenem”, składa się z „onkogenu” — genu kodującego biał-ka transformujące, odpowiedzialne za przekształcenie komórki prawidło-wej w nowotworową — i innych genów, które zawierają informacje niez-będne dla syntezy pozostałych białek wirusowych. Wirogen, podobnie jak inne geny komórkowe, kontrolowany jest przez system represorowy ko-mórki. Zgodnie z tą hipotezą ekspresja zarówno onkogenu, jak i innych składowych genów wirogenu jest niezależna. Normalnie „onkogeny” są wyłączone (switched off). O ekspresji „wirogenu” decydują w znacznej mierze cechy genetyczne komórki, jest ona równocześnie jednak uzależ-niona od wpływów wewnętrznego i zewnętrznego środowiska. Przekształ-cenie nowotworowe komórki następuje przez włączenie (switch on) jej własnej onkogenicznej informacji. Derepresję onkogenu powodować może proces starzenia się, naruszenie regulacji na poziomie komórkowym czy ogólnoustrojowym, działanie fizycznych i chemicznych czynników kan-cerogennych, zakażenie innymi wirusami. Możliwa jest ekspresja całego „wirogenu”, częściej jednak zdarza się ekspresja tylko jego części — pro-dukcja antygenów wirusowych, cząstek wirusa lub białek transformują-cych.

Częściowa ekspresja „wirogenu” decydująca np. o produkcji grupowo swoistego antygeny lub nawet ekspresja całego wirogeny, czyli produkcja cząstek wirusowych nie powoduje powstania nowotworu. Komórki, w któ-rych nastąpiła częściowa ekspresja „wirogeny”, są jednak bardziej po-datne na aktywację endogenicznej onkogenicznej informacji. Według tej hipotezy, powstawanie nowotworów jest naturalnym wydarzeniem biolo-gicznym zależnym od spontanicznej lub spowodowanej derepresji onko-genu. W związku z tym, najistotniejszym problemem w kontroli powsta-

wania nowotworów jest poznanie mechanizmów, które w normalnych komórkach nie dopuszczają do ujawnienia się endogenicznej informacji wirusowej. Hipoteza ta opiera się na następujących informacjach: prawie u wszystkich gatunków kręgowców stwierdzono antygeny gatunkowo swoiste onkogennych wirusów typu C. U przedstawicieli różnych gatunków kręgowców w tym i u ludzi (myszy, kury, chomiki, szczury, koty, węże, małpy) stwierdzono wirusy onkorna typu C. We wczesnych zarodkach kur i szczepów myszy o niskiej zapadalności na białaczkę (Balb/C, C3H, C57Bl i Swiss) oraz u myszy dzikich wykazano obecność cząstek pączkującego wirusa i obecność gatunkowo swoistego antygeny. Odkrycie to wskazuje na obecność w tych zarodkach „wirogeny” w stanie częściowej derepresji. Stwierdzono pojawianie się wirusów typu C w hodowlach *in vitro* komórek myszy, szczurów i chomików pierwotnie wolnych od wirusa.

Podsumowując założenia hipotezy można przedstawić je następująco:

1. Informacja genetyczna konieczna dla transformacji istnieje w każdej komórce;
2. Powstanie nowotworu i produkcja cząstek wirusowych jest wynikiem derepresji „onkogenu” i „wirogeny”;
3. „Onkogen” nie funkcjonuje w normalnej komórce (jest w stanie represji);
4. „Wirogeny” jest przekazywany pionowo.

#### HIPOTEZA „PROTOWIRUSA”

Hipoteza ta została zaproponowana przez Temina [29]. Postuluje ona, że synteza DNA zależna od RNA jest możliwym mechanizmem przeniesienia informacji nie tylko w procesie nowotworowym, ale i normalnym różnicowaniu się tkanek, a być może i w różnicowaniu się komórek w odpowiedzi immunologicznej. Hipoteza ta zakłada zmiany w strukturze DNA nie wymagające wycięcia odcinków DNA. Pewien odcinek komórkowego DNA nazwany przez Temina „protowirusem” może służyć jako matryca dla syntezy RNA, który z kolei służy wtórnie jako matryca dla syntezy DNA. Jest to możliwe dzięki istnieniu RNA-zależnej polimerazy DNA. W ten sposób przepisany DNA może być zintegrowany z komórkowym DNA w różnych miejscach. Proces ten w efekcie doprowadza do amplifikacji genów. Zdaniem Temina, informacja genetyczna, niezależnie od podziału komórkowego, może zostać przekazana z komórki do komórki doprowadzając do ich zróżnicowania.

„Protowirus”, czyli przenoszony odcinek DNA oraz czas, w którym ten proces się odbywa, jak i miejsce wbudowania „protowirusa” do genomu są kontrolowane przez RNA-zależną polimerazę DNA.

Według Temina ewolucja „protowirusa” w rzadkich przypadkach może prowadzić do powstania wirusa. Procesy prowadzące do powstania nowotworów mogą być wariantami ewolucji „protowirusa” na skutek mutacji w sekwencji zasad lub integracji „protowirusa” w uszkodzone przez czynniki kancerogenne miejsca genu. Informacja onkogenna może, ale nie musi być homologiczna z informacją onkorna wirusów.

Założenia hipotezy protowirusa można podsumować następująco:

1. Informacja genetyczna konieczna dla transformacji powstaje w komórce *de novo*;
2. W proponowanym mechanizmie onkogenezy wymagana jest RNA-zależna polimeraza DNA;
3. Jako przejaw nieprawidłowej ewolucji protowirusa fragmenty informacji genetycznej komórki mogą się tak połączyć, że powstanie informacja onkogenna (transformacja lub wytworzenie cząstek wirusów onkogennych);
4. RNA-zależna DNA polimeraza występuje w normalnych komórkach, w których odgrywa istotną rolę w procesie różnicowania;
5. Możliwość dla powstania transformacji nowotworowej jest przekazywana pionowo.

Jak dotąd jedynym dowodem przemawiającym za słusnością hipotezy „protowirusa” jest obecność w normalnych komórkach organizmu RNA-zależnej polimerazy DNA.

#### LITERATURA

- [1] ALLEN D. W. i COLE P., 1972 — Viruses and human cancer, *The New England Journal of Medicine*, **13**: 70.
- [2] BADER J. P., STECK T. L. i KAKEFUDA T., 1970 — The structure of the RNA of RNA-containing Tumor Viruses, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 104.
- [3] BALTIMORE D., 1970 — RNA-dependent DNA Polymerase in virions of RNA Tumor Viruses, *Nature*, **226**: 1209.
- [4] BENTVELZEN P., 1972 — Hereditary infections with mammary tumor viruses in mice, [w] RNA viruses and host genome in oncogenesis, red. P. Emmelot, P. Bentvelzen, North Holland 309.
- [5] BERNHARD W., 1960 — The detection and study of tumor viruses with the electron microscope, *Cancer Res.* **20**: 712.
- [6] CHANDRA P., ZUNINO F. i GÖTZ A., 1972 — *Bis-DEAE*, fluorenone: A specific inhibitor of DNA polymerases from RNA tumor viruses, *FEBS Letters*, **22**: 161.
- [7] DMOCHOWSKI L., 1969 — Comparison of leukemogenic and sarcomagenic viruses at the ultrastructural level, [w] *Comparative Leukemia Research* 61, red. R. M. Dutcher, Philadelphia.
- [8] DMOCHOWSKI L., WILLIAMS W. C., SWEARINGEN G. R., MYERS B. i FUJINAGA S., 1971 — Immunological studies on mouse mammary tumors and leukemia, *Texas Dep. Biol. Med.*, **29**: 41.

- [9] DUESBERG P. H., 1970 — On the structure of RNA tumor viruses, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 79.
- [10] DUESBERG P., HELM K. V. i CANAANI E., 1971 — Properties of a soluble DNA Polymerase isolated from RSV, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 747.
- [11] ELLERMAN V. i BANG O., 1908 — Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. f. Bakt., Abt. I (orig.)*, **46**: 595.
- [12] GILLESPIE D., MARSHALL S. i GALLO R. G., 1972 — RNA of RNA tumor viruses contains poly A, *Nature New Biology*, **236**: 227.
- [13] GOODMAN N. C. i SPIEGELMAN S., 1971 — Distinguishing reverse transcriptase of on RNA tumor virus from other known DNA polymersases, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **68**: 2203.
- [14] HARTLEY J. W. i ROWE W. P., 1966 — Production of altered cell foci in tissue culture by defective Moloney sarcoma virus particles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**: 780.
- [15] HARTLEY J. W., ROWE W. P., CAPPS W. I. i HUEBNER R. J., 1969 — Isolation of naturally occurring viruses of the murine leukemia virus group in tissue culture, *J. Virology*, **3**: 126.
- [16] HUEBNER R. J., HARTLEY J. W., ROWE W. P., LANE W. T. i CAPPS W. J., 1966 — Rescue of the defective genome of Moloney sarcoma virus from a noninfectious hamster tumor and the production of pseudotype sarcoma viruses with various murine leukemia viruses, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**: 1164.
- [17] HUEBNER R. J., TODARO G. J., SARMA P., HARTLEY J. W., FREEMAN A. E., PETERS R. L., WHITMIRE C. E., MEIER H. i GILDEN R. V., 1970 — „Switched off” Vertically transmitted C-type RNA tumor viruses as determinants of spontaneous and induced cancer: a new hypothesis of viral carcinogenesis, *Detectivité, Démasquage et stimulation des virus oncogènes*, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 33;
- [18] HUEBNER R. J. i GILDEN R. V., 1972 — Inherited RNA viral genomes (Virogenes and oncogenes) in the etiology of cancer, [w] *RNA viruses and host genome in oncogenesis*, red. P. Emmelot i P. Bentvelzen, North Holland, 197.
- [19] JANG S. S., HERRERA F. M., SMITH R. G., REITZ M. S., LANCINI G., TING R. C. i GALLO . C., 1972 — Rifamycin antibiotics, inhibitors of Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase and of purified DNA polymerases from human normal and leukemic lymphoblasts, *J. Nat. Cancer Inst.*, **49**: 7.
- [20] KACIAN D. L., WATSON K. F., BURNY A. i SPIEGELMAN S. 1971 — Purification of the DNA polymerase of avian myeloblastosis virus, *Biochem. Biophys. Acta*, **246**: 365.
- [21] NOWIŃSKI R. C., OLD L. J., SARKAR N. H. i MOORE D. H., 1970 — Common properties of the oncogenic RNA viruses (oncornaviruses), *Virology*, **42**: 1152.
- [22] PAYNE L. N., 1972 — Interaction between host genome and avian RNA tumor viruses, [w] *RNA viruses and host genome in oncogenesis*, red. P. Emmelot P. Bentvelzen, North Holland, 93.
- [23] ROUS P., 1911 — Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate, *J. A. M. A.*, **56**: 198.
- [24] SCHLOM J., HARTEK D. H., BURNY A. i SPIEGELMAN S., 1971 — DNA-

polymerase activities in virions of visna virus a causative agent of a „Slow” neurological disease, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**: 182.

- [25] TEMIN H. M., 1964 — The participation of DNA in Rous sarcoma virus production, Virology, **23**: 486.
- [26] TEMIN H. M., 1964 — Nature of the provirus of Rous sarcoma, Nat. Cancer Inst. Monog., **17**: 557.
- [27] TEMIN H. M. i MIZUTANI S., 1970 — RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, Nature, **226**: 1211.
- [28] TEMIN H. M., 1970 — The role of the DNA provirus in carcinogenesis by RNA tumor viruses, [w] Lepetit colloquia on biology and medicine 2. red. Silverstri North Holland, Amsterdam-Londyn, (1176).
- [29] TEMIN H. M., 1971 — The provirus hypothesis: speculation on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis, J. Nat. Cancer Inst., **46**: III.

*Otrzymano: styczeń, 1973.*

*Przyjęto: kwiecień, 1973.*

*Adres autorów: ul. Tytusa Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław.*





## CYTOCHEMIA ENZYMATYCZNA JĄDRA KOMÓRKOWEGO \*

Andrzej VORBRODT

Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice

*Streszczenie.* W referacie omówiono dotychczasowe osiągnięcia w zakresie cytochemii enzymatycznej jądra komórkowego z uwzględnieniem zarówno techniki przygotowania materiału do badań, jak i możliwości użycia różnych metod badania lokalizacji enzymów. W pierwszej części omówiono zalety i wady badania jąder izolowanych oraz znajdujących się *in situ*, tzn. w skrawkach tkankowych. Zwrócono szczególną uwagę na korzyści wynikające z użycia ultracienkich skrawków mrożonych. Przedstawiono wyniki badań nad lokalizacją enzymów jądrowych wykonanych metodą cytochemii enzymatycznej, autoradiografii i immunohistochemii. Spośród 6 grup enzymów zaledwie około 20 przedstawicieli oksydoreduktaz, transferaz i hydrolaz może być wykrytych histochemicznie w jądrze komórkowym, natomiast liazy, izomerazy i ligazy nie są dostępne badaniu cytochemicznemu. W referacie przedstawiono też lokalizację enzymów w otoczce jądrowej i jej związek z siateczką śródplazmatyczną.

## WSTĘP

Zgodnie z poglądem Pearse'a wyrażonym w 1968 r. [50], spośród ponad 400 enzymów występujących w tkankach kręgowców, około 20% można było wykryć metodami histochemicznymi. Odpowiada to w przybliżeniu liczbie 80 enzymów, które mogą być zlokalizowane w skrawkach tkankowych. W chwili obecnej prawdopodobnie dalszych 20-30 enzymów można wykryć stosując znane założenia metodyczne, co w sumie daje liczbę około 100 enzymów.

Postęp w cytochemii ultrastrukturalnej umożliwił wprowadzenie pojęcia wyznaczników enzymatycznych (markerów) składników i organelli komórkowych [42, 47]. Jednakże do chwili obecnej jądro jest jedynym

---

\* W referacie podano numery enzymów zgodnie z „Enzyme Nomenclature”, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1965.

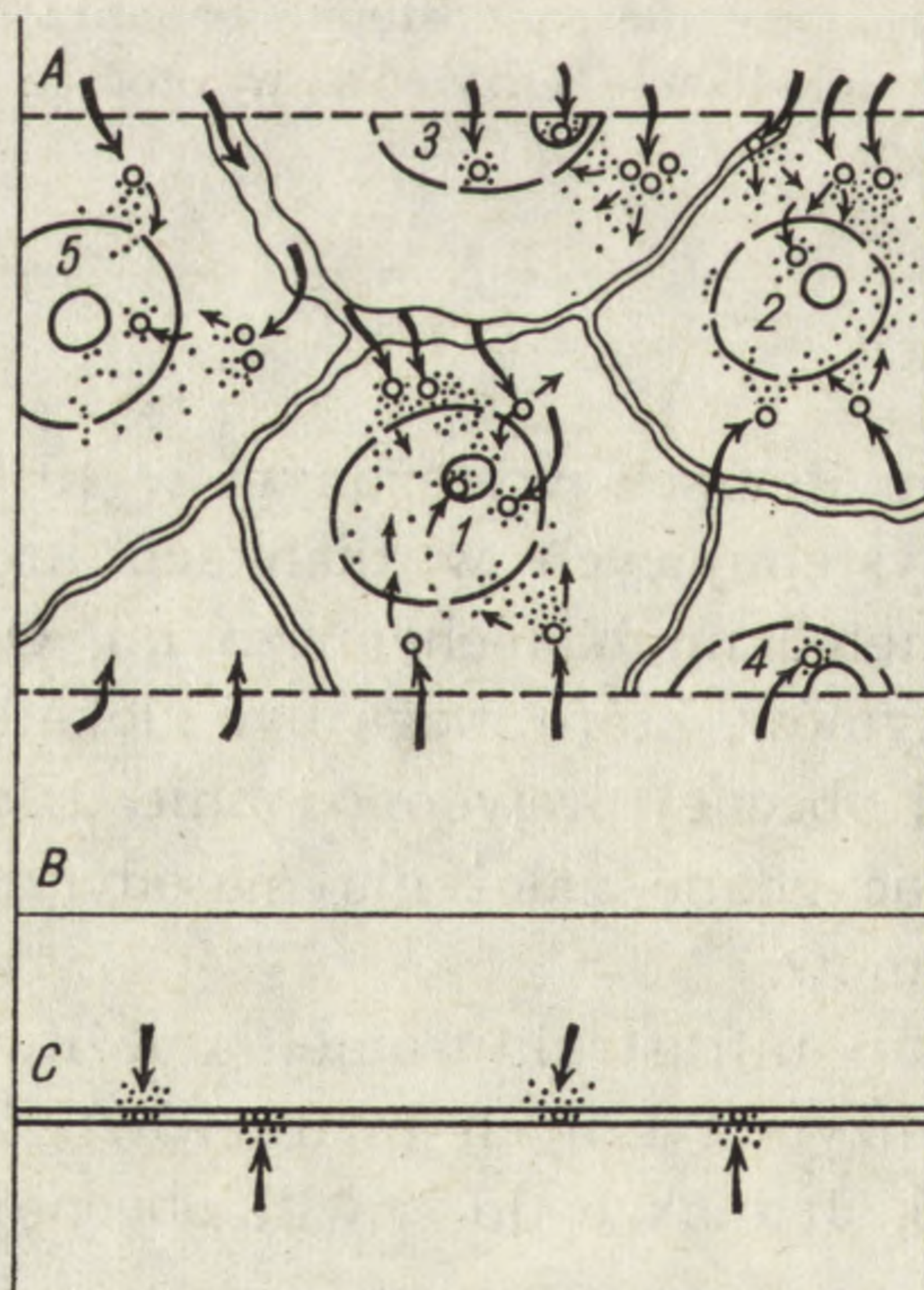
składnikiem komórki, który nie ma „własnego” markera enzymatycznego. Powodowane to jest brakiem odpowiedniej metody cytochemicznej umożliwiającej wykrycie przynajmniej jednego typowego enzymu jądrowego, jak np. polimerazy RNA lub pirofosforylasy NAD.

Nagromadzenie prawie wszystkich wykrywalnych cytochemicznie enzymów jest nieporównywalnie większe w organellach cytoplazmatycznych niż w jądrze komórkowym. W tej sytuacji aktywność enzymów cytoplazmatycznych może maskować enzymy jądrowe i współzawodniczyć z nimi w reakcji z substratem. Wiele z tych problemów dotyczących trudności w wykrywaniu aktywności enzymów jądrowych będzie przedmiotem rozważań w dalszych częściach niniejszego opracowania.

#### PROBLEMY TECHNICZNE. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Wybór odpowiedniej metody przygotowania skrawków tkankowych lub innego materiału biologicznego ma zasadnicze znaczenie dla uzyskania właściwego wyniku końcowego. Zalety i wady używanych metod są przedstawione w tabeli 1.

Szczególną uwagę należy zwrócić na badanie jąder komórkowych in



Rys. 1. Zjawiska mogące zachodzić podczas inkubacji w skrawkach mrożonych — A — „grubych” (45 $\mu$ ), B, C — ultracienkich (około 100 nm) (Dokładne wyjaśnienie rysunku w tekście)

TABELA 1. Metody przygotowania materiału biologicznego do badania cytochemicznego enzymów jądrowych

Metoda	Zalety	Wady
I. Jądra in situ		
A. Mikroskopia świetlna		
1. Utrwalanie w acetonie Suszenie — mrożenie Mrożenie — podstawianie	Nie zaleca się	Hamowanie aktywności enzymów; dogodne dla powstawania artefaktów z dyfuzji enzymu lub produktów reakcji
2. Nieutrwalane lub utrwalane skrawki kriostatowe	Dobre zachowanie aktywności enzymatycznej	Grubość skrawków sprzyja interfeencji enzymów cytoplazmatycznych
3. Skrawki mrożone utrwalane w formol-calcium lub aldehydzie glutarowym	Dobre zachowanie struktury, względnie dobre lub dostateczne zachowanie aktywności większości enzymów	jak wyżej
4. Rozmazy komórkowe, jednowarstwowe hodowle komórek, odciśki tkankowe utrwalane lub nieutrwalane	jak wyżej	Możliwa interferencja enzymów cytoplazmatycznych; utrudnienia w penetracji składników środowiska inkubacyjnego
B. Mikroskopia elektronowa		
1. Zwykła „dwustopniowa” technika	Dobre zachowanie ultrastruktury, średnie zachowanie aktywności enzymatycznej	Interferencja enzymów cytoplazmatycznych
2. Ultracienkie skrawki mrożone utrwalane lub nieutrwalane	Dobre zachowanie aktywności enzymatycznej, średnio dobre zachowanie ultrastruktury, uniknięcie interakcji enzymów cytoplazmatycznych	Możliwość „ucieczki” rozpuszczalnych enzymów
II. Izolowane jądra		
A. Utrwalane lub nieutrwalane jądra izolowane w środowisku wodnym	Dobre zachowanie nierozpuszczalnych enzymów; uniknięcie interfeencji enzymów cytoplazmatycznych	Możliwa ucieczka enzymów rozpuszczalnych; trudności penetracji niektórych substratów
B. Jądra izolowane w środowisku bezwodnym	Dobre zachowanie rozpuszczalnych enzymów	Złe zachowanie szczegółów ultrastruktury; utrata lipidów

situ, to znaczy w ich normalnym środowisku cytoplazmatycznym. Do tego celu używa się skrawków tkankowych przeważnie z kriostatu lub mikrotomu mroźniowego (grubość skrawków 5-15  $\mu$ ). Skrawki używane zwykle do badań cytochemicznych w mikroskopie elektronowym (dwustopniowa technika) uzyskiwane z niemroźącego mikrotomu zwanego „chopper” lub z mikrotomu mroźniowego są stosunkowo grube (30-50  $\mu$ ). Główną masę takich skrawków stanowią składniki cytoplazmatyczne z licznymi organellami, bogatymi w większość enzymów wykrywalnych cytochemicznie. W tej sytuacji wykrycie enzymów jądrowych napotyka trudności, z których badacze nie zawsze zdają sobie sprawę. Na rys. 1, przedstawiono schematycznie zjawiska zachodzące w skrawkach (grubości 45  $\mu$ ) używanych w cytochemii ultrastrukturalnej, w toku inkubacji ich przy badaniu enzymów jądrowych. Składniki środowiska inkubacyjnego (grube strzałki) wnikają do skrawka o grubości 45  $\mu$  oznaczonego literą A wzdłuż szczelin międzykomórkowych lub bezpośrednio do cytoplazmy lub jąder w miejscu ich przecięcia. Koncentracja substratów płynu inkubacyjnego będzie nie zmieniona w przeciętnych jądrach (rys. 1, 3 i 4). Skład środowiska inkubacyjnego penetrującego do jąder leżących wewnątrz skrawka (rys. 1, 1 i 2) jest prawdopodobnie zmieniony (małe strzałki), ponieważ płyn inkubacyjny zetknął się już po drodze z cząsteczkami enzymów (małe kółka) obecnych w błonie komórkowej oraz w organellach cytoplazmatycznych. Produkt reakcji, pokazany jako czarne kropki, może przesunąć się razem z penetrującym skrawek środowiskiem inkubacyjnym i adsorbować się na strukturach jądrowych. Takie zjawisko jest obserwowane często, gdy do wykrywania różnych fosfataz stosuje się metodę precypitacyjną.

W przeciwieństwie do przedstawionych niedogodności, użycie ultracienkich skrawków mrożonych otwiera znacznie dogodniejsze możliwości badań. Na rysunku 1 ultracienki skrawek mrożony przedstawiony jako linia B jest narysowany w tej samej skali jak skrawek gruby (A) i odpowiada grubości 100 nm. Linia C przedstawia również ultracienki skrawek o tej samej grubości co B, lecz pokazanej jakby w większym powiększeniu dla zilustrowania cząsteczek enzymów i produktu reakcji. Jak widzimy, możliwości tworzenia artefaktów wynikających z ewentualnych przesunięć substratów i produktów reakcji wewnątrz skrawka są wybitnie zmniejszone lub całkowicie ominięte. Kontakt między cząsteczkami enzymów a składnikami środowiska inkubacyjnego jest wybitnie ułatwiony, a produkt reakcji może być tworzony w miejscach działania enzymu bez żadnych tendencji do przemieszczeń. Jedną z głównych niedogodności użycia ultracienkich skrawków mrożonych jest tworzenie małej ilości produktu reakcji, co wynika ze stosunkowo niskiej koncentracji cząste-

czek enzymu obecnych w ultracienkim skrawku. W związku z tym czas reakcji (inkubacji) musi być nieco przedłużony. Inną niedogodnością jest możliwość łatwego wypłukania enzymów słabo związanych ze strukturami komórkowymi (lioenzymów). Pomimo tych, zresztą nieznacznych niedogodności, technika krioultramikrotomii jest w chwili obecnej najodpowiedniejszą metodą przygotowania materiału tkankowego do cytochemicznego badania aktywności enzymatycznej w jądrach *in situ*.

#### METODY BADANIA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ W JĄDRACH KOMÓRKOWYCH

Większość metod użytych przy wykrywaniu oksydoreduktaz jest oparta na redukcji soli tetrazolowych do barwnych formazanów. Zdaniem niektórych autorów, struktury jądrowe charakteryzują się brakiem zdolności wiązania soli tetrazolowych oraz formazanów. Poza tym, w czasie badania izolowanych jąder wchodzi w grę słaba penetracja soli tetrazolowych oraz niektórych substratów, jak np. bursztynianu, do jąder komórkowych [2, 41, 78]. Uzyskanie więc ujemnej reakcji na niektóre dehydrogenazy w jądrach nie jest zawsze wskaźnikiem braku danej aktywności enzymatycznej, lecz raczej małej czułości użytej metody tetrazolowej. Wprowadzenie żelazicyjanku potasu jako akceptora wodoru prawdopodobnie ulepszy technikę wykrywania aktywności dehydrogenaz. W tej metodzie końcowy produkt reakcji występuje w postaci żelazocyjanku miedzi, który jest dobrze widoczny w mikroskopie elektronowym [48]. Ostatnio opracowano nową metodę badania lokalizacji oksydazy cytochromowej na poziomie ultrastrukturalnym, opartą na oksydatywnej polimeryzacji dwuaminobenzydyny [58, 59].

Cytochemiczne metody wykrywania większości enzymów hydrolitycznych są oparte na reakcjach precypitacyjnych z użyciem metali ciężkich.

Poza wspomnianymi (klasycznymi) metodami cytochemicznymi są jeszcze inne, które mogą być z powodzeniem zastosowane podczas badania lokalizacji enzymów jądrowych. Jedną z tych metod jest autoradiografia wykorzystana przez niektórych autorów do badania miejsca działania polimerazy RNA oraz innych enzymów „znakowanych” radioaktywnym inhibitorem [49]. Inną techniką, która rokuje duże nadzieje w badaniu enzymów jądrowych, jest immunohistochemia wprowadzona przez Coonsa [15, 16]. W chwili obecnej ta technika jest systematycznie ulepszana i przystosowywana do mikroskopii elektronowej [27, 29, 30, 38].

#### ENZYMY JĄDROWE WYKRYWANE METODAMI CYTOCHEMICZNYMI

##### OKSYDOREDUKTAZY

Wyniki ilościowych badań biochemicznych wskazują, że co najmniej 13 enzymów oddechowych znajduje się w izolowanych jądrach komórkowych [8, 52, 65, 89].

Metodami histochemicznymi na poziomie mikroskopu świetlnego stwierdzono aktywność następujących dehydrogenaz w jądrach badanych *in situ*: izocytrynianowej, alkoholowej, glutaminowej, DL- $\beta$ -hydroksymasłowego kwasu, mleczanowej, DL- $\alpha$ -glicerofosforanu [91], fosfoglukonianu i glukozy-6-fosforanu [37]. Te dwa ostatnie enzymy badane były z zastosowaniem żelazicyjanku potasu na poziomie ultrastrukturalnym. W izolowanych jądrach wątroby szczura stwierdzono dodatni odczyn na NADH<sub>2</sub>-tetrazolową reduktazę, NADPH<sub>2</sub>-terazolową reduktazę, dehydrodenazę mleczanową i dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową [78]. Wszyscy wymienieni autorzy nie stwierdzili dodatniej reakcji na dehydrogenazę bursztynianową na terenie jądra komórkowego. Enzym ten nie był stwierdzony również metodami biochemicznymi w izolowanych jądrach ani jąderkach; dlatego zaskakujące są obserwacje [12, 13, 73] wskazujące na dodatni odczyn na dehydrogenazę bursztynianową w jąderkach komórek nabłonka normalnego i nowotworowego oraz w neuronach. Według Zawistowskiego, lokalizacja badanych przez niego dehydrogenaz (patrz wyżej) dotyczyła głównie jąderek. Przeciwnie, Vorbrodt i wsp. [78] obserwowali równomierne rozłożenie odczynu w całym jądrze oraz brak dodatniej reakcji na reduktazę NADH<sub>2</sub>-tetrazolową w jąderkach. Za pomocą mikroskopu elektronowego i zastosowania techniki z żelazicyjankiem potasu, Nagasaka [37] obserwował dodatni odczyn na dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (związaną z NADP) w błonie jądrowej oraz w zwartej chromatynie. W wewnętrznej błonie otoczki jądrowej plemników węża dodatni odczyn występował również przy badaniu dehydrogenazy fosfoglukonianowej.

Przy użyciu dwuaminobenzzydyny (DAB) w płynie inkubacyjnym stwierdzono dodatni odczyn na oksydazę cytochromową w wewnętrznej błonie otoczki jądrowej oraz w euchromatynie jąder izolowanych z grasicy szczura. Badania te wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały również obecność produktów reakcji w strukturach jądrowych określanych mianem „coiled bodies” [56]. Bardzo podobne wyniki były uzyskane przez Buchwałowa i wsp. [10], na izolowanych jądrach wątroby szczura, izolowanych błonach z tych jąder oraz na izolowanych jądrach grasicy. Należy podkreślić, że jak dotychczas wyniki takie były uzyskiwane jedynie podczas badania izolowanych jąder, a przed ich ostateczną oceną konieczne jest zbadanie aktywności enzymu w jądrach *in situ*.

#### TRANSFERAZY. GLIKOZYLOWE TRANSFERAZY

Z dużej grupy tych enzymów jedynie kilka może być wykrytych cytochemicznie. Enzymy te są ogólnie znane jako typowo cytoplazmatyczne i nigdy nie były stwierdzone w jądrach komórkowych w czasie

stosowania metod biochemicznych. Warto jednak podkreślić, że w pewnych odosobnionych przypadkach dodatni odczyn histochemiczny obserwowano w jądrze komórkowym. Godlewski [20] obserwował dodatnią reakcję na fosforylaze glikogenową (EC 2.4.1.1.) oraz na tzw. enzym rozgałęziający (EC 2.4.1.18) w jądrach niektórych komórek wątrobiaka wysiękowego Novikoffa. Dodatni odczyn na fosforylaze glikogenową był również obserwowany w jądrach niektórych komórek nabłonka w stanach przedrakowych ludzkiej szyjki macicy [21]. Shantaveerappa i wsp. [60] obserwowali reakcję na fosforylaze glikogenową w jądrach złuszczonej komórki nabłonka rogówki królika i małpy.

#### Nukleotydylotransferaza RNA (EC 2.7.7.6)

Lokalizacja tego enzymu znanego powszechnie pod nazwą polimerazy RNA była badana z zastosowaniem ultrastrukturalnej autoradiografii przez Maul i Hamiltona [34]. Autorzy ci inkubowali izolowane jądra wątroby szczura z trójfosforowymi nukleotydami będącymi prekursorami RNA. Jeden z nukleotydów był znakowany trytem i miejsca jego wbudowania były traktowane jako miejsca działania polimerazy RNA zależnej od DNA. Jeden enzym aktywowany jonami Mg, odpowiedzialny za syntezę rybosomalnego RNA był zlokalizowany na terenie jąderka. Drugi enzym aktywowany jonami manganu i siarczanem amonu był zlokalizowany głównie w chromatynie, i zdaniem autorów katalizuje on syntezę RNA podobnego do DNA.

#### Rybonukleazy (EC 2.7.7.16 i EC 2.7.7.17)

Enzymy te mogą być wykrywane czterema różnymi metodami, które będą po kolei omówione.

##### a) *Metoda błony substratowej*

Ta technika wprowadzona przez Daousta [17] i stopniowo ulepszana pozwala na poznanie lokalizacji aktywności rybonukleazy (RNAazy) na poziomie tkankowym. Dlatego też wyniki uzyskane tą metodą nie dostarczają nam informacji o wewnątrzjądrowej lokalizacji enzymu.

##### b) *Metody immunohistochemiczne*

Stosując technikę immunohistochemiczną i posługując się mikroskopem świetlnym Ehinger [19] oraz Morikawa [35] stwierdzili obecność RNAazy I w jąderkach komórek trzustki szczura oraz w jądrach i w błonie jądrowej wątroby wołu oraz w komórkach nerki i w makrofagach. Morikawa obserwował obecność RNAazy II w jądrach leukocytów utrwalanych w acetonie lub w formalinie oraz słabą reakcję w jądrach komórek nerki utrwalanych w formalinie.

##### c) *Metoda azowa wykrywania RNAazy*

Wydaje się, że najbardziej specyficznym substratem do wykrywania RNAazy jest  $\alpha$ -naftolu-urydno-3'-fosforan, który w środowisku inkubacyjnym jest hydrolizowany przez RNAazę do 2' : 3' -UMP i do wolnego naftolu. Uwolniony naftol jest wiązany z odpowiednią solą dwuazową dając nierozpuszczalny barwnik. Dodatni odczyn uzyskany tą metodą występuje wyłącznie w błonie komórkowej i nie był obserwowany na terenie jądra komórkowego [61, 88].

d) *Technika precypitacji fosforanu ołowiu*

Technika precypitacyjna wykrywania aktywności RNAazy jest oparta na metodzie Gomoriego wykrywania kwaśnej fosfotazy [25], która to technika była zaadoptowana przez Aronsona i wsp. [3] do wykrywania aktywności DNAazy II. Metoda wykrywania RNAazy była opisana przez Tapera [70], który zastosował substrat RNA oraz egzogenne fosfatazy (kwaśną lub zasadową) do uwalniania końcowych grup fosforanowych oligonukleotydów uwolnionych z RNA pod wpływem RNAazy. Uwolniony ortofosforan jest wychwytywany przez jony ołowiu i wypada z roztworu jako fosforan ołowiu, który może być uwidoczony za pomocą żółtego wielosiarczku amonu, ewentualnie może być oglądany w mikroskopie elektronowym. Jak widzimy, jest to typowa dwustopniowa reakcja zagrożająca wielką możliwością powstania artefaktów wynikających z dyfuzji produktów pierwszego lub drugiego etapu reakcji oraz adsorpcją egzogennych fosfataz na strukturach jądrowych. Dalszą niedogodnością jest użycie RNA, który może być atakowany nie tylko przez RNAazy, ale i przez fosfodwuesterazy. Taper [71, 72] obserwował dodatnią reakcję zarówno na RNAazę zasadową, jak i RNAazę kwaśną w większości jąder komórkowych. Na poziomie mikroskopu elektronowego i zastosowaniu utrwalanych w aldehydzie glutarowym ultracienkich skrawków mrożonych, Zotikow i Bernhard [90] stwierdzili obecność dodatniego odczynu na obie RNAazy na terenie skondensowanej chromatyny jądrowej. Ponieważ autorzy ci nie obserwowali dodatniego odczynu w jąderkach, pomimo że zarówno metodami immunohistochemicznymi oraz ilościowymi metodami biochemicznymi stwierdzono obecność RNAazy w tej strukturze jądrowej, wyniki ich nasuwają wątpliwości co do swojej specyficzności.

#### ENZYMY HYDROLITYCZNE

##### 1. Karboksylolizaza (EC 3.1.1.1.)

O obecności tego typu enzymu na terenie jądra komórkowego donoszą w swojej publikacji Barnard i wsp. [7], którzy użyli do wykrywania enzymu znakowany trytem inhibitor. Obecność radioaktywności obser-



wowali oni tylko w jądrach komórek nabłonkowych wyścielających kanaliki kręte nerki myszy, natomiast komórki wątroby wykazywały materiał radioaktywny wyłącznie w cytoplazmie. Obecność karboksyloesterazy w jądrach komórek nerki, a brak tego enzymu w jądrach komórek wątrobowych, może świadczyć o biochemicznej specjalizacji różnych organów na poziomie struktur komórkowych.

## 2. Fosfataza zasadowa (EC 3.1.3.1.)

Od czasu wprowadzenia przez Takamatsu [69] i Gomoriego [23] histochemicznej metody wykrywania fosfatazy zasadowej, pojawiło się wiele setek, a być może i tysięcy, publikacji, w których opisywano lokalizację odczynu na fosfatazę zasadową. Zauważono, że w skrawkach tkankowych w jądrach leżących w pobliżu miejsc o wysokiej aktywności fosfatazy zasadowej pojawia się również dodatni odczyn na ten enzym. Bardzo dawne eksperymenty Gomoriego [24] oraz Novikoffa [40] wskazują, że pojawienie się reakcji w jądrach komórkowych wynika z wtórnej adsorpcji fosforanu wapnia, i że jądra nie zawierają tego enzymu. Według Gomoriego [25] odczyn w jądrach pojawia się, gdy stężenie jonów wapnia jest niskie (0,01-0,03 M). Jeśli stężenie podniesiemy do około 0,1 M, to wówczas całkowicie zanikają wszelkie artefakty wynikające z dyfuzji fosforanu wapnia. Stwierdzenie to jest równie aktualne w chwili obecnej jak 20 lat temu. Zgodnie z powiedzeniem, że „wyjątki potwierdzają regułę” zachodzą skrajne przypadki, o których warto wspomnieć, np. Chévremont i Firket [14] obserwowali dodatnią reakcję na fosfatazę zasadową w jądrach rosnących *in vitro* fibroblastów i mioblastów; występowała ona zarówno w czasie stosowania metody Gomoriego, jak i metody azowej.

Ogólnie można powiedzieć, że stosując właściwie utrwaloną i odpowiednio przygotowaną tkankę cytochemiczna reakcja na fosfatazę zasadową nie występuje w jądrach komórkowych nawet po włączeniu tak aktywnych tkanek, jak nabłonki jelita cienkiego oraz kanalików krętych nerki.

## 3. Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2.)

Fosfataza kwaśna (FK) uważana za typowy wyznacznik lizosomów [42, 47] nie jest wykrywalna cytochemicznie w jądrach większości komórek zwierzęcych i roślinnych. Jest to zgodne z wynikami badań biochemików analizujących skład enzymatyczny izolowanych jąder i jąderek [11, 64, 65]. Jednakże podobnie jak w przypadku fosfatazy zasadowej, i tutaj są pewne wyjątki. Na przykład w czystym preparacie jąderek izo-

lowanych z oocytów jeżowca morskiego Vincent [75] stwierdził, metodami ilościowymi, stosunkowo wysoką aktywność fosfatazy kwaśnej. Love i wsp. [31] oraz Soriano i Love [67] obserwowali dodatni odczyn na fosfatazę kwaśną na terenie jąderek komórek HeLa hodowanych *in vitro*, posługując się przy tym zarówno mikroskopem świetlnym, jak i elektro-nowym. Produkt reakcji grupował się głównie w tzw. centrach włóknistych jąderka. Podobny odczyn dodatni na fosfatazę kwaśną obserwowano w naszej pracowni na materiale komórkowym, pochodzącym z guza wątroby chomika, który został wywołany wirusem onkogennym SV40.

#### 4. Fosfodwuesteraza (EC 3.1.4.1.)

Cytochemiczne badania nad lokalizacją fosfodwuesterazy I w wątrobie szczura z zastosowaniem substratu  $\alpha$ -naftolutymidyno-5'-fosforanu wykazały, że większość aktywności występuje w błonach ograniczających kanaliki żółciowe [66]. Odmienne wyniki uzyskał Wolf i wsp. [83, 84], stosując środowisko inkubacyjne zawierające substrat indygogeny. Uzyskane przez niego obrazy lokalizacji fosfodwuesterazy I (pH 9) były zasadniczo podobne do opisanych przez Sierakowską i wsp. [66]. Przy wykrywaniu fosfodwuesterazy II (pH 4,8-5,2) w nie utrwalonych skrawkach mrożonych śledziony, nerki, wątroby i jelita szczura i świni dodatni odczyn pojawiał się głównie w jądrach komórkowych. Przy pH 5,9 odczyn zmniejszał się w jądrach, natomiast pojawiał w lizosomach.

#### 5. Dezoksyrybonukleaza I (EC 3.1.4.5) i dezoksyrybonukleaza II (EC 3.1.4.6.)

Biochemiczna analiza jąder i jąderek izolowanych zarówno w środowisku wodnym, jak i bezwodnym wskazuje, że DNAaza I i DNAaza II są obecne w jądrze komórkowym, i w przeciwieństwie do RNAazy nie występują w jąderku [1, 11, 64, 65, 68]. Te zasadnicze różnice w wewnątrzjądrowym rozmieszczeniu DNAazy i RNAazy powinny być wzięte pod uwagę, gdy badamy lokalizację ich stosując metody cytochemiczne.

Zarówno wspomniana poprzednio metoda błony substratowej Daousta [17], jak i immunohistochemiczne badania Marshalla [33] nie dostarczają informacji o wewnątrzjądrowej lokalizacji aktywności DNAazy.

##### a) *Metody indygoenne*

Tsou i wsp. [74] opracowali nowe indygoenne substraty, które ich zdaniem mogą służyć do wykrywania aktywności DNAazy przez hydrolizę 3'- lub 5' wiązań fosforowych w DNA. Podstawową techniczną zaletą użytych substratów jest mała dyfuzja uwolnionego 5-jodoindoksyliu. W środowisku zasadowym autorzy obserwowali dodatnią reakcję w jądrach komórek endotelialnych oraz w nerkach i wątrobie. Zdaniem Wolfa

i wsp. [83, 84] DNAaza II może być również odpowiedzialna za hydrolizę ich substratu przy pH 4,8–5,2 w jądrach komórkowych.

Ponieważ szczegóły techniczne tych metod nie były dokładnie przez autorów opisane oraz nie ukazały się dalsze doniesienia na ten temat, musimy odnieść się z dużą rezerwą do wyników uzyskanych przez wymienionych autorów stosujących pochodne indoksyłu.

#### b) Metoda precypitacyjna

Metoda wykrywania DNAazy II z zastosowaniem techniki precypitacji fosforanu ołowiu była opracowana przez Aronsona i wsp. [3]. W mrożonych kriostatowych skrawkach utrwalonych w mieszaninie acetonu, formaliny i wody wykazano tą metodą silną dodatnią reakcję w jądrach komórkowych różnych tkanek i narządów. Metoda ta była starannie przebadana i zmodyfikowana przez Vorbrodta [77], który zalecił użycie mrożonych skrawków tkanki utrwalonej w płynie Bakera (formol-calcium) oraz środowisko inkubacyjne różniące się od oryginalnego wyższym pH (5,9), niższą koncentracją azotanu ołowiu (0,002 M) i niższą koncentracją DNA. Modyfikacje te doprowadziły do skrócenia czasu inkubacji i wykazania lokalizacji enzymu nie tylko w jądrach, lecz również w lizosomach. Jąderka pozostawały nie zabarwione. Obserwacje zostały potwierdzone przez Zotikowa i Bernharda [90] na ultracienkich skrawkach mrożonych, badanych w mikroskopie elektronowym. Autorzy ci obserwowali gęste złogi produktu reakcji w skondensowanej chromatynie, podczas gdy jąderka nie wykazywały obecności produktu reakcji.

Wyniki uzyskane metodą precypitacyjną należy przyjmować jednak z zastrzeżeniami. Wiadomo bowiem z prac Rosenthala i wsp. [55], że w momencie powstawania precypitatów fosforanu ołowiu wypadają też z roztworu nukleotydy, które wiążąc się z ołowiem tworzą również osad zmieszany z produktem reakcji. Ta precypitacja nukleotydów zwiększa się wraz ze zwiększeniem stężenia ołowiu w środowisku inkubacyjnym. Precypitaty te, jak to wykazali Moses i wsp. [36] oraz Rosenthal i wsp. [54, 55], są wybitnie spowinowaczone z heterochromatynowymi rejonami, lecz nie z jąderkami. Drugim źródłem artefaktów jest wykazana ostatnio w naszej pracowni tendencja fosfatazy kwaśnej (obecnej w środowisku inkubacyjnym) do adsorpcji na strukturach jądrowych. W konsekwencji możemy uzyskiwać lokalizację produktu reakcji na skondensowanej chromatynie, która wynika nie z rzeczywistej aktywności enzymu, lecz z odkładania się precypitatów oraz z adsorpcji fosfatazy kwaśnej, która uwalnia ortofosforany z oligonukleotydów powstałych pod wpływem działania DNAazy na cząsteczki DNA.

Ogólnie można powiedzieć, że nie mamy dotychczas odpowiednio specyficznej metody cytochemicznej umożliwiającej badanie lokalizacji aktywności dezoksyrybonukleaz.

## 6. ATP fosfohydrolaza (EC 3.6.1.3.)

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja fosfohydrolaz ATP (ATPaz) jest jednym z najbardziej kontrowersyjnych problemów enzymatycznej cytochemii. Seria artykułów dotyczących zagadnień nieenzymatycznej hydrolizy ATP przez jony ołowiu w środowisku opisanym przez Wachstein i Meisel [82] podważyła zaufanie do ich metod [36, 54, 55]. Nie wnikając w problemy techniczne wykrywania cytochemicznego aktywności ATPazowej warto przypomnieć, że metodami biochemicznymi Siebert [65] wykazał obecność w jądrach komórkowych, izolowanych z różnych narządów zwierzęcych, dwa typy aktywności ATPazowej. Jeden typ, nazwany ATPazą A zlokalizowany jest głównie w jąderku, ma optymalne działanie przy pH 5,9 i jest aktywowany jonami magnezu. Podobny enzym wykazujący wysoką specyfikę substratową został wyizolowany z jąder nerki świni i nazywany GTPazą A [62–65]. Drugi typ zwany ATPazą B wykazuje optymalne działanie przy pH 8,4 i jest aktywowany jonami wapnia. Aktywność tego enzymu jest zlokalizowana głównie w pozajądrowej części jądra. Lokalizacja dwóch, bardzo podobnych typów ATPaz, była niezależnie badana metodami cytochemicznymi przez Vorbrodta i Bańkowskiego z zastosowaniem własnej metody cytochemicznej [5, 6, 76]. W dalszych badaniach porównano wyniki biochemicznych badań Sieberta z doświadczeniami cytochemicznymi. Lokalizacja enzymu (enzymów?) jądrowego hydrolizującego ATP i GTP przy pH 5,9 odpowiadającego ATPazie A była starannie przebadana w skrawkach tkankowych i w izolowanych jądrach zarówno za pomocą mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego [79, 80]. Ze względu na możliwą interferencję enzymów cytoplazmatycznych przy inkubacji skrawków mrożonych (por. komentarz do rys. 1), przeprowadzono dalsze próby z użyciem utrwalanych w aldehydzie glutarowym ultracienkich skrawków mrożonych. W takich skrawkach lokalizacja produktu reakcji po inkubacji w środowisku zawierającym ATP lub GTP, świadcząca o aktywności ATPazy A była obserwowana na terenie jąderka i ziarnistości interchromatynowych [81]. Wygląd produktu reakcji złożonego z bardzo drobnych gęstych elektronowo precypitatów zlokalizowanych w ściśle określonych strukturach wewnątrzjądrowych świadczy, że nie mamy tu do czynienia z jego przypadkową adsorpcją, która zwykle dotyczy skondensowanej chromatyny. Warto tutaj dodać, że lokalizacja aktywności ATPazy A odpowiada rozmieszczeniu jądrowych składników rybonukleoproteidowych.

W chwili obecnej nie mamy innych, alternatywnych metod uwidocznienia aktywności ATPazy w jądrze komórkowym. Ponieważ obecne metody wykrywania ATPaz są dalekie od doskonałości, dlatego należy jak najbardziej starać się unikać ewentualnych źródeł błędów. Dlatego też

należy z naciskiem zalecić używanie ultracienkich skrawków mrożonych lub izolowanych jąder w celu możliwie największej redukcji ewentualnego wpływu enzymów cytoplazmatycznych. Istnieje też możliwość zmniejszenia powstawania artefaktów wynikających z nieenzymatycznej hydrolyzy ATP przez wprowadzenie do płynu inkubacyjnego czynników kompleksujących jony ołowiu jak np. tiron, bursztynian lub cysteinę [18, 32].

#### 7. Nukleozydodwufosfataza (EC 3.6.1.6)

Nukleozydodwufosfataza (NDPaza) jest uważana za enzymatyczny wyznacznik siateczki śródplazmatycznej, hydrolizujący IDP, UDP, GDP, lecz nie CDP lub ADP [43]. W niektórych komórkach enzym ten występuje w znacznej koncentracji w wewnętrznych elementach aparatu Golgiego, gdzie występuje również pirofosfataza tiaminowa (TPPaza). W wielu neuronach, szczególnie zwojowych, dodatni odczyn na TPPazę i NDPazę występuje nie tylko w aparacie Golgiego, lecz również wewnątrz jąder [45]. Również Yasuzumi i wsp. [85] obserwowali dodatnią reakcję na TPPazę w jądrach komórek łącznotkankowych takich narządów, jak żołądek, płuca i jądra.

#### ENZYMY OTOCZKI JĄDROWEJ

W skrawkach tkankowych inkubowanych w celu uwidoczniania różnych enzymów i następnie badanych w mikroskopie elektronowym można dostrzec produkt reakcji w przestrzeni okołojądrowej ograniczonej dwoma listkami (błonami) otoczki jądra. Wyniki wielu badań cytochemicznych wykazały obecność następujących enzymów w przestrzeni okołojądrowej:

- 1) dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa [37].
- 2) oksydaza roślinna (oksydaza BED) w korzonkach kukurydzy [39].
- 3) peroksydaza (endogenna), w różnych komórkach zwierzęcych [4, 46].
- 4) esteraza acetylo-cholinowa, w niektórych neuronach [44].
- 5) fosfataza kwaśna, w zarodkowych komórkach krwiotwórczych [80], w kwasochłonnych leukocytach [4].
- 6) glukozy-6-fosfataza, w różnych komórkach roślinnych i zwierzęcych [22, 28, 57].
- 7) arylosulfataza, w komórkach roślinnych [53], w kwasochłonnych leukocytach [4].
- 8) nukleozydodwufosfataza (NDPaza), w różnych komórkach zwierzęcych [43, 51].
- 9) pirofosfataza tiaminowa, w niektórych komórkach zwierzęcych [22, 51].
- 10) karboksylaza acetylo-CoA (EC 6.4.1.2.) w komórkach mięsnych wątroby szczura [87].

Wszystkie zestawione enzymy są obecne nie tylko w przestrzeni okołojądrowej, lecz również w woreczkach siateczki śródplazmatycznej, natomiast nie były one znalezione w jądrze komórkowym. W związku z tym enzymy te nie mogą być uważane za jądrowe, lecz raczej za należące do układu siateczki śródplazmatycznej. Ponieważ ciągłość strukturalna przestrzeni okołojądrowej z siateczką śródplazmatyczną jest dobrze znana, dlatego obecność tej samej aktywności enzymatycznej w obu strukturach nie jest zaskakująca.

Jak wiemy, otoczka jądrowa nie jest strukturą ciągłą, lecz ma liczne otwory zwane szczelinami lub porami. Yasuzumi i Tsubo [86] obserwowali dodatni odczyn na ATPazę w rejonie szczelin jądrowych komórek nabłonka spłotu naczyńkowego u myszy. Obserwacje te byłyby niezmiernie interesujące i ważne, gdyby nie dziwna metoda zastosowana przez autorów. Mianowicie inkubowali oni najpierw tkankę w środowisku zawierającym ATP, lecz nie zawierającym jonów ołowiu; jony te były dodawane pod koniec reakcji. W związku z tym badania te powinny być potwierdzone po zastosowaniu właściwej techniki wykrywania aktywności ATPazy. Biochemiczna analiza izolowanych otoczek jądrowych wskazuje na obecność w nich poza glukozo-6-fosfatazą i DPNH-cytochrom C reduktazą również aktywności aktywowanej jonami magnezu ATPazy [26]. Metodą cytochemiczną Bańkowski [6] wykazał dodatnią reakcję na ATPazę A w otoczce nie utrwalonych jąder izolowanych z wątroby szczura. Obserwacje potwierdzone były za pomocą mikroskopu elektronowego przez Vorbrodta [80] oraz Buchwałowa i wsp. [9].

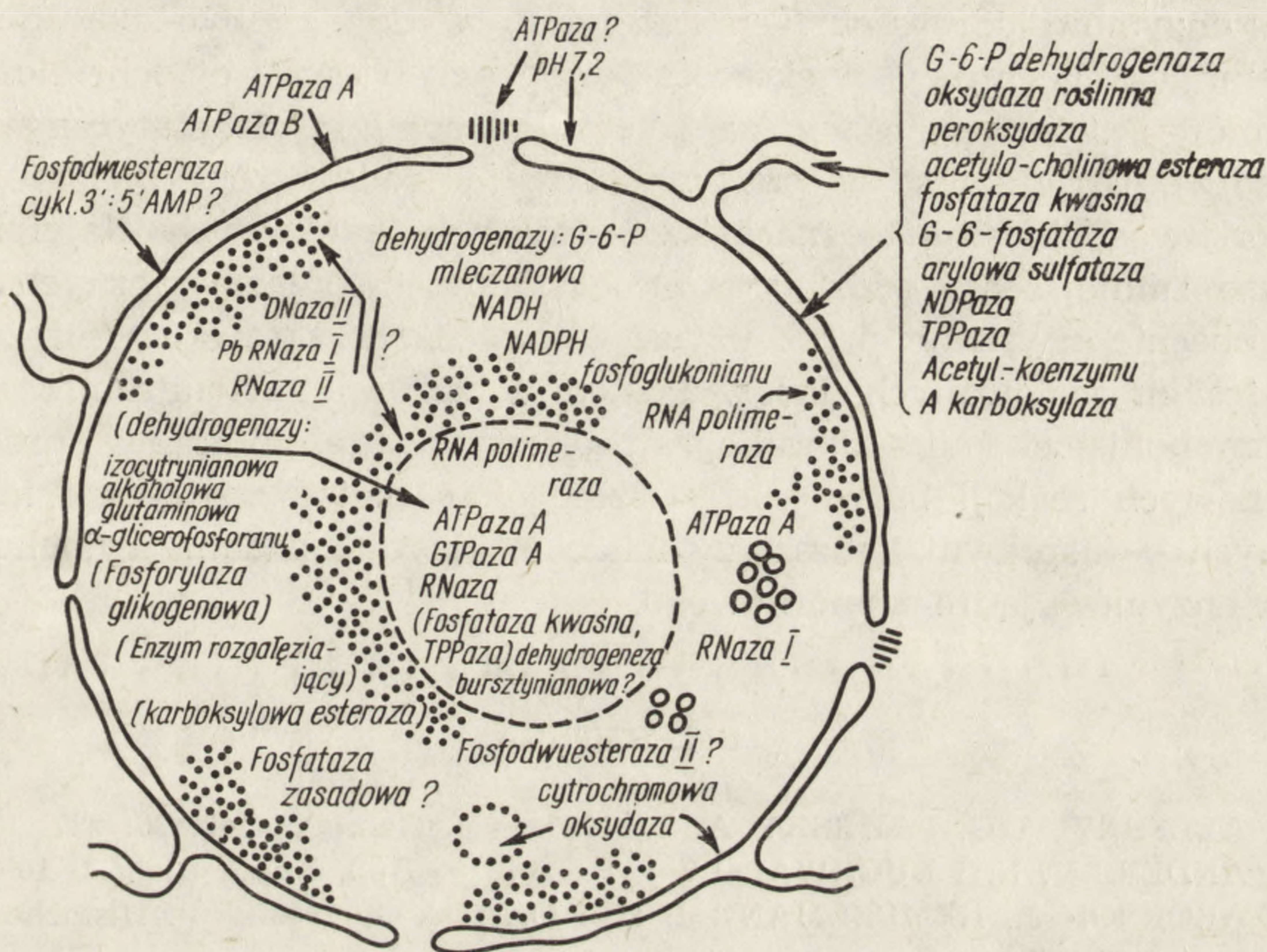
Aktywność cytochromowej oksydazy była ostatnio również wykazana w otoczce izolowanych jąder grasicy [56] oraz w izolowanych jądrach wątroby szczura [9].

#### UWAGI KOŃCOWE

Jądro jest ośrodkiem informacji genetycznej komórki i w związku z tym można przypuszczać, że jego struktura i skład chemiczny stanowią odzwierciedlenie tej specjalistycznej funkcji. Biorąc pod uwagę strukturę i funkcję jądra możemy w nim wydzielić cztery układy: układ chromosomalny (chromatyna), jąderko, sok jądrowy (przestrzeń płynną) i otoczkę jądrową.

Większość enzymów wykrywanych metodami cytochemicznymi w jądrze komórkowym znajduje się również w organellach cytoplazmatycznych i w związku z tym trudno jest uważać jakikolwiek z nich za typowy marker jądrowy. Spośród sześciu znanych grup enzymów, jedynie niektóre oksydoreduktazy, transferazy i hydrolazy (w sumie około 20 enzymów) mogą być w chwili obecnej wykrywane cytochemicznie na terenie

jądra; liazy, izomerazy i ligazy nie są dotychczas dostępne do badania cytochemicznego. Na załączonym schemacie (rys. 2) przedstawiono rozmieszczenie enzymów w jądrze komórkowym i w przestrzeni okołojądrowej (perinuclear space) wykrywalnych metodami cytochemicznymi. Szereg en-



Rys. 2. Rozmieszczenie w jądrze komórkowym i w przestrzeni okołojądrowej enzymów wykrywalnych metodami cytochemicznymi. Pola kropkowane przedstawiają chromatynę skondensowaną; małe kółka odpowiadają ziarenkom interchromatynowym; linia przerywana odgranicza jąderko od pozostałych struktur jądra; enzymy zamknięte w nawiasie były obserwowane jedynie w odosobnionych przypadkach; znak zapytania przy nazwie enzymu oznacza, że obecność danego enzymu w jądrze komórkowym jest wątpliwa; strzałki wskazują najczęstsze występowanie produktu reakcji w danej strukturze jądra, w przypadku oksydazy cytochromowej strzałki wskazują na obecność produktu reakcji w wewnętrznym listku otoczki jądrowej oraz w tzw. coiled body

zymów, włączając szczególnie ważne dla funkcji jądra, jest słabo związanych ze strukturą (lioenzymy), co również w znacznym stopniu ogranicza możliwości zastosowania metod cytochemicznych do badania enzymologii jądra komórkowego.

Wewnątrzjądrowa lokalizacja enzymów biorących udział w metabolizmie materiału genetycznego (kwasów nukleinowych) jest sprawą specjalnie interesującą. Dotychczas uzyskane informacje wskazują, że enzymy związane z metabolizmem RNA są głównie skoncentrowane w jąderku a w mniejszym stopniu na terenie jądra, szczególnie w interchromatyno-

wych ziarnach i w rejonach przychromatynowych. Do tych enzymów można zaliczyć polimerazę RNA, rybonukleazy i prawdopodobnie ATPazę A i B.

Nasuwa się ogólny wniosek, że postęp w badaniu cytochemicznym organelli cytoplazmatycznych jest znacznie większy niż w zakresie poznania enzymów jądrowych. Ten stan rzeczy wydaje się być spowodowany faktem, że koncentracja większości dostępnych badaniu cytochemicznemu enzymów jest znacznie wyższa w strukturach cytoplazmatycznych niż w jądrze. Utrudnia to w znacznym stopniu badanie enzymologii jądra komórkowego *in situ*, to znaczy w skrawkach tkankowych. Najefektywniejsze zmniejszenie oddziaływania enzymów cytoplazmatycznych może być obecnie uzyskane przez użycie ultracienkich skrawków mrożonych lub frakcji izolowanych jąder. Postęp w zakresie krioultramikrotomii, w immunohistochemii, autoradiografii ultrastrukturalnej oraz w opracowaniu nowych reakcji barwnych — szczególnie metod azowych i indygo-gennych — usprawni i rozszerzy nasze możliwości badania cytochemicznego enzymów jądra komórkowego.

#### LITERATURA

- [1] ALLFREY V. G. i MIRSKY A. E., 1953 — *J. Gen. Physiol.*, **36**: 227.
- [2] ANDERS V. N. i BUCHWAŁOW I. B., 1972 — *Bull. Exptl. Biol.*, **2**: 109.
- [3] ARONSON J., HEMPELMANN I. H. i OKADA S., 1958 — *J. Histochem. Cytochem* **6**: 255.
- [4] BAINTON D. F. i FARQUHAR M. G., 1970 — *J. Cell. Biol.*, **45**: 54.
- [5] BAŃKOWSKI Z. i VORBRODT A., 1957 — *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II B*, **5**: 245.
- [6] BAŃKOWSKI Z., 1963 — *Folia Histochem. Cytochem.*, **1**: 17.
- [7] BARNARD E. A., BUDD G. C. i OSTROWSKI K., 1970 — *Exptl. Cell. Res.*, **60**: 405.
- [8] BETEL J., 1967 — *Biochim. Biophys. Acta*, **143**: 62.
- [9] BUCHWAŁOW I. B., ZBARSKI I. B., RAICHLIN N. T., TROICKAJA L. P. i FILIPOWA N. A., 1971 — *Citologia*, **13**: 654.
- [10] BUCHWAŁOW I. B., DMITRIEW H. A., TROICKAJA L. P., ZBARSKI I. B., PEREWOSZCZIKOWA K. A., RAICHLIN N. T., FILIPOWA N. A., *Cytologia* (w druku).
- [11] BUSCH H., 1968 [w] *Comprehensive Biochemistry* M. FLORKIN i E. H. STOTZ, Elsevier Publ. C. Comp. Amsterdam, London, New York, **23**: 39-76.
- [12] CHATTERJEE P. R., i MITRA S., 1961 — *Nature*, **192**: 285.
- [13] CHATTERJEE P. R., i MITRA S., 1962 — *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 6.
- [14] CHÈVREMONT M., i FIRKET H., 1953 — *Int. Rev. Cytol.*, **2**: 261.
- [15] COONS A. H., i KAPLAN M. H., 1950 — *J. Exptl. Med.*, **91**: 1.
- [16] COONS A. H., 1956 — *Intern. Rev. Cytol.*, **5**: 1.
- [17] DAOUST R., 1957 — *Exptl. Cell. Res.*, **12**: 203.
- [18] DEIMLING O. H., 1964 — *Histochemie*, **4**: 48.
- [19] EHINGER E., 1965 — *Histochemie*, **5**: 145.



- [20] GODLEWSKI H. G., 1961 — *Acta Histochem.*, **11**: 58.
- [21] GODLEWSKI H. G., 1964 — *Acta Union Intern. Cancer.*, **20**: 706.
- [22] GOLDFISCHER S., ESSNER E. i NOVIKOFF A. B., 1964 — *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 72.
- [23] GOMORI G., 1939 — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **42**: 23.
- [24] GOMORI G., 1951 — *J. Lab. Clin. Med.*, **37**: 526.
- [25] GOMORI G., 1953 — *Microscopic Histochemistry*. The University of Chicago Press.
- [26] KASHING D. M., i KASPER C. B., 1969 — *J. Biol. Chem.*, **244**: 3786.
- [27] KUHLMAN W. D., 1970 — [w] *Electron Microscopy*, red. P. Favard tom I. 535-536, Soc. Franc. Micr. Electr. Paris.
- [28] LAZARUS S. S., i BARDEN H., 1964 — *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 792.
- [29] LEDUC E. H., AVRAMEAS S., BOUTEILLE M., 1968 — *J. Exptl. Med.*, **127**: 109.
- [30] LEDUC E. H., SCOTT G. B., AVRAMEAS S., J. 1969 — *J. Histochem. Cytochem.* **17**: 211.
- [31] LOVE R., STUDZIŃSKI G. P., WALSH R. J., 1969 — *Exptl. Cell. Res.*, **58**: 62.
- [32] MALENDOWICZ L., 1972 — *Folia Histochem. Cytochem.*, **10**: 237.
- [33] MARSHALL J. M., 1954 — *Exptl. Cell. Res.*, **6**: 240.
- [34] MAUL G. G., HAMILTON T. H., 1967 — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**: 1371.
- [35] MORIKAWA S., 1967 — *J. Histochem. Cytochem.*, **15**: 662.
- [36] MOSES H. L., ROSENTHAL A. S., BEAVER D. L., SCHUFFMAN S. S., 1966 — *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 702.
- [37] NAGASAKA M., 1970 — [w] *Electron Microscopy* red P. Favard, tom I, 555, Soc. Franc. Micr. Electr. Paris.
- [38] NAKANE P. K., i PIERCE B. G., 1966 — *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 920.
- [39] NIR. I., SELIGMAN A. M., 1971 — *J. Histochem. Cytochem.*, **19**: 611.
- [40] NOVIKOFF A. B., 1951 — *Science*, **113**: 320.
- [41] NOVIKOFF A. B., i ESSNER E., 1960 — *Amer. J. Medicine*, **29**: 102.
- [42] NOVIKOFF A. B., i ESSNER E., 1962 — *Fed. Proc.*, **21**: 1130.
- [43] NOVIKOFF A. B., i HEUS M., 1963 — *J. Biol. Chem.*, **238**: 710.
- [44] NOVIKOFF A. B., QUINTANA N., VILLAVERDE H., FORSCHIRM R. 1966 — *J. Cell. Biol.*, **29**: 525.
- [45] NOVIKOFF A. B., 1967 — [w] *The Neuron*, red. H. Hyden. Elsevier, New York.
- [46] NOVIKOFF A. B., BEARD M. E., ALBALA A., SHEID B., QUINTANA N. i BIEMPICA L., 1971 — *J. Microscopie* **12**: 381.
- [47] NOVIKOFF A. B., i NOVIKOFF P. N. 1972 — [w] *Biomembranes*, red. L. A. Manson, Plenum Publishing Corp. New York, tom II, 33-39.
- [48] OGAWA K., SAITO T., MAYAHARA H., 1968 — *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 49.
- [49] OSTROWSKI K., BARNARD E. A., 1961 — *Exptl. Cell. Res.*, **25**: 465.
- [50] PEARSE A. C. E., 1968 — *Histochemistry*, Third Edition Churchill Ltd., London, tom I.
- [51] PELLETIER G., NOVIKOFF A. B., 1972 — *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 1.
- [52] POKROWSKI A. A., ZBARSKI, I. B., GAPPAROW M. M., PIEREWOSZCZIKOWA K. K., TUTELIAN W. A., DIELEKTORSKAJA L. N., LASZNIWA N. W. i PONOMAREWA L. G., 1970 — [w] *The cell nucleus and its ultrastructures*, 156-160. Moskva.

- [53] POUX N., 1965 — *J. Histochem. Cytochem.*, **13**: 520.
- [54] ROSENTHAL A. S., MOSES H. L., BEAVER D. L., SCHUFFMAN S. S., 1966 — *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 698.
- [55] ROSENTHAL A. S., MOSES H. L., CANOTE C. E., TICE L., 1969 — *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 839.
- [56] RUPEC M., BRÜHL R., SEKERIS C. E., 1971 — *Exptl. Cell Res.*, **66**: 157.
- [57] SABATINI D., BENSCH K., BARNETT R. J., 1963 — *J. Cell Biol.*, **17**: 19.
- [58] SELIGMAN A. M., KARNOVSKY M. J., WASSERKRUG H. L., HANKER J. S., 1968 — *J. Cell Biol.*, **38**: 1.
- [59] SELIGMAN A. M., WASSERKRUG L. H., PLAPINGER R. E., 1970 — *Histochemie*, **23**, 43.
- [60] SHANTAVEERAPPA T. R., WAITZMAN H. R., BOURNE G. H., 1966 — *Histochemie*, **7**: 81.
- [61] SHUGAR D., i SIERAKOWSKA H., 1967 — [w] *Progress Nucleic Acid Res.*, tom VII, 369-429.
- [62] SIEBERT G., 1970 — [w] *The Cell Nucleus*, red. Mitchell I. S.
- [63] SIEBERT G., 1963 — *Exptl. Cell Res. Suppl.*, **9**: 389.
- [64] SIEBERT G., 1966 — *National Cancer. Inst. Monogr.*, **23**: 285.
- [65] SIEBERT G., 1968 — [w] *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florkin i E. H. Stotz tom XIII, 1-37. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, New York.
- [66] SIERAKOWSKA H., SZEMPLIŃSKA H., SHUGAR D., 1963 — *Acta Biochim. Polon.*, **10**: 399.
- [67] SORIANO R. Z., i LOVE R., 1971 — *Exptl. Cell Res.*, **65**: 467.
- [68] SWINGLE K. F., COLE L., 1964 — *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 442.
- [69] TAKAMATSU H., 1939 — *Tr. Soc. Path. Jap.*, **29**: 492.
- [70] TAPER H. S., 1968 — *Ann. Histochem.*, **14**: 301.
- [71] TAPER H. S., BRUCHER J. M., FORT I., 1971 — *Cancer*, **28**: 482.
- [72] TAPER H. S., FORT L., BRUCHER J. M., 1971 — *Cancer Res.*, **31**: 913.
- [73] TEWARI H. B., i BOURNE G. H., 1962 — *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 619.
- [74] TSOU K. C., CHANG M. Y., MATSUKAWA S., 1968 — [w] *3rd Intern. Congress of Histochem. Cytochem.*, 273-274, Springer Verlag, New York.
- [75] VINCENT V. S., 1952 — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**: 139.
- [76] VORBRODT A., 1957 — *Exptl. Cell Res.*, **12**: 154.
- [77] VORBRODT A., 1961 — *J. Histochem. Cytochem.*, **9**: 647.
- [78] VORBRODT A., STEPLEWSKI Z., ŻOŁNIERCZYK Z., 1965 — *Folia Histochem. Cytochem.*, **3**: 137.
- [79] VORBRODT A., KRZYŻOWSKA-GRUCA S., STEPLEWSKI Z., 1964 — *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **12**: 337.
- [80] VORBRODT A., 1967 — *Acta Histochem.*, **28**: 215.
- [81] VORBRODT A., i BERNHARD W., 1968 — *J. Microscopie*, **7**: 195.
- [82] WACHSTEIN M., MEISEL E., 1957 — *Amer. J. Clin. Path.*, **27**: 13.
- [83] WOLF P. L., HORWITZ J. P., FREISLER J. V. VON DER MUEHLL E., VASQUEZ J., 1968 — [w] *3rd Intern. Congress Histochem. Cytochem.* 295, Springer Verlag, New York.
- [84] WOLF P. L., HORWITZ J. P., FREISLER J. V. VASQUEZ J., von der MUEHLL E., 1968 — *Biochim. Biophys. Acta*, **159**: 212.
- [85] YASUZUMI G., SUHIGARA R., NAKAI Y., SUGIOKA T., ENOMOTO K., 1965 — *J. Electron Microscopy*, **14**: 346.
- [86] YASUZUMI G., i TSUBO J., 1966 — *Exptl. Cell Res.*, **43**: 281.

- [87] YATES R. D., HIGGINS J. A., BARNETT R. J., 1969 — J. Histochem. Cytochem., **17**: 379.
- [88] ZAN-KOWALCZEWSKA H., SIERAKOWSKA H., SHUGAR D., 1966 — Acta Biochim. Polon., **13**: 237.
- [89] ZBARSKI I. B., i PEREWOSZCZIKOWA K. A., 1970 — [w] The Cell Nucleus and its Ultrastructures, 144-155. Moskva.
- [90] ZOTIKOV L., i BERNHARD W., 1970 — J. Ultrastr. Res., **30**: 642.
- [91] ZAWISTOWSKI S., BŁAWAT F., KOWALSKA Z., TOWIAŃSKA A., 1965 — Folia Histochem. Cytochem., **3**: 283.

*Otrzymano: styczeń, 1973.*

*Przyjęto: maj, 1973.*

*Adres autora: ul. Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice.*



## WZGLĘDNA INTENSYWNOŚĆ SYNTEZY KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH W KOMÓRCIE

Tomasz GOŁASZEWSKI i Marta RYTEL

Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

*Streszczenie.* W artykule omówiono wpływ zmian składu pożywki na intensywność syntezy różnych klas RNA w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych. Omówiono również niektóre mechanizmy regulacji natężenia tej syntezy.

W komórkach bakteryjnych i eukariotycznych występuje kilka klas kwasów rybonukleinowych (RNA). Różnią się one między sobą tak pod względem funkcjonalnym (rybosomowe RNA — rRNA, przenoszący aminokwasy — tRNA, informacyjny — mRNA), jak też pod względem stopnia spolimeryzowania — a zatem i wartości stałych sedymentacji S. Bliższe dane na temat różnych form rRNA przytoczono w innym artykule [1]. Tutaj zaznaczymy, że prócz tzw. dojrzałych rRNA, wykrywanych w rybosomach, występują również prekursorowe rRNA, które w trakcie „obróbki potranskrypcyjnej” przekształcają się w stabilne formy polimeru (por. [1]). W jądrze komórkowym — prócz prekursorowych rRNA — występuje heterogenny wysokocząsteczkowy RNA określany skrótem angielskim HnRNA (dawniej D-RNA), który tu oznaczamy skrótem HjRNA. Jest to polidispersyjny zestaw cząsteczek o stałych sedymentacji 20S — 100S (por. [2]; HjRNA powstaje w chromatynie pozająderekowej i stanowi formę prekursorową dla mRNA przekazywanego do cytoplazmy.

Całkowity RNA komórki może być podzielony na dwie podstawowe klasy: RNA stabilny (rRNA, tRNA) oraz RNA szybko metabolizowany (HjRNA, mRNA). Dla uproszczenia nie klasyfikujemy tu prekursorowego rRNA stanowiącego nieznaczny odsetek rRNA.

W artykule tym, główną uwagę poświęcimy zmianom względnego natężenia syntezy rRNA i mRNA w komórkach bakteryjnych. Zmiany takie w komórkach eukariotycznych następują nie tylko w warunkach zakłócających szybkość podziałów komórkowych, lecz również są one następ-

stwem fizjologicznych zmian całego metabolizmu komórkowego: w czasie rozwoju zarodkowego i podczas poszczególnych faz cyklu podziałowego. Zagadnienie to omówiono — w odniesieniu do rRNA — w innym artykule [1].

### 1. NATEŻENIE SYNTEZY RNA A WARUNKI HODOWLI KOMÓREK

W danych z literatury dotyczących przedmiotu, wyróżnia się dwa podstawowe typy zmian w pożywce wzrostowej mające wpływ na względną szybkość syntezy poszczególnych klas kwasów rybonukleinowych. Jeden z nich polega na zamianie gorszego źródła energii (np. kwasu bursztynowego) na lepsze źródło energetyczne. Mamy wówczas do czynienia z tzw. wzbogaceniem żywieniowym pożywki (ang. „shift up”); w przeciwnym przypadku — gdy lepsze źródło energii (jakim jest np. glukoza) jest zastępowane przez składnik mniej wydajny energetycznie — dokonujemy tzw. zubożenia żywieniowego pożywki (ang. „shift down”).

Drugi typ zmian w składzie pożywki polega na usuwaniu określonego składnika (aminokwasu, zasady azotowej) ze środowiska, w którym hodowane są komórki auksotroficzne, niezdolne do syntezy danego związku. Tego rodzaju badania prowadzi się m. in. na mutantach „rozluźnionych” (ang. „relaxed”), które w warunkach głodu aminokwasowego syntetyzują RNA, mimo że zahamowana jest u nich synteza białek (wznawiana dopiero po przywróceniu aminokwasu — w okresie „uzdrawiania” komórki) lub na „ścisłych” (ang. „stringent”) szczepach bakteryjnych, u których następuje wówczas równoczesne zahamowanie syntezy białek i RNA. O wykorzystaniu tych szczepów do badań nad syntezą rRNA pisaliśmy szerzej w innych artykułach [3, 4]. Tutaj zajmiemy się szerzej omówieniem mechanizmu kontrolującego zmiany natężenia syntezy stabilnych i niestabilnych kwasów rybonukleinowych (czyli względnej szybkości syntezy tych RNA) — zmiany takie mają miejsce właśnie po „zubożeniu” lub „wzbogaceniu” żywieniowym pożywki [5–13]. Wiadomo, że po przeniesieniu komórek z pożywki zawierającej bogatsze źródło energii do pożywki zawierającej gorsze źródło energetyczne następuje preferencyjne obniżenie syntezy rRNA [5, 8, 9], przy jednoczesnym zwiększeniu syntezy mRNA [5]. W pracowni Nakady stwierdzono [14], że usunięcie uracylu z pożywki wzrostowej dla pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) doprowadza do obniżenia syntezy rRNA, choć pozostaje bez wpływu na syntezę mRNA.

Przeciwnie, gdy komórki przenoszone są z pożywki zawierającej gorsze źródło energii do pożywki bogatszej energetycznie, wówczas w początkowym okresie wzrostu w dogodniejszych warunkach następuje wzmożona synteza rRNA [6, 7], a synteza mRNA jest poważnie ograniczona [7].

Szczegółowe badania nad mechanizmem regulacji procesów syntezy różnych klas RNA prowadzili Lazzarini i Winslow [15]. Stwierdzili oni, iż u mutantu „rozluźnionego” *E. coli* CP-79 — w warunkach zubożenia żywieniowego pożywki — synteza mRNA jedynie nieznacznie obniża się w porównaniu do natężenia syntezy stwierdzanej w komórkach kontrolnych — spadek ten wynosi około 20%. W przeciwieństwie do mRNA, synteza rRNA obniża się wówczas o 75%. U tego samego mutantu hodowanego w warunkach głodu aminokwasowego następuje jedynie 25% redukcja natężenia syntezy RNA, przy czym tRNA i rRNA gromadzą się w komórce z podobną szybkością, jak w normalnych warunkach wzrostu (tzn. w obecności aminokwasów w pożywce). Innymi słowami, podczas głodu aminokwasowego mutanty „rozluźnione” charakteryzują się preferencyjnym zahamowaniem syntezy mRNA [15].

Szczep „ścisty” *E. coli* CP-78 reaguje w sposób odmienny: po usunięciu określonego aminokwasu z pożywki, w komórce następuje niemal całkowite zahamowanie syntezy RNA. Zgodnie z danymi przytoczonymi przez Lazzariniego i Winslowa [15] niemal całkowitemu zahamowaniu (ponad 90%) syntezy rRNA towarzyszy 60% inhibicja syntezy mRNA. W tym przypadku mamy więc do czynienia z preferencyjnym zahamowaniem syntezy stabilnego RNA.

W warunkach głodu aminokwasowego w komórce szczepów „ścistych” *E. coli* nagromadzają się pochodne guanozyny wpływające hamująco na syntezę RNA [16–21]. Związkami tymi są: czterofosforan guanozyny (ppGpp) i pięcioletofosforan guanozyny (pppGpp). Zadaniem Kjeldgaarda [20] oba związki są bezpośrednimi efektorami syntezy rRNA powstającymi u mutantów „ścistych” — w czasie głodu aminokwasowego — na 50S podjednostce rybosomu. Ważną rolę spełnia w procesie ich syntezy pewien czynnik białkowy (tzw. ścisły). Powstawanie tych związków wymaga obecności ATP [21]. W regulację ich syntezy wprzęgnięty jest — prócz czynnika „ścislego” [20] — również tRNA [21]. W obecności na rybosomie aminoacylo-tRNA synteza ppGpp i pppGpp jest wstrzymana [21]. Istnieją sugestie, w myśl których czterofosforan guanozyny preferencyjnie hamuje syntezę rRNA [16–18]. Okazało się bowiem, że szczególnie drastycznie ppGpp ogranicza syntezę rRNA stymulowaną przez czynnik  $\psi_r$  [18], zidentyfikowany później z czynnikiem wydłużania łańcuchów polipeptydowych Tu i czynnikiem Ts (por. [22]). Można sądzić [22], że czynniki te mogą być wprzęgnięte zarazem w procesy wydłużania łańcuchów RNA.

Niedawne badania Traversa i Bucklanda [22] sugerują, że ppGpp wpływa hamująco przede wszystkim na aktywność jednej z trzech form konformacyjnych polimerazy RNA obecnych w komórkach pałeczki okrężnicy; polimeraza występująca w formie konformacyjnej  $(E^\delta)_s$  (patrz niżej) jest najprawdopodobniej stabilizowana przez czynniki Tu i Ts [22].

Interesujące dane na temat regulacji syntezy różnych klas RNA uzyskano w pracowni Dennisa [23, 24]. Autorzy zajmowali się kinetyką syntezy stabilnych RNA i mRNA u szczepu *B/r Escherichia coli* w warunkach wzbogacenia żywieniowego pożywki wzrostowej. Próbowali oni wyjaśnić, czy obserwowany wówczas wzrost syntezy rRNA wynika z aktywacji polimerazy RNA nie wprzęgniętej w procesy transkrypcji przed zmianą pożywki, czy też wynika on z indukcji nowych cząsteczek enzymu. W badaniach swoich posłużyli się ciekawą techniką, a wnioski — rzucające nowe światło na omawiane zagadnienie — oparli na matematycznych wyliczeniach.

Poniżej przytaczamy równanie, którym posługiwali się cytowani autorzy [23, 24]:

$$r_s = c_s \cdot \psi_s \cdot N_{pol},$$

w którym  $r_s$  oznacza szybkość syntezy stabilnego RNA w danym momencie,  $c_s$  — szybkość wydłużania łańcucha tego RNA,  $\psi_s$  — liczbę cząsteczek polimerazy RNA transkrybujących stabilny RNA, a  $N_{pol}$  — liczbę cząsteczek polimerazy RNA w komórce. Autorzy określili, który z wymienionych parametrów ulega zmianie po wzbogaceniu żywieniowym pożywki.

Autorzy [23] wykorzystali w swoich badaniach fakt, że antybiotyk rifampicyna hamuje jedynie proces inicjacji syntezy łańcuchów polinukleotydowych, nie wpływa natomiast na syntezę już rozpoczętego uprzednio łańcucha RNA [25]. Założyli oni, że — w obecności rifampicyny — czas, w którym piętno  $^3\text{H}$ -urydyny przestaje się już włączać do danej klasy RNA odpowiada czasowi potrzebnemu do transkrypcji określonego odcinka DNA, np. zespołu cistronów kierujących syntezą rRNA: od miejsca inicjacji (miejsce promotera) do końca zespołu genów. Czym później po dodaniu rifampicyny do próby badanej dodawano  $^3\text{H}$ -urydynę, tym mniej piętna wykrywano w rRNA. Piętno urydyny zanikało najpierw w 30S podjednostkach rybosomowych (zawierających 16S rRNA), później dopiero — w 50S podjednostkach rybosomu (zawierających 23S rRNA i 5S rRNA). Pozostawało to w związku z przyjmowanym dziś modelem ułożenia cistronów rRNA w jednostce transkrypcyjnej [26]: cistrony dla 16S rRNA leżą blisko miejsca inicjacji syntezy (promotera), cistrony dla 23S rRNA zajmują pozycję środkową, a cistrony dla 5S rRNA — leżą w pozycji dystalnej, na końcu jednostki transkrypcyjnej rRNA (por. [27]).

Czas potrzebny na ukończenie łańcuchów rRNA wzrasta wraz ze zwolnieniem prędkości podziałów komórkowych. Prędkość ta znacznie spada, jeśli pożywkę zawierającą glukozę i aminokwasy zastąpimy pożywką zawierającą sole kwasu bursztynowego jako jedyne źródło ener-



getyczne. Poziome oddalenie krzywych inkorporacji urydyny do 30S i 50S podjednostek rybosomowych w funkcji czasu (odczytywane wzdłuż osi odciętych) jest równe czasowi potrzebnemu — w danych warunkach hodowli — dla syntezy 23S rRNA i 5S rRNA) czyli łącznie 3120 nukleotydów [23]. W pożywce glukozowo-aminokwasowej czas ten wynosi 30–34 sekundy, w pożywce bursztynianowej — 42–46 sekund. Czasy wyliczone wskazują, że szybkość wydłużania się łańcuchów RNA rybosomowego ( $c_r$ ) wynosi w obu pożywkach odpowiednio: 6300 i 4400 nukleotydów na minutę. Tym samym, szybkość wydłużania łańcuchów rRNA podczas wzbogacenia żywieniowego pożywki (glukoza i aminokwasy zamiast bursztynianów) wzrasta o około 45%.

Powstaje pytanie, jaka jest szybkość wydłużania łańcuchów mRNA? Autorzy z grupy Dennisa (por. [23]) wyliczyli, że podczas wzrostu pałeczki okrężnicy w pożywkach glukozowo-aminokwasowych szybkość wydłużania się łańcuchów mRNA wynosi około 3000 nukleotydów na minutę, a tym samym jest ona dwukrotnie niższa niż szybkość wydłużania cząsteczek rRNA.

W pracy swojej pracownicy grupy Dennisa podkreślili, że szybkość wydłużania łańcuchów mRNA — w przeciwieństwie do analogicznej wartości dla rRNA — nie zależy od szybkości podziałów komórki.

W dalszych rozważaniach [23] autorzy podają, że liczba cząsteczek polimerazy przepisujących rRNA jest równa iloczynowi tzw. liniowej gęstości polimerazy RNA na rDNA (por. [1]) (czyli liczby cząsteczek enzymu na jednostkę transkrypcyjną rRNA) i liczby jednostek transkrypcyjnych rRNA w genomie (przyjmując, że na początku replikacji chromosomów u *E. coli* występuje 6 zespolonych jednostek w genomie). Z odpowiednich wyliczeń [23, 24] wynika, że wzrost liczby cząsteczek polimerazy przepisujących stabilny RNA ( $\psi_s$ ) i szybkości wzrostu łańcuchów rRNA ( $c_s$ ) wystarczająco tłumaczą zwiększenie szybkości syntezy rRNA obserwowane po wzbogaceniu pożywki u *E. coli*. Zdaniem autorów z grupy Dennisa [23, 24], w grę wchodzi wówczas zjawisko przerzucenia (transferu) pewnej liczby cząsteczek polimerazy RNA z genów kodujących mRNA do genów kierujących syntezą rRNA. Wyrazem tego zjawiska jest wzrost wspomnianej już wyżej tzw. gęstości liniowej cząsteczek polimerazy RNA wzdłuż rDNA podczas wzrostu szybkości podziałów komórkowych. W szybko dzielących się komórkach pałeczki okrężnicy (przy wartości  $\mu = 3$ , gdzie  $\mu$  oznacza czas podwajania masy komórek) cistrony rRNA są bliskie wysycenia cząsteczkami polimerazy RNA. Wzrost wartości  $\psi_s$  — liczby cząsteczek polimerazy RNA wprzęgniętych w syntezę stabilnego RNA (a więc głównie rRNA) — wraz ze wzrostem wartości  $\mu$  jest skorelowany ze wzrostem względnej szybkości stabilnego RNA, czyli stosunku szybkości syntezy stabilnego RNA do



charakteryzuje się masą cząsteczkową 480 000 [22]. Tym samym, zmiany strukturalne polimerazy RNA — jako odzwierciedlenie zmian ekologicznych komórki — doprowadzałyby do zmian względnego natężenia syntezy określonych klas kwasów rybonukleinowych.

## 2. WZGLĘDNE NATEŻENIE SYNTEZY RÓŻNYCH KLAS RNA W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH

Istnieje zasadnicze podobieństwo między bakteriami i komórkami eukariotycznymi pod względem przebiegu zmian we względnym natężeniu syntezy stabilnego RNA i mRNA mającym miejsce po dokonaniu zmian w składzie pożywki wzrostowej. Tak na przykład po przeniesieniu komórek drożdży do uboższej energetycznie pożywki obserwuje się u nich spadek syntezy rRNA i wzmożone nagromadzenie się mRNA [29, 30]. Zgodnie z wynikami Holoubka i wsp. [31], komórki raka puchlinowego Ehrlicha przeniesione z organizmu myszy do roztworu soli, a więc z układu *in vivo* do układu *in vitro* (co przypomina w swym charakterze zmianę warunków typu zubożenia żywieniowego pożywki, por. rozdz. 1), rozpoczynają wzmożoną syntezę mRNA i charakteryzują się zarazem obniżeniem syntezy rRNA. Badania autorów [31] sugerują, iż syntetyzowany z większą (niż w warunkach *in vivo*) wydajnością mRNA stanowi jakościowo odmienną pulę tego RNA od informacyjnego RNA wytwarzanego *in vivo*. Powstający *in vitro* mRNA jest przez komórki wykorzystywany do syntezy określonych białek, białek niezbędnych dla przystosowania się organizmu do nowych — mniej korzystnych — warunków ekologicznych.

Pewną analogią do zubożenia żywieniowego pożywki jest zapewne zmiana warunków oświetlenia rozwijających się roślin. Komórki gametofitu paproci wodnej *Pteridium aquilinum* przeniesione z warunków normalnego oświetlenia światłem białym, do warunków oświetlenia światłem czerwonym — mniej przydatnym do wzrostu — dały charakterystyczną odpowiedź metaboliczną: wzmogły syntezę mRNA, wydatnie zmniejszając syntezę rRNA [32].

Badania w pracowni Bogorada [33], wykazały że po oświetleniu rośliny uprzednio hodowanej w warunkach zaciemnienia — a więc po dokonaniu zmian przypominających wzbogacenie żywieniowe pożywki — następuje preferencyjna synteza rRNA w plastydach.

W ostatnich latach pojawiło się szereg prac [34–36] potwierdzających, że wraz ze zmianą warunków hodowli komórek eukariotycznych następuje zmiana szybkości syntezy rRNA i mRNA. Zdaniem Kubińskiego i Kocha [37] każdy stress, na jaki narażona jest komórka, wywołuje zmniejszoną syntezę rRNA i zwiększoną syntezę mRNA. Z kolei każdo-

razowe wprowadzenie warunków sprzyjających wzrostowi komórek wzmaga syntezę rRNA — komórki charakteryzują się wówczas wzmożoną syntezą rybosomów, umożliwiającą następnie intensywniejszą produkcję białek.

#### UWAGI KOŃCOWE

Zarówno u bakterii jak i w komórkach eukariotycznych rRNA stanowi blisko 80% całkowitego kwasu rybonukleinowego. Rybosomowy RNA jest syntetyzowany — w warunkach fizjologicznych — intensywniej niż tRNA i mRNA [31, 38]. W układzie *in vitro* w danym momencie podczas transkrypcji DNA *E. coli* rRNA stanowi blisko 5% transkryptu, mimo że cistrony rRNA stanowią zaledwie 0,3% matrycy [39].

Okres życia rRNA w komórkach rosnących jest długi — odpowiada on czasowi życia kilku generacji komórek (w przypadku komórek HeLa wynosi to kilkadziesiąt godzin) [2]. Natomiast HjRNA i produkt z niego powstający — mRNA są związkami bardzo nietrwałymi: dla większości cząsteczek HjRNA w jądrach komórek HeLa okres półtrwania wynosi około 1,5 minuty, dla mRNA — 3 godziny. Szybkość syntezy HjRNA komórek HeLa — mierzona na podstawie włączania znakowanych prekursorów — jest czterokrotnie wyższa od szybkości syntezy prekursorowego 45S rRNA (wynoszącej około 2 minut). Względna szybkość syntezy mRNA — w porównaniu do syntezy rRNA — obliczona ze wzoru

$$\frac{dm}{dr} = \frac{1}{2} \frac{m}{r} \left(1 + \frac{T}{T_m}\right)$$

(w którym  $T$  oznacza czas podwajania komórek HeLa (= 24 godziny),  $T_m$  — okres półtrwania mRNA (= 3 godziny) natomiast  $m/r$  — stosunek mas cząsteczkowych mRNA i prekursorowego rRNA) jest o około 80% powolniejsza niż rRNA. Dane te wskazują, że jedynie nieznaczna część puli HjRNA ulega przekształceniu w mRNA — blisko 90% cząsteczek HjRNA ulega niezwykle szybkiej degradacji na terenie jądra komórkowego [42]. Tym samym można sądzić, że HjRNA jest tą klasą polimeru, która w komórce eukariotycznej charakteryzuje się najwyższą względną szybkością syntezy.

Stwierdzenie to zostało poparte doświadczeniami przeprowadzonymi przez Wu i Soeiro [40], którzy udowodnili, że zarówno prekursorowy rRNA, jak też HjRNA powstają ze wspólnej puli prekursorów — rybonukleotydów. Dowód ten jest konieczny, jeśli względną szybkość syntezy HjRNA i prekursorowego rRNA określa się na podstawie szybkości włączania znakowanych nukleotydów do łańcucha nukleotydowego. Do-

wodem takim jest identyczny przebieg krzywych obrazujących kinetykę zmian tzw. specyficznego stosunku U/C względem czasu dla obu RNA.

Kończąc ten przegląd należy podkreślić, że względne natężenie (szybkość) syntezy różnych klas RNA zmienia się w warunkach fizjologicznych w zależności od stadium rozwojowego organizmu, szczególnie w okresie embrionalnym, a także w różnych okresach (fazach) cyklu komórkowego. O zagadnieniu tym pisaliśmy szerzej w innym artykule [1], tutaj dodajmy, że zmiany w szybkości syntezy różnych klas RNA w czasie rozwoju zarodkowego u organizmów zwierzęcych, a także we wczesnym okresie kiełkowania zarodków roślinnych [1], mogą wynikać ze zmian w konformacji matrycy. Jak wykazali Travers i wsp. [41], natężenie syntezy *in vitro* na matrycy DNA zależy od konformacji tej matrycy, determinowanej w pewnej mierze przez siłę jonową środowiska (a także temperaturę). Podobny mechanizm jest zapewne wprzęgnięty w regulację syntezy RNA w czasie cyklu komórkowego (por. [28]). Wówczas bowiem wraz ze zmianami konsystencji chromatyny zmienia się aktywność metaboliczna jądra komórkowego.

#### LITERATURA

- [1] GOŁASZEWSKI T., 1973 — Losy metaboliczne rybosomowych kwasów rybonukleinowych, *Post. Biochem.*, **20**: 393–422.
- [2] SOEIRO R., VAUGHAN M. H., WARNER J. R., DARNELL J. E., jr., 1968 — The turnover of nuclear DNA-like RNA in Hela cells, *J. Cell. Biol.*, **39**: 112–118.
- [3] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., 1966 — Powstawanie i rozwój rybosomów, *Post. Biochem.*, **12**: 413–429.
- [4] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., 1970 — Czy rzeczywiście prorybosomy bakteryjne? *Post. Mikrobiol.*, **9**: 327–336.
- [5] HAYASHI M., SPIEGELMAN S., 1961 — The selective synthesis of informational RNA in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**: 1564–1580.
- [6] MITSUI H., ISHIHAMA A., OSAWA S., 1963 — Some properties of newly synthesized ribosomal ribonucleic acid in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **76**: 401–409.
- [7] OTAKA E., OSAWA S., SIBATANI A., 1964 — Stimulation of <sup>14</sup>C-leucine incorporation into protein *in vitro* by ribosomal RNA of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Comm.*, **15**: 568–574.
- [8] NEIDHARDT F., MAGASANIK B., 1960 — Studies on the rate of ribonucleic acid synthesis in the growth of bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 99–116.
- [9] NAKADA D., ANDERSON I. A. C., MAGASANIK B., 1964 — Fate of the ribosomal RNA Produced by a "Relaxed" mutant of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **9**: 472–488.
- [10] Friesen J. D., 1966 — Control of messenger RNA synthesis and decay in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **20**: 559–573.
- [11] KURLAND C. G., MAALØE O., 1962 — Regulation of ribosomal and transfer RNA synthesis, *J. Mol. Biol.*, **4**: 193–210.

- [12] NEIDHARDT F. C., FRAENKEL D. G., 1961 — Metabolic regulation of RNA synthesis in bacteria, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26: 63-73.
- [13] ROSSET R., JULIEN J., MONIER R., 1966 — Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate, J. Mol. Biol., 18: 308-316.
- [14] NAKADA D., SMITH I., 1962 — The stability of ribosomes in uracil-starved *Escherichia coli*, Biochim. Biophys. Acta, 61: 414-420.
- [15] LAZZARINI R. A., WINSLOW R. M., 1970 — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35: 383-390.
- [16] CASHEL M., GALLANT J., 1969 — Two compounds implicated in the function of the *RC* gene of *Escherichia coli*. Nature, 221: 838-841.
- [17] CASHEL M., 1970 — Inhibition of RNA polymerase by ppGpp, a nucleotide accumulated during the stringent response to amino acid starvation in *E. coli*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35: 407-413.
- [18] TRAVERS A., KAMEN R., CASHEL M., 1970 — The in vitro synthesis of ribosomal RNA, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35: 415-418.
- [19] LAZZARINI R. A., JOHNSON L. D., 1973 — Regulation of ribosomal RNA synthesis in cold-shocked *E. coli*, Nature New Biol., 243: 17-20.
- [20] KJELDGAARD N. O., 1973 — Mechanisms of RNA control, wykład niepubl., wygłoszony na 3. Konferencji Linderstrøma-Langa zat. Biochemical Control of Cell Growth, 27-30 czerwca, 1973 roku, Espoo, Finlandia.
- [21] HASELTINE W. A., BLOCK R., 1973 — Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphates requires the presence of a codon specific uncharged transfer RNA in the acceptor site of ribosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 70: 1564-1568.
- [22] TRAVERS A., BUCKLAND R., 1973 — Heterogeneity of *Escherichia coli* RNA polymerase, Nature New Biol., 243: 257-260.
- [23] DENNIS P. P., BREMER H., 1973 — Regulation of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* B/r: An analysis of a shift-up. 1. Ribosomal RNA chain growth rates, J. Mol. Biol., 75: 145-159.
- [24] BREMER H., BERRY L., DENNIS P. P., 1973 — Regulation of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* B/r: An analysis of a shift-up. 2. fraction of RNA polymerase engaged in the synthesis of stable RNA at different steady-state growth rates, J. Mol. Biol., 75: 161-179.
- [25] PATO M. L., MEYENBURG K. v., 1970 — Residual RNA synthesis in *Escherichia coli* after inhibition of initiation of transcription by rifampicin, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35: 497-504.
- [26] DOOLITTLE W. F., PACE N. R., 1971 — Transcriptional organisation of ribosomal RNA cistrons in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 68: 1786-1790.
- [27] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., 1972 — Badania nad syntezą rybosomowych kwasów rybonukleinowych, Post. Biochem., 19: 553-567.
- [28] GOŁASZEWSKI T., SZARKOWSKI J. W., 1971 — Uorganizowanie strukturalno-metaboliczne jądra komórkowego, Post. Biochem., 17: 163-179.
- [29] MITCHISON J. M., GROSS P. R., 1965 — Selective synthesis of messenger RNA in a fission yeast during a step-down, and its relation to the cell cycle, Exptl. Cell Res., 37: 259-277.
- [30] MITCHISON J. M., CUMMINS J. E., GROSS P. R., CREANOR J., 1969 — The uptake of bases and their incorporation into RNA during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* in normal growth and after a step-down, Exptl. Cell Res., 57: 411-422.

- X [31] HOLOUBEK V., DAOUD A. H., HOLOUBEK H. M., 1971 — Metabolism of histones and nuclear RNA in Ehrlich ascites cells subjected to nutritional step-down shift, *Texas Rep. Biol. Med.*, **29**: 563–578.
- [32] SOBOTA A. E., 1972 — Ribonucleic acid synthesis associated with a developmental change in the gametophyte of *Pteridium aquilinum*, *Plant Physiol.*, **49**: 914–918.
- [33] HARTEL E., BOGORAD L., 1973 — Effect of light on ribonucleic acid metabolism in greening maize leaves, *Plant Physiol.*, **51**: 10–16.
- [34] BÖLCSFÖLDI G., POELS L., ELIASSON E., 1971 — RNA metabolism in human cells during amino acid deprivation I, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 664–675; Bölcsföldi G., Eliasson E., 1972 — RNA metabolism in human cells during amino acid deprivation, *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 67–74.
- [35] INGLE J. 1968 — The effect of light and inhibitors on chloroplast and cytoplasmic RNA synthesis, *Plant Physiol.*, **43**: 1850–1854; Jackson M., Ingle J., 1973 — The interpretation of studies on rapidly labeled ribonucleic acid in higher plants, *Plant Physiol.*, **51**: 412–414.
- [36] BELLAMY A. R., 1966 — RNA synthesis in exponentially growing tobacco cells subjected to a step-down nutritional shift, *Biochim. Biophys. Acta*, **123**: 102–115.
- [37] KUBINSKI H., KOCH G., 1966 — Regulation of the synthesis of various ribonucleic acids in animal cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **22**: 346–351.
- [38] PETTIJOHN D. E., 1972 — Ordered and preferential initiation of ribosomal RNA synthesis in vitro, *Nature New Biol.*, **235**: 204–206.
- [39] YANKOFSKY S. A., SPIEGELMAN S., 1963 — Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **49**: 538–544.
- [40] Wu R. S., SOEIRO R., 1971 — Turnover of nuclear RNA in HeLa cells: Evidence for a single ribonucleotide pool, *J. Mol. Biol.*, **58**: 481–487.
- [41] TRAVERS A., BAILLIE D. I., PEDERSEN S., 1973 — Effect of DNA conformation on ribosomal RNA synthesis in vitro, *Nature New Biol.*, **243**: 161–163.

Otrzymano: wrzesień, 1973

Przyjęto: wrzesień, 1973

Adres autorów: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,  
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36.

## 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. Phillips, 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
21 <sub>15,16</sub>	met-asp-wal-tyr-ala-leu- 90 -liz-arg-gln-gli-arg-tre- 100 e -leu-tyr-gli-fen-gli-gli-COOH	met-asp-wal-wal-tyr-ala- 90 -leu-liz-arg-gln-gli-arg-tre- 100 -leu-tyr-gli-fen-gli-gli-COOH
89 <sub>2</sub>	(E <sup>δ</sup> ) <sub>s</sub>	(E <sub>δ</sub> ) <sub>s</sub>
94 <sub>9</sub>	[42]	[2]
95 <sup>22</sup>	HeLa	HeLa

Postępy Biologii Komórki, t. 1, nr 1, 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 ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% 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 and 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 101, 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

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
Warszawa 40, ul. Freta 16

