

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 9-NR 2
1982 (131-348)

Postepy Biologii Komórki

PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, 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 we Wrocławiu

Nakład 514 + 96 egz. Ark. wyd. 17. Ark. druk $13\frac{5}{8}$ + 0,25 wkł. kred. Papier druk. sat. kl. III,
80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w maju 1982 r. Podpisano do druku w grudniu
1982 r. Druk ukończono w grudniu 1982 r. Zam. 1178/82

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

Od Redakcji

Niniejszy zeszyt *Postępów Biologii Komórki* zawiera referaty wygłoszone na zaproszenie organizatorów na dwóch konferencjach poświęconych zagadnieniom cytogenetycznym:

- Konferencji szkoleniowej zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Redakcję *Postępów Biologii Komórki* w Warszawie, 26 listopada 1980 r. nt. *Struktura chromatyny i replikacja DNA* (organizatorzy: prof. dr hab. Zofia Osuchowska, prof. dr hab. Jerzy Kawiak i prof. dr hab. Maria Olszewska),
- V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej w Łodzi, 17–18 września 1981 r. (organizator: doc. dr hab. Henryk Hübner).

POSTĘPY W POZNANIU
STRUKTURY MATERIAŁU GENETYCZNEGO U EUKARYOTA
I. STRUKTURA CHROMATYNY *

ADVANCES IN KNOWLEDGE ON STRUCTURE OF GENETIC
MATERIAL IN EUKARYOTA
I. STRUCTURE OF CHROMATIN

Henryk HÜBNER i Andrzej Kiejstut KONONOWICZ

Zakład Biologii, Instytut Nauk Podstawowych, Wojskowa Akademia Medyczna,
Łódź

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

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki ostatnich badań nad strukturą chromatyny. Opisano budowę i funkcję nukleosomów, tworzenie w wyniku ich zwinienia fibryli podstawowej o średnicy 10 nm, a następnie struktury zwanej solenoidem (średnica 25–30 nm). Fibryle solenoidu mogą być spiralizowane we włókno o średnicy 50–60 nm, które przyłączone jest do centralnej struktury chromosomu (rusztowania) zbudowanej z trudno rozpuszczalnych białek. Scharakteryzowano kwaśne białka chromatyny (HMG) wywierające prawdopodobnie wpływ na łączenie się histonów w nukleosomy. Opisano zmiany struktury nukleosomów związane z aktywacją chromatyny. Przedstawiono również niektóre właściwości eu- i heterochromatyny, przy czym szczególną uwagę zwrócono na dwa rodzaje heterochromatyny: pozytywną i negatywną. Podano wyniki działania kwaśnego utrwalacza na wybarwienie heterochromatyny pozytywnej, wpływ silnej zasady na eu- i heterochromatynowe prążki chromosomów metafazowych oraz wyniki badań autoradiograficznych z zastosowaniem ^3H -AMD.

Summary. In this paper recent results of structural organization of chromatin have been presented. Organization and function of nucleosomes, forming basic fibril (diameter of 10 nm) which by supercoiling makes a structure called solenoid (diameter of 25–30 nm) have been described. Fibrils of solenoid can form helical

* Referat wygłoszony na konferencji szkoleniowej zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki na temat „Struktura chromatyny i replikacja DNA” (Warszawa, 26 listopada 1980 r.).

fibril of a diameter 50–60 nm which is joined to scaffold of chromosome composed from nonsoluble proteins of chromatin. High mobility group proteins (HMG) of chromatin probably play a role in integration of histones by maintaining the structure of nucleosomes. Changes of nucleosome structure related to chromatin activation have been described. We also presented properties of eu- and heterochromatin. Attention on two kinds of heterochromatin is paid: positive and negative. Results of effect of acid fixative on positive heterochromatin, effect of strong base on heterochromatin bands of metaphase chromosomes, as well as results of autoradiographic investigations with the use of ^3H -AMD have been reported.

WSTĘP

W poznaniu struktury i funkcji chromatyny poczyniono w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat znaczne postępy w wyniku badań prowadzonych z zastosowaniem rozmaitych metod. Wykazano, że pomiędzy budową genów u Prokaryota i Eukaryota istnieją duże różnice (u organizmów wyższych geny występują w formie nieciągłych jednostek), opisano nukleosomy, poznano nowe elementy mechanizmu regulacji funkcji genów, w tym rolę hormonów i niehistonowych białek chromatyny. Badano również strukturę włókien chromatynowych o różnej średnicy.

Postępy w badaniach nad strukturą i funkcją chromatyny zostały omówione w artykułach dotyczących wyników badań nad: strukturą fibryli chromatynowych [56], histonami [28, 44, 47], białkami niehistonowymi [27, 29], nukleosomami [16, 26, 30], chronologią replikacji DNA [64], strukturą chromosomów metafazowych [23, 43] i regulacją funkcji genów [21, 74]. Informacje te chcielibyśmy uzupełnić o niektóre nowe dane piśmiennictwa i wyniki badań własnych.

STRUKTURA NUKLEOSOMU A JEGO FUNKCJA

Interesującą koncepcją jest utożsamianie frakcji chromatyny, której DNA jest w większości zawarty w nukleosomach, z tą częścią genomu, która nie ulega ekspresji genetycznej [57]. Z kolei część DNA, która zawierałaby informację dla kodowanych białek stanowiłaby długie pasma „nagiej” podwójnej helisy. Istnienie długich pasm „nagiego” DNA wykazali już w 1974 r. Varshavsky i wsp. [67]. Donieśli oni, że w komórkach wysiękowych w 20% chromatyny pozbawionej histonu H1 średnia długość łańcucha wynosi 4000 pz. Uderzający jest jednak fakt, że w preparatach chromatyny pozbawionej histonów H1 uwidoczniono długie odcinki wolnego DNA niezależnie od tego czy otrzymano ją z komórek, które aktywnie transkrybują swój genom (wątroba, hodowla ko-

mórek nerki), czy też z komórek, w których transkrypcja jest prawie całkowicie zablokowana (erytrocyty kury). McKay [41] podkreśla, że nukleosomy są tworzone niezależnie od sekwencji zasad DNA, ale jego doświadczenia z „mikrochromosomami” SV 40 wykazały, że punkty inicjacji transkrypcji DNA wirusowego nie tworzą nigdy nukleosomów. Kraut i Werner [33] podkreślają, że takie odcinki są rzadkie, lecz mogą mieć znaczenie dla regulacji funkcji genów u Eukaryota lub replikacji ich DNA. Miejsca te mogłyby mieć zdolność przyłączania specyficznych białek potrzebnych do zainicjowania i przebiegu tych procesów.

Newman [52] zaproponował alternatywną strukturę podstawową, która byłaby słuszna dla nieaktywnej chromatyny, w tym (co warto szczególnie podkreślić) chromatyny chromosomów podziałowych. Zgodnie z jego poglądem około 10 nm włókno podstawowe, zbudowane z typowych nukleosomów, występuje jedynie w aktywnej chromatynie. Podstawowym włóknem chromatyny nieaktywnej byłyby liniowo ułożone ciała un , odwrotnej wersji ciałek nu . Newman przyjmuje, że histon H1 tworzy rdzeń ciała un , a pozostałe histony znajdują się na powierzchni tej struktury. Za koncepcją ciałek un przemawia fakt, że w wyizolowanej chromatynie nie zawsze obserwuje się strukturę paciorkową, a wyizolowane nukleosomy mają często heterogenną budowę. Często też podstawowe włókno chromatyny ma średnicę 20 nm [52].

Mimo licznych badań budowa oktameru histonowego nukleosomów nie została do tej pory wyjaśniona. Kornberg [32] jest zdania, że histony są prawdopodobnie ułożone liniowo i symetrycznie wzdłuż odcinka DNA o długości 140 pz. Wydaje się niemal pewne, że cząsteczki histonu H3 są położone na obu końcach oktameru, natomiast co do sekwencji pozostałych cząsteczek zdania są podzielone. Trifonow [66] podaje następującą kolejność: H3-H4-H2B-H2A-H2A-H2B-H3-H4, natomiast Newman [52] uważa, że w ciałku un występuje sekwencja: H3-H2A-H2B-H4-H4-H2B-H2A-H3. Należy podkreślić, że obie proponowane sekwencje cząsteczek histonów spełniają warunek symetrii, mogą one także tworzyć tetramer w połówce nukleosomu, a taki ich układ umożliwia całkowite jego rozwinięcie. Warunek rozwinięcia jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu procesu transkrypcji lub replikacji [30]. Histon H1 jest również związany z oktamerem rdzenia. Wydaje się, że jego N-koniec łączy się z punktem wejścia do rdzenia, a C-koniec z punktem wyjścia [2, 3, 53]. Mechanizm powstawania i rozpadania się nukleosomów jest nadal niejasny. Na ten proces *in vivo* mają wpływ liczne czynniki. Wielu autorów [8, 34, 38, 62, 68, 72] dowodzi, że na łączenie się histonów w nukleosomy wpływają liczne kwaśne białka chromatyny, w tym również HMG 1 i HMG 2.

BIAŁKA HMG

Wydaje się, że u wszystkich organizmów wyższych w chromatynie znajdują się co najmniej 4 białka, które są związane z jej aktywnymi regionami. Są to tzw. białka HMG (high mobility group HMG) [59, 61, 62, 68, 69, 71, 72]. We wszystkich komórkach organizmów wyższych stwierdzono 4 główne frakcje HMG, a mianowicie: HMG 1, HMG 2, HMG 14 i HMG 17. Białka te stanowią od 1 do 5% ogólnej ilości białek chromatyny, co odpowiada 10^5 – 10^6 cząsteczek na jądro. Mogą one być usuwane z chromatyny za pomocą 0,35 M roztworu NaCl.

Masa cząsteczkowa HMG 1 wynosi 26 000. Białko to składa się z 220 reszt aminokwasowych i zawiera 5–7% proliny, 11–12% kwasu asparaginowego, 17–18% kwasu glutaminowego, 17–21% lizyny oraz 4–6% argininy. HMG 2 jest nieco większym polipeptydem składającym się z 263 reszt aminokwasowych. Jego masa cząsteczkowa wynosi 29 000. Aminokwasy wymienione przy omawianiu budowy HMG 1 występują również w HMG 2 w prawie identycznych odsetkach [24, 61, 62, 69]. HMG 14 zawiera 100 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi 10 500. W porównaniu z obu omówionymi białkami ma nieco wyższą procentową zawartość proliny (8–10). Jeszcze wyższą zawartość tego aminokwasu ma HMG 17 (10–16%). Jego masa cząsteczkowa wynosi 9250 i białko to zawiera 89 reszt aminokwasowych [61, 68, 71].

Białka HMG mają niewielką cząsteczkę, a podczas elektroforezy są bardzo ruchliwe. Stanowią one grupę konserwatywnych białek chromatyny i, jak wynika z podanej charakterystyki, ich skład aminokwasowy wyróżnia się pewnymi cechami szczególnymi, bowiem obok wysokiej zawartości jednych aminokwasów, inne występują rzadko lub są nieobecne (cysteina, histydyna, metionina, fenyloalanina i tyrozyna). Prolina i kwas glutaminowy dominują przy końcu C, lizyna i arginina zaś przy N-końcu, stąd w ich cząsteczce można wyróżnić dwie grupy czynnościowe. Białka HMG 1 i 2 charakteryzują się wyraźnym powinowactwem do pojedynczego łańcucha DNA i są one prawdopodobnie zaangażowane w proces rozwijania podwójnej helisy DNA. Budowa tych białek została dokładnie opisana przez Kłyszejko-Stefanowicz [29].

SOLENOID

Badania przy użyciu ME nad upakowaniem DNA w chromosomach dostarczają dowodów na istnienie co najmniej 4 klas fibryli o coraz większych średnicach, a mianowicie:

- fibryle podstawowe o średnicy 10 nm,
- fibryle o średnicy 25–30 nm,

fibryle o średnicy 50–60 nm,

fibryle o średnicy 100–200 nm [1, 36, 39, 56, 75].

Fibryla podstawowa powstaje poprzez zwinięcie nukleosomów w zwój o średnicy około 10 nm. Jest ona znana z badań w ME [56]. Duże znaczenie w powstawaniu tej struktury ma histon H1, który tworzy połączenia boczne, powodując zwijanie się nici z nanizanymi nukleosomami.

Finch i Klug [12], badając chromatynę wątroby szczura po krótkotrwałym trawieniu nukleazą mikrokokową, obserwowali fragmenty chromatyny o długości do 40 nukleosomów, wyglądające jak superspirala o średnicy 25–30 nm. Tę konfigurację fibryli chromatynowej nazwali oni solenoidem. Butt i wsp. [6] wykazali, że takie częściowe trawienie nukleazą mikrokokową daje odcinki o długości 1600 i 3200 pz. Mogą one odpowiednio reprezentować 1 i 2 pierścienie zwoju solenoidu. W tym przypadku 1 zwój miałby 8 nukleosomów, chociaż podawane są również liczby w granicach od 3 do 10. Włókno o średnicy 25–30 nm można sobie wyobrazić jako strukturę liniową, ciągłą, z nie wypełnionym wnętrzem. Mogą one być zbudowane z na przemian leżących skondensowanych i bardziej luźnych obszarów. Skondensowane odcinki są nazywane „superkoralikami” (superbeads) [36, 39, 51] i dla ich uformowania się niezbędny jest również histon H1 [51, 53].

Na podstawie przytoczonych danych można stwierdzić, że konformacje DNA pod postacią „koralików na sznurku” i „superkoralików” są jakby czynnościowym stanem chromatyny międzypodziałowej, a więc chromatyny, która może być odwracalnie aktywowana.

FIBRYLE CHROMATYNOWE WYŻSZEGO RZĘDU I BIAŁKA RUSZTOWANIA

Mardena i Laemmli [39] wykazali, że podczas mitozy fibryle solenoidu mogą ulegać kolejnej spiralizacji we włókno o średnicy 50–60 nm. Jest ono przyłączane do centralnej struktury chromosomu, nazywanej rusztowaniem. Rusztowanie jest zbudowane z trudno rozpuszczalnych białek, stanowiących około 1% ogólnej ilości białek chromosomowych.

Białka rusztowania były przez Laemmliego i wsp. [36] badane w izolowanych chromosomach komórek HeLa. Wykryto ponad 20 różnych białek, wśród których 3 główne miały masy cząsteczkowe 35 000, 51 000 i 53 000. Rusztowanie pozostaje w postaci nietkniętej struktury nawet wówczas, gdy zostaną usunięte wszystkie histony i rozpuszczalne białka niehistonowe. Jest interesujące, że DNA pozbawiony histonów pozostaje nadal przyczepiony do rusztowania, tworząc pętle DNA, których przeciętna długość wynosi 15–30 nm (45 000–90 000 pz). Charakter po-

wiązania DNA z białkami rusztowania nie jest znany, przypuszcza się jedynie, że istnieje pewien rodzaj „węzła topologicznego” (topological knot). Węzły takie są uważane za wspólną cechę DNA u wszystkich organizmów niezależnie od stopnia rozwoju ewolucyjnego [14]. Sądzi się także, że mogą się one łatwo tworzyć i łatwo rozpadać przy udziale topoizomerazy II [37].

Jest możliwe, że poszczególne odcinki podwójnego łańcucha DNA mają liczne punkty przyczepu do rusztowania. Dwa największe chromosomy człowieka (nr 1 i 2) zawierają łańcuch DNA o długości dochodzącej do 80 nm. W ME stwierdzono w nich około 4000 pętli. We włóknie o średnicy 50–60 nm DNA tych pętli jest już w wysokim stopniu zespiralizowany.

Analizowano także wyższe rzędy spiralizacji włókien chromatynowych (fibryle 100–200 nm i grubsze). Struktury te występują przede wszystkim w chromatynie podziałowej (chromosomach) oraz w odcinkach heterochromatynowych chromatyny międzypodziałowej.

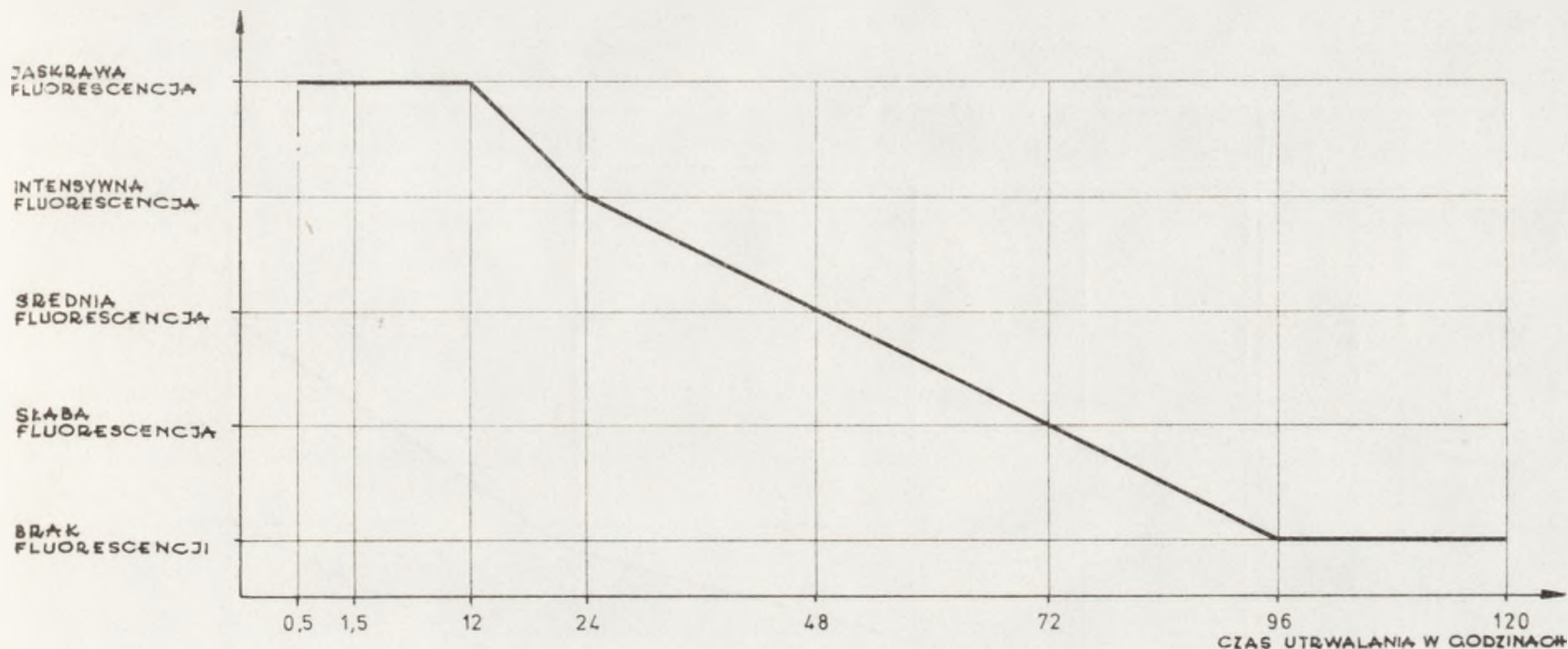
O ile wydaje się, że białka niehistonowe nie biorą udziału w powstawaniu struktur niższego rzędu, to nie można tego wykluczyć w upakowaniu wyższego rzędu. Prace [7, 9, 11, 36, 75] sugerują, że białka niehistonowe są odpowiedzialne za kształt chromosomu. Badania w mikroskopie świetlnym włókien wyizolowanych z chromosomów mitotycznych człowieka i muszki owocowej wykazały, że mają one średnicę 400 nm i są wyraźnie puste w środku, co potwierdziły także badania przekrojów poprzecznych tych włókien w ME [1]. Na tej podstawie sugeruje się, że przedstawione stopnie spiralizacji chromatyny nie muszą być uniwersalne.

CHROMOSOMY METAFAZOWE

Od czasów Heitza [19] wyróżnia się dwa typy chromatyny: euchromatynę i heterochromatynę, których zasadnicze cechy są znane. Chcemy zatem zwrócić uwagę jedynie na dwa typy heterochromatyny i na zagadnienie ewentualnej dominacji w nich par AT i GC.

Wyniki badań nad zróżnicowanym wybarwianiem się chromosomów stały się podstawą wprowadzenia pojęć heterochromatyna pozytywna i heterochromatyna negatywna. Pierwsza z nich jest w porównaniu z innymi regionami chromosomów bardziej skondensowana. Przykładami heterochromatyny pozytywnej w chromosomach są prążki Q (G). Heterochromatyna negatywna jest bardziej rozproszona i znajduje się w przewężeniach wtórnych. W chromosomach człowieka przykładem heterochromatyny negatywnej jest jej region w chromosomie nr 9 (prążek C przewężenia wtórnego).

Przeprowadzono badania (ryc. 1) nad wpływem czasu utrwalania chromosomów metafazowych w kwaśnym utrwalaczu (płyn Carnoy) na intensywność fluorescencji jaskrawych prążków Q chromosomów człowieka. Wyniki tych doświadczeń dowodzą, że długotrwałe działanie kwaś-



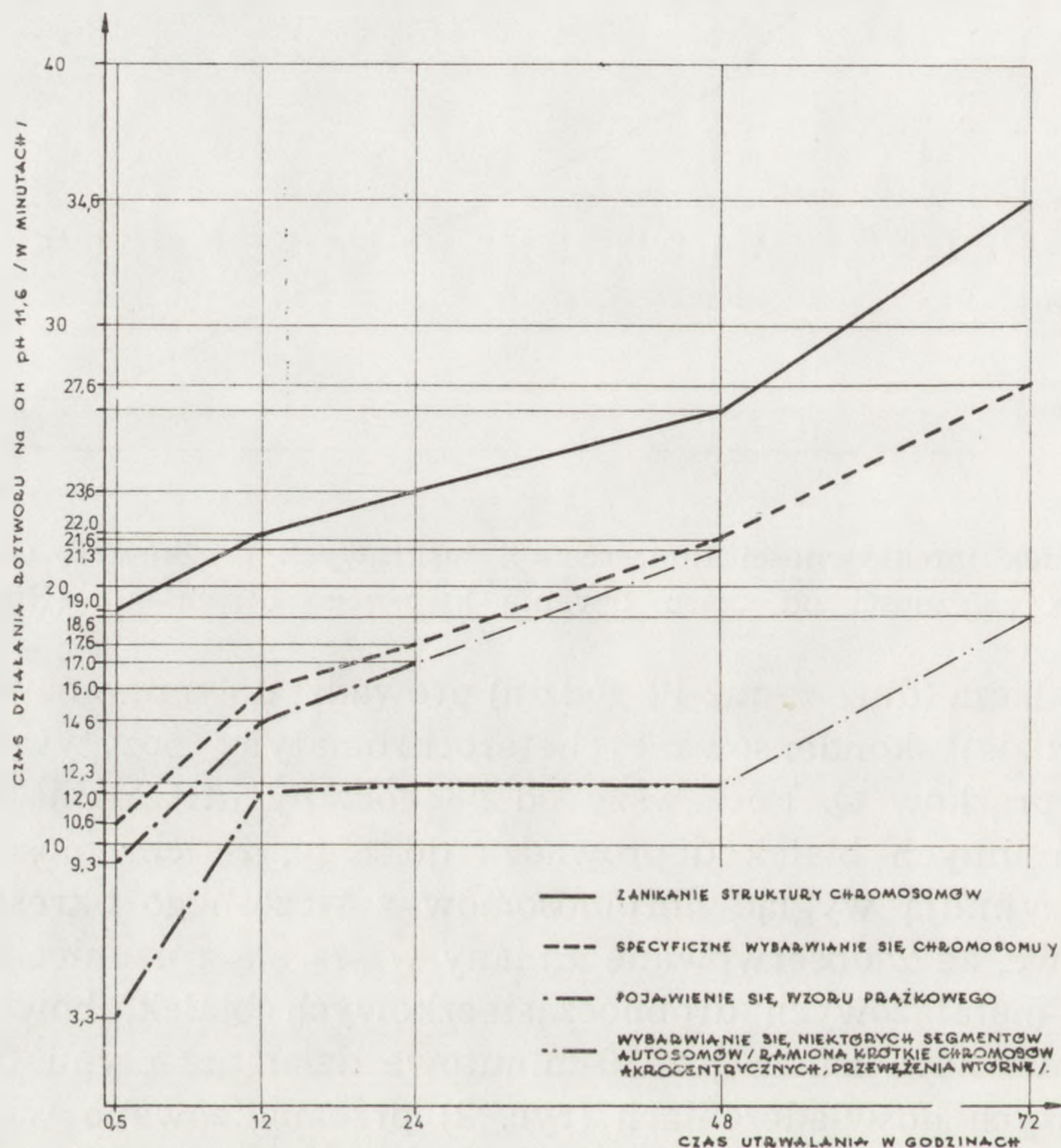
Ryc. 1. Spadek intensywności fluorescencji jaskrawych prążków Q chromosomów człowieka w zależności od czasu trwania kwaśnego utrwalania (Hübner, npbl.)

nego utrwalacza (dłuższe niż 12 godzin) prowadzi do zmian nawet w obrębie najbardziej skondensowanej heterochromatyny pozytywnej, tj. jaskrawych prążków Q. Począwszy od 48 godziny utrwalania ekstrakcja histonów i innych białek doprowadza do tego, że chromosomy metafazowe przyjmują wygląd chromosomów z wczesnego okresu profazy. Jest możliwe, że zaobserwowane zmiany wiążą się z usunięciem z chromosomów metafazowych drobnocząsteczkowych białek, bowiem znaczną część histonów usuwa już 30-minutowe działanie płynu Carnoy [4].

W dalszych doświadczeniach (ryc. 2) przeanalizowano wpływ silnej zasady na euchromatynowe i heterochromatynowe prążki chromosomów metafazowych człowieka. Chromosomy poddawano krótkiemu i długiemu działaniu kwaśnego utrwalacza, a następnie barwiono je w roztworze według Giemsy doprowadzonym przy użyciu 1 N NaOH do pH = 11,6. Stwierdzono, że wybarwienie się heterochromatyny przewężeń wtórnych autosomów oraz ramion krótkich i centromerów chromosomów akrocentrycznych jest możliwe, gdy kwaśne utrwalanie nie trwa dłużej niż 48 godz. Zdolność do wybarwienia się pełnego wzoru prążków G zanika po 24 godz. utrwalania. Heterochromatynowy obszar w ramionach długich chromosomu Y jest tym segmentem w genomie człowieka, który w środowisku silnej zasady najdłużej zachowuje swój charakterystyczny wygląd.

Jak wiadomo, działanie zasady prowadzi do usunięcia z chromatydy dużych ilości DNA [23], a w konsekwencji — do ich zupełnej de-

strukcji. Z omówionych badań wynika, że na ekstrakcję DNA są najbardziej odporne regiony heterochromatyny pozytywnej, a przede wszystkim jaskrawe prążki Q. Obszary heterochromatyny negatywnej reagują najwcześniej na ekstrakcyjne działanie zasady. Jest możliwe, że łączy się to z niskim stopniem kondensacji tego rodzaju heterochromatyny.

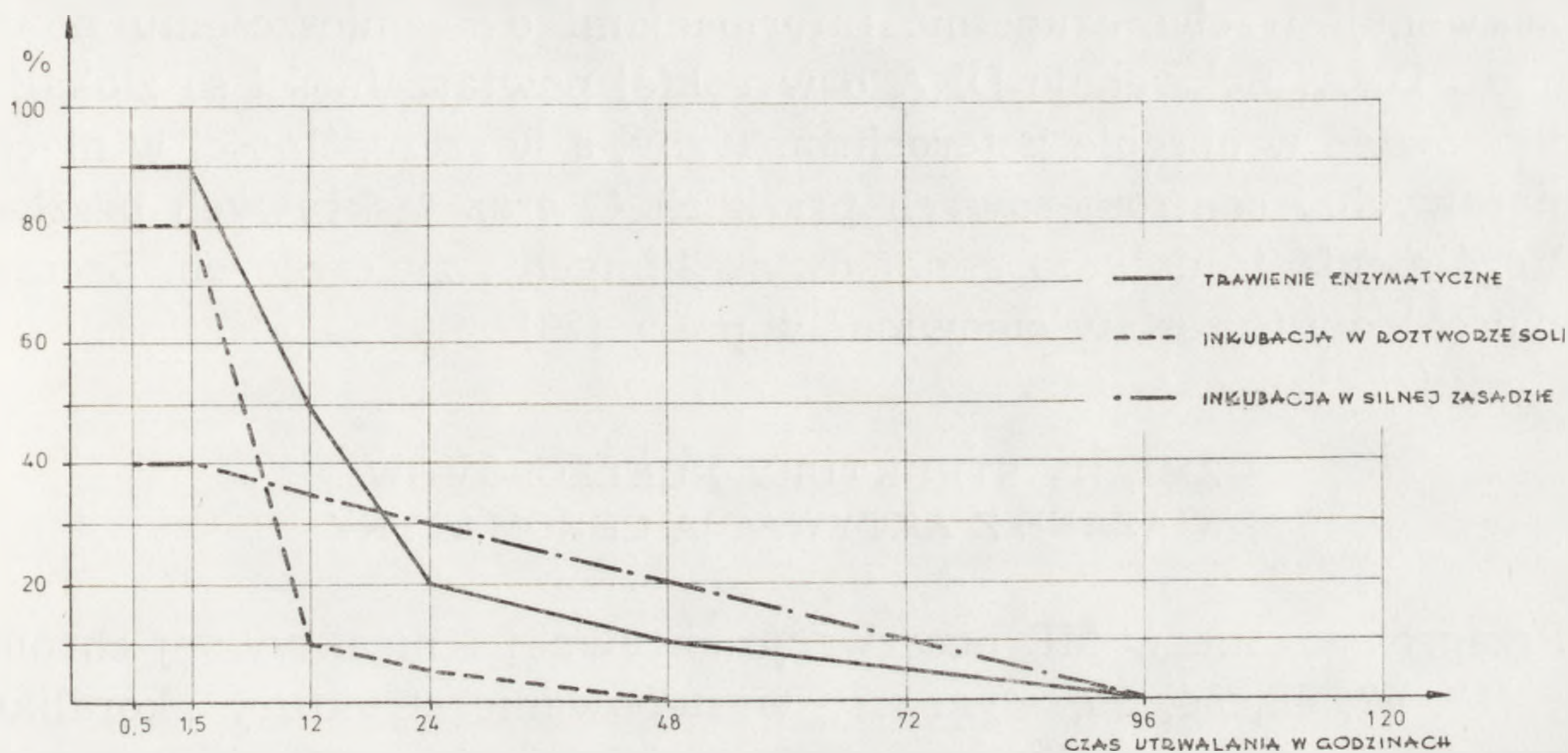


Ryc. 2. Wpływ silnej zasady na chromosomy metafazowe człowieka (Hübner, npbl.)

Na tych samych seriach preparatów utrwalanych w różnym czasie przeanalizowano procentową częstość wybarwienia się niektórych jaskrawych prążków Q chromosomów człowieka, po zastosowaniu 3 różnych metod wstępnego traktowania celem wybarwienia wzoru prążków G (ryc. 3). Zastosowano metody trawienia roztworem trypsyny, inkubacji w $2 \times SSC$ oraz inkubacji w roztworze barwiącym o $pH = 11,6$. Jak się okazało, dwie najbardziej wydajne metody (trawienie enzymatyczne i inkubacja w soli) tracą w wyniku przedłużonego utrwalania zdolność wywoływania specyficznego wybarwienia prążków heterochromatyny. Jest interesujące, że spadek wydajności metody inkuba-

cji w środowisku silnie zasadowym jest wyraźnie mniej uzależniony od długości czasu utrwalania.

Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że białka odgrywają dużą rolę w konstrukcji heterochromatynowych odcinków chromosomów metafazowych. Usunięcie białek w wyniku długotrwałego działania mie-



Ryc. 3. Częstość wybarwienia się jaskrawych prążków Q chromosomów człowieka w zależności od czasu utrwalania (Hübner, npbl.)

szaniny kwasu octowego lodowatego i metanolu jest prawdopodobnie przyczyną tego, że trawienie trypsyną lub działanie roztworem soli nie może już zmienić konformacji heterochromatyny w ten sposób, aby było możliwe jej specyficzne wybarwienie się we wzór prążkowy.

W badaniach nad strukturą chromatyny w prążkach chromosomów metafazowych znaczenie mają również wyniki badań autoradiograficznych, w tym szczególnie po zastosowaniu ^3H -aktynomycyny D (^3H -AMD). Antybiotyk ten posiada wybiórczą zdolność do wbudowywania się między pary C—G podwójnej spirali DNA, co jest związane z powinowactwem do guaniny.

Analiza wiązania się ^3H -AMD z chromosomami człowieka wskazuje na jej wyraźne powinowactwo do niefluoryzujących regionów chromosomów, w tym przede wszystkim do przewężeń pierwotnych i wtórnych oraz telomerów, bowiem nad nimi stwierdzono około połowy wszystkich ziaren autoradiograficznych zlokalizowanych nad chromosomami [22].

Wyniki potwierdzają tezę, że nie każdy region (prążek) utrwalonego chromosomu metafazowego jest tak samo łatwo dostępny dla AMD. Intensywne wiązanie się ^3H -AMD z regionami przewężeń pierwotnych, niektórych przewężeń wtórnych, telomerów, a w ogólności z negatywnymi prążkami Q może wskazywać, że są to prążki, w których istnieje przewaga par GC. Z kolei niewiązanie się ^3H -AMD z jaskrawo fluory-

zującymi prążkami Q może dowodzić, że istnieje tam przewaga par AT.

Przytoczone dane wskazują, że obszary negatywnej heterochromatyny są łatwo dostępne, a pozytywnej heterochromatyny trudno dostępne dla AMD.

Opis strukturalnej organizacji chromatyny i wynikających z tego konsekwencji trzeba uzupełnić informacjami o rozmieszczeniu powtarzalnego DNA. Sekwencje DNA o wysokiej powtarzalności są zlokalizowane głównie w obrębie heterochromatyny, a w szczególności w niecentromerowych i centromerowych prążkach C oraz jaskrawych prążkach Q. Uogólnienia te dotyczą genomów roślinnych i zwierzęcych. Szczegółowo problemy te zostały omówione w pracy [23].

ZMIANY STRUKTURY NUKLEOSOMÓW ZWIĄZANE Z AKTYWACJĄ CHROMATYNY

Przeprowadzone w ME obserwacje aktywnej i nieaktywnej chromatyny [17, 42, 46, 54, 55] wykazały występowanie struktury „koralików na sznurku” jedynie w nieaktywnych odcinkach chromatyny oraz w odcinkach z małą aktywnością procesu transkrypcji. Odcinki chromatyny, które kodują rRNA lub białka wytwarzane w dużej ilości (np. fibroinę jedwabiu) nie mają budowy nukleosomowej, a współczynnik upakowania wynosi 1,1 w porównaniu z nagim DNA. Współczynnik ten jest znacznie niższy, bowiem dla chromatyny nukleosomowej wynosi on od 1,6 do 2,5 [13, 15, 42]. Badania nad przejściem chromatyny kodującej rRNA ze skondensowanej formy koralikowej do rozwiniętej niekoralikowej były przeprowadzone przez Foe [13]. Wydaje się, że stan rozwinięcia elementarnej, nukleosomowej struktury nie jest bezpośrednio związany z samym tylko procesem transkrypcji. Fragmenty, które aktualnie nie podlegają transkrypcji pozostają w niekoralikowej konformacji. Być może występują wówczas połówki nukleosomów lub są one nawet całkowicie rozwinięte.

Nukleosomy i wyższego rzędu struktury aktywnych odcinków chromatyny wykazują szereg fizykochemicznych i biochemicznych właściwości, które pozwalają na odróżnienie chromatyny aktywnej od nieaktywnej. Uważa się [18, 72, 73], że za pewne różnice są odpowiedzialne białka HMG 14 i HMG 17, natomiast nie są w tych procesach aktywne HMG 1 i HMG 2. Pierwsze z tych białek wiążą się z cząsteczką rdzenia nukleosomu w proporcji 1 cząsteczka HMG na 1 nukleosom. Zakłada się, że aktywne nukleosomy mają jakąś cechę, która odróżnia je od nukleosomów nieaktywnych i warunkuje wiązanie się z nimi HMG. Weisbrod i wsp. [72] uważają, że różnica polega na tym, iż aktywne nukleosomy są uboższe o histony H2A i H2B. Zostało to potwierdzo-

ne doświadczalnie [45]. Podkreśla się również, że aktywne nukleosomy są wrażliwe na trawienie DNAzą I, a podczas tego trawienia uwalniają się białka HMG 14 i 17. Łatwa degradacja aktywnych genów przez ten enzym nie jest odbiciem ich aktualnej aktywności transkrypcyjnej, bowiem łatwej degradacji podlegają również geny o potencjalnych możliwościach transkrypcyjnych. Niektórzy autorzy [45] uważają, że aktywacja genów jest zupełnie odmiennym procesem od ich inaktywacji. Sprawy te są jednak jeszcze mało poznane.

NUKLEOSOMY W EUCHROMATYNYE LUŻNEJ I ZWARTEJ ORAZ W HETEROCHROMATYNYE

Nieuniknione jest pytanie, jaka jest zależność między strukturą chromatyny a różnymi stanami jej aktywności? Rozróżnienie pomiędzy euchromatyną i heterochromatyną jest w pierwszym rzędzie cytologiczne i cytogenetyczne. Obie frakcje zawierają ten sam zestaw histonów, lecz znacznie różnią się pod względem zawartości białek niehistonowych. Względna ilość chromatyny luźnej (euchromatyny) i chromatyny zwartej, w skład której wchodzi również heterochromatyna, jest komórkowo specyficzna i może wahać się w szerokich granicach [58].

Odwracalna lub nieodwracalna kondensacja chromatyny pewnych odcinków lub całych chromosomów, a nawet całego genomu, stanowi podstawę specjalizacji komórkowej [31, 48, 49, 50, 63]. Do tej pory nie są poznane molekularne podstawy procesu kondensacji chromatyny. Interesującym przykładem przejścia chromatyny luźnej w zwartą są zmiany zachodzące w czasie rozwoju krwinki czerwonej ptaków. Ich dojrzałe erytrocyty zachowują jądro komórkowe, chociaż z punktu widzenia biochemicznego przypominają nie zawierające jąder erytrocyty ssaków. W tej linii komórkowej ptaków, już we wczesnych etapach rozwoju krwinki czerwonej, wykrywa się obecność nowego histonu H5, którego struktura i frakcja jest bardzo zbliżona do H1 [65]. Histon H5 stopniowo zastępuje histon H1. Początkowo jest on wysoce ufosforylowany w regionach N- i C-końca. Ostateczna kondensacja i inaktywacja chromatyny w procesie dojrzewania erytrocytów zbiega się w czasie z defosforylacją histonu H5. Isenberg [25] podaje dalsze przykłady występowania wariantu strukturalnego H1 dla różnych stadiów rozwojowych u wielu organizmów.

Euchromatyna międzypodziałowa istnieje prawdopodobnie w wielu stanach funkcjonalnych, wśród których można wyróżnić 3 zasadnicze:
— nieaktywna i skondensowana w danej komórce lub linii komórkowej,
— aktywna, luźna, lecz aktualnie nie podlegająca transkrypcji,

— aktywna, luźna i podlegająca transkrypcji.

Poza powiązaniem aktywnych genów z białkami HMG 14 i 17, udowodniono ostatnio również występowanie w nich szeregu izotypów histonów [20, 25]. Mikroheterogenność histonów zdaje się polegać głównie na ich odwracalnych posyntetycznych modyfikacjach (metylacja, acetylacja, fosforylacja i rybozylacja). Zdaniem niektórych badaczy [72, 73], modyfikacja histonów H1, H3, H2A i H2B łączy się z procesem ich asocjacji z białkami HMG 14 lub HMG 17.

Szczególne modyfikacja H2A (tzw. histon A24) została odkryta w jądrach komórkowych ssaków [5, 25]. Histon A24 jest związany za pomocą wiązania izopeptydowego z lizyną 119 ubikwityny. Jest to wysoce konserwatywne białko o 75 resztach aminokwasowych i masie cząsteczkowej 8400. Białko to występuje nie tylko u zwierząt, ale również u wyższych roślin i drożdży. Wykazano [5], że około 10% H2A grasicy cielęcia ulega modyfikacji do A24. Specjalna rola białka A24 w procesie inaktywacji euchromatyny została wykazana na modelu regenerującej wątroby [5]. Wiązanie się ubikwityny z chromatyną jest odwracalne. W komórkach mitotycznych nie stwierdzono powiązania tego białka z chromatyną, lecz w fazie G1 proces ten zachodzi w znacznym stopniu [40].

Na szczególną uwagę zasługują te białka chromatyny, które kontrolują proces transkrypcji. Białka te były badane m.in. przez Kuehna i wsp. [35] *in vitro* u *Physarum polycephalum*. Izolowany przez nich kompleks rDNP, składający się z 38 kZ, zawierał 2 jednostki transkrypcyjne rRNA. *In vitro* wierna transkrypcja tego kompleksu może być stymulowana przez fosforylację kwaśnego białka regulatorowego o masie cząsteczkowej 70 000. Ten izolowany proteid wiązał się z wysoką specyficznością z kompleksem rDNP nieco powyżej przypuszczalnej lokalizacji promotora. Zostały również wykryte inne białka o podobnej roli. Busch [5] opisał fosfoproteid C-14 występujący we frakcji DNP komórek hepatomy Novikoffa. Usunięcie tego białka oraz usunięcie 2 histonów, będących prawdopodobnie izotypami H1, uniemożliwia wybiórczą transkrypcję DNA. Engelke [10] opisał białko występujące w oocytach *Xenopus*, które wiąże się wybiórczo z centralnym punktem genu kodującego 5S RNA i warunkującym przebieg transkrypcji tego genu.

Jak wynika z przedstawionych danych, postęp w badaniach nad strukturą i funkcją chromatyny obok rozwiązania jednych problemów odkrywa istnienie nowych. Jednym z takich nowych problemów jest budowa genów organizmów wyższych.

LITERATURA

- [1] BAK A. L., BAK P., ZEUTHEN J., Characterization of human chromosomal unit fibers, *Chromosoma (Berl.)*, **73**: 301–315, 1979.
- [2] BONNER J. M., STEDMAN J. D., Histone H1 is proximal to histone 2A and to A24, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2190–2194, 1979.
- [3] BOULIKAS T., WISEMAN J. M., GARRARD W., Points of contact between histone H1 and the histone octamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 127–131, 1980.
- [4] BRODY T., Histones in cytological preparations, *Exptl. Cell Res.*, **85**: 255–261, 1974.
- [5] BUSCH H., BALLAL N. R., BUSCH R. K., CHOI Y. C., DAVIS F., GOLDKNOPF I. L., MATSUI S. I., RAG M. S., ROTHBLUM L. I., The nucleolus — a model for analysis of chromatin control, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 665–683, 1978.
- [6] BUTT T. R., JUMP D. B., SMULSON M. E., Nucleosome periodicity in HeLa cell chromatin as probed by micrococcal nuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1628–1632, 1979.
- [7] CARTER C. W., Histone packing in the nucleosome core particle of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3649–3653, 1978.
- [8] CHAMPOUX J. J., Proteins that affect DNA conformation, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 449–479, 1978.
- [9] ELGIN S. C. R., WEINTRAUB H., Chromosomal proteins and chromatin structure, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 725–774, 1975.
- [10] ENGELKE D. R., NG S. Y., SHASTRY B. S., ROEDER R. G., Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes, *Cell*, **19**: 717–728, 1980.
- [11] FELSENFELD G., Chromatin, *Nature*, **271**: 115–122, 1978.
- [12] FINCH J. T., KLUG A., X-ray and electron microscope analysis of crystals of nucleosome cores, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 1–9, 1978.
- [13] FOE V. E., Modulation of ribosomal RNA synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: An electron microscopic study of the relationship between changes in chromatin structure and transcriptional activity, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 723–739, 1978.
- [14] FRANK-KAMENETSKII M. D., LUKASHIN A. V., VOLOGODSKII A. V., Statistical mechanics and topology of polymer chains, *Nature*, **258**: 398–402, 1975.
- [15] FRANKE W. W., TRENDELENBURG M., ZENTGRAF H., SPRING H., Morphology of transcriptionally active chromatin, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 755–782, 1978.
- [16] FRONK J., Struktura nukleosomu, *Post. Biochem.*, **26**: 77–103, 1980.
- [17] GAREL A., AXEL R., Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 3966–3970, 1976.
- [18] GAZIT B., PANET A., CEDAR H., Reconstruction of a deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1787–1790, 1980.
- [19] HEITZ E., Das Heterochromatin der Moose, *I Jahrb. Wiss. Bot.*, **69**: 762–818, 1928.
- [20] HOLT C., STRICKLAND W. N., BRANDT W. F., STRICKLAND M. S., More histone structures, *FEBS Letters*, **100**: 201–218, 1979.

- [21] HORST A., Regulacja czynności genu u eukariontów, *Postępy Biol. Kom.*, **3**: 127–154, 1976.
- [22] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Autoradiographic studies on differentiation of chromatin in interphase nuclei and mitotic chromosomes. II. Incorporation of ^3H -thymidine and binding of ^3H -actinomycin D by selected segments of human mitotic chromosomes as a function of their differentiated ability to bind acridine fluorochrome, *Acta Med. Pol.*, **18**: 251–260, 1977.
- [23] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych, *Postępy Biol. Kom.*, **4**: 339–370, 1977.
- [24] ISACKSON P. J., FISHBACK J. L., BIDNEY D. L., REECK G. R., Preferential affinity of high molecular weight High Mobility Group non-histone chromatin proteins for single-stranded DNA, *J. Biol. Chem.*, **254**: 5569–5572, 1979.
- [25] ISENBERG I., Histones, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**: 159–191, 1979.
- [26] JERZMANOWSKI A., STAROŃ K., *Struktura materiału genetycznego*, [w:] *Biologia molekularna, Informacja genetyczna*, red. Z. Lassota, PWN, 1980, 116–130.
- [27] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., Specyficzność białek nie-histonowych, *Postępy Biol. Kom.*, **3**: 31–50, 1976.
- [28] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., BARTKOWIAK J., Biologiczna aktywność histonów, *Post. Biochem.*, **16**: 347–388, 1970.
- [29] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., Niejednorodność i specyficzność białek nie-histonowych, *Post. Biochem.*, **25**: 287–350, 1979.
- [30] KONONOWICZ H., Segregacja rdzeni nukleosomów w czasie replikacji DNA, *Postępy Biol. Kom.*, **6**: 307–320, 1979.
- [31] KONONOWICZ A. K., KURAN H., OLSZEWSKA M. J., Cytochemical and ultrastructural studies of changes in the nucleus and nucleolus during cell differentiation in the root cortex of *Haemanthus katharinae*, *Folia Histochem. Cytochem.*, **14**: 151–164, 1976.
- [32] KORNBURG R. D., Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science*, **184**: 868–871, 1974.
- [33] KRAUT W., WERNER D., Analysis of the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **564**: 390–401, 1979.
- [34] KROHNE G., FRANKE W. W., Immunological identification and localization of the predominant nuclear protein of the amphibian oocyte nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1034–1038, 1980.
- [35] KUEHN G. D., AFFOLTER H. U., ATMAR V. J., SEEBECK T., GUBLER U., BRAUN R., Polyamine-mediated phosphorylation of a nuclear protein from *Physarum polycephalum* that stimulates rRNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2541–2545, 1979.
- [36] LAEMMLI U. K., CHENG S. M., ADOLPH K. W., PAULSON J. R., BROWN J. A., BAUMBACH W. R., Metaphase chromosome structure: The role of nonhistone proteins, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 351–360, 1978.
- [37] LIU F., LIU C. C., ALBERTS B. M., Type II DNA topoisomerases: Enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break, *Cell*, **19**: 697–707, 1980.
- [38] LUTTER L. C., Kinetic analysis of deoxyribonuclease I cleavages in the

- nucleosome core: Evidence for a DNA superhelix, *J. Mol. Biol.*, **124**: 391-420, 1978.
- [39] MARDEN M. P. F., LAEMMLI U. K., Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model, *Cell*, **17**: 849-858, 1979.
- [40] MATSUI S. I., SEON B. K., SANDBERG A. A., Disappearance a structural chromatin protein A24 in mitosis: Implications for molecular basis of chromatin condensation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 6386-6390, 1979.
- [41] McKAY R., Probing eukaryotic gene control, *Nature*, **282**: 556-557, 1979.
- [42] McKNIGHT S. L., BUSTIN M., MILLER O. L., Electron microscopic metabolism in the *Drosophila melanogaster* embryo, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 741-754, 1978.
- [43] MICHALSKA J., Struktura chromosomów metafazowych, *Postępy Biol. Kom.*, **4**: 371-391, 1977.
- [44] MICHNIEWICZ H., Najnowsze hipotezy dotyczące interakcji DNA—histony, *Postępy Biol. Kom.*, **3**: 23-30, 1976.
- [45] MILLER D. M., TURNER P., NIENHUIS A. W., AXELROD D. E., Gopalakrishnan, Active conformation of the globin genes in uninduced and induced erythroleukemia cells, *Cell*, **14**: 511-521, 1978.
- [46] MILLER O. L., BEATTY B. R., Vizualization of nucleolar genes, *Science*, **164**: 955-957, 1969.
- [47] MYŚLIWSKI A., Histony, *Postępy Biol. Kom.*, **1**: 15-38, 1974.
- [48] NAGL W., FUSENING H. P., Types of chromatin organization in plant nuclei, *Pl. Syst. Evol., Suppl.*, **2**: 221-233, 1979.
- [49] NAGL W., Condensed interphase chromatin in plant and animal cell nuclei: fundamental differences, *Pl. Syst. Evol., Suppl.*, **2**: 247-260, 1979.
- [50] NAGL W., Nuclear ultrastructure: Condensed chromatin in plants is species specific (karyotypical), but not tissue specific (functional), *Protoplasma*, **100**: 53-71, 1979.
- [51] NELSON P. P., ALBRIGHT S. C., WISEMAN J. M., GARRARD W. T., Reassociation of histone H1 with nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **254**: 1751-1760, 1979.
- [52] NEWMAN S. T., The un body: A possible structure for transcriptionally inactivated chromatin, *J. Theor. Biol.*, **79**: 55-56, 1979.
- [53] NOLL M., KORNBERG R. D., Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1, *J. Mol. Biol.*, **109**: 393-404, 1977.
- [54] OLINS A. L., OLINS D. E., Spheroid chromatin units (v-bodies), *J. Cell Biol.*, **59**: 252a, 1973.
- [55] OLINS A. L., OLINS D. E., Spheroid chromatin units (v-bodies), *Science*, **183**: 330-332, 1974.
- [56] OLSZEWSKA M. J., Ultrastruktura chromatyny i chromosomów, *Postępy Biol. Kom.*, **1**: 1-14, 1974.
- [57] OUDET P., GROSS-BELLARD M., CHAMBON P., Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit, *Cell*, **4**: 281-300, 1975.
- [58] PEDERSON T., Chromatin structure and gene transcription: Nucleosomes permit a new synthesis, *Int. Rev. Cytol.*, **55**: 1-22, 1978.
- [59] PETERS E. H., LEVY-WILSON B., DIXON G. H., Evidence for the location of High Mobility Group protein T in the internucleosomal linker regions of Trout testis chromatin, *J. Biol. Chem.*, **254**: 3358-3361, 1979.

- [60] PRUNELL A., KORNBERG R. D., LUTTER L., KLUG A., LEVITT M., CRICK F. H. C., Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin, *Science*, **204**: 855-858, 1979.
- [61] RABBANI A., GOODWIN G. H., JOHNS E. W., Studies on the tissue specificity on the High Mobility Group non-histone chromosomal proteins from calf, *Biochem. J.*, **173**: 497-505, 1978.
- [62] ROMANI M., RODMAN T. C., VIDALI G., Serological analysis of species specificity in the High Mobility Group chromosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, **254**: 2918-2922, 1979.
- [63] SCHMALENBERGER B., NAGL W., Different DNA content, chromatin condensation, and transcription activity in retina cell nuclei of the Guinea-pig, *Pl. Syst. Evol., Suppl.*, **2**: 119-125, 1979.
- [64] SCHMIDT M., Przebieg replikacji DNA w chromosomach człowieka, *Postępy Biol. Kom.*, **6**: 141-149, 1979.
- [65] SUNG M. T., Phosphorylation and dephosphorylation of histone V(H5): Controlled condensation of avian erythrocyte chromatin, *Biochemistry*, **16**: 286-290, 1977.
- [66] TRIFONOV E., The helical model of the nucleosome core, *Nucl. Acids Res.*, **5**: 1371-1380, 1978.
- [67] VARSHAVSKY A. J., ILYIN Y. V., GEORGIEV G. P., Very long stretches of free DNA in chromatin, *Nature*, **250**: 602-606, 1974.
- [68] WALKER J. M., GOODWIN G. H., JOHNS E. W., The primary structure of the nucleosome-associated chromosomal protein HMG 14, *FEBS Letters*, **100**: 394-398, 1979.
- [69] WALKER J. M., GOODERHAM K., JOHNS E. W., The isolation and partial sequence of peptides produced by cyanogen bromide cleavage of calf thymus non-histone chromosomal High Mobility Group protein 2, *Biochem. J.*, **181**: 659-665, 1979.
- [70] WALKER J. M., HASTINGS J. R. B., JOHNS E. W., A novel continuous sequence of 41 aspartic and glutamic residues in a non-histone chromosomal protein, *Nature*, **271**: 281-282, 1978.
- [71] WALKER J. M., HASTINGS J. R. B., JOHNS E. W., The primary structure of a non-histone chromosomal protein, *Europ. J. Biochem.*, **76**: 461-468, 1977.
- [72] WEISBROD S., GROUDINE M., WEINTRAUB H., Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes, *Cell*, **19**: 289-301, 1980.
- [73] WEISBROD S., WEINTRAUB H., Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 630-634, 1979.
- [74] WILAND E., Rola niehistonowych białek chromatyny (NHP) w kontroli transkrypcji podczas cyklu komórkowego, *Postępy Biol. Kom.*, **5**: 217-232, 1978.
- [75] WORCEL A., Molecular architecture of the chromatin fiber, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**: 313-323, 1978.
- [76] ZINKLE M., A new model of DNA and histone organization in chromatin: Explanation of conformational transitions in chromatin structure and their dissociation, *Studia Biophysica*, **75**: 107-130, 1979.

Otrzymano: 20 września 1981.

Przyjęto: 19 października 1981.

Adres autorów: Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

POSTĘPY W POZNANIU STRUKTURY MATERIAŁU
GENETYCZNEGO U EUKARYOTA
II. STRUKTURA GENÓW *

ADVANCES IN KNOWLEDGE ON STRUCTURE
OF GENETIC MATERIAL IN EUKARYOTA
II. STRUCTURE OF GENES

Henryk HÜBNER, Alina DZWONKOWSKA i Regina OSIECKA

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

Streszczenie. W artykule przedstawiono strukturę niektórych genów Eukaryota. Opisano budowę genów dla histonów, białek globinowych, immunoglobuliny, insuliny, owoalbuminy, tRNA i rRNA. W genach tych, z wyjątkiem genów histonowych i niektórych genów dla tRNA, obszary kodujące (eksony) są rozdzielone przez sekwencje interweniujące (introny). W odniesieniu do cząsteczek tRNA przedstawiono również dojrzewanie RNA (processing), podczas którego sekwencje interweniujące są usuwane w procesie nazwanym „splicing”. W procesie tym sekwencje interweniujące są wycinane z pre-tRNA, a nowo utworzone końce sekwencji kodujących wiązane, tworząc dojrzały produkt.

Summary. The paper reviews structure of some eukaryotic genes. We described organization of genes coding for histones, globins, immunoglobulin, insuline, ovalbumin, tRNAs and rRNAs. In these genes, except those of histones and some tRNA genes, the coding regions (exons) are separated by intervening sequences (introns). During the processing of tRNA the intervening sequences are removed by a process which has been called „splicing”. In process of splicing intervening sequences are excised from pre-tRNA and the newly formed termini of coding sequences are joined to form the mature product.

* Referat wygłoszony na konferencji szkoleniowej zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki na temat „Struktura chromatyny i replikacja DNA” (Warszawa, 26 listopada 1980 r.).

WSTĘP

W ostatnich latach prowadzono szereg badań struktury genów u organizmów eukariotycznych. Badania te prowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego, jak również stosowano technikę enzymów restrykcyjnych i technikę klonowania DNA.

Endonukleazy restrykcyjne są enzymami wysoce specyficznymi. Posiadają one zdolność rozpoznawania tylko palindromowych sekwencji DNA oraz cięcia komplementarnych nici DNA w punktach zwykle od siebie oddalonych i ułożonych symetrycznie. Możliwe są trzy różne konformacje palindromowej sekwencji DNA, która może być rozpoznawana przez endonukleazy. Opisywane są formy liniowe, symetryczne (podwójna spinka do włosów) i czteroniciowe formy klatkowe. Te trzy koncepcje formy sekwencji palindromowych przedstawił Stasiak [39, 40] w swych pracach dotyczących enzymów restrykcyjnych. Autor podał również klasyfikację tych enzymów, opisał ich budowę i mechanizm działania. Pierwszym wyizolowanym enzymem restrykcyjnym był enzym Eco RI, który otrzymano z komórek *E. coli* w 1968 r. [27]. Dotychczas opisano już około 100 endonukleaz restrykcyjnych. Listę dotychczas wyizolowanych enzymów podał Roberts [34], który dla niektórych z tych enzymów podał również rozpoznawane przez nie sekwencje. Na podstawie analizy właściwości enzymów restrykcyjnych wyróżnia się obecnie trzy ich typy. Wspólną cechą tych enzymów jest rozpoznawanie specyficznej sekwencji nukleotydów w obecności jonów Mg^{++} , różnią się zaś między innymi wymaganiami w stosunku do ATP i adenozyłometioniny [39, 40]. Endonukleazy restrykcyjne są enzymami obecnie powszechnie używanymi przy ustalaniu lokalizacji genów w chromosomach, izolowaniu i badaniu budowy tych genów, określaniu sekwencji DNA. Stosuje się je również w technikach klonowania i rekombinowania DNA.

Badania prowadzone wymienionymi metodami potwierdziły obecność sekwencji wtrąconych w genach organizmów wyższych. Nieciągłą strukturę genów stwierdzono po raz pierwszy w 1977 r. w odniesieniu do genu kodującego owoalbuminę [7]. Sekwencje wtrącone, zwane także sekwencjami interweniującymi lub intronami (intervening sequences, introns), rozdzielają kodujące części genu — eksony (exons). Jak wykazały ostatnie badania, sekwencje interweniujące ulegają procesowi transkrypcji razem z sekwencjami kodującymi genu, a produktem tego procesu jest cząsteczka pre-RNA. Tworzenie dojrzałego RNA (mRNA, tRNA lub rRNA w zależności od rodzaju genu) następuje w procesie dojrzewania (processing), podczas którego introny są wycinane z pre-RNA, a sekwencje kodujące genu łączone w dojrzałą cząsteczkę RNA.

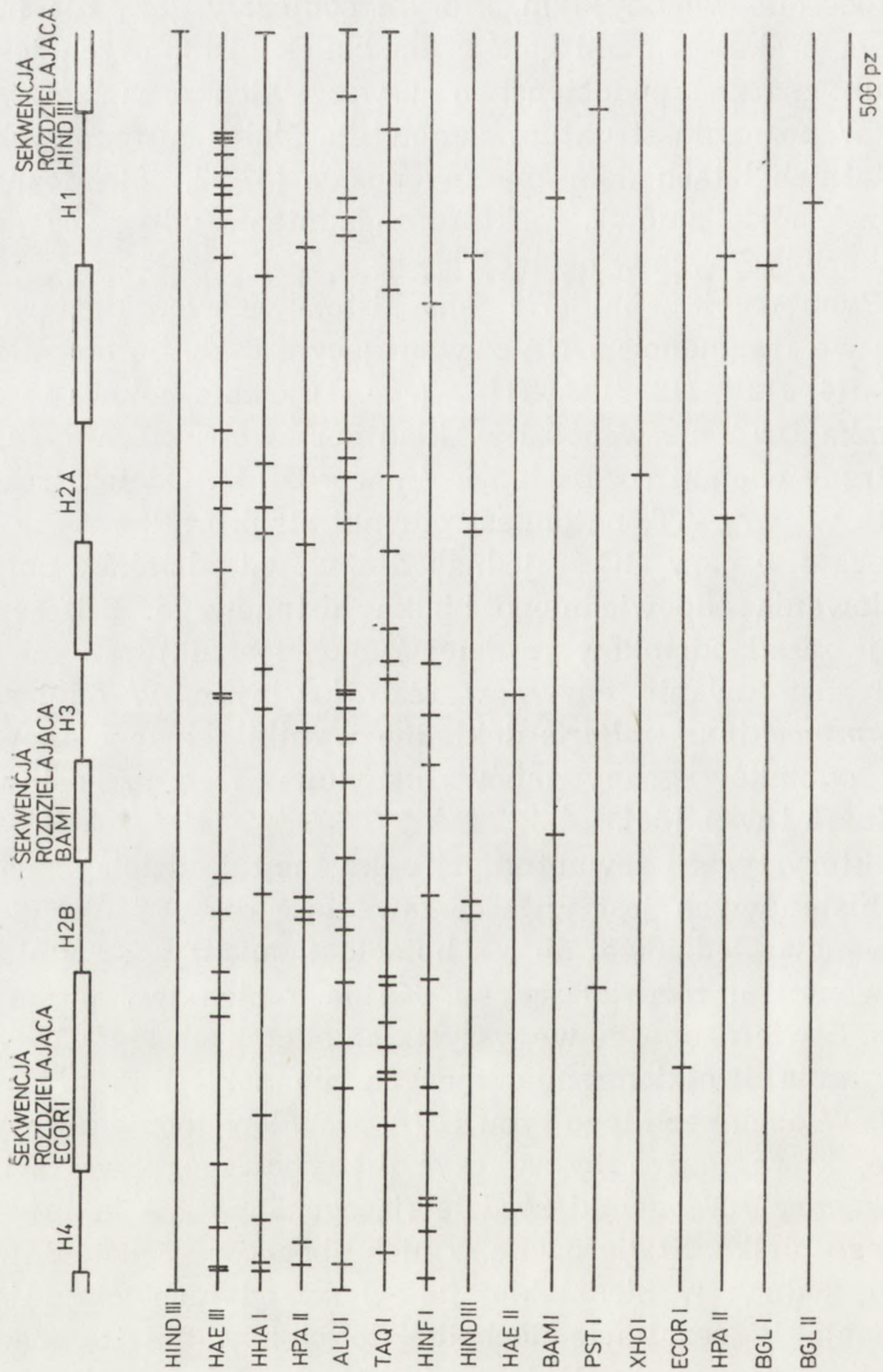
BUDOWA GENÓW CIĄGŁYCH

Geny kodujące białka histonowe należą do klasy genów eukariotycznych o najprostszej budowie. Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż nie ulegały one procesom ewolucyjnym, którym podlegały geny dla innych białek. Dowodem braku ewolucji genów dla białek histonowych jest ich identyczność lub znaczne podobieństwo u wszystkich organizmów eukariotycznych. W poznaniu struktury genów dla białek histonowych poczyniono w ostatnich latach dość znaczny postęp [5, 32, 36]. Można zatem na ich przykładzie omówić niektóre zagadnienia dotyczące genów organizmów eukariotycznych w ogólności.

U jeżowca *Psammechinus miliaris* geny histonowe tworzą grupę, która znajduje się we fragmencie DNA zawierającym 6 kz. Są one ułożone w kolejności 5'-H4, H2B, H3, H2A, H1-3' (ryc. 1). Około połowa tego histonowego odcinka DNA nie wchodzi w skład genów strukturalnych, lecz stanowi zewnętrzne odcinki rozdzielające (spacer DNA). Odcinki rozdzielające są bogate w pary AT, natomiast odcinki strukturalne — w pary GC. Odcinki bogate w pary GC są jednak dłuższe od odcinków potrzebnych do zakodowania odpowiedniego białka histonowego. Bliższe poznanie sekwencji zasad odcinków rozdzielających i strukturalnych było możliwe dzięki zastosowaniu enzymów restrykcyjnych. W odniesieniu do jeżowca *Psammechinus miliaris* dokładne wyniki sekwencjonowania poszczególnych odcinków grupy genów histonowych są przedstawione w pracy Schaffnera i wsp. [36].

Cechą charakterystyczną zewnętrznych sekwencji rozdzielających geny dla białek histonowych jest wysoka zawartość par AT i względnie prosta ich sekwencja. Jednakże nie ma homologii między różnymi zewnętrznymi sekwencjami rozdzielającymi. Każda z nich jest zatem jednostką unikalną. Stwierdzono, że we wszystkich odcinkach tego DNA występują zgrupowania krótkich zmieniających się sekwencji złożonych z 2-3 par zasad. W odcinkach tego typu DNA prawdopodobnie nie występują sekwencje, które można by zaliczyć do typowego powtarzalnego DNA. Bogate w pary AT odcinki rozdzielającego DNA nie kodują żadnego dodatkowego białka. Stwierdzono w nich obecność sygnałów inicjacji transkrypcji, jednak w niedalekiej odległości od nich znajdują się sygnały terminacji. W rezultacie dochodzi do blokowania translacji.

Jeżeli chodzi o sekwencje DNA genów strukturalnych dla białek histonowych, to najistotniejszą sprawą, na którą chcemy zwrócić uwagę, jest fakt, że geny te mają strukturę ciągłą. Jest to prawdopodobnie wyjątek wśród genów strukturalnych organizmów wyższych. Przed sekwencjami kodującymi białko występują regiony bogate w pary GC.



Ryc. 1. Mapa fizyczna i restrykcyjna 6 kz odcinka DNA zawierajacego geny dla bialek histonowych u *Psammochinus mi-laris* (wedlug [36]). Sekwencje kodujace bialka histonowe H4, H2B, H3, H2A i H1 (czesc gorna, linie ciagle) oddzielone sa sekwencjami rozdzielajacymi („spacer DNA”). Nizej przedstawiono miejsce dzialania dla roznych enzymow restrykcyjnych (pionowe kreski oznaczaja miejsca cięcia)

W regionach tych, nazywanych sekwencjami poprzedzającymi, stwierdzono większą zawartość par GC (50–71%) niż w regionach kodujących białka histonowe (46–61%). Sekwencje poprzedzające geny dla histonów H4 i H2B zawierają około 200 pz, a dla histonu H2B sekwencja jest mniejsza (około 140 pz). Po sygnale terminacji translacji znajdują się odcinki bogate w pary AT, które są podobne do sekwencji występujących w zewnętrznych sekwencjach rozdzielających. Odcinek DNA położony między sygnałem terminacji translacji a zewnętrzną sekwencją rozdzielającą nazywany jest sekwencją kończącą.

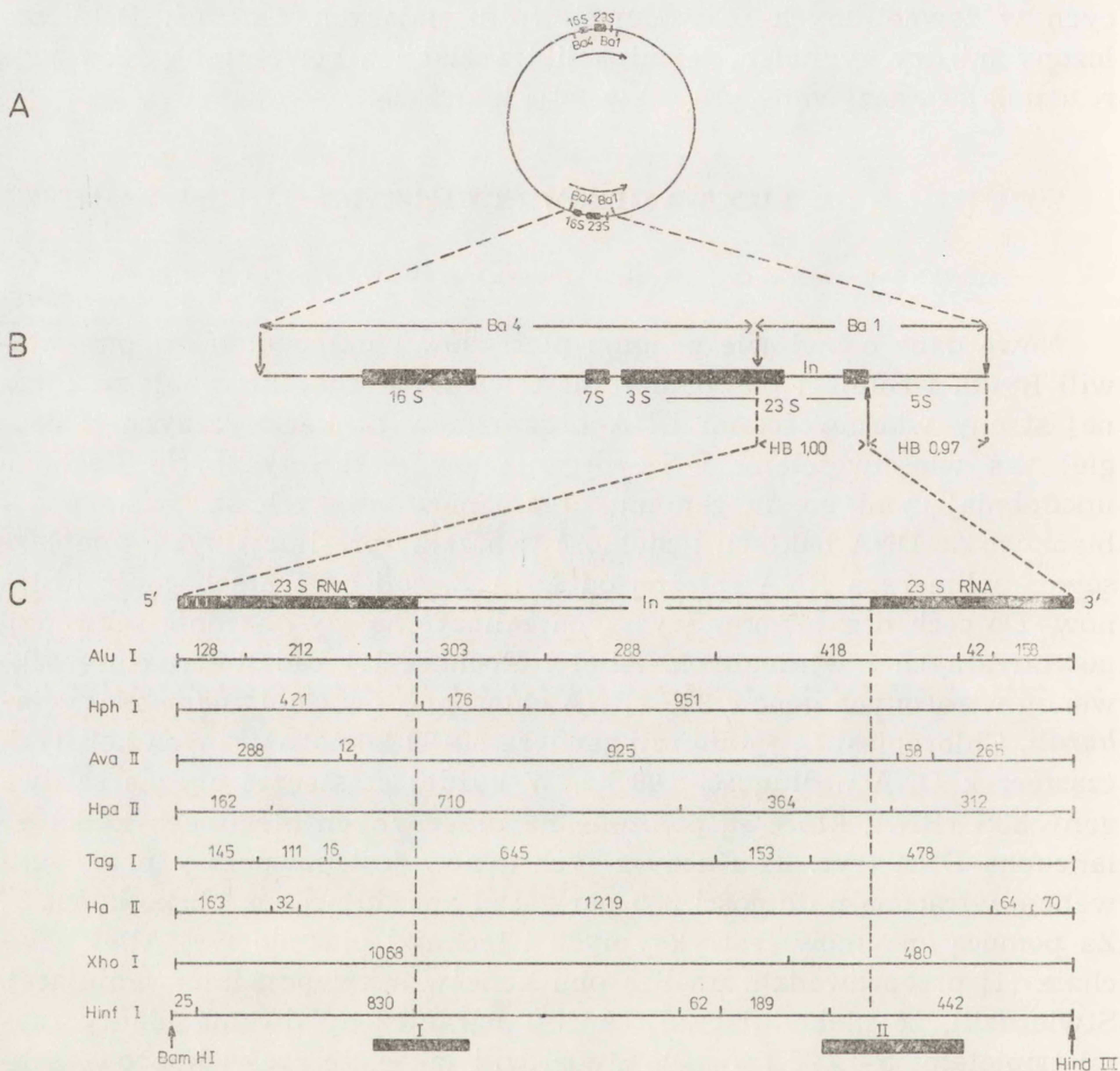
BUDOWA GENÓW NIECIĄGLYCH

SEKWENCJE WTRĄCONE W GENACH PLASTYDÓW I MITOCHONDRIÓW

Nowe dane o budowie genomu plastydów i mitochondriów przedstawili Rytko i Biliński [35]. Chloroplastowy DNA charakteryzuje się z jednej strony właściwościami DNA organizmów prokariotycznych, z drugiej zaś właściwościami DNA organizmów eukariotycznych. Cechami upodabniającymi go do genomu organizmów niższych są: ściśle podobieństwo do DNA bakterii i zdolność tworzenia pre-inicjalnych kompleksów z polimerazą RNA zależną od DNA *E. coli* oraz nieobecność histonów. Do cech organizmów wyższych zaliczyć należy obecność sekwencji powtarzalnych i wtrąconych. Allet i Rochaix [1] badali strukturę sekwencji wtrąconych genów 23S rRNA chloroplastów *Chlamydomonas reinhardii*. Chloroplast *C. reinhardii* zawiera 60–80 homogenicznych kolistych cząsteczek DNA o długości 190 kz. W każdej cząsteczce obecne są dwa geny 23S rRNA, które są położone na przeciwnych biegunach kolistego łańcucha DNA (ryc. 2). Każdy z tych genów jest podzielony przez sekwencję wtrąconą o długości 850 par zasad znajdującą się blisko końca 3'. Za pomocą enzymów restrykcyjnych i techniki plazmidowej Allet i Rochaix [1] przeprowadzili analizę obu końców sekwencji interweniującej. Stwierdzili, że niekodujący DNA jest ograniczony dwoma identycznymi tripletami 5'-CGT (ryc. 3). Stwierdzili także, że części końcowe sekwencji wtrąconych mają 40% par GC, a sekwencje kodujące — 50,6% tych par. Jest interesujące, że koniec odcinka kodującego przy końcu 5' sekwencji wtrąconej stanowi sekwencja złożona z 5 pz (5'-CGTGA), która jest również obecna w kodującej części genu blisko końca 3' sekwencji interweniującej (ryc. 3).

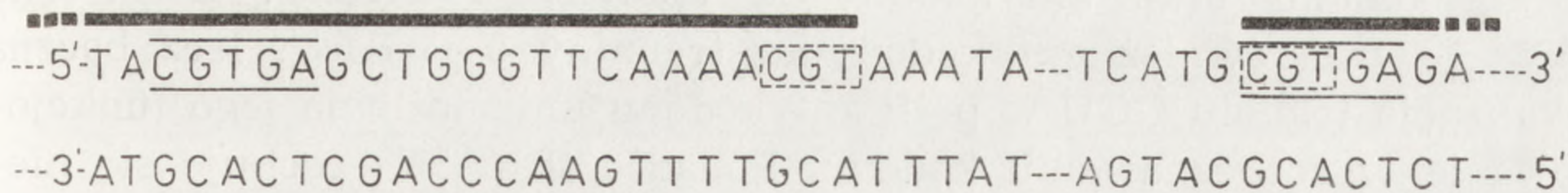
Geny nieciągłe zostały stwierdzone także w mitochondriach *Neurospora crassa*. Mitochondrialny DNA tego organizmu ma również strukturę kolistą o wielkości 60 kz i zawiera geny dla 17S i 24S rRNA, około 25 genów dla tRNA i jeszcze bliżej nie znaną liczbę genów struktural-

nych dla białek [13]. Heckman i RajBhandary [14] stwierdzili, że geny dla tRNA zgrupowane są w dwu obszarach, z których jeden znajduje się między dwoma genami dla rRNA (17S rRNA i 24S rRNA) rozdzielonymi przez około 5–6 kb odcinek DNA, drugi w pobliżu genu dla 24S rRNA (ryc. 4). Przeprowadzone przez Hahna i wsp. [13] oraz Heck-



Ryc. 2. Lokalizacja i struktura genów rRNA w genomie chloroplastów *Chlamydomonas reinhardtii* (według [1])

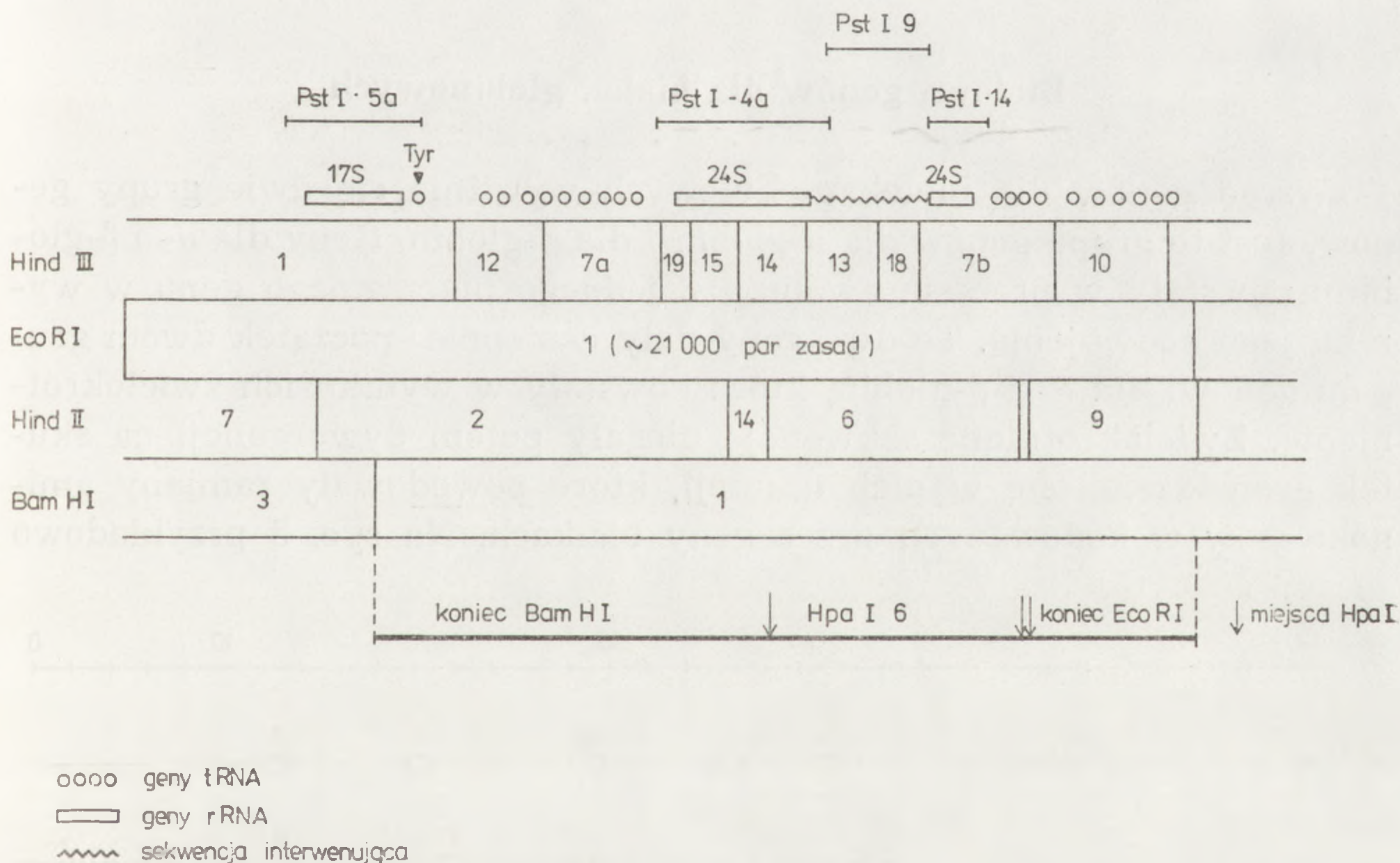
A — kolista cząsteczka DNA chloroplastu *C. reinhardtii*. Dwa geny rRNA zlokalizowane są na przeciwnych biegunach cząsteczki DNA. Kierunek transkrypcji tych genów jest przeciwny (strzałki). Ba 4 i Ba 1 — odcinki powstające w wyniku trawienia DNA enzymem Bam HI; B — odcinek DNA zawierający geny rRNA. W genie 23S rRNA obecna jest insercja (In) o długości 0,78 kb. Sekwencje kodujące oznaczone są jako ciemne obszary; C — mapa restrykcyjna sekwencji interweniującej i przyległych regionów kodujących genu 23S rRNA. Zaznaczono miejsca trawienia DNA dla niektórych enzymów restrykcyjnych oraz podano długości odcinków DNA (w pz), które powstają w wyniku trawienia DNA tymi enzymami. Ciemne obszary oznaczone jako I i II wskazują złącza ekson-intron, które były sekwencjonowane



Ryc. 3. Sekwencja nukleotydów połączeń ekson-intron w genie 23S rRNA w chloroplastach *Chlamydomonas reinhardtii* (według [1]). Grube ciemne linie ponad sekwencją nukleotydów wskazują odcinki eksonów. Przy krańcach obu eksonów sąsiadujących z sekwencją interweniującą zaznaczono identyczne sekwencje: 5'-CGT i 5'-CGTGA

mana i RajBhandary [14] badania wykazały, że w genie dla 24S rRNA obecna jest sekwencja wtrącona o długości około 2 kz.

Li i Tzagoloff [25], stosując również enzymy restrykcyjne i technikę plazmidową, badali mitochondrialny DNA *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrialny DNA *S. cerevisiae* koduje między innymi dwa oddzielne tRNA^{Thr} (tRNA₁^{Thr} i tRNA₂^{Thr}) oraz tRNA^{Val}. Autorzy wykazali, że tRNA₁^{Thr} wykazuje pewne nietypowe cechy: ma 8 zamiast 7 zasad w pęt-



Ryc. 4. Mapa genów dla tRNA i rRNA znajdujących się w 21 kb fragmencie mitochondrialnego DNA *Neurospora crassa*, który powstaje po trawieniu tego DNA enzymem Eco RI (według [17]). Geny dla tRNA są zlokalizowane między genami dla 17S i 24S rRNA i po prawej stronie genu dla 24S rRNA. Gen dla 24S rRNA ma jedną sekwencję interweniującą o długości około 2000 pz. Pokazano odcinki DNA powstające w wyniku trawienia mitochondrialnego DNA endonukleazami Hind III, Eco RI, Hind II i Bam HI

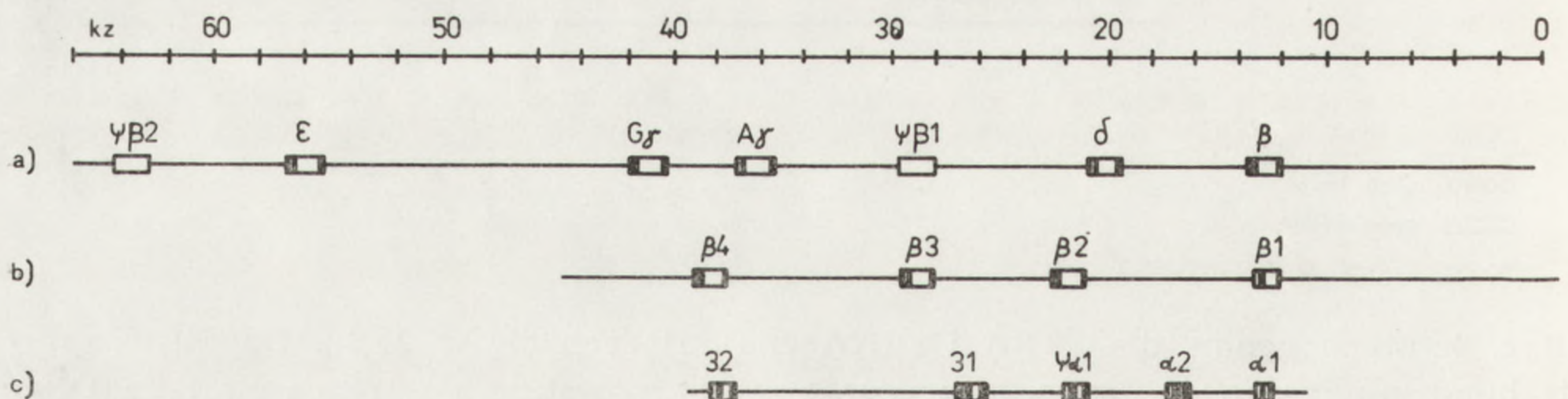
li antykodonu oraz antykodon dla leucyny 3'-GAU-5'. Cząsteczka tRNA₁^{Thr} ma również antykodon dla treoniny 5'-GGU-3', lecz boczna lokalizacja tripletu GGU w pętli antykodonu uniemożliwia jego funkcjonowanie w rozpoznawaniu kodonu. Ponadto tRNA₁^{Thr} cechuje się niezwykle niską zawartością par GC (20%).

BUDOWA GENÓW STRUKTURALNYCH

Geny dla białek organizmów eukariotycznych mają również strukturę nieciągłą. Udowodniono to dzięki poznaniu struktury genów dla α -globin [18, 29, 33] i β -globin [3, 17-19, 23, 24, 29, 37, 38], owoalbuminy [7, 11, 26], albuminy [20], insuliny [4], immunoglobulin [6], α 2-kolagenu [2], owcmukoidów [41] i innych. Liczba sekwencji wtrąconych znajdujących się w jednym genie strukturalnym może być różna, od jednej do kilkunastu i jest prawdopodobnie uzależniona od wielkości kodowanej cząsteczki białka. Rozmiary sekwencji kodujących i sekwencji wtrąconych nie podlegają żadnym regułom lub też jest możliwe, że takich reguł do tej pory nie poznano.

Budowa genów dla białek globinowych

Wśród genów dla białek globinowych wyróżnia się dwie grupy genów. Jest to grupa genów dla α -globin i dla β -globin. Geny dla α - i β -globiny powstały w procesie ewolucji z jednego pierwotnego genu w wyniku jego podwojenia. Te dwa geny dały następnie początek dwóm grupom genów: dla α - i β -globin, które powstały w wyniku ich zwielokrotnienia. Zwielokrotnione sekwencje ulegały potem dywergencji na skutek gromadzenia się w nich mutacji, które powodowały zamiany aminokwasów w kodowanych przez geny białkach. Na ryc. 5 przykładowo

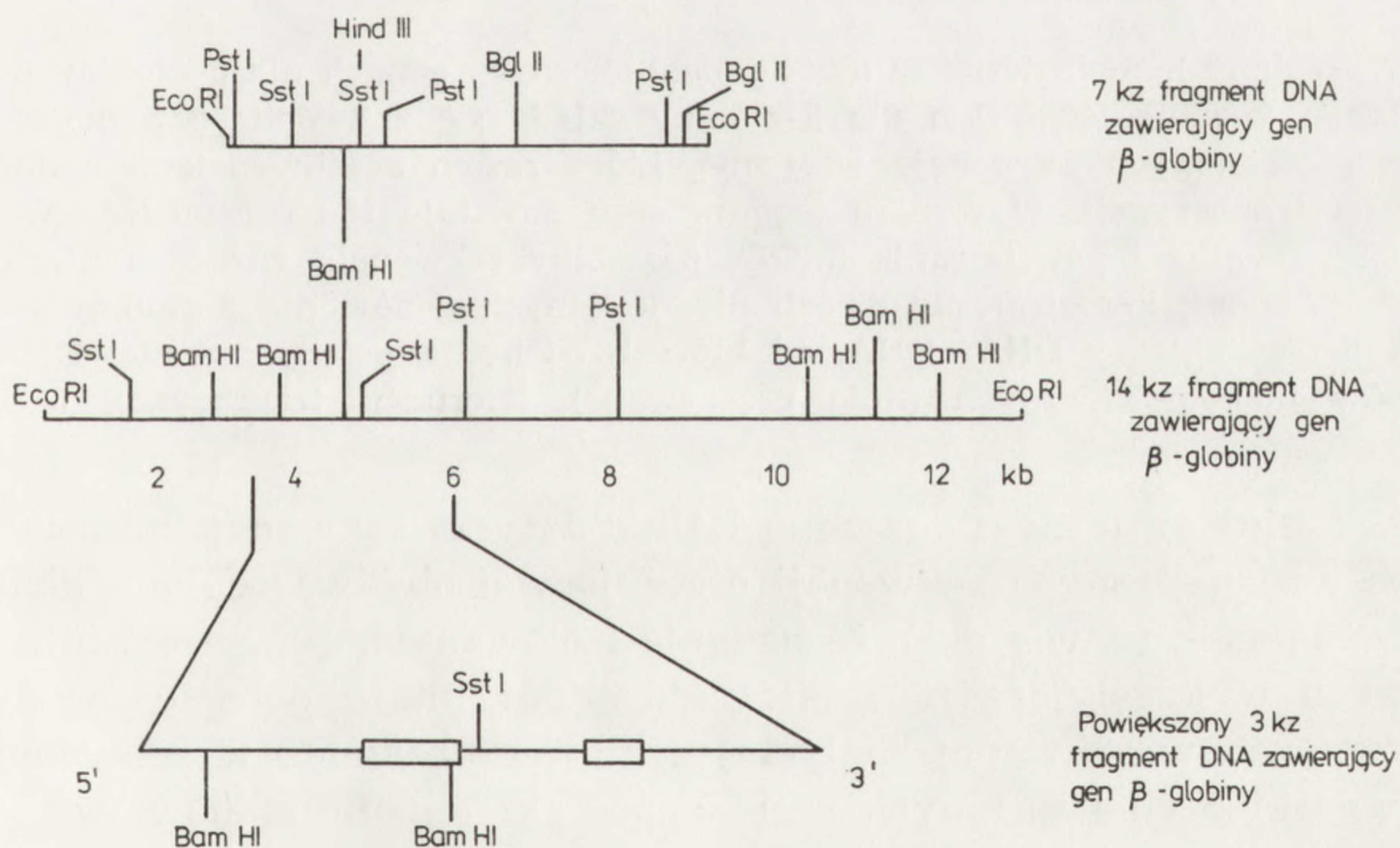


Ryc. 5. Mapy fizyczne trzech grup genów dla białek globinowych (według [8]); a) — grupa genów α -globinowych u człowieka, b) — grupa genów β -globinowych u królika, c) — grupa genów β -globinowych u człowieka. Kierunek transkrypcji: od strony lewej ku prawej

przedstawiono grupy genów α -globinowych u człowieka i β -globinowych u królika i człowieka.

Grupa genów dla β -globin u myszy składa się z 7 genów ułożonych w kolejności 5'- $\beta y3$ - $\beta h0$ - $\beta h1$ - $\beta h2$ - $\beta h3$ - β_{major} - β_{minor} -3' i zajmujących około 70 kz DNA [16]. Gen $\beta y3$ koduje peptydy globinowe u zarodków mysich, geny β_{maj} i β_{min} kodują peptydy globinowe u myszy dorosłych. Nie wyizolowano natomiast żadnych białek, które odpowiadałyby genom $\beta h0$, $\beta h1$ i $\beta h2$. Sekwencja tych genów jest częściowo homologiczna do sekwencji genu $\beta y3$, a częściowo do sekwencji genów β_{maj} i β_{min} . Gen $\beta h3$ w wyniku insercji zasady w kodonie 90 nie koduje normalnej β -globiny.

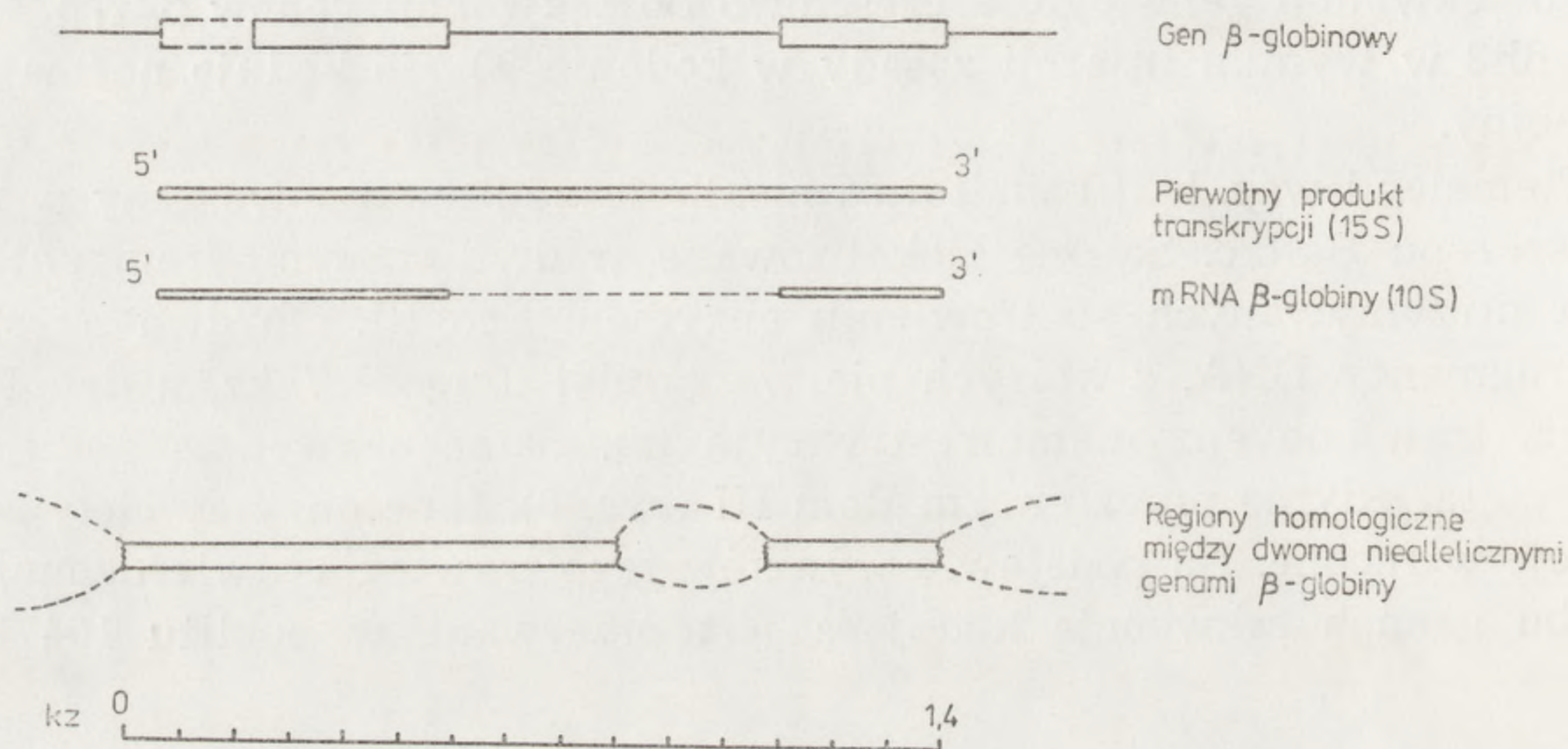
Tiemeier i wsp. [42] badali dwa niealleliczne β -globinowe geny u myszy szczepu Balb/c. Są one zlokalizowane w dwu różnych fragmentach DNA otrzymywanych po trawieniu enzymem Eco RI. Obydwa uzyskane fragmenty DNA, z których pierwszy miał długość 7 kz, a drugi — 14 kz, trawiono enzymami restrykcyjnymi. Sama sekwencja kodująca była cięta jedynie przez enzym Bam HI (ryc. 6). Inne enzymy cięły sekwencje wtrącone. Na podstawie wyników tego trawienia stwierdzono, że w obu genach sekwencja kodująca jest przerywana w pobliżu 104 ko-



Ryc. 6. Mapy restrykcyjne dwóch fragmentów DNA (7 i 14 kz) powstających w wyniku trawienia DNA myszy Balb/c enzymem Eco RI i zawierających dwa niealleliczne geny dla β -globiny (według [42]). Wzór trawienia endonukleazami tych dwóch fragmentów DNA jest różny; wspólne są jedynie jedno miejsce trawienia dla enzymu Bam HI i jedno miejsce trawienia dla enzymu Sst I. Zaznaczono sekwencje kodujące jednego z genów dla β -globiny, które rozdzielone są sekwencją interweniującą. Kierunek transkrypcji 5' \rightarrow 3'

donu, od którego zaczyna się sekwencja interweniująca o długości kilkuset par zasad.

Tiemeier i wsp. [42] analizowali następnie heterodupleksy DNA obu nieallelicznych genów i zaobserwowali tylko dwa małe regiony homologii. Sekwencje homologiczne obejmowały odcinki kodujące i fragmenty interweniujące w bezpośrednim sąsiedztwie z odcinkami kodującymi (ryc. 7). Wynika z tego, że różnice między dwoma nieallelicznymi gena-



Ryc. 7. Regiony homologiczne w dwóch nieallelicznych genach dla β -globiny u myszy Balb/c (według [42]). Gen dla β -globiny składa się z dwóch sekwencji kodujących rozdzielonych sekwencją wtrąconą, która razem z sekwencjami kodującymi ulega transkrypcji. W wyniku tego procesu powstaje 15S pre-mRNA. W procesie dojrzewania i powstawania mRNA β -globiny sekwencja wtrącona ulega eliminacji. Regiony homologiczne dwóch nieallelicznych genów dla β -globiny tworzą razem heterodupleksy DNA—DNA, od których odchodzą pojedyncze nici DNA regionów niehomologicznych (linie przerywane). Kierunek transkrypcji $5' \rightarrow 3'$

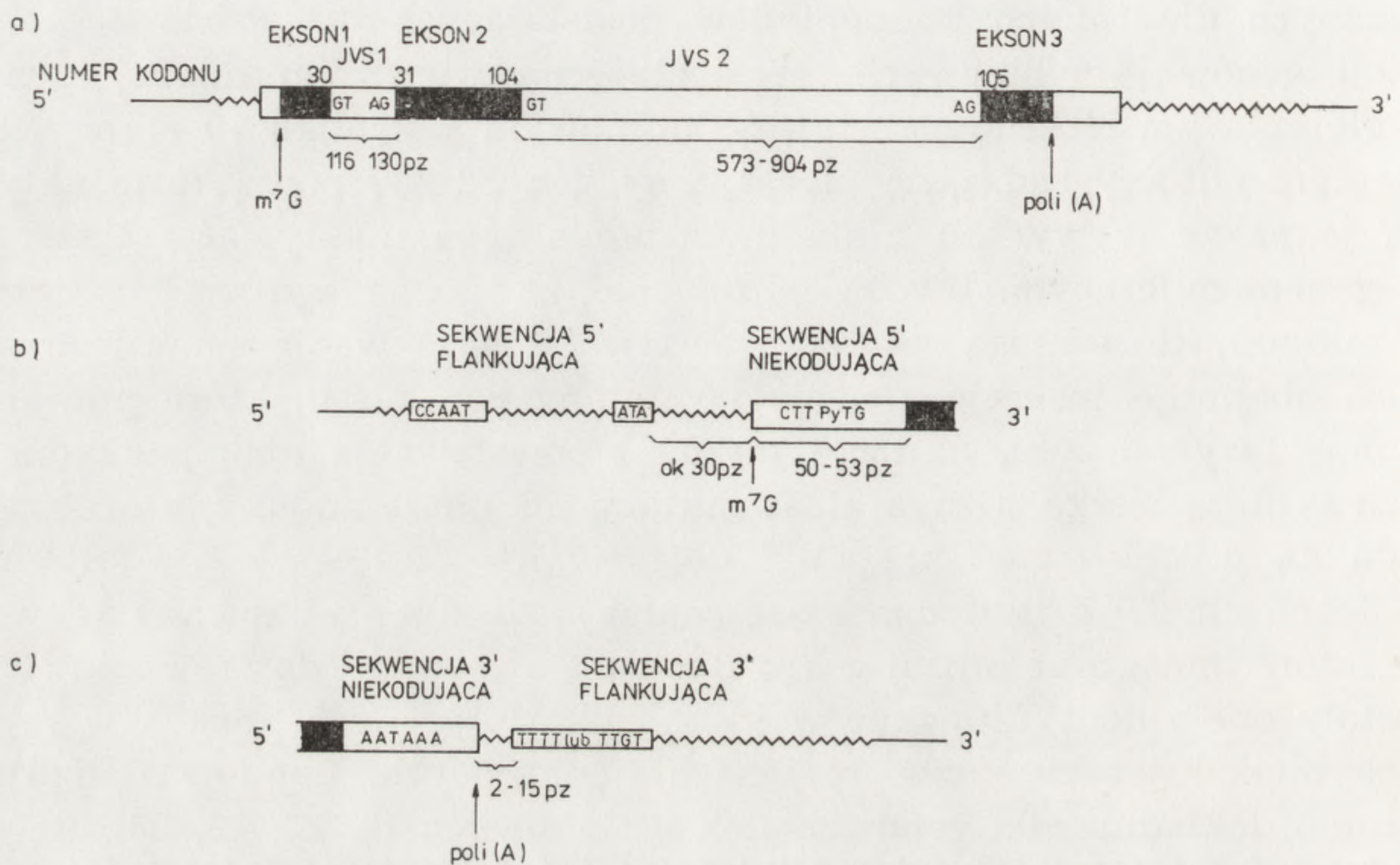
mi dla β -globiny u myszy szczepu Balb/c dotyczą sekwencji interweniujących i zewnętrznych sekwencji otaczających obydwa regiony kodujące. Można zatem stwierdzić, że badania izolowanych genów organizmów wyższych wykazały, że niealleliczność genów może polegać nie tylko na różnicach w sekwencjach kodujących, lecz również w sekwencjach interweniujących i w innych regionach. Fakt ten nie stanowi wyjątku, dotyczy bowiem również innych genów organizmów wyższych.

Lacy i Maniatis [23] badali grupę genów β -globinowych u królika, która składa się z czterech genów: $5' - \beta_4 - \beta_3 - \beta_2 - \beta_1 - 3'$ (ryc. 5). Geny β_3 i β_4 kodują β -globiny zarodkowe lub płodowe. Gen β_1 koduje β -globiny u myszy dorosłych. Gen β_2 jest tzw. pseudogenem, ponieważ nie stwierdzono obecności jego mRNA w komórkach zarodków ani w komórkach osobników dorosłych. W związku z tym przeprowadzono bada-

nia w celu stwierdzenia przyczyny nieaktywności tego genu. Teoretycznie przyczyna taka mogłaby polegać na delecjach, insercjach lub zamianach par zasad. Lacy i Maniatis [23] wykazali, że w pseudogenie $\beta 2$ u królika miała miejsce delecja w 20 kodonie, a w konsekwencji nastąpiła zmiana fazy odczytu kodu. Stwierdzono także, że druga delecja miała miejsce w kodonie 128, a ponadto w genie tym zaszło kilka mutacji mylnych, które spowodowały zamianę aminokwasów charakterystycznych dla innych polipeptydów powstających na podstawie informacji genów β -globinowych. W ogólności stwierdzono między genem $\beta 1$ -globinowym i pseudogenem $\beta 2$ -globinowym u królika 10 różnic. Wymienieni autorzy sądzą, że nieaktywny gen $\beta 2$ był początkowo aktywny, jednakże w wyniku mutacji nastąpiła jego inaktywacja i stał się on genem milczącym. Uważa się obecnie, że można wyróżnić dwie klasy mutacji, które mogą spowodować trwałą inaktywację genu. Pierwsza klasa obejmuje insercje, delecje i zamiany par zasad, które powodują zmianę fazy odczytu, mutacje mylne i powstawanie kodonów kończących syntezę białka. Druga klasa mutacji obejmuje zmiany, które wpływają na przebieg transkrypcji i dojrzewanie cząsteczek pre-mRNA.

Jeżeli chodzi o tę drugą klasę mutacji, to zidentyfikowano sekwencje, które mogą brać udział w regulacji transkrypcji i dojrzewaniu RNA. Zostały one zidentyfikowane w kilku eukariotycznych genach w regionach niekodujących i tzw. regionach flankujących. Regiony flankujące opisano dokładnie dla genów białek globinowych [8, 23, 33, 38]. Region 5' flankujący obejmuje początkowe sekwencje genów (ryc. 8). Jest on zlokalizowany w kierunku 5' od miejsca, do którego w RNA po zakończeniu procesu transkrypcji przyłącza się 7-metyloguanozyna (m^7G). W literaturze angielskiej używa się dla niej nazwy „cap” (kapturek), gdyż chroni ona mRNA przed degradacją uniemożliwiając jego hydroлизę przez egzonukleazę, która degradowuje mRNA w kierunku 5' \rightarrow 3' [10]. Sekwencją wspólną dla tego regionu flankującego we wszystkich eukariotycznych genach strukturalnych jest sekwencja pirymidyna—ATA—puryna (tzw. box ATA; ryc. 8). Prawdopodobnie odgrywa ona pewną rolę w procesie inicjacji transkrypcji i dojrzewaniu pre-mRNA u organizmów wyższych. W badanych przez Lacy i Maniatis [23] genach dla β -globin u królika sekwencja ta zaczyna się na wysokości 31 pary zasad w kierunku 5' od miejsca m^7G w mRNA. Pomędzy 77 a 84 pz znajduje się region, który zawiera sekwencję CACCCT występującą we wszystkich genach dla β -globin organizmów dorosłych z wyjątkiem genu $\beta 2$. W pseudogenie tym brak jest również sekwencji CCAAT charakterystycznej dla regionu 5' flankującego większości genów organizmów wyższych [8]. Brak tych dwóch sekwencji w pseudogenie $\beta 2$ potwierdza sugestię, że mogą one odgrywać pewną rolę w procesach transkrypcji.

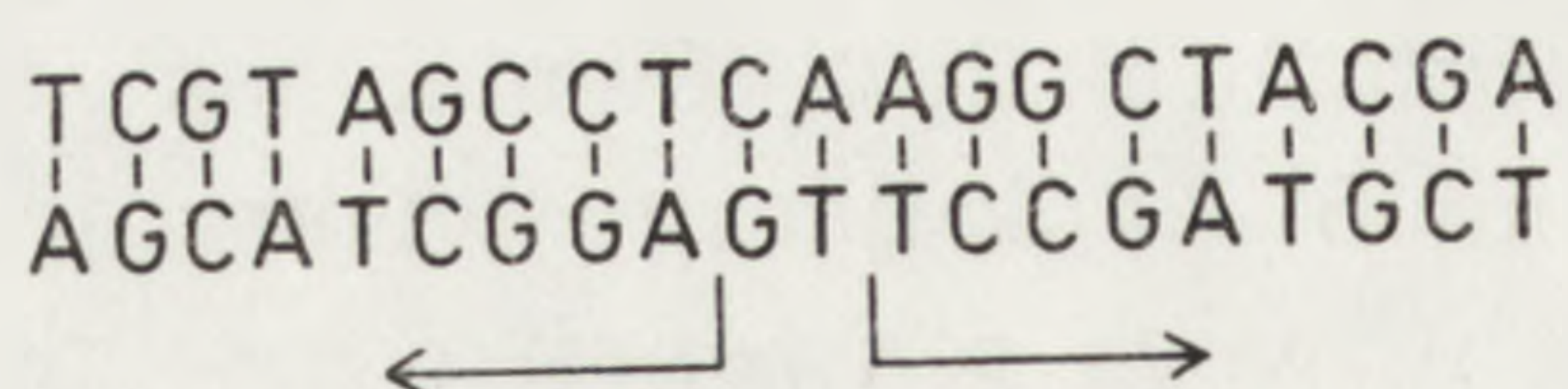
Sekwencje flankujące 5' opisano dokładnie w genach dla białek globinowych człowieka [8, 33, 37, 38]. Podobnie jak w genach u królika, w genach dla α - i β -globin u człowieka triplet ATA (box ATA) jest zwykle zlokalizowany w odległości około 30 par zasad od miejsca m^7G w mRNA. Triplet ATA jest ograniczony przez sekwencje bogate w pary GC.



Ryc. 8. Schemat struktury nieciągłych genów dla β -globin u ssaków

a) — budowa genów dla β -globin. Obszary zaczerńnione oznaczają sekwencje kodujące genów, obszary białe — sekwencje interwenujące (IVS) i niekodujące. Linie faliste oznaczają sekwencje flankujące. Pokazano miejsca przyłączenia m^7G i poli(A) do globinowego mRNA. W sekwencjach interwenujących zaznaczono pierwsze i ostatnie dwunukleotydy; b) — sekwencja 5' flankująca i sekwencja 5' niekodująca. Zaznaczono charakterystyczne sekwencje nukleotydów w tych odcinkach genów dla β -globin; c) — sekwencja 3' flankująca i sekwencja 3' niekodująca

Intrygującą cechą regionu flankującego 5' w genie dla δ -globiny u człowieka jest obecność dwu zachodzących na siebie sekwencji palindromowych występujących po stronie 5' tripletu ATA. Odcinki palindromowe charakteryzują się tym, że występują w nich komplementarne sekwencje odwrotnie ułożone (ryc. 9). Dłuższy palindrom w sekwencji flankującej genu dla δ -globiny ma długość 46 pz, krótszy — 39 pz. Po-



Ryc. 9. Sekwencja palindromowa w dwuniciowym DNA

dobne regiony znaleziono w analogicznych miejscach w genach strukturalnych dla insuliny u człowieka [4].

We wszystkich genach β -globinowych z wyjątkiem genu δ w kierunku 5' od sekwencji bogatej w pary AT znajduje się sekwencja CCAAT (tzw. box CCAAT; ryc. 8). Gen dla δ -globiny posiada sekwencję CCAAC. W genach dla γ -globin fragment o długości 16 pz zawierający sekwencję CCAAT jest powtórzony dwukrotnie. Sekwencja CCAAT występuje także w genach dla białek α -globinowych. Mimo że sekwencja ta jest zwykle zlokalizowana w odległości 60–80 pz od miejsca m^7G w mRNA, w α -globinowym pseudogenie ($\psi\alpha 1$) odległość ta wynosi tylko 51 pz. Spowodowane jest to delecją 23 par zasad między sekwencjami ATA i CCAAT. Brak tego regionu może więc wpływać na brak funkcji tego genu. Efstratiadis i wsp. [8] sugerują, że sekwencja CCAAT może odgrywać pewną rolę w inicjacji transkrypcji i dojrzewaniu RNA.

U różnych ssaków w genach dla β -globin dorosłych osobników sekwencje położone w kierunku 5' od sekwencji CCAAT są bardzo podobne. Sekwencje te są specyficzne dla tych genów; brak jest ich w zarodkowych i płodowych genach globinowych człowieka, α -globinowych genach u myszy i w innych genach organizmów eukariotycznych.

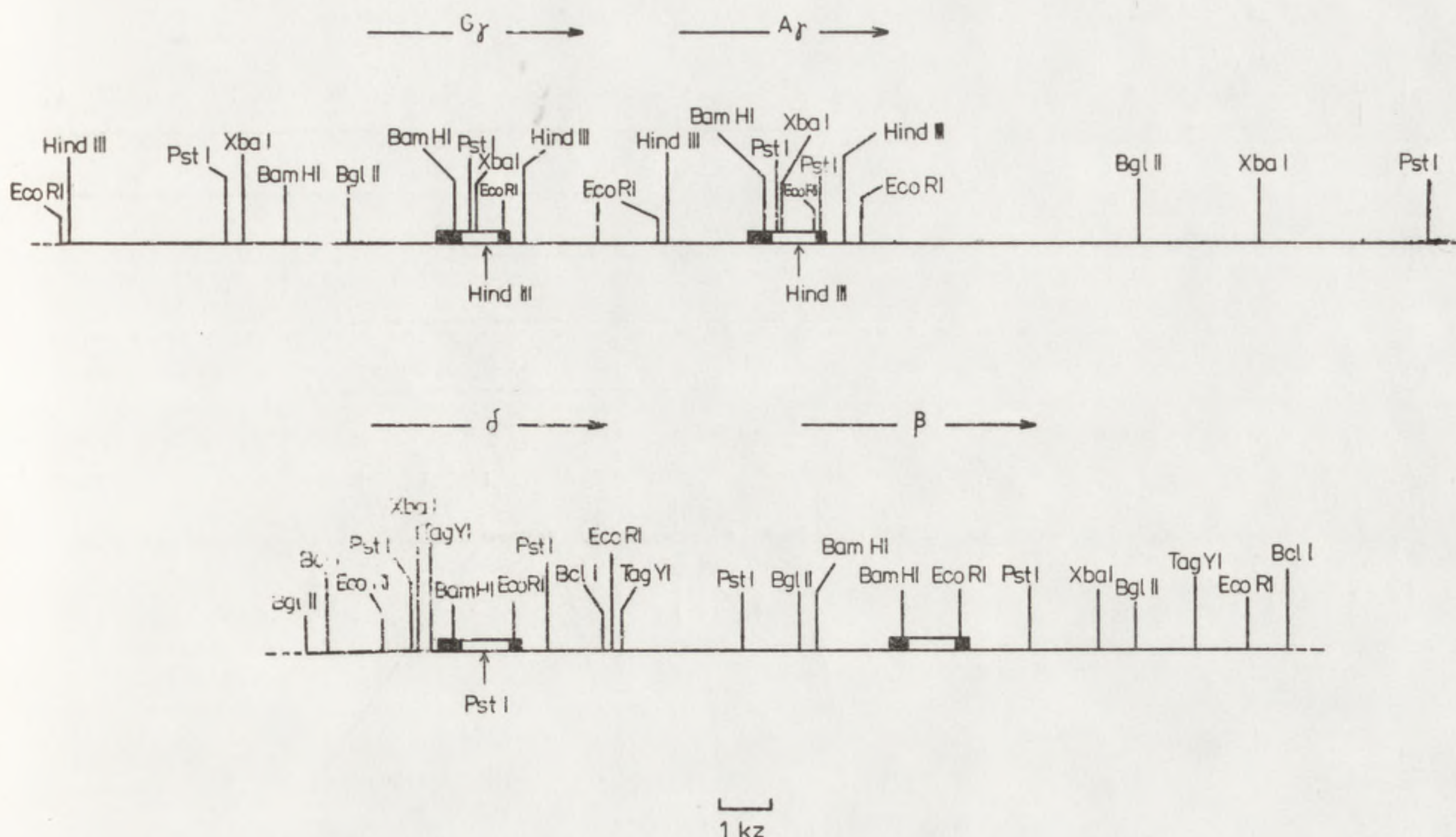
W kierunku 3' od miejsca, do którego w RNA przyłącza się po transkrypcji sekwencja poli(A) stanowiąca zakończenie łańcucha mRNA, znajduje się sekwencja flankująca 3' (ryc. 8). W pewnych eukariotycznych genach stwierdzono obecność sekwencji TTTT lub TTGT znajdujących się w odległości 6 pz od miejsca poli(A). W genach β -globinowych odległość ta jest różna i wynosi 2–15 pz. Różnorodność lokalizacji tych sekwencji i ich brak w innych eukariotycznych genach nie pozwoliły jeszcze na określenie ich funkcji.

W genach dla białek globinowych występują na ich końcach 5' i 3' inne sekwencje nie kodujące białka. Nie kodujące 5' sekwencje genów globinowych znajdują się między miejscem m^7G a kodonem inicjującym. W genach dla białek globinowych długość tych sekwencji jest mniej więcej stała i wynosi 50–53 pz. Charakterystyczną sekwencją tego regionu jest sekwencja CTT—pirymidyna—TG (ryc. 8). Lacy i Maniatis [23], badając nie kodujące 5' sekwencje w pseudogenie $\beta 2$ królika, stwierdzili, że znajduje się w nim podobna sekwencja UAUUUG, która różni się dwiema zasadami od sekwencji w genie $\beta 1$. Autorzy sugerują, że sekwencja CTT—pirymidyna—TG w nie kodującym 5' regionie genów globinowych odgrywa pewną rolę w inicjacji translacji. Stwierdzili oni ponadto, że w pseudogenie $\beta 2$ u królika ta nie kodująca sekwencja ma długość tylko 48 pz. W genie tym nastąpiła delecja 5 par zasad będących częścią sekwencji, w której powtarzają się pary nukleotydów CA i GA (CAGACAGA). Efstratiadis i wsp. [8] stwierdzili podobne delecje w ge-

nach β -globinowych u człowieka i u myszy. Sugerują oni, że mogą one powstawać w wyniku błędnego sparowania homologicznych sekwencji po procesie replikacji.

Nie kodujące 3' sekwencje znajdują się między kodonem terminującym a miejscem przyłączenia łańcucha poli(A) (ryc. 8). We wszystkich genach β -globinowych u człowieka miejsce to jest poprzedzone sekwencją AATAAA, która prawdopodobnie odgrywa rolę w dojrzewaniu lub poliadenylacji cząsteczek mRNA. Sekwencja taka występuje także w β -globinowych genach u królika i w α -globinowych genach u człowieka. W β -globinowych genach ssaków sekwencje między miejscem przyłączenia poli(A) a sekwencją AATAAA różnią się znacznie. Po drugiej stronie sekwencji AATAAA znajdują się sekwencje homologiczne we wszystkich genach badanych przez Efstratiadis i wsp. [8] z wyjątkiem genów dla γ -globin. W genach dla γ -globin część tego regionu uległa delecji. Obecność delecji oraz insercji różnej wielkości wskazuje, że sekwencje nie kodujące regionu 3' nie odgrywają większej roli w funkcjonowaniu globinowego mRNA.

We wszystkich dotychczas poznanych β -globinowych genach organizmów wyższych występują dwie sekwencje wtrącone, z których jedna jest mniejsza (IVS1), a druga większa (IVS2). Mniejszy intron rozpoczyna się między tripletami dla 30 i 31 aminokwasu β -globin, a większy — między tripletami dla 104 i 105 aminokwasu (ryc. 8). IVS1 składa się ze 116–130 par zasad, a IVS2 z 573–904 par zasad. Stwierdzono, że długość intronu IVS2 w genach dla β -globin u człowieka jest mniej zróżnicowana i waha się w granicach 854–904 pz. Końce 5' intronów zawierają dwunukleotyd GT, a końce 3' — AG [7]. Koniec 5' IVS2 β -globinowych genów ma ewolucyjnie nie zmienioną sekwencję złożoną z 7 par zasad. Z kolei wykazano zmienność w pozostałych sekwencjach intronów. Sugeruje to, że sekwencje złącza ekson/intron odgrywają rolę w procesie dojrzewania RNA. Zostało to udowodnione poprzez wykazanie, że delecja fragmentu zawierającego połączenie sekwencji kodującej z intronem prowadzi do zahamowania procesu powstawania prawidłowego mRNA. Charakterystyczne są również sekwencje kodujące przyległe do połączenia ekson/intron, w których powtarzają się jednakowe sekwencje złożone z 8 par zasad. Jeffreys [17] stosując technikę enzymów restrykcyjnych porównywał budowę genów β -globinowych u 60 osób. Autor ten stwierdził u dwóch kobiet obecność dwu allelicznych genów dla δ -globiny. Różnice między tymi genami polegały na obecności lub braku w sekwencji interweniującej miejsca trawienia enzymu Pst I (ryc. 10). U innych badanych osób Jeffreys [17] stwierdził obecność allelicznych genów dla $A\gamma$ i $G\gamma$ -globiny. Różnice między allelami tych genów dotyczyły również sekwencji wtrąconych i enzymu Hind III (ryc. 10).



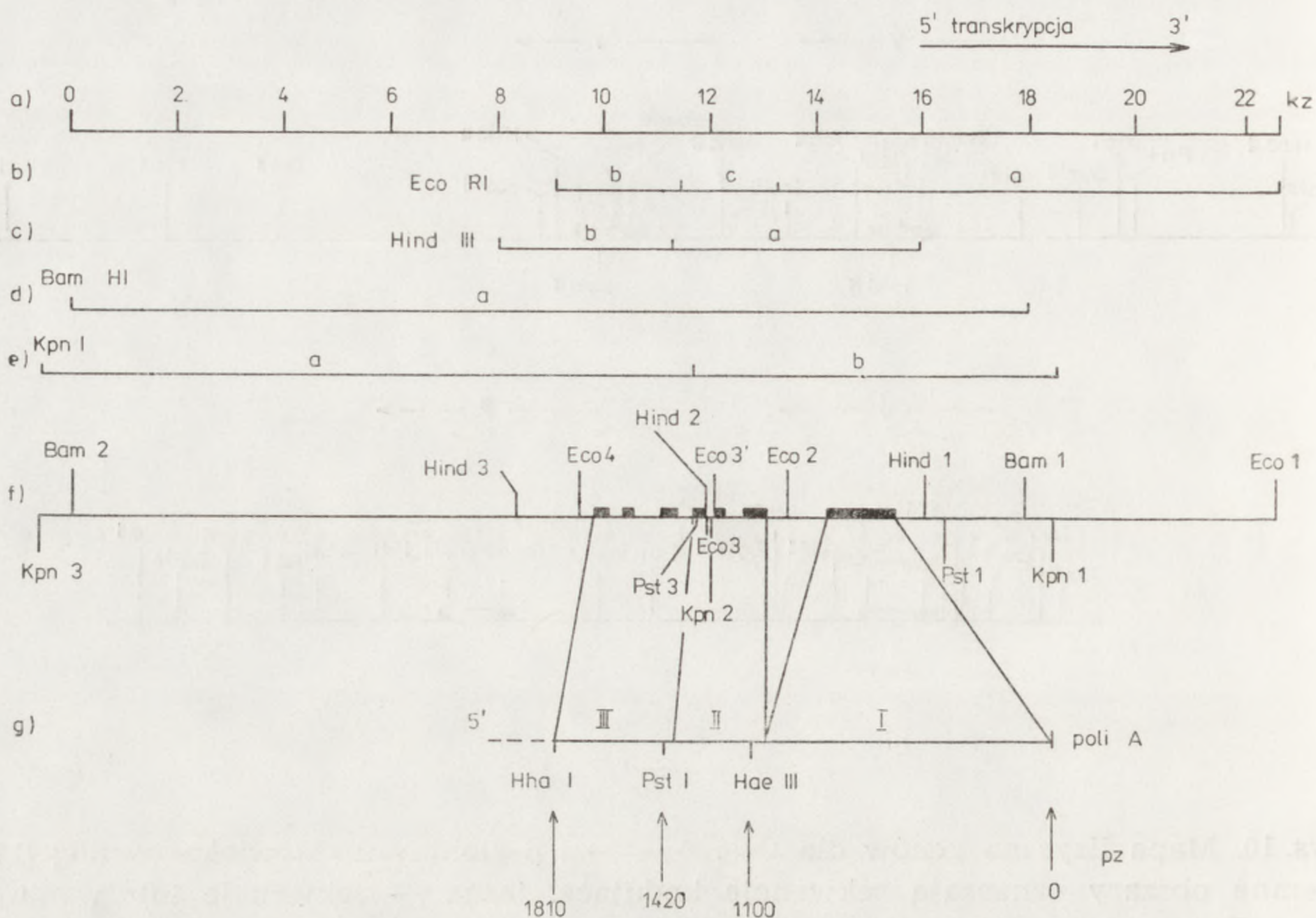
Rys. 10. Mapa fizyczna genów dla G γ -, A γ -, δ - i β -globiny u człowieka według [17]). Ciemne obszary oznaczają sekwencje kodujące, jasne — sekwencje interweniujące. Zaznaczono miejsca działania niektórych enzymów restrykcyjnych. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów

W grupie α -globinowych genów stwierdzono również dwie sekwencje interweniujące. Pierwsza z nich zaczyna się między kodonami dla 31 i 32 aminokwasu białka, a druga — między kodonami dla 99 i 100 aminokwasu. Budowa tych sekwencji wykazuje dość wysoki stopień homologii w różnych genach α -globinowych. Na złączach ekson/intron występują charakterystyczne sekwencje 3' AG i 5' GT. Sekwencji 5' GT nie ma w pseudogenie $\alpha 1$ u człowieka. W grupie genów globinowych największą zgodność sekwencji wtrąconych obserwowano między parami genów β/δ , γ/ϵ i β/ϵ . Introny IVS1 wykazują mniejszą rozbieżność sekwencji par zasad niż introny IVS2.

Sekwencje odcinków kodujących genów globinowych są poznane i w przeciwieństwie do innych sekwencji genów organizmów eukariotycznych są badane jedynie w aspekcie różnic odbijających się w pierwszorzędowej budowie poszczególnych rodzajów białek globinowych.

Budowa genu dla owoalbuminy

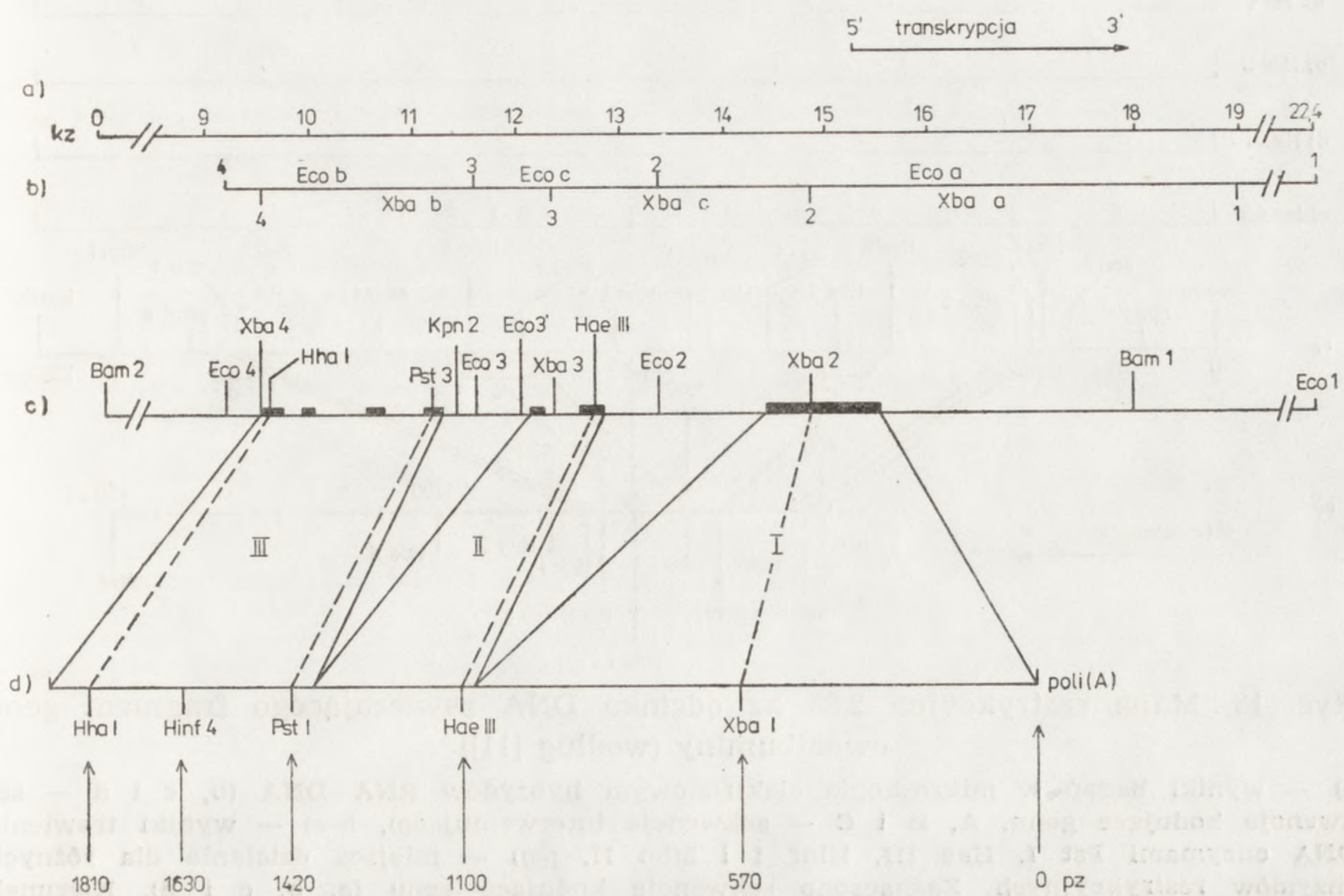
Sekwencje kodujące mRNA owoalbuminy znajdują się we fragmencie DNA o długości 6000 pz. Ten fragment DNA jest około trzy razy dłuższy niż mRNA owoalbuminy. Badania struktury genu dla owoalbuminy wykazały, że gen ten posiada 6 sekwencji interweniujących, które



Ryc. 11. Organizacja fragmentu DNA kodującego mRNA owoalbuminy (według [26])
 a) — skala w kz, b-e) — fragmenty DNA powstające w wyniku jego trawienia enzymami Eco RI, Hind III, Bam HI i Kpn I, f) — mapa DNA kodującego mRNA owoalbuminy. Zaznaczono 7 sekwencji kodujących rozdzielonych przez sekwencje interweniujące, g) — mapa mRNA owoalbuminy

oddzielają 7 odcinków DNA kodujących owoalbuminę (ryc. 11 i 12) [26]. Dokładne zbadanie budowy tego genu było możliwe dzięki zastosowaniu enzymów restrykcyjnych i techniki klonowania DNA.

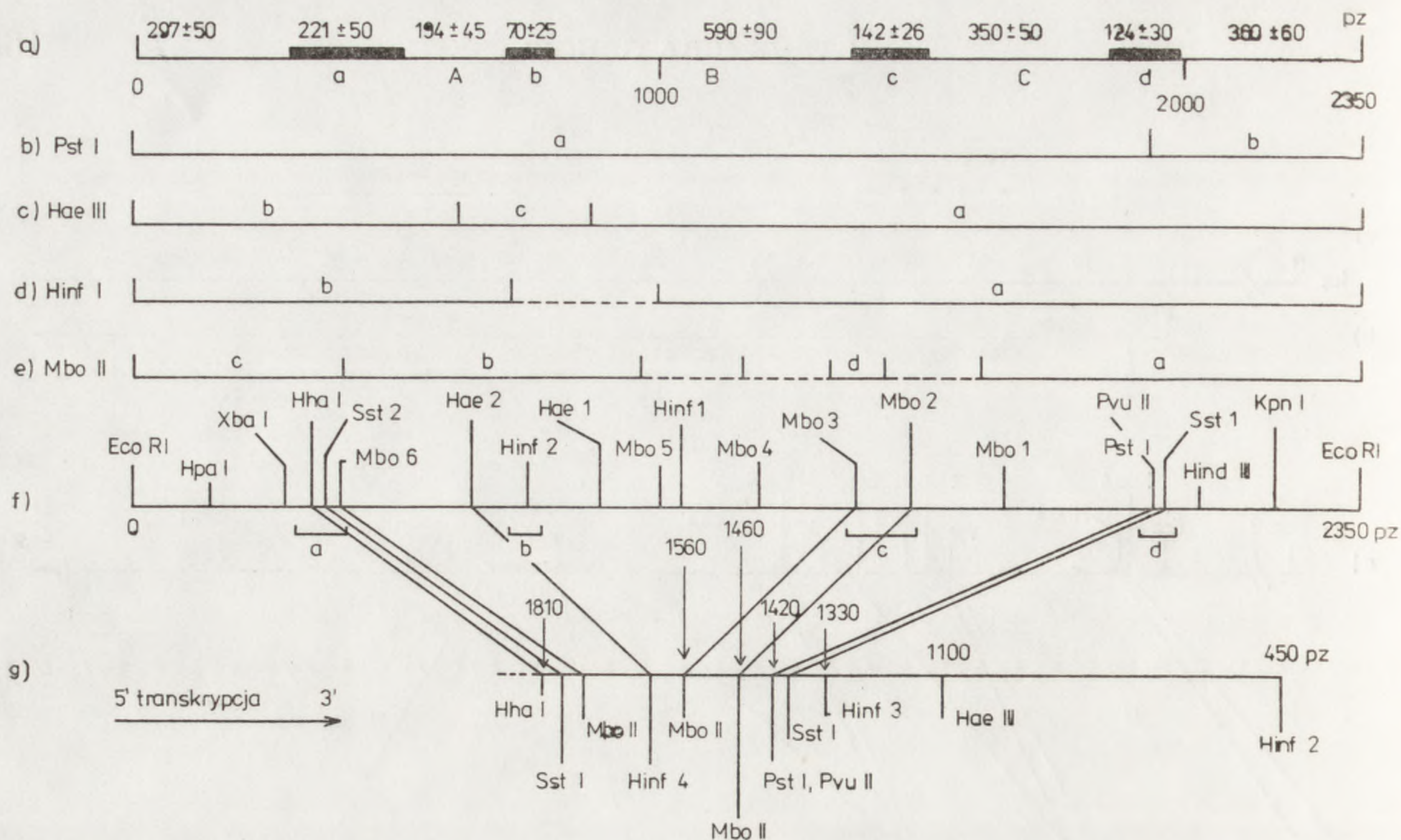
Breathnach i wsp. [7] stwierdzili, że enzym Eco RI trawi DNA z jajnika kurcząt dając trzy fragmenty zawierające gen dla owoalbuminy. Te fragmenty DNA były następnie poddawane działaniu innych enzymów restrykcyjnych w celu określenia struktury genu dla owoalbuminy. Garapin i wsp. [11] stosując enzymy: Eco RI, Pst I, Hae III, Hinf I, Mbo II, Kpn I, Hha I, Sst I i inne badali jeden z tych fragmentów kodujący część 5' mRNA o długości około 500 nukleotydów. Odcinki DNA, które otrzymywano po trawieniu tego fragmentu i miejsca działania enzymów restrykcyjnych przedstawiono na ryc. 13 b-f. Wyniki analizy restrykcyjnej oraz wyniki hybrydyzacji otrzymanych fragmentów DNA z próbkami komplementarnego DNA pozwoliły stwierdzić, że odcinek DNA kodujący część 5' mRNA zawiera cztery fragmenty kodujące białka, które oddzielone są od siebie trzema sekwencjami wtrąconymi. Zostało to potwierdzone przez wyniki badań w mikroskopie



Ryc. 12. Organizacja genu dla owoalbuminy (według [26])

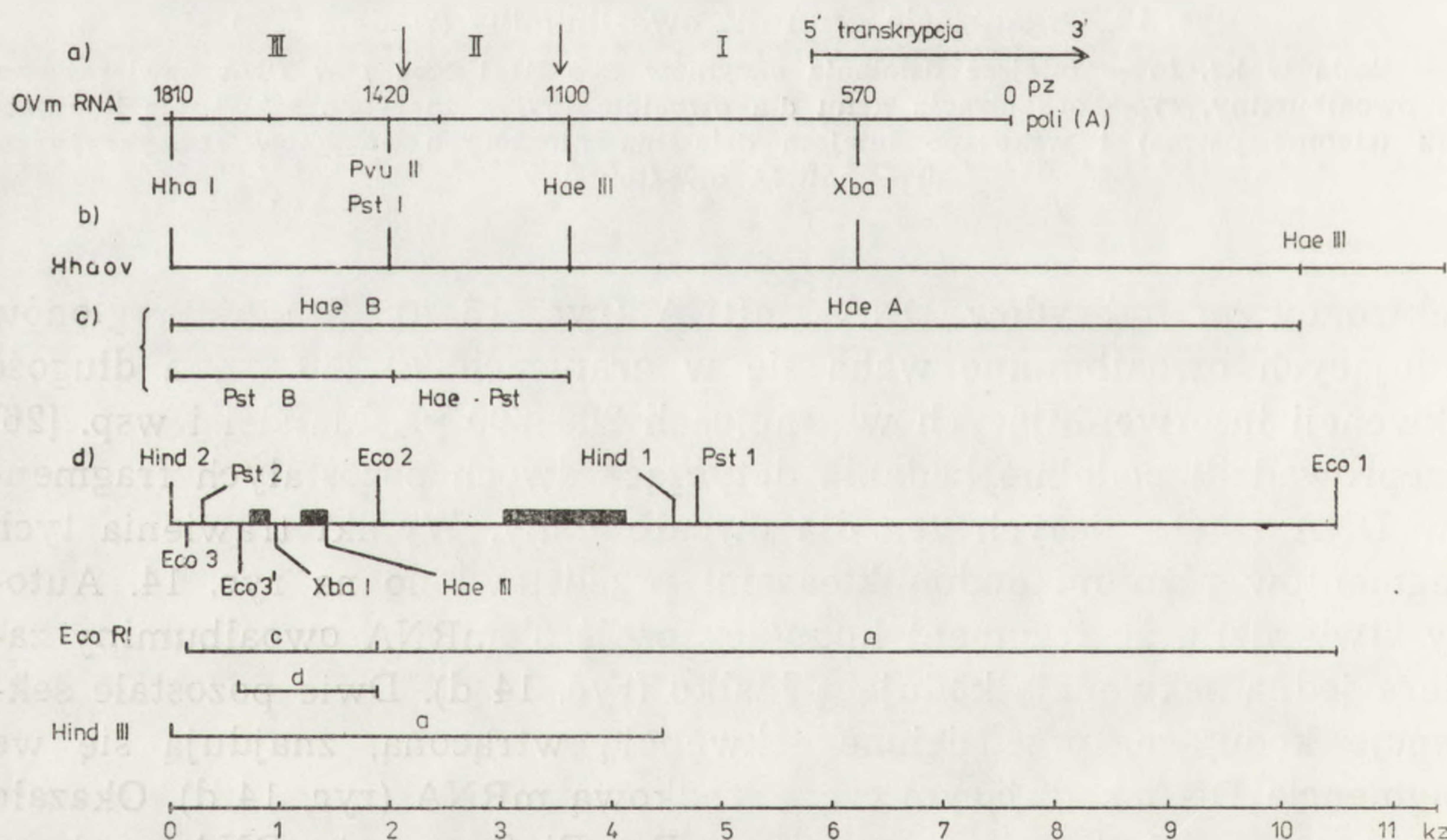
a) — skala w kz, b) — miejsce działania enzymów Eco RI i Xba I w DNA zawierającym gen owoalbuminy, c) — organizacja genu dla owoalbuminy. Zaznaczono sekwencje kodujące genu (ciemne pasma) i wskazano miejsca działania niektórych enzymów restrykcyjnych, d) — mRNA owoalbuminy

elektronowym hybrydów DNA—mRNA (ryc. 13 a). Długość regionów kodujących owoalbuminę waha się w granicach 70–220 pz, a długość sekwencji interweniujących w granicach 200–600 pz. Mandel i wsp. [26] przeprowadzili podobne badania dotyczące dwóch pozostałych fragmentów DNA zawierających gen dla owoalbuminy. Wyniki trawienia tych fragmentów różnymi endonukleazami przedstawiono na ryc. 14. Autorzy stwierdzili, że fragment kodujący część 3' mRNA owoalbuminy zawiera jedną sekwencję kodującą białko (ryc. 14 d). Dwie pozostałe sekwencje kodujące, przedzielone sekwencją wtrąconą, znajdują się we fragmencie DNA kodującym część środkową mRNA (ryc. 14 d). Okazało się, że w wyniku trawienia enzymem Eco RI fragmentu DNA zawierającego gen dla owoalbuminy mogą powstać dwa różne fragmenty kodujące część środkową mRNA (fragmenty c i d; ryc. 14 d). Te dwa różne fragmenty DNA kodujące ten sam odcinek mRNA wskazują na obecność dwu różnych alleli genu owoalbuminowego, które różnią się obecnością lub brakiem dodatkowego miejsca cięcia enzymu Eco RI.



Ryc. 13. Mapa restrykcyjna 2,35 kb odcinka DNA zawierającego fragment genu owoalbuminy (według [11])

a) — wyniki badań w mikroskopie elektronowym hybrydów RNA—DNA (b, c i d — sekwencje kodujące genu, A, B i C — sekwencje interweniujące), b-e) — wyniki trawienia DNA enzymami Pst I, Hae III, Hinf I i Mbo II, f-g) — miejsca działania dla różnych enzymów restrykcyjnych. Zaznaczono sekwencje kodujące genu (a, b, c i d). Kierunek transkrypcji 5' → 3'

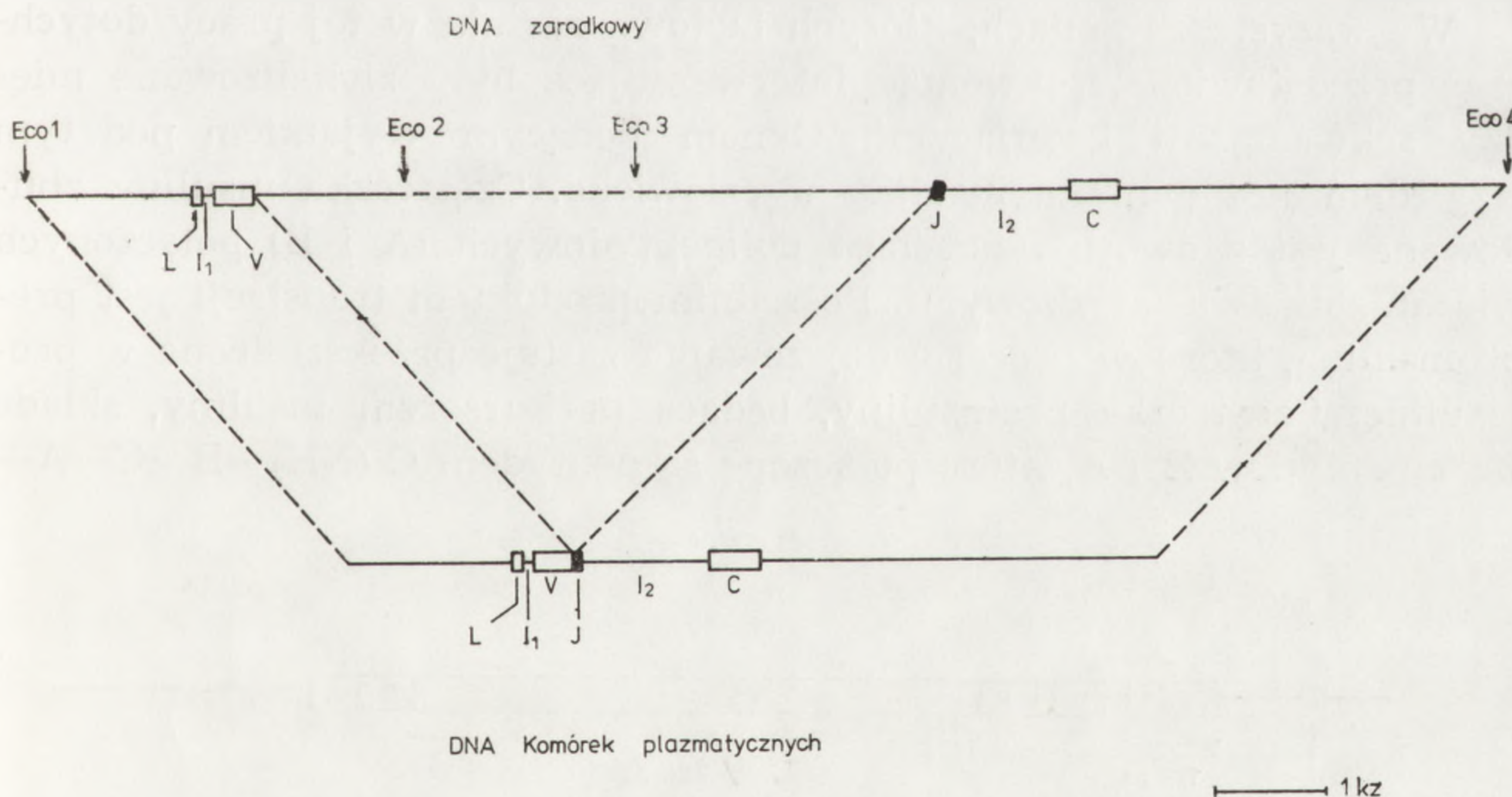


Ryc. 14. Mapy mRNA owoalbuminy i DNA zawierającego trzy sekwencje kodujące genu dla owoalbuminy (według [26])

a) — mRNA owoalbuminy. Zaznaczono trzy regiony RNA I, II i III kodowane przez sekwencje obecne we fragmentach DNA powstających po trawieniu DNA enzymem Eco RI, b-c) — wyniki trawienia enzymami restrykcyjnymi odcinka DNA zawierającego gen dla owoalbuminy, d) — fragment DNA odpowiadający I i II regionowi mRNA. Trzy sekwencje kodujące rozdzielone są przez dwie sekwencje interweniujące; poniżej — wyniki trawienia tego odcinka DNA enzymami Eco RI i Hind III

Budowa genów dla immunoglobulin

Immunoglobuliny są białkami, których cząsteczki zbudowane są z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch łańcuchów lekkich (κ lub λ) i dwóch ciężkich (γ). Brack i wsp. [6] badali strukturę genów dla polipeptydów λ u myszy Balb/c. Znane są dwa typy łańcucha u myszy: λ_1 i λ_2 , które charakteryzowane są przez specyficzne sekwencje aminokwasów w części stałej łańcucha polipeptydowego. Dzięki zastosowaniu techniki enzymów restrykcyjnych i badaniu w mikroskopie elektronowym heterodupleksów DNA—DNA autorzy stwierdzili, że podczas różnicowania limfocytów ma miejsce somatyczne przegrupowanie sekwencji genu dla lekkiego łańcucha immunoglobuliny. Okazało się, że w DNA komórek zarodków myszy Balb/c sekwencje genu dla łańcucha λ_1 składają się z dwu części, które znajdują się w dwu różnych fragmentach DNA powstających w wyniku trawienia DNA zarodka endonukleazą Eco RI (ryc. 15). Pierwszy z tych fragmentów obejmuje sekwencję kodującą początkowe peptydy łańcucha λ (region L) oraz sekwencję, która koduje resztę początkowych peptydów łańcucha polipeptydowego i region zmienny (V) tego łańcucha. Te dwie sekwencje kodujące oddzielone są od siebie krótką sekwencją wtrąconą (I_1). Drugi fragment DNA obejmuje kodującą sekwencję J o długości około 40 pz oraz sekwencję,

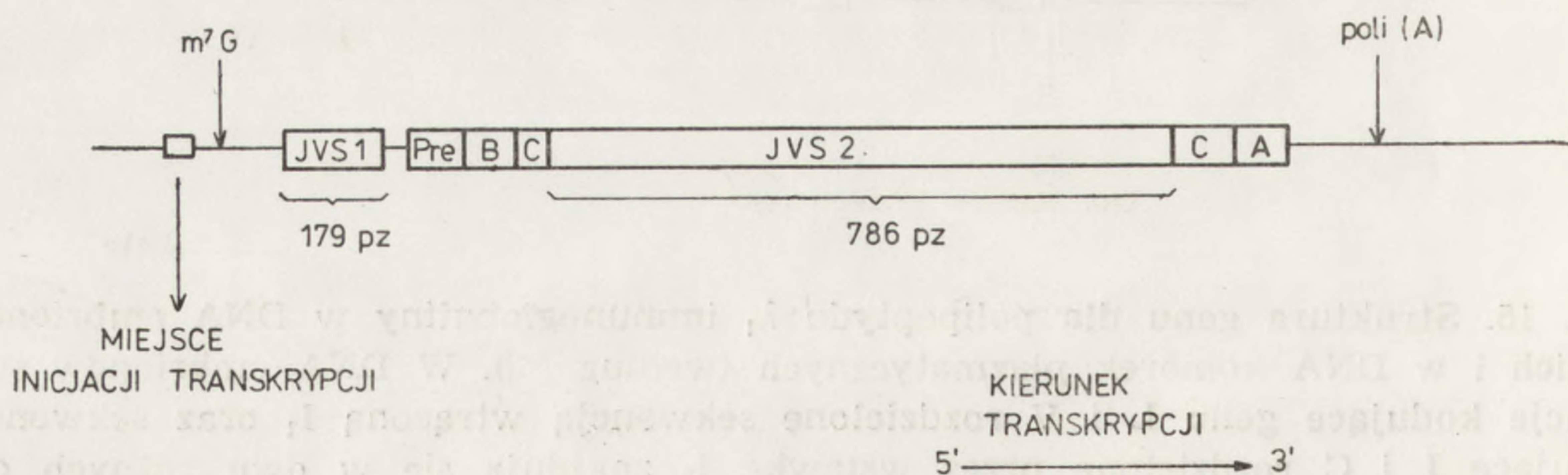


Ryc. 15. Struktura genu dla polipeptydu λ_1 immunoglobuliny w DNA embrionów mysich i w DNA komórek plazmatycznych (według [6]). W DNA embrionów sekwencje kodujące genu L i V rozdzielone sekwencją wtrąconą I_1 oraz sekwencje kodujące J i C rozdzielone przez wstawkę I_2 znajdują się w dwu różnych odcinkach DNA oddalonych od siebie. W wyniku procesów rekombinacyjnych ma miejsce przegrupowanie sekwencji DNA i połączenie odcinka V i odcinka J

która koduje stały region (C) łańcucha λ . Wstawka (I_2) oddzielająca te dwie sekwencje kodujące obejmuje około 1200 pz. W wyniku przegrupowania, które ma miejsce podczas różnicowania komórek, te dwa fragmenty DNA zostają przeniesione w bezpośrednie sąsiedztwo. W DNA komórek plazmatycznych szpiczaka produkujących polipeptyd λ_1 dwie części genu dla tego białka są ze sobą połączone. Nastąpiło to w wyniku procesu rekombinacji, w wyniku którego połączeniu uległy sekwencja V i sekwencja J (ryc. 15). Sekwencja J odgrywa kluczową rolę w procesie rekombinacji oraz w procesie cięcia i wiązania RNA („splicing”). Jedna połowa regionu J zawiera sekwencję nukleotydów będącą sygnałem dla rekombinacji DNA. Drugą połową tego regionu posiada sygnał dla procesu dojrzewania RNA, w wyniku którego następuje połączenie regionów kodujących część stałą (C) i część zmienną (V) łańcucha λ immunoglobuliny. W komórkach zróżnicowanych gen dla łańcucha γ_1 immunoglobuliny składa się z trzech sekwencji kodujących (L, V + J, C), które oddzielone są dwiema sekwencjami interweniującymi. Brack i wsp. [6] sugerują, że somatyczne przegrupowanie sekwencji DNA może odgrywać pewną rolę jako mechanizm kontroli działania genów w procesie różnicowania komórek.

Budowa genu dla insuliny

We wszystkich genach, których budowa została w tej pracy dotychczas przedstawiona, sekwencje interweniujące były zlokalizowane między sekwencjami kodującymi. Genem będącym wyjątkiem pod tym względem jest gen dla insuliny u człowieka. Częsteczka insuliny zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych (A i B) połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Pośrednim produktem translacji jest preproinsulina, która w procesie dojrzewania zostaje przekształcona w proinsulinę. Częsteczka proinsuliny, będąca prekursorem insuliny, składa się z peptydów B i A, które połączone są peptydem C ($\text{NH}_2\text{—B—C—A—}$

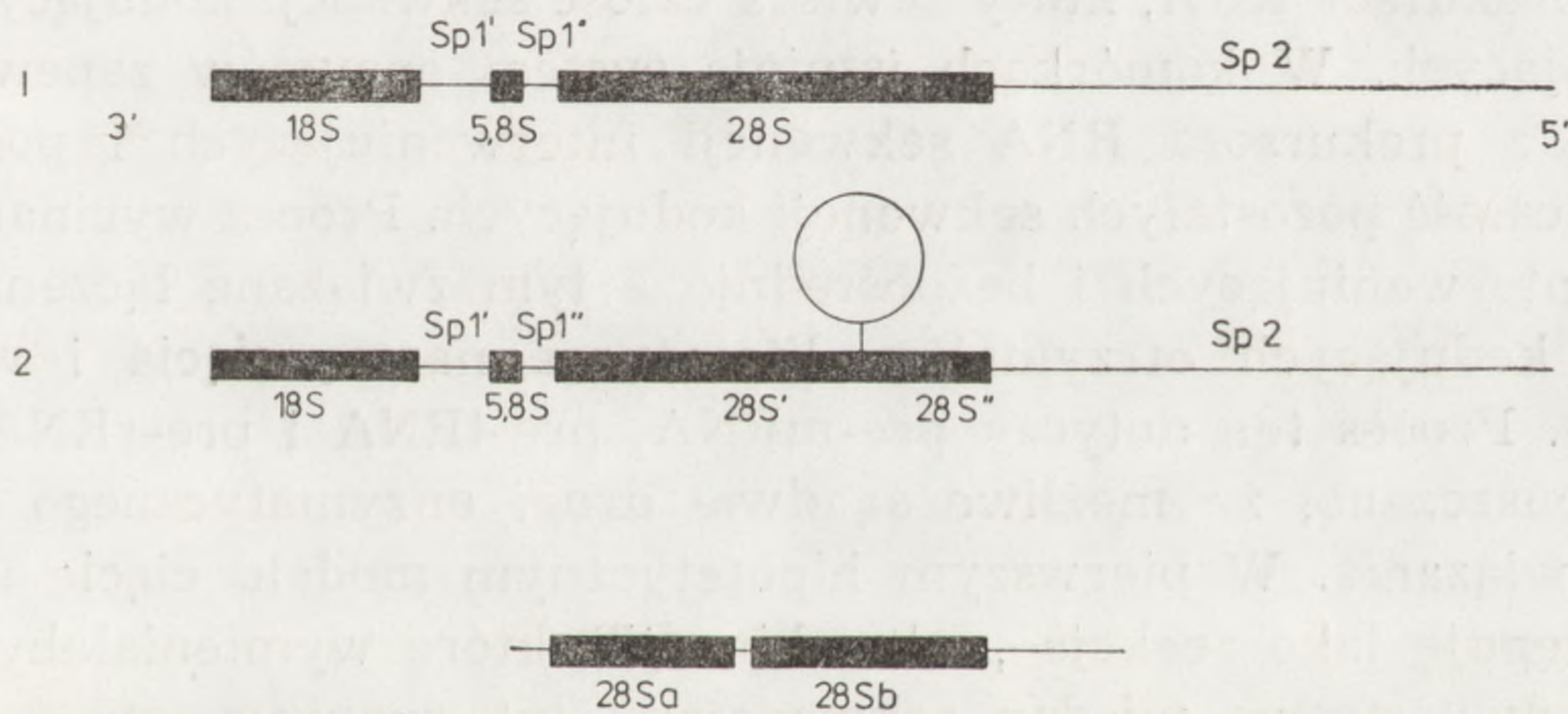


Ryc. 16. Schemat budowy genu dla insuliny u człowieka (według [4])

COOH). Gen dla insuliny zawiera cztery segmenty kodujące oznaczone jako Pre, B, C i A [4]. Gen ten posiada dwie sekwencje interweniujące (ryc. 16). Większa sekwencja wtrącona (JVS2) o długości 786 pz przerywa region kodujący peptyd C proinsuliny. Mniejsza wstawka znajduje się w sekwencji 5' niekodującej genu dla insuliny. Długość tej sekwencji wtrąconej wynosi 179 pz.

STRUKTURA CISTRONÓW rDNA u *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Geny rDNA u *D. melanogaster* były jednymi z pierwszych, w których stwierdzono obecność sekwencji wtrąconych [12, 31, 43]. Badania Pellegrini i wsp. [31] pozwoliły na dokładniejsze poznanie budowy tych cistronów. Autorzy ci wyizolowali z DNA *Drosophila melanogaster* pojedyncze łańcuchy rDNA o długości 40–60 kz. Następnie w mikroskopie elektronowym badali strukturę hybrydów rRNA—DNA. Okazało się, że niektóre z genów 28S rRNA posiadały strukturę ciągłą, inne zaś strukturę nieciągłą i zawierały wstawkę interweniującą (ryc. 17). Autorzy



Ryc. 17. Schemat struktury dwu typów genów rRNA u *Drosophila melanogaster* (według [31]). Geny kodujące 5,8S, 18S i 28S rDNA są przedstawione jako ciemne pasma; 1 — gen typu C, 2 — gen typu I posiadający insercję w regionie 28S rDNA, Sp1 — wewnętrzna sekwencja rozdzielająca („spacer DNA”), Sp2 — zewnętrzna sekwencja rozdzielająca („spacer DNA”). Rysunek dolny przedstawia dwa fragmenty genu 28S rDNA (28S a i 28S b) rozdzielone przez krótką sekwencję rozpoczynającą się w odległości około 1,8 kz od Sp1. Taką przerwę („gap”) obserwowano tylko w 10% badanych genów

oznaczyli geny ciągłe przez S, a geny mające sekwencję interweniującą przez I. Okazało się dalej, że wstawki mają różną długość. Możliwe było wyróżnienie trzech klas wielkości wstawek interweniujących: 1,0–2,0 kz, 3,5–4,5 kz i 6,0–7,0 kz. Na przebadanych 108 genów kodujących 28S rRNA 49 (45%) było typu I, a 59 (55%) — typu C. Wykazano ponadto,

że w chromosomie X występują geny typu I i C i że są one tam rozmieszczone przypadkowo. W chromosomie Y występują tylko geny typu C. W chromosomie X geny typu C występują z częstością 40%, a geny typu I — 60%.

Wellauer i wsp. [43] badali geny 18S rRNA i 28S rRNA zgrupowane w jednym locus na chromosomie X i na chromosomie Y. Stwierdzili oni również, że wiele genów 28S rRNA jest przerywanych przez insercję. Autorzy ci wyróżnili dwa typy wstawek. Wstawki o długości 5 kz i 0,5–1,0 kz zaliczyli do typu 1, a insercję o długości 1,5–4,0 kz do drugiego typu wstawek. Autorzy stwierdzili, że na chromosomie Y tylko 16% genów dla 28S rRNA jest przerywanych i większość sekwencji wtrąconych jest typu 2, podczas gdy na chromosomie X większość insercji jest typu 1 i procent genów przerywanych jest większy (około 65%).

BUDOWA GENÓW DLA tRNA ORAZ CIĘCIE I WIĄZANIE CZĄSTECZEK RNA

Na genach organizmów eukariotycznych powstaje w procesie transkrypcji prekursor RNA, który zawiera całość sekwencji kodujących i interweniujących. W komórkach istnieje system enzymów zapewniający wycięcie z prekursora RNA sekwencji interweniujących i połączenie w jedną całość pozostałych sekwencji kodujących. Proces wycinania sekwencji interweniujących i bezpośrednio z tym związane łączenie fragmentów kodujących otrzymał w literaturze nazwę cięcia i wiązania (splicing). Proces ten dotyczy pre-mRNA, pre-tRNA i pre-rRNA.

Przypuszczano, że możliwe są dwie drogi enzymatycznego procesu cięcia i wiązania. W pierwszym hipotetycznym modelu cięcie i wiązanie występują jako reakcja „rekombinacji”, która wymieniałaby wiązania fosfodwuestrowe między sekwencjami interweniującymi i kodującymi. W ten sposób tworzyłyby się pętle zbudowane z sekwencji interweniujących, które potem byłyby odcinane. Drugi model sugeruje, że proces cięcia i wiązania przebiega w dwóch stadiach. Pierwszy miałby polegać na rozpoznaniu przez endonukleazę kodujących fragmentów RNA i hydrolizie wiązań fosfodwuestrowych na obu końcach sekwencji interweniujących. W drugim etapie tego procesu przy udziale ligazy RNA miałyby następować wiązanie sekwencji kodujących.

Większość dotychczas zbadanych genów dla tRNA ma jedną sekwencję interweniującą. Sekwencje wtrącone zostały wykryte w genach dla tRNA^{Trp} [22, 28], tRNA^{Ser}_{UCG} [9, 22], tRNA^{Leu} [22], tRNA^{Tyr} i tRNA^{Phe} [21, 22]. Sekwencje wtrąconych nie stwierdzono w genach dla tRNA^{Ser}_{UCA} [9] oraz w pięciu genach dla tRNA^{Glu} [15]. Wstawki w genach dla tRNA są zwykle zlokalizowane w pobliżu sekwencji kodujących pętlę antyko-

donu. Długość sekwencji interweniujących wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu par zasad.

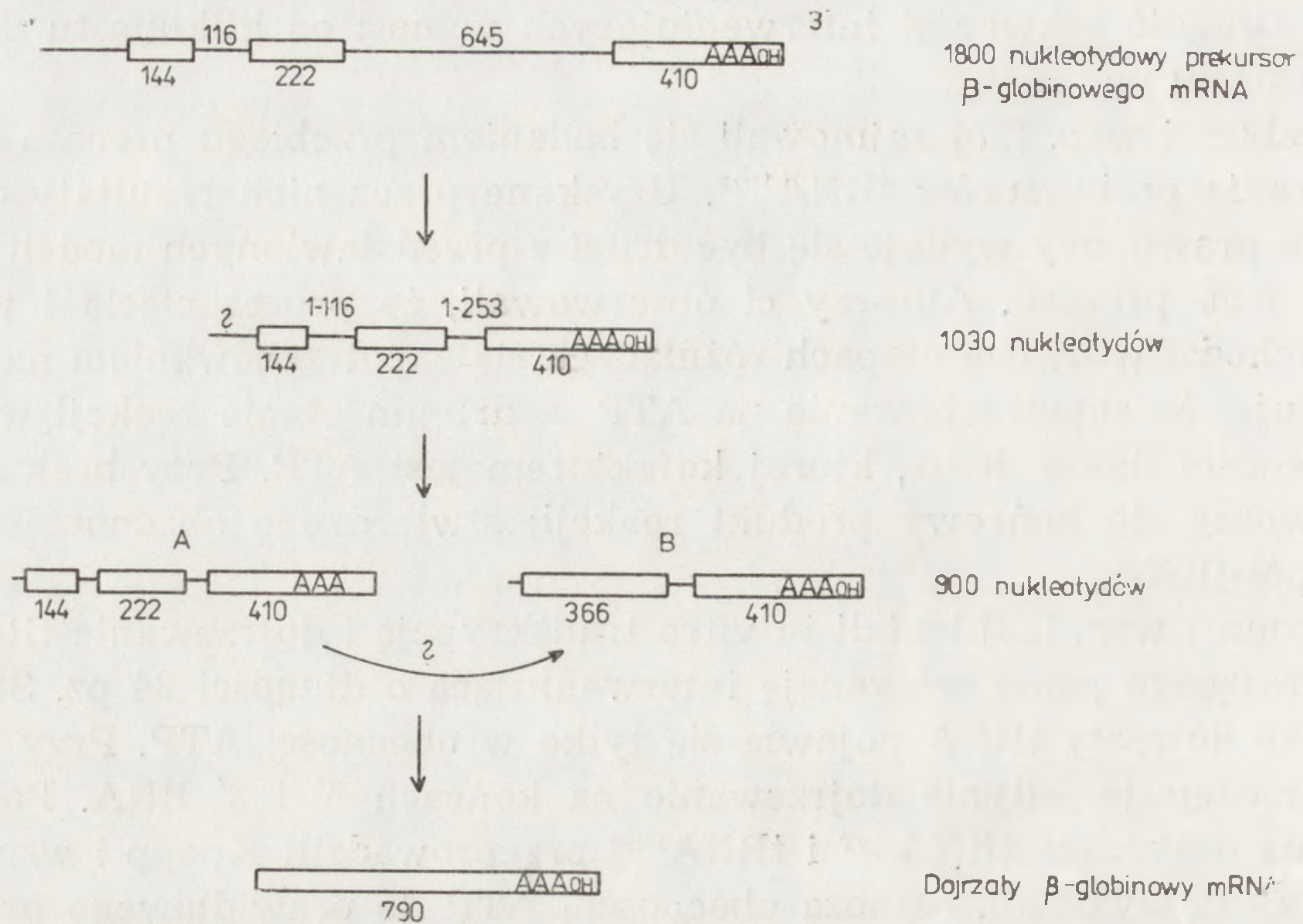
Peebles i wsp. [30] zajmowali się badaniem przebiegu procesu cięcia i wiązania prekursorów tRNA^{Phe}. Uzyskane przez nich rezultaty dowodzą, że prawdziwy wydaje się być drugi z przedstawionych modeli przebiegu tego procesu. Autorzy ci obserwowali, że proces cięcia i wiązania zachodzi w dwóch etapach różniących się zapotrzebowaniem na ATP. Sugerują, że zapotrzebowanie na ATP w drugim etapie reakcji wynika z obecności ligazy RNA, której kofaktorem jest ATP. Przy braku ATP nie tworzy się końcowy produkt reakcji; stwierdzono obecność cząsteczek pół-tRNA.

Ogden i wsp. [28] badali *in vitro* transkrypcję i dojrzewanie tRNA^{Trp} zawierającego jedną sekwencję interweniującą o długości 34 pz. Stwierdzili, że dojrzwały tRNA pojawia się tylko w obecności ATP. Przy braku ATP następuje jedynie dojrzewanie na końcach 5' i 3' RNA. Podobne badania dotyczące tRNA^{Tyr} i tRNA^{Phe} przeprowadzili Knapp i wsp. [21]. Autorzy ci wykazali, że poza obecnością ATP do prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania tRNA jest niezbędny Mg⁺⁺ (lub inny dwuwartościowy kation).

Knapp i wsp. [22] w kolejnej pracy przedstawili bliższą charakterystykę reakcji cięcia i wiązania tRNA drożdży. Badali oni produkty reakcji cięcia prekursorów tRNA dla 5 różnych aminokwasów: fenyloalaniny, tyrozyny, seryny, leucyny i tryptofanu. Prekursory tRNA zawierają sekwencję interweniującą, która w pierwszym etapie dojrzewania zostaje wycięta z cząsteczek pre-tRNA dzięki hydrolizie wiązań fosfodwuestrowych. Autorzy wykazali, że sekwencje interweniujące wycinane są pod postacią pojedynczych liniowych cząsteczek, które mają końcówki 5'-hydroksylową i 3'-fosforanową. Powstałe po wycięciu dwie połówki tRNA mają 3'-fosforanowy koniec w połówce 5' i 5'-hydroksylowy koniec w połówce 3'. Wymienieni autorzy wykazali, że przedstawiona połowa izolowanych połówek powstałych w procesie cięcia warunkuje ich aktywność w procesie ich wiązania. Dowodem na to jest fakt, że usunięcie z połówki 5' końca 3'-fosforanowego eliminuje zdolność tej połówki tRNA do reakcji wiązania.

Przedstawiony w odniesieniu do cząsteczki tRNA proces cięcia i wiązania (splicing) jest jednym z etapów potranskrypcyjnych modyfikacji cząsteczek pre-RNA. Całość tych modyfikacji nosi nazwę dojrzewania (processing). Na ryc. 18 przedstawiono schematycznie proces dojrzewania na przykładzie β -globinowego mRNA.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że zastosowanie nowych metod klonowania genów i sekwencjonowania DNA dostarcza ważnych danych o strukturze organizmów wyższych. Stwierdzenie obecności sekwencji



Ryc. 18. Proces dojrzewania pre-mRNA β -globiny u myszy (według [19])

Powstały w wyniku transkrypcji pre-mRNA o długości 1800 nukleotydów zawiera trzy sekwencje kodujące o długościach 144, 222 i 410 nukleotydów oraz dwie sekwencje interweniujące zawierające 116 i 645 nukleotydów. Sekwencje wtrącone w procesie dojrzewania ulegają stopniowej eliminacji. Pierwszym przejściowym produktem dojrzewania jest RNA o długości 1030 nukleotydów, w którym brak jest dużego fragmentu większej sekwencji interweniującej. Ten RNA ma jeszcze ciągle dwie wstawki. W następnym etapie dojrzewania powstają dwa typy cząsteczek RNA (A i B) o długości 900 nukleotydów. Cząsteczki typu A mają dwie krótkie wstawki, podczas gdy cząsteczki typu B — tylko fragment sekwencji interweniującej, która w pre-mRNA miała długość 645 nukleotydów. Możliwe, że najpierw powstają cząsteczki typu A, z których jedna wstawka zostaje wycięta, w wyniku czego powstają cząsteczki typu B. W ostatnim etapie dojrzewania sekwencje interweniujące obecne w 900 nukleotydowym RNA usuwane są całkowicie. W wyniku tego procesu powstaje dojrzały mRNA o długości 790 nukleotydów

interweniujących w większości badanych genów pozwala przypuszczać, że są one cechą charakterystyczną dla genów organizmów eukariotycznych. Dalsze badania tych sekwencji oraz pozostałych sekwencji genów dostarczą, zapewne już w najbliższej przyszłości, nowych danych na temat struktury genów i ich funkcjonowania.

LITERATURA

- [1] ALLET B., ROCHAIX J. D., Structure analysis at the ends of the intervening DNA sequences in the chloroplast 23S ribosomal genes of *C. reinhardtii*, *Cell*, 18: 55-60, 1979.
- [2] AVVEDIMENTO V. E., VOGELI G., YAMADA Y., MAIZEL J. V., Jr., PASTAN I., de CROMBRUGGHE B., Correlation between splicing sites within an intron and their sequence complementarity with U1 RNA, *Cell*, 21: 689-696, 1980.

- [3] BARALLE F. E., SHOULDERS C. C., PROUDFOOT N. J., The primary structure of human ϵ -globin gene, *Cell*, **21**: 621–626, 1980.
- [4] BELL G. J., PICTET R. L., RUTTER W. J., CORDELL B., TISCHER E., GOODMAN H. M., Sequence of the human insulin gene, *Nature*, **284**: 26–32, 1980.
- [5] BIRNSTIEL M. L., SCHAFFNER W., SMITH H. O., DNA sequences coding for the H2B histone of *Psammechinus miliaris*, *Nature*, **266**: 603–607, 1977.
- [6] BRACK C., HIRAMA M., LENHARD-SCHULLER R., TONEGAWA S., A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination, *Cell*, **15**: 1–14, 1978.
- [7] BREATHNACH R., MANDEL J. L., CHAMBON P., Ovalbumin gene is split in chicken DNA, *Nature*, **270**: 314–319, 1977.
- [8] EFSTRATIADIS A., POSAKONY J. W., MANIATIS T., LAWN R. M., O'CONNELL C., SPRITZ R. A., DeRIEL J. K., FORGET B. G., WEISSMAN S. M., SLIGHTOM J. L., BLECHL A. E., SMITHIES O., BARALLE F. E., SHOULDERS C. C., PROUDFOOT N. J., The structure and evolution of the human ϵ -globin in gene family, *Cell*, **21**: 635–668, 1980.
- [9] ETCHEVERRY T., COLBY D., GUTHRIE C., A precursor to minor species of yeast tRNA^{Ser} contains an intervening sequence, *Cell*, **18**: 11–26, 1979.
- [10] FILIPOWICZ W., Translacja, [w:] *Biologia molekularna, Informacja genetyczna*, red. Z. Lasota, PWN, Warszawa 1980, 286–325.
- [11] GARAPIN A. C., CAMI B., ROSKAM W., KOURILSKY P., Le PENNEC J. P., PERRIN F., GERLINGER P., COCHET M., CHAMBON P., Electron microscopy and restriction enzyme mapping reveal additional intervening sequences in the chicken ovalbumin split gene, *Cell*, **14**: 629–639, 1978.
- [12] GLOVER D. M., HOGNESS D. S., A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of *Drosophila melanogaster* rDNA, *Cell*, **10**: 167–176, 1977.
- [13] HAHN U., LAZARUS C. M., LÜNSDORF H., KÜNTZEL H., Split gene for mitochondrial 24S ribosomal RNA of *Neurospora crassa*, *Cell*, **17**: 191–224, 1979.
- [14] HECKMAN J. E., RajBHANDARY U. L., Organization of tRNA and rRNA genes in *N. crassa* mitochondria; intervening sequence in the large rRNA gene and strand distribution of the RNA genes, *Cell*, **17**: 583–595, 1979.
- [15] HOSBACH H. A., SILBERKLANG M., McCATHY B. J., Evolution of a *D. melanogaster* glutamate tRNA gene cluster, *Cell*, **21**: 169–178, 1980.
- [16] JAHN C. L., HUTCHISON C. A., III, PHILIPS S. J., WEAVER S., HALGWOOD N. L., VOLIVA C. F., EDGELL M. H., DNA sequence organization of β -globulin complex in the BALB/c mouse, *Cell*, **21**: 159–168, 1980.
- [17] JEFFREYS A. J., DNA sequence variants in the G γ -, A γ -, δ - and β -globin genes of man, *Cell*, **18**: 1–10, 1979.
- [18] JEFFREYS A. J., WILSON V., WOOD D., SIMONS J. P., KAY R. M., WILLIAMS J. G., Linkage of adult α - and β -globin genes in *X. laevis* and gene duplication by tetraploidization, *Cell*, **21**: 555–564, 1980.
- [19] KINNIBURGH A. J., MERTZ J. E., ROSS J., The precursor of mouse β -globin messenger RNA contains two intervening sequences, *Cell*, **14**: 681–693, 1978.
- [20] KIONSSIS D., EIFERMAN F., van de RIJN P., GORIN M. B., INGRAM R. S., TILGHMAN S. M., The evolution of α -fetoprotein and albumin. II. The

- structures of α -fetoprotein and albumin genes in the mouse, *J. Biol. Chem.*, **256**: 1966–1967, 1981.
- [21] KNAPP G., BECKMANN J. S., JOHNSON P. F., FUHRMAN S. A., ABELSON J., Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes, *Cell*, **14**: 221–236, 1978.
- [22] KNAPP G., OGDEN R. C., PEEBLES C. L., ABELSON J., Splicing of yeast tRNA precursors: structure of reaction intermediates, *Cell*, **18**: 37–45, 1979.
- [23] LACY E., MANIATIS T., The nucleotide sequence of a rabbit β -globin pseudogene, *Cell*, **21**: 545–553, 1980.
- [24] LAWN R. M., EFSTRATIADIS A., O'CONNELL C. O., MANIATIS T., The nucleotide sequence of the human β -globin gene, *Cell*, **21**: 647–651, 1980.
- [25] LI M., TZAGOLOFF A., Assembly of the mitochondrial membrane system: sequences of yeast mitochondrial valine and unusual threonine tRNA gene, *Cell*, **18**: 47–53, 1979.
- [26] MANDEL J. L., BREATHNACH R., GERLINGER P., Le MEUR M., GANNON F., CHAMBON P., Organization of coding and intervening sequences in the chicken ovalbumin split gene, *Cell*, **14**: 641–653, 1978.
- [27] MESELSON M., YUAN R., DNA restriction enzyme from *E. coli*, *Nature*, **217**: 1110–1114, 1968.
- [28] OGDEN R. C., BECKMANN J. S., ABELSON J., KANG H. S., SÖLL D., SCHMIDT O., In vitro transcription and processing of yeast tRNA gene containing an intervening sequence, *Cell*, **17**: 399–406, 1979.
- [29] PATIENT R. K., ELKINGTON J. A., KAY R. M., WILLIAMS J. G., Internal organization of the major adult α - and β -globin genes of *X. laevis*, *Cell*, **21**: 565–573, 1980.
- [30] PEEBLES C. L., OGDEN R. C., KNAPP G., ABELSON J., Splicing of yeast tRNA precursors: a two-stage reaction, *Cell*, **18**: 27–35, 1979.
- [31] PELLEGRINI M., MANNING J., DAVIDSON N., Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*, *Cell*, **10**: 213–224, 1977.
- [32] PORTMANN R., SCHAFFNER W., BRINSTIEL M., Partial denaturation mapping of cloned histone DNA from the sea urchin *Psammechinus miliaris*, *Nature*, **264**: 31–34, 1976.
- [33] PROUDFOOT N. J., MANIATIS T., The structure of a human α -globin pseudogene and its relationship to α -globin gene duplication, *Cell*, **21**: 537–544, 1980.
- [34] ROBERTS R. J., Restriction and modification enzymes and their recognition sequences, *Nucleic Acids Research*, **8**: r63–r80, 1980.
- [35] RYTKA J., BILIŃSKI T., Dziedziczenie pozajądrowe, [w:] *Biologia molekularna, Informacja genetyczna*, red. Z. Lassota, PWN, Warszawa 1980, 406–431.
- [36] SCHAFFNER W., KUNZ G., DAETWYLER H., TELFORD J., SMITH H. O., BIRNSTIEL M. L., Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analyzed by sequencing, *Cell*, **14**: 655–671, 1978.
- [37] SLIGHTOM J. L., BLECHL A. E., SMITHIES O., Human fetal $G\gamma$ - and $A\gamma$ -globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes, *Cell*, **21**: 627–638, 1980.
- [38] SPRITZ R. A., DeRIEL J. K., FORGET B. G., WEISSMAN S. M., Complete nucleotide sequence of the human δ -globin gene, *Cell*, **21**: 639–646, 1980.
- [39] STASIAK A., Enzymy restrykcyjne. I. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II, *Postępy Biochemii*, **26**: 343–368, 1980.

- [40] Stasiak A., Enzymy restrykcyjne. II. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I i III, *Postępy Biochemii*, **26**: 369-388, 1980.
- [41] STEIN J. CATTERALL J. F., KRISTO P., MEANS A. R., O'MALLEY B. W., Ovomucoid intervening sequences specify functional domains and generate protein polymorphism, *Cell*, **21**: 681-687, 1980.
- [42] TIEMEIER D. C., TILGHMAN S. M., POLSKY F. I., SEIDMAN J. G., LEDER A., EDGELL M. H., LEDER P., A comparison of two cloned mouse β -globin genes and their surrounding and intervening sequences, *Cell*, **14**: 237-245, 1978.
- [43] WELLAUER P. K., DAWID I. B., TARTOF K. D., X and Y chromosomal ribosomal DNA of *Drosophila*: comparison of spacers and insertions, *Cell*, **14**: 269-278, 1978.

Otrzymano: 20 września 1981.

Przyjęto: 19 października 1981.

Adres autorów: Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

- (10) ...
- (11) ...
- (12) ...
- (13) ...

REPLIKACJA DNA W KOMÓRCIE EUKARIOTYCZNEJ *

DNA REPLICATION IN AN EUKARYOTIC CELL

Małgorzata SCHMIDT

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Streszczenie. W artykule dokonano przeglądu danych biochemicznych na temat replikacji DNA w komórce eukariotycznej oraz przedstawiono wyniki badań cytogenetycznych, dotyczących syntezy chromosomowego DNA. Poruszono szczególne aspekty syntezy DNA w chromosomach, związane z asynchronią homologów, różnicami międzykankowymi, replikacją heterochromatyny i chromosomów płci. Dokonano syntetycznego omówienia danych biochemicznych i cytogenetycznych, składających się na podstawowy zarys procesów przebiegających w komórce podczas fazy S.

Summary. The article provides the review of biochemical data on DNA replication in eukaryotic cells, as well as a summary of cytogenetical results concerning the general aspects of chromosomal DNA synthesis. Peculiarities of DNA replication within chromosomes are considered, i.e. homologue asynchrony, tissue specific differences, replication within heterochromatin and the sex chromosomes. Biochemical and cytogenetical data are summarized to construct a comprehensive representation of the present knowledge on the replication process in eukaryotic cells.

DANE DOTYCZĄCE PRZEBIEGU REPLIKACJI
NA POZIOMIE MOLEKULARNYM ¹

„Decyzja” o rozpoczęciu procesów, prowadzących do podziału komórkowego, związana jest prawdopodobnie z osiągnięciem przez komórki określonej masy lub krytycznego stężenia pewnych związków [11]. Isto-

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981.

¹ Szerszy przegląd molekularnych mechanizmów replikacji DNA u prokariotów znaleźć można w opracowanym przez W. Jachymczyka rozdziale Replikacja DNA [w:] *Biologia molekularna*, red. Z. Lassota, PWN, 1980, 133-166.

ta tego zjawiska nie została dotąd poznana. Sygnał taki może prawdopodobnie następować w jakimkolwiek momencie cyklu; u eukariotów musi jednak upłynąć od niego określony czas, potrzebny na ukończenie poprzedniej replikacji i podziału oraz na niezbędne procesy przygotowujące [6, 11]. Konsekwencją sygnału do proliferacji jest szereg procesów, obejmujących m. in. replikację genomu, które raz rozpoczęte, muszą zostać ukończone [6].

Bezpośrednim bodźcem do rozpoczęcia fazy S jest przejście na teren jądra specyficznych czynników cytoplazmatycznych [27]. Są to, jak się wydaje, heterogenne białka o szybkim obrocie metabolicznym, stąd też proces transkrypcji i translacji jest niezbędny dla zainicjowania syntezy [12, 57, 65]. U eukariotów synteza DNA rozpoczyna się równocześnie w wielu punktach genomu o ściśle określonej lokalizacji, zwanych miejscami inicjacji [26]. Zawierają one prawdopodobnie sekwencje unikalne [26, 36, 81], które, jak stwierdzono w odniesieniu do prokariotów, mogą kodować specyficzne białka inicjatorowe [77]. W miejscu inicjacji wiązania wodorowe między komplementarnymi łańcuchami DNA ulegają przerwaniu; oba one służą jako matryca dla semikonserwatywnej replikacji łańcuchów potomnych. Powstają tzw. widełki replikacyjne, w których operuje szereg enzymów, zwanych wspólnie kompleksem replikacyjnym. Zarówno skład, jak i funkcje kompleksu replikacyjnego są nadzwyczaj złożone i daleko jeszcze do ich ostatecznego poznania. Nie ulega jednakże wątpliwości, że do zadań kompleksu replikacyjnego należy m. in. dostarczanie energii, destabilizowanie i rozwijanie helisy, polimeryzacja, łączenie fragmentów, wycinanie nukleotydów i reparacja [1].

Synteza odbywa się w obu ramionach widełek, w kierunku od końca 5' do 3', w sposób nieciągły — poprzez produkcję małych jednostek replikacyjnych (4S), nazywanych fragmentami Okazaki [1, 7]. Fragmenty te mają u eukariotów około 200 nukleotydów długości i są inicjowane przez krótkie (8–15 nukleotydów), tzw. starterowe, niespecyficzne sekwencje RNA [1, 7, 9, 77]. Inicjacja fragmentów Okazaki przez polimerazę RNA nie wymaga transkrypcji [7, 22] ani sekwencji unikalnych, występuje jednak preferencyjnie w pewnych odcinkach DNA [81]. Starterowe rybonukleotydy są następnie wycinane i zastępowane przez dezoksyrybonukleotydy. Ma to znaczenie dla zapewnienia wymaganej wierności replikacji (1 błąd na 10^9 – 10^{11} zasad) i jest związane z niezdolnością polimerazy DNA do inicjowania syntezy *de novo* [1]. Poszczególne fragmenty Okazaki są sukcesywnie łączone przez ligazę w dłuższe jednostki [9, 24, 54]. W izolowanych jądrach obserwować można wyłącznie elongację zainicjowanych już łańcuchów [65]; produkowane są fragmenty o długości do około 200 nukleotydów, po czym synteza ulega zatrzyma-

niu [55]. Wskazuje to na udział białek cytoplazmatycznych w łączeniu fragmentów Okazaki, co potwierdzają wyniki Mullera i wsp. [55]. Synteza w obu ramionach widełek wykazuje pewien stopień asynchronii [81] i postępuje aż do osiągnięcia punktów terminacji. Terminacja nie wymaga obecności sekwencji unikalnych, a u prokariotów może następować, gdy między dwoma sąsiadującymi widełkami replikacyjnymi pozostaje jeszcze do zreplikowania około 500 par zasad, synteza których zostaje ukończona już po separacji łańcuchów potomnych [81].

Powstały fragment DNA, obejmujący jedno miejsce inicjacji i związany z nim obszar elongacji łańcucha stanowi samodzielną jednostkę replikacji, nazywaną replikonem. Długość replikonu wynosi około 30 μm , co odpowiada łańcuchowi DNA o długości od 50 000–150 000 par zasad, czyli 200–500 nukleosomom [60]. Przyległe 20–30 jednostek replikacyjnych zorganizowane jest w skupisko replikonów (cluster), w obrębie którego zarówno inicjacja, jak i terminacja replikacji przebiega w sposób synchroniczny [26, 36], podlegając pewnym autonomicznym mechanizmom kontrolnym [63, 70]. Ocena rozmiarów większych jednostek replikacyjnych i ich klasyfikacja budzi pewne kontrowersje i tak np. Yurov [88–90] postuluje znacznie większe rozmiary replikonu (około 250–300 μm), negując tym samym istnienie skupiska replikonów. Spory te mają jednak charakter formalny i nie podważają koncepcji regulacji syntezy na poziomie dużych fragmentów DNA [63, 70], odpowiadających strukturze supersolenoidalnej [87].

Tempo przesuwu widełek replikacyjnych wynosi u eukariotów średnio 100 nukleotydów na sekundę [1], tj. od 0,2 do 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ [13, 31, 90]. Według większości autorów zmiany tempa w ciągu fazy S nie są charakterystyczne [9, 67] i zależą od warunków wzrostu komórek [63], towarzysząc zmianom stosunku ATP/ADP [65]. Niektóre doniesienia sugerują zmienne tempo progresji widełek, wzrastające około 3-krotnie w trakcie przebiegu fazy S [31, 89]. Równomierny wzrost tempa od 0,8 do 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ w okresie od wczesnej do późnej fazy S stwierdzano w komórkach heteroploidalnych [31]. W komórkach diploidalnych postuluje się wzrastanie tempa w czasie wczesnej fazy S, spadek w czasie środkowej fazy S i ponowny gwałtowny wzrost pod koniec replikacji [31]. Yurov [89] uważa, że zmiany te wynikają z heterogenności replikonów, gdyż tempo w obrębie pojedynczego replikonu jest stałe, a replikony aktywowane pod koniec fazy S wykazują znacznie wyższe, choć również stałe, tempo elongacji. Według tego autora różnice te charakteryzują również replikony pojedynczej komórki i nie należą do heterogenności populacji komórkowej [90].

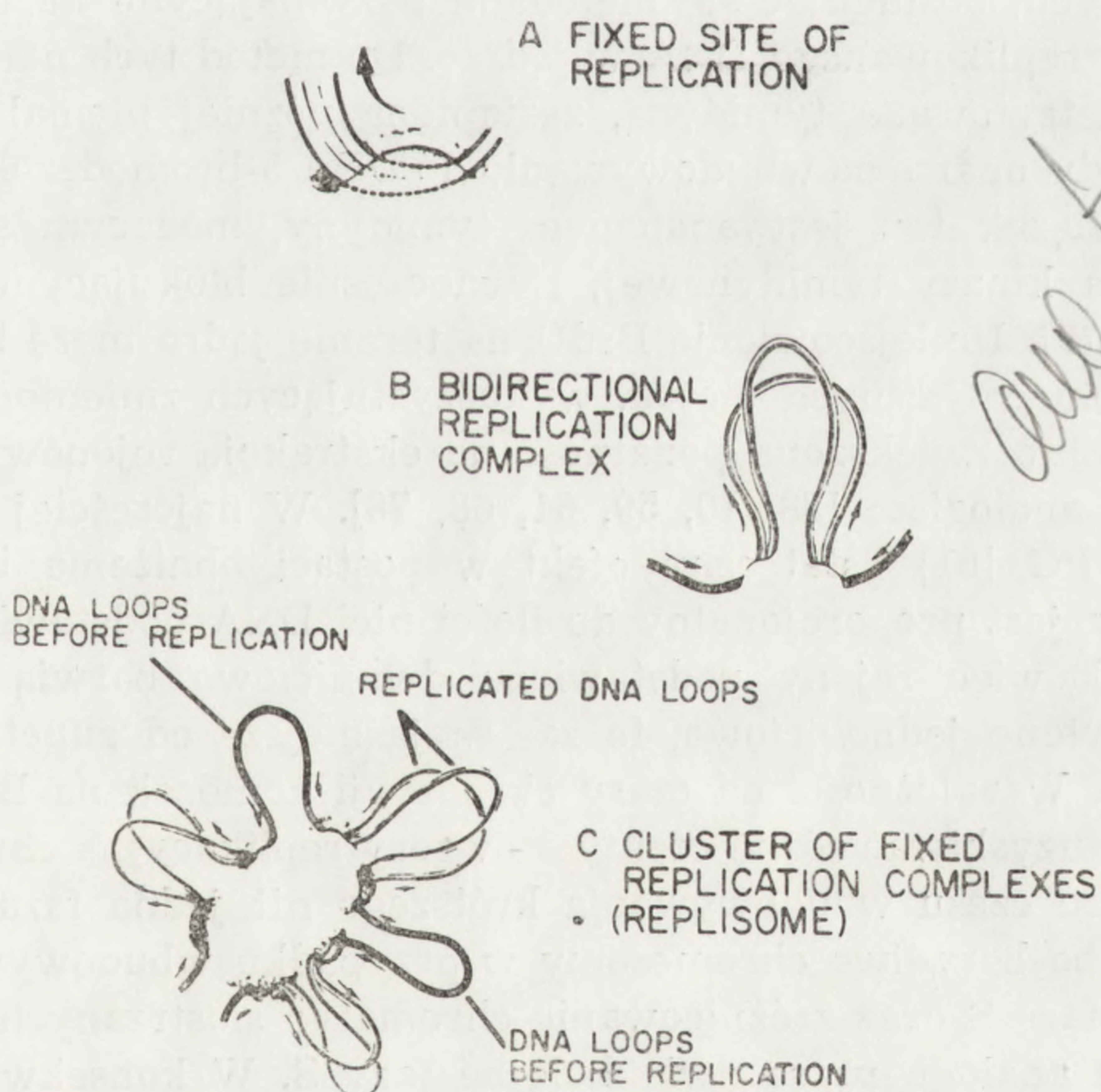
Zarówno autorzy stwierdzający stałe tempo przesuwu widełek, jak i postulujący wzrost tempa podczas fazy S są zgodni co do tego, że

całkowita ilość DNA syntetyzowanego w komórce rośnie podczas wczesnej fazy S, spada w środkowej fazie S i ponownie wzrasta pod koniec replikacji [9, 31, 67]. Kinetykę taką stwierdzano w populacjach komórkowych [31], w pojedynczej komórce [90], w całkowitym DNA i we fragmentach Okazaki [9]. Interpretacja genezy tego zjawiska jest jednak różna w poszczególnych doniesieniach; część autorów wiąże je ze zmianami tempa przesuwu widełek replikacyjnych [31], większość zaś uważa zmiany częstości inicjacji [9, 63, 67] za odpowiedzialne za całościowy obraz kinetyki syntezy.

Porządek replikacji poszczególnych replikonów i ich skupisk wydaje się być ściśle określony [23, 43, 85]. Hamlin stwierdził, że inicjacja replikonów w środkowej i późnej fazie S wymaga integralności poprzednio zsyntetyzowanego DNA; po jego uszkodzeniu za pomocą promieni X kontynuacja syntezy DNA w komórce nie zachodzi [23]. Wiele danych wskazuje również na istnienie w obrębie genomu różnych klas DNA, synteza których może się odbywać niejako autonomicznie, jednak w sposób skorelowany z syntezą pozostałej części genomu. Wcześniej replikujące sekwencje posiadają stosunkowo wyższą zawartość par GC [37]. DNA satelitarny replikuje zazwyczaj później niż główne pasmo [37], wykazując przy tym prawdopodobnie wyższe tempo syntezy [35]. Mattern i Painter [51] zasugerowali istnienie oddzielnej puli prekursorów dla średnio powtarzających się sekwencji oraz odrębny mechanizm ich syntezy w porównaniu z sekwencjami unikalnymi i wysoce powtarzalnymi.

Nowo zreplikowana chromatyna wydaje się mieć odmienne właściwości biochemiczne niż włókna macierzyste. Jest ona podatna na nukleazy tnące pojedynczy łańcuch DNA, co wynika prawdopodobnie z obecności fragmentów zawierających pojedynczy łańcuch w obrębie widełek replikacyjnych [24]. Za zmienioną wrażliwość na trawienie DNazą I [60] odpowiadają prawdopodobnie białka cytoplazmatyczne, biorące udział w inicjacji. Tworzą one przejściowe kompleksy z nowo zreplikowanym DNA [54, 55], dając niedojrzałą, bogatą w białka formę chromatyny i są następnie zastępowane przez histony. Nowo zsyntetyzowane histony nie wiążą się wybiórczo z nowym DNA [25]. Istnieją dane świadczące o tym, że histony wchodzące w skład nukleosomu przekazywane są w czasie replikacji razem, czyli w sposób konserwatywny [28]. Po przyłączeniu histonów chromatyna odzyskuje strukturę nukleosomową, nadal jednak różni się od chromatyny dojrzałej, wykazując stosunkowo większą oporność na trawienie nukleazami [55, 56]. Murphy i wsp. [56] wiążą to zjawisko z krótszymi niż normalnie rejonami łączników międzynukleosomowych, zawierających w nowo zreplikowanej chromatynie od 10 do 29 par zasad.

Ostatnie badania biochemiczne oraz mikroskopia elektronowa wykazały związek nowo zreplikowanej chromatyny z matrix jądra — fibrynogranularną siecią, zbudowaną z kwaśnych białek jądrowych, RNA i DNA [4, 60, 87]. Chromatyna w fazie S zorganizowana jest w około 125 000 pętli o rozmiarach 10–50 μm utrzymywanych za pomocą białek niehistonowych oraz RNA [60]. Pętle te mają strukturę solenoidalną i uwidaczniają się w mikroskopii elektronowej w postaci „halo” otaczającego matriks jądra [87]. Zarówno mikroskopia elektronowa, jak i badania autoradiograficzne dostarczyły danych świadczących o zdolności pętli chromatynowych do przesuwania się przez związane z matrix kompleksy replikacyjne, w wyniku czego nowo zreplikowany DNA, początkowo powiązany z matriks, stopniowo to powiązanie traci [60, 87]. Tak więc wydaje się, że zarówno inicjacja, jak i elongacja zachodzi w miejscach połączeń włókien z matriks, a pętle chromatynowe są ruchome [87], w odróżnieniu od kompleksów replikacyjnych, na stałe zasocjowanych z matriks [60]. Na podstawie wymienionych danych Pardoll i wsp. [60] zaproponowali przestrzenny model replikacji DNA w komórce eukariotycznej, według którego powiązane z matriks pętle DNA mają średnią



Ryc. 1. Model replikacji DNA w komórce eukariotycznej, oparty na zasadzie ustabilizowanych kompleksów replikacyjnych i ruchomych pętli chromatynowych [60]

długość 80 kb (10–50 μm), co odpowiada długości replikonu. Każda z tych pętli przesuwa się przez dwa zakotwiczone w matriks kompleksy replikacyjne, rozpoczynając z punktu inicjacji i wysuwając się jako nowa, podwojona pętla. Przyległe replikony związane są z sąsiadującymi kompleksami replikacyjnymi, wiążącymi z matriks naprzemiennie zreplikowane i niezreplikowane pętle DNA, tworząc skupisko, w obrębie którego synteza postępuje w sposób synchroniczny (ryc. 1).

DANE CYTOGENETYCZNE DOTYCZĄCE OGÓLNEGO PRZEBIEGU REPLIKACJI DNA W CHROMOSOMACH EUKARIOTYCZNYCH

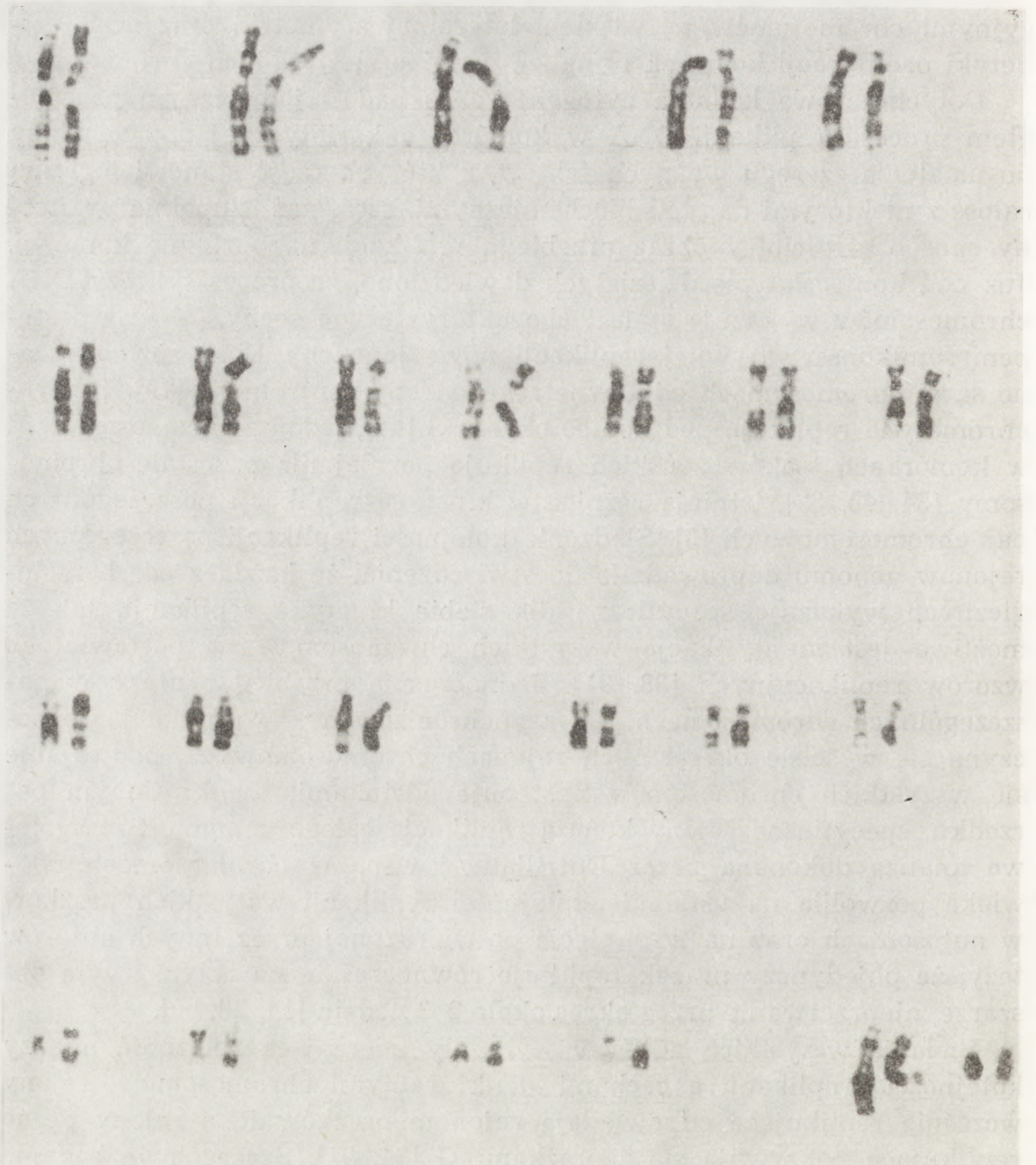
Badania cytogenetyczne nad replikacją DNA odzwierciedlają kompleksowe skutki procesów molekularnych, ujawniające się na poziomie komórki, mogą więc do pewnego stopnia służyć weryfikacji danych biochemicznych, mogą również wykrywać procesy i prawidłowości nieuchwytnie w finezyjnych, lecz wrywkowych studiach, dokonywanych na poziomie molekularnym.

Badania chromosomowe nad replikacją DNA wykonuje się od lat pięćdziesiątych, posługując się metodami pozwalającymi na uwidocznienie świeżo zreplikowanego DNA w jądrze. Do metod tych należy autoradiografia z trytowaną tymidyną, zastąpioną później niemal całkowicie przez metody oparte na wbudowywaniu do DNA 5-bromodezoksyurydyny (BrdU). Związek ten jest analogiem tymidyny, mogącym służyć jako substrat dla kinazy tymidynowej, równocześnie blokującym anabolizm tymidyny [79]. Umiejscowienie BrdU na terenie jądra może być wykrywane za pomocą licznych metod, wykorzystujących zmienione wiązanie barwników lub zwiększoną podatność na ekstrakcję rejonów DNA podstawionego analogiem [38, 40, 59, 61, 68, 78]. W najczęściej stosowanej metodzie FPG [61] ostateczny efekt w postaci obniżenia barwliwości chromatyny jest proporcjonalny do ilości nici DNA podstawionych analogiem. Tak więc rejony podstawione dwuniciowo barwią się słabiej niż podstawione jednoniciowo, te zaś są jaśniejsze od zupełnie niepodstawionych. W zależności od czasu ekspozycji komórek na BrdU można tą techniką uzyskiwać różne efekty — wzory replikacyjne chromosomów w przypadku czasu wbudowywania krótszego niż jedna faza S, równomiernie słabo barwliwe chromosomy w przypadku wbudowywania przez jedną całą fazę S oraz zróżnicowanie chromatyd siostrzanych przy wbudowywaniu analogu przez dwie kolejne fazy S. W konsekwencji, technika FPG, oparta ściśle na zjawisku replikacji DNA, znalazła wszechstronne zastosowanie w badaniach cytogenetycznych i legła u podstaw 3 różnych podejść badawczych, służących studiom nad wzorami replika-

cyjnymi chromosomów, zjawiskiem lateralnej asymetrii, oraz oceną kinetyki proliferacji komórek i analizą wymian siostrzanych chromatyd.

Dotychczasowe badania cytogenetyczne nad fizjologicznym przebiegiem procesu replikacji DNA w komórce eukariotycznej doprowadziły do ustalenia szeregu ważnych faktów, z których część stanowi logiczną całość z niektórymi danymi biochemicznymi, część zaś uzupełnia w istotny sposób całościowy obraz przebiegu replikacji na poziomie komórki. Już pod koniec lat pięćdziesiątych dowiedziono, że proces syntezy DNA chromosomów wykazuje stałe i charakterystyczne cechy. Wraz z postępem semikonserwatywnej replikacji nowe łańcuchy DNA rozmieszczone są w chromosomach od zewnętrznej strony centromeru [19]. Heterochromatyna replikuje pod koniec okresu S [44], jeden z chromosomów X w komórkach ssaków żeńskich replikuje później niż pozostałe chromosomy [34, 45, 82], istnieją różnice w kinetyce replikacji poszczególnych par chromosomowych [5]. Śledzenie kolejności replikacji poszczególnych rejonów genomu doprowadziło do stwierdzenia, że każda z par homologicznych wykazuje specyficzną dla siebie kinetykę replikacji, tak że możliwa jest identyfikacja wszystkich chromosomów na podstawie ich wzorów replikacyjnych [38, 91]. Jednocześnie przebieg syntezy w poszczególnych chromosomach jest zsynchronizowany — replikacja rozpoczyna się w ściśle określonych rejonach chromosomowych, podwajanie się wszystkich chromosomów następuje odcinkami, w określonym porządku, specyficzne rejony kończą replikację całego genomu. Szczegółowa analiza dokonana przez Dutrillaux i wsp. na chromosomach człowieka pozwoliła na ustalenie kolejności replikacji wszystkich prążków w autosomach oraz na wysunięcie potwierdzonej przez innych autorów tezy, że pojedynczy prążek replikuje równocześnie na całym swym obszarze, nieprzerwanie przez okres około 2–3 godzin [14, 70, 80].

Badania wszystkich autorów wykazały uderzającą zbieżność między kolejnością replikacji a cechami strukturalnymi chromosomów; rejony wcześnie replikujące odpowiadają rejonom prążków R, a rejony późno replikujące pokrywają się z prążkami G [34, 91]. Szczegółowe badania przeprowadzone na chromosomach ludzkich doprowadziły do stwierdzenia, że cały genom replikowany jest w dwóch fazach, najprawdopodobniej nie zachodzących na siebie [8, 14, 71]. W czasie fazy S, trwającej średnio 6–10 godzin, pierwsze 2–4 godziny zajmuje replikacja prążków R autosomów i aktywnego chromosomu X [34, 69, 71, 91]. W środkowej fazie S następuje według Schemppa i Vogela [69] znaczne zwolnienie tempa replikacji tych chromosomów. Od drugiej do piątej godziny fazy S rozpoczyna się okres późnej replikacji, w czasie którego dokonuje się synteza DNA prążków G autosomów oraz synteza całego DNA nieaktywnego chromosomu X oraz chromosomu Y [34, 69, 71, 91]. Przejście od



Ryc. 2. Przejście od wczesnej do późnej fazy S. Po lewej stronie każdej pary chromosomy z komórki wbudowującej BrdU w ciągu pierwszych 2 godzin fazy S, po prawej — chromosomy z komórki eksponowanej na analog od 2 do 4 godziny fazy S. Kompletnie i równoczesne odwrócenie wzoru replikacyjnego chromosomów [71]

okresu wczesnej do późnej replikacji następuje jednocześnie we wszystkich chromosomach komórki [14, 71], co potwierdza istnienie w komórce mechanizmów synchronizujących przebieg procesu w poszczególnych chromosomach (ryc. 2).

SZCZEGÓLNE ASPEKTY REPLIKACJI DNA CHROMOSOMÓW

Przedstawiono w ogólnym zarysie dane cytogenetyczne, składające się na zasadniczy obraz przebiegu replikacji DNA w komórce eukariotycznej. Rozważania te nie objęły pewnych szczególnych aspektów zagadnienia, zasługujących na oddzielne omówienie. Jednym z nich jest asynchronia homologów oraz specyficzne zachowanie się rejonów heterochromatynowych. Asynchroniczna replikacja chromosomów homologicznych była obserwowana przez wielu autorów, szczególnie w rejonach heterochromatynowych [14, 21, 72]. Geneza tego zjawiska jest dość złożona. Subtelna zazwyczaj asynchronia homologów, występująca w rejonach prążków G, wykrywalna za pomocą krótkotrwałego wbudowywania BrdU, wydaje się odzwierciedlać regulacyjną zmienność inicjacji skupisk replikonów [70]. Innego rodzaju zjawiskiem jest zmienność obserwowana w obrębie dużych, C-pozytywnych odcinków heterochromatynowych, wynikająca z heteromorfizmu oraz wewnętrznego zróżnicowania strukturalnego tych regionów. Badania licznych autorów dowiodły, że zarówno wielkość prążków C, jak i ich lokalizacja względem centromeru, wykazuje znaczną zmienność osobniczą, dziedziczną zgodnie z prawami Mendla [2, 48, 50, 62]. Metoda wbudowywania BrdU do komórek przez 1 cykl replikacyjny umożliwiła wniknięcie w strukturę tych regionów, uwidaczniając tzw. lateralne asymetrie. Zjawisko to polega na asymetrycznej barwliwości odcinków heterochromatynowych i wynika z nierównomiernego rozłożenia tymidyny w komplementarnych łańcuchach DNA [47]. Występowanie lateralnych asymetrii stwierdzono w chromosomach ludzkich 1, 9, 15, 16 [2], 6, 19 [15] i Y [18, 46]. Badania biochemiczne pozwoliły na zlokalizowanie w tych regionach genomu różnych frakcji satelitarnego DNA [20] oraz zasugerowały różny czas replikacji dla poszczególnych frakcji [37] i odrębny mechanizm ich syntezy [51]. Należy sądzić, że powtarzające się sekwencje w tych regionach wykazują specyficzny skład zasad i stopień powtórzeń, a ponadto cechują się znaczną heterogennością, co częściowo odpowiada za obserwowaną cytogenetycznie niejednoczasową i zmienną ich replikację [72].

Innego rodzaju odstępstwem od przedstawionej uprzednio reguły, polegającej na stałej i specyficznej dla każdego chromosomu kinetyce replikacji, są obserwowane przez licznych autorów różnice międzykankowe. Zarówno badania biochemiczne [52], jak i drobiazgowo studia cytogenetyczne [16, 49, 76] dostarczyły dowodów na istnienie subtelnych różnic w kinetyce replikacji DNA pochodzącego z różnych tkanek. Różnice te polegają na różnym tempie elongacji lub łączenia fragmentów DNA w większe jednostki [52], co na poziomie chromosomu przejawia się jako wcześniejsza lub późniejsza replikacja określonych prążków [16, 49

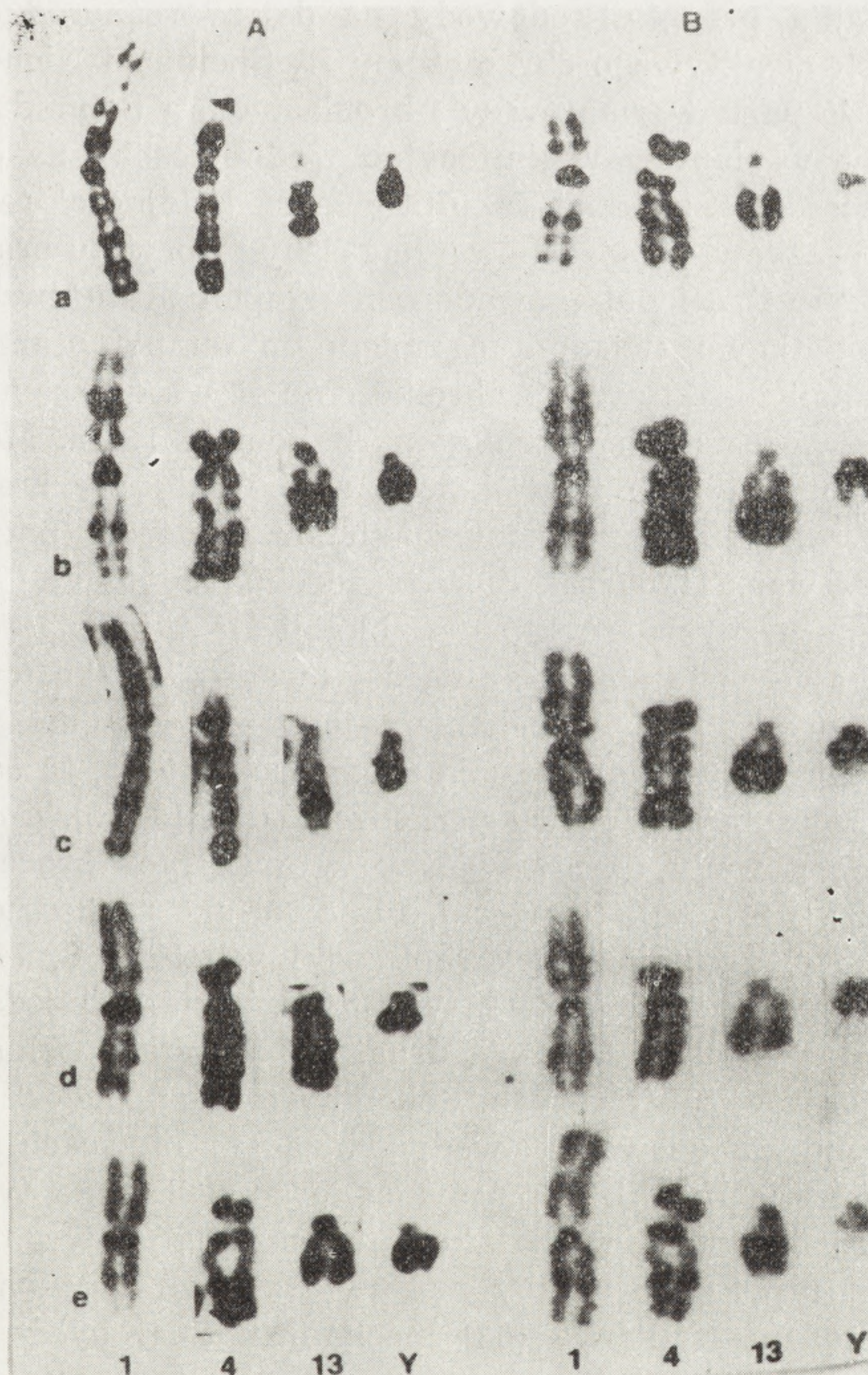
76]. Zjawiska te mogą być związane ze zmianami strukturalnymi, towarzyszącymi represji różnych rejonów genomu i następującą zmianą warunków rozkręcania podwójnej spirali [52]. Zespół Prokofiewej-Belgovskiej nie wahał się nawet postulować zmian ilościowych materiału genetycznego w wyniku różnicowania się komórek [49]; nie ma jednak dotąd żadnych dowodów potwierdzających ten pogląd.

Omówione różnice pomiędzy chromosomami homologicznymi, oraz między chromosomami z różnych tkanek dotyczyły zazwyczaj prążków lub regionów chromosomowych rozsianych po genomie. W komórkach ludzkich istnieją jednakże chromosomy, których cała DNA replikuje w sposób odmienny od pozostałej części genomu. Są to chromosomy różnicujące komórki męskie i żeńskie — nieaktywny X i Y. W obu tych chromosomach replikacja DNA wykazuje pewne cechy wspólne. Proces ten dokonuje się w całości podczas późnej fazy S [34, 71, 91], rozpoczynając się z opóźnieniem około 3 godzin w stosunku do pozostałych chromosomów [71]. Tempo replikacji jest w omawianych chromosomach szybsze [72] w porównaniu, odpowiednio, z homologicznym chromosomem X oraz z chromosomami z grupy G, co przejawia się w autoradiografii relatywnie intensywniejszym piętnem tych chromosomów po zastosowaniu krótkotrwałego znakowania. Trudno wyrokować, czy szybsze tempo syntezy stanowi unikalną cechę tych chromosomów płci wobec ogólnego wzrostu tempa replikacji w komórce pod koniec okresu S [9, 31] oraz wobec przyśpieszonej syntezy DNA w rejonach heterochromatynowych [35].

Zarówno nieaktywny chromosom X, jak i chromosom Y wykazują znaczną, niespotykaną w innych chromosomach zmienność kinetyki replikacji, tak w odniesieniu do tempa, jak i kolejności replikacji poszczególnych regionów. Badania nad replikacją chromosomu Y prowadził Kałużewski [30], uzyskując interesujące wyniki, dowodzące istnienia znacznych różnic międzykomórkowych w limfocytach jednego dawcy. Niepublikowane wyniki tego autora wskazują na istnienie w limfocytach co najmniej dwóch populacji komórkowych, w których terminacja syntezy DNA chromosomu Y przypada na różne stadia zaawansowania fazy S (ryc. 3). Ostatnim regionem, kończącym replikację chromosomu Y jest region Yq12 [30, 72] będący, zgodnie z wynikami Limona i wsp. [46], siedliskiem złożonej lateralnej asymetrii. Nasuwa to przypuszczenie, że specyficzna budowa DNA tego regionu może być związana ze zjawiskiem obserwowanym przez Kałużewskiego oraz z progresywną, a nie jednoczasową replikacją prążka Yq12, opisaną przez Schmidt [72]. Zmienny czas replikacji C-pozytywnego bloku Yq12, determinujący całkowity czas replikacji chromosomu Y, mógłby również wpływać ze zmiennej ilości zawartego w tym prążku materiału, podobnie jak to ma miejsce

w przypadku innych rejonów heterochromatynowych [48, 50]. Jednakże wobec występowania różnic między komórkami jednego osobnika, polimorfizm chromosomowy nie może stanowić adekwatnego wyjaśnienia genezy tego zjawiska.

Podobny fenomen, polegający na braku jednolitej kinetyki replikacyjnej, można obserwować podczas replikacji nieaktywnego chromosomu X w komórkach ludzkich. Początkowo Latt [39], a także Grzeschik

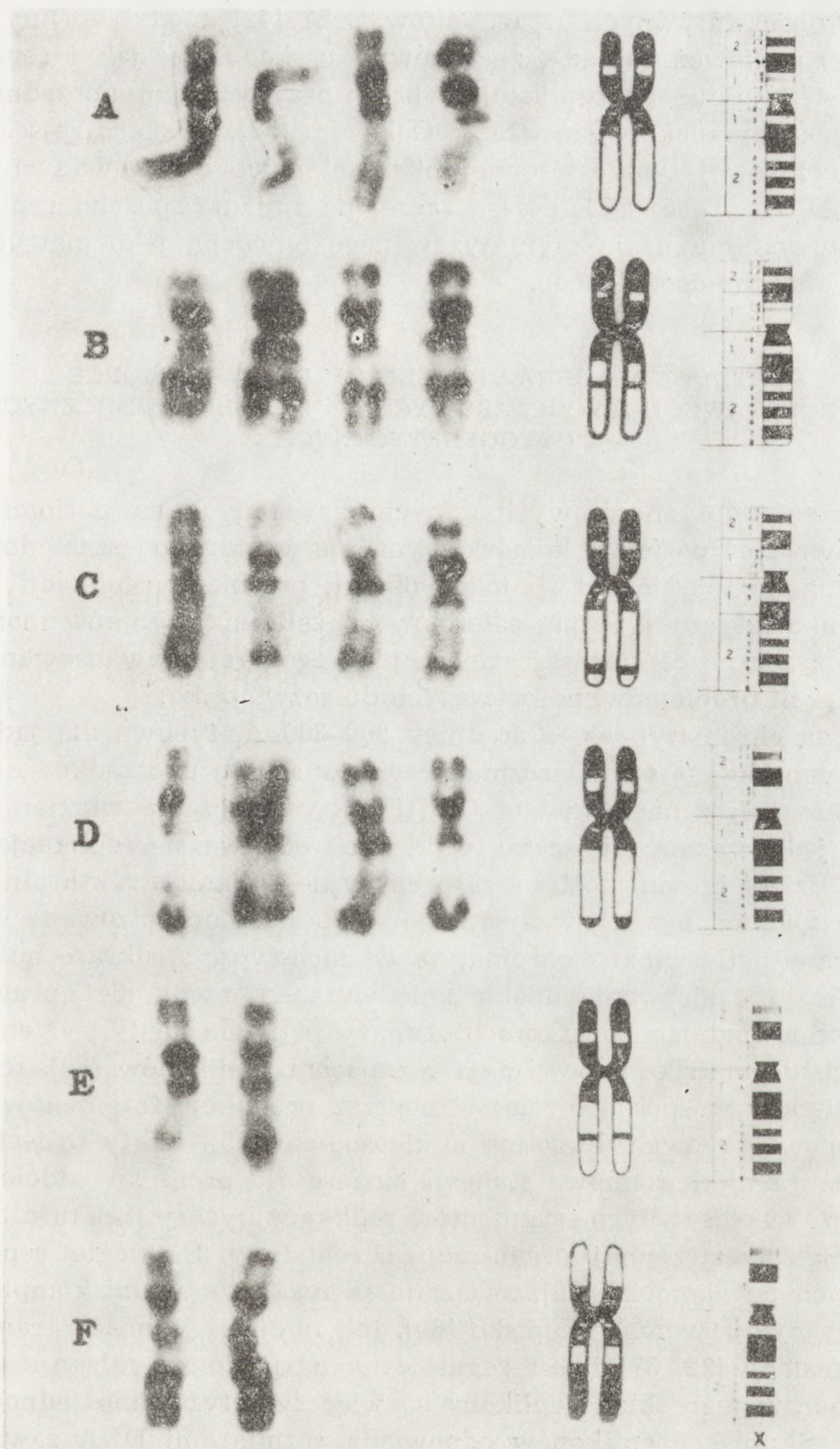


Ryc. 3. Końcowa faza replikacji chromosomu Y w limfocytach jednego dawcy. Po lewej stronie chromosomy Y o stosunkowo mało zaawansowanej replikacji, po prawej — chromosomy Y w zaawansowanym stadium syntezy w odniesieniu do autosomów. Technika FPG, terminalne wbudowywanie tymidyny (Kałużewski B., dane niepublikowane)

i wsp. [21] zauważyli różnicę w kolejności replikacji poszczególnych prążków obu homologicznych chromosomów X. Wkrótce Willard i Latt [83] donieśli o istnieniu alternatywnych wariantów replikacji nieaktywnego chromosomu X w limfocytach. Badania porównawcze limfocytów, fibroblastów i komórek płynu owodniowego [29, 84] doprowadziły zespół Willarda do stwierdzenia jednolitej kinetyki replikacyjnej nieaktywnego chromosomu X w dwóch ostatnich typach komórek, przy czym miałyby ona być identyczna z wariantem rzadko występującym w limfocytach. Ostatnie badania przyniosły dowody na dalszą różnorodność wzorów replikacyjnych nieaktywnego chromosomu X. Shelden i Nichols [76] wykazali obecność paru wariantów w fibroblastach, a Schmidt i wsp. [37] określili liczbę wariantów w limfocytach jednej osoby na około 6, postulując jednocześnie znaczną fakultatywność kolejności replikacji poszczególnych prążków, przy zachowaniu zasady priorytetu prążków R nad prążkami G (ryc. 4). Niepublikowane dane zespołu Kałużewski, Schmidt, Stolzmann dodatkowo świadczą o zmiennym tempie oraz braku synchronii replikacji nieaktywnego chromosomu X w odniesieniu do postępu syntezy w pozostałych chromosomach komplementu. Można spekulować, że u podłoża tych zjawisk leży albo relatywny brak regulacji, albo procesy związane z różnicowaniem się komórek (przy założeniu, że pojedynczy wariant charakteryzuje odrębną populację komórkową).

Do cytogenetycznych aspektów replikacji DNA można również zaliczyć przykuwające ostatnio coraz więcej uwagi zjawisko wymian chromatyd siostrzanych (SCE). Mechanizm tego zjawiska nie został dotąd poznany, jednak wszyscy autorzy są zgodni co do tego, że odzwierciedla ono jeden ze sposobów naprawy uszkodzeń DNA [3, 75]. Coraz liczniejsze są ostatnio dowody na nieodłączny związek tych procesów reparacyjnych z fazą S [41, 86]; co więcej, zdają się one zachodzić bezpośrednio w miejscu działania widełek replikacyjnych [41, 58, 74]. Kato [32] reprezentuje pogląd, że istnieją 2 typy SCE, z których jeden związany jest integralnie z replikacją DNA, drugi zaś powstaje wskutek poreplikacyjnych procesów naprawczych. Rekombinacja łańcuchów DNA w SCE pierwszego typu następowałaby według niego w miejscach przerw między fragmentami Okazaki, a nierównomierne SCE tego typu mogłoby odpowiadać za zmienność materiału heterochromatynowego w prążkach C [33]. Drugi typ SCE służyłby naprawie złamań łańcucha DNA.

Według modelu Hollidaya [53] mechanizm SCE byłby zapoczątkowany przez przerwy pojedynczego łańcucha DNA, powodujące rekombinację zreplikowanych już dupleksów, w wyniku czego powstawałyby fragmenty helisy złożone z dwóch macierzystych lub dwóch potomnych łańcuchów DNA. Jakkolwiek istnieją dowody biochemiczne na istnienie



Ryc. 4. Warianty replikacyjne nieaktywnego chromosomu X w limfocytach jednej osoby. Technika FPG, terminalne wbudowywanie BrdU [73]

tych „konserwatywnych” fragmentów DNA [42], model ten ma istotne wady, ponieważ zakłada, że zarówno uszkodzenie, jak i reparacja DNA następują już po replikacji, wbrew przytoczonym uprzednio danym. Można by spekulować wraz z Ockeyem [58], że skoro zajście SCE wymaga czasowej i przestrzennej bliskości nowo replikowanych fragmentów DNA, proces SCE polega raczej na zmianie sposobu replikacji, np. wykorzystaniu nowo zsyntetyzowanego łańcucha jako matrycy dla syntezy łańcucha opóźnionego.

SYNTETYCZNY OBRAZ REPLIKACJI DNA W KOMÓRCE NA PODSTAWIE DOTYCHCZASOWYCH DANYCH BIOCHEMICZNYCH I CYTOGENETYCZNYCH

Połączenie dotychczasowych danych, uzyskanych na poziomie molekularnym i na poziomie komórkowym, nie wystarcza jeszcze do konstruowania kompletnego i spójnego obrazu przebiegu replikacji w komórce eukariotycznej. Próba całościowego zebrania wyników może być jednak użyteczna dla lepszej orientacji w ogólnym zaawansowaniu badań i w skali problemów, pozostających do rozwiązania.

Włókna chromatynowe o średnicy 200–300 Å, typowe dla jądra interfazowego [66], są w nim rozmieszczone w sposób uporządkowany, poprzez stałe połączenia z matrix [10]. Punkty połączenia włókien z matriks są jednocześnie miejscami, w których odbywa się replikacja DNA [10, 60], dzięki czemu możliwe są precyzyjne zmiany strukturalne i segregacja włókien bez ich wzajemnego splątania. Zorganizowane w uporządkowane pętle włókna chromatynowe zachowują strukturę nukleosomową oraz zróżnicowanie upakowania wyższego rzędu [64], prawdopodobnie odpowiadające prążkom. Rozmiary pętli chromatynowych przyłączonych do matriks odpowiadają rozmiarom replikonów [60]. Ich synteza postępuje w sposób nieciągły, poprzez produkcję fragmentów Okazaki, odpowiadających długością nukleosomom [55]. Fakty te wskazują, że struktura nukleosomowa stanowi barierę dla progresji widełek oraz że synteza sukcesywnych fragmentów replikacyjnych jest naturalną konsekwencją przestrzennej organizacji chromatyny. Przyległe replikony, w grupach po około 25 [26], związane są z sąsiadującymi kompleksami replikacyjnymi tworząc skupisko [60]. Ich inicjacja wymaga transkrypcji i translacji [22, 57] i jest regulowana na poziomie całego skupiska; wchodzące w jego skład replikony są więc syntetyzowane jednocześnie [63, 70]. Skupisko replikonów odpowiada rozmiarami DNA zawartemu w prążku prometafazalnym [26]. Jednostek takich jest w genomie około 3000 [26], a czas ich replikacji wynosi średnio 2 godziny [67, 70, 89]. Poszczególne skupiska replikonów ulegają podwajaniu w ściśle określo-

nym porządku [23], stąd wzory replikacyjne chromosomów są stałe i specyficzne.

Komórka ma wewnętrzny program replikacji genomu, realizowany pod kontrolą mechanizmów regulacyjnych, podlegający jednak pewnym wpływom środowiska zewnętrznego. Program ten determinuje całkowite tempo syntezy DNA w przeciągu fazy S, porządek syntezy replikonów, a także zapewnia synchronizację produkcji fragmentów DNA w obrębie całego genomu, skoro na podstawie wzoru replikacyjnego pojedynczego chromosomu można przewidzieć stopień zaawansowania syntezy w pozostałych chromosomach komórki.

Tempo syntezy jest, jak się wydaje, regulowane poprzez częstość inicjacji [63, 67], która wzrasta we wczesnej fazie S, spada znamienne w środkowej fazie S i ponownie wzrasta pod koniec replikacji [9, 67]. Kinetyka ta odpowiada dwufazowemu przebiegowi replikacji chromosomów [71], tłumaczy trudności w uzyskiwaniu wzorów replikacyjnych w środkowej fazie S [69, 71] oraz do pewnego stopnia odpowiada za szybsze tempo replikacji rejonów heterochromatynowych [35]. Rozmiary replikonów oraz prędkość ruchu widełek nie podlegają regulacji w trakcie trwania fazy S [63, 67], jednak utrzymanie stałego tempa wymaga odpowiedniego dowozu substancji odżywczych do komórki [63].

Kolejność syntezy replikonów wymuszana jest strukturą włókien chromatynowych, gdyż hierarchia powstających fragmentów replikacyjnych odzwierciedla organizację przestrzenną włókien, a we wszystkich chromosomach, włącznie z chromosomami płci, replikują najpierw prążki R. Wzór replikacyjny chromosomu jest prawdopodobnie determinowany przez jego strukturę, nie ulega więc większym zmianom po przeniesieniu pojedynczego chromosomu ludzkiego do komórki hybrydu międzygatunkowego [17].

Mechanizm synchronizujący przebieg syntezy DNA poszczególnych chromosomów nie jest znany. Obserwowany dwufazowy sposób replikacji genomu [9, 67, 69, 71] może tu odgrywać pewną rolę. Zakładając, że skupiska replikonów odpowiadają prążkom prometafazowym i że czas ich replikacji wynosi do 4 godzin [89], nie można wykluczyć, że synteza genomu na poziomie molekularnym przebiega zasadniczo w dwóch rzutach — poprzez inicjację skupisk replikujących w czasie wczesnej fazy S, ich skompletowanie i następową inicjację syntezy wszystkich późno replikujących rejonów genomu. Kontynuacja replikacji w środkowej i późnej fazie S wymaga integralności poprzednio zsyntetyzowanych replikonów [23]. Można spekulować, że synteza lub aktywacja układów enzymatycznych, uwarunkowana ukończeniem replikacji we wcześniej duplikujących rejonach, jest niezbędnym warunkiem dla inicjacji dalszych replikonów. Twierdzenie to jest o tyle usprawiedliwione, że inicja-

cja replikonów wymaga transkrypcji i translacji de novo [22]. Niewykluczone jednak, że same zmiany struktury i przestrzennej organizacji włókien chromatynowych [26, 43], towarzyszące zreplikowaniu rejonów prążków R, są koniecznym i wystarczającym warunkiem dla rozpoczęcia syntezy w bardziej skondensowanych rejonach prążków G. Możliwe wreszcie, że różne klasy DNA [43] lub chromatyny [90], replikowane są z udziałem odrębnych mechanizmów [51], co tłumaczyłoby zmiany częstości inicjacji w przebiegu fazy S [63, 67] oraz heterogenność replikonów pojedynczej komórki w odniesieniu do tempa elongacji [90].

LITERATURA

- [1] ALBERTS B., STERNGLANZ R., Recent excitement in the DNA replication problem, *Nature*, **269**: 655–661, 1977.
- [2] ANGELL R. R., JACOBS P. A., Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin: frequency and inheritance, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 144–152, 1978.
- [3] BENDER M. A., GRIGGS H. G., BEDFORD J. S., Recombinational DNA repair and SCE, *Mutat. Res.*, **24**: 117–123, 1974.
- [4] BEREZNEY R., BUCHHOLTZ L. A., Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver, *Exp. Cell Res.*, **132**: 1–13, 1981.
- [5] BIANCHI N. O., De BIANCHI M. S. A., DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures, *Chromosoma*, **17**: 273–280, 1965.
- [6] BROOKS R. F., BENNETT D. C., SMITH J. A., Mammalian cell cycle needs two random transitions, *Cell*, **19**: 493–504, 1980.
- [7] BRUN G., WEISSBACH A., Initiation of HeLa cell DNA synthesis in a sub-nuclear system, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **75**: 5931–5935, 1978.
- [8] CAMARGO M., CERVENKA J., Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes, *Hum. Genet.*, **54**: 47–53, 1980.
- [9] COLLINS J. M., Rates of DNA synthesis during the S phase of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8570–8577, 1978.
- [10] COMINGS D. E., Arrangement of chromatin in the nucleus, *Hum. Genet.*, **53**: 131–143, 1980.
- [11] COOPER S., A unifying model for the G₁ period in prokaryotes and eukaryotes, *Nature*, **280**: 17–19, 1979.
- [12] DAS M., Mitogenic hormone-induced intracellular message. Assay and partial characterization of an activator of DNA replication induced by epidermal growth factor, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **77**: 112–116, 1980.
- [13] DIEDEN J., PAINTER R. B., KAPP L. N., Estimation of DNA fork displacement rates from isolated mammalian chromosomes, *Chromosoma*, **81**: 365–370, 1980.
- [14] DUTRILLAUX B., CONTURIER J., RICHER C. L., VIEGAS-PEQUIGNAT E., Sequence of DNA replication in 277 R- and Q bands of human chromosomes using a BrdU treatment, *Chromosoma*, **58**: 51–61, 1976.
- [15] EMANUEL B. S., Compound lateral asymmetry in human chromosome 6, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 153–159, 1978.

- [16] FARBER R. A., DAVIDSON R. L., Differences in the order of termination of DNA replication in human chromosomes in peripheral blood lymphocytes and skin fibroblasts from the same individual, *Cytogenet. Cell Genet.*, **18**: 349-363, 1977.
- [17] FARBER R. A., Patterns of replication of human chromosomes in human X mouse hybrids with different chromosome compositions, *Cytogenet. Cell Genet.*, **27**: 246-253, 1980.
- [18] GIBAS Z., LIMON J., Isolabeling of the long arm of the human Y chromosome demonstrated by the FPG technique, *Chromosoma*, **69**: 113-120, 1978.
- [19] GIANELLI F., Human chromosomes DNA synthesis. Monographs in human genetics. Vol. 5, red. L. Beckman, M. Hauge, S. Karger—Basel, München, New York 1970.
- [20] GOSDEN J. R., MITCHELL A. R., BUCKLAND R. P., CLYTON R. R., EVANS H. J., The location of four human DNA's on human chromosomes. Rotterdam Conference 1974, 2nd International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects Original Article Series XX, N. York.
- [21] GRZESCHIK K. H., KIM M. A., JOHANNSMANN R., Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining, *Humangenetik*, **29**: 41-59, 1975.
- [22] GUY A. L., TAYLOR J. H., Actinomycine D inhibits initiation of DNA replication in mammalian cells, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **75**: 6088-92, 1978.
- [23] HAMLIN J. L., Effect of damage to early, middle and late replicating DNA on progress through the S period in Chinese hamster ovary cell, *Exp. Cell Res.*, **112**: 225-232, 1978.
- [24] HERMAN T., De PAMPHILIS M., WASSERMAN P., Structure of chromatin at deoxyribonucleic acid replication forks: Okazaki fragments released from replicating SV 40 chromosomes by single-strand specific endonucleases are not in nucleosomes, *J. Biochem.*, **18**: 4563-4571, 1979.
- [25] JACKSON V., GRANNER D., CHALKLEY R., Deposition of histone onto the replicating chromosome: Newly synthesized histone is not found near the replication fork, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **73**: 2266-2269, 1976.
- [26] JASNY B. R., TAMM J., Temporal organization of replication in DNA fibers of mammalian cells, *J. Cell Biol.* **81**: 692-697, 1979.
- [27] JAZWINSKI S. M., WANG J. L., EDELMAN G. M., Initiation of replication in chromosomal DNA induced by extracts from proliferating cells, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **73**: 2231-2235, 1976.
- [28] JERZMANOWSKI A., STAROŃ K., JACHYMCZYK W., Struktura materiału genetycznego. Replikacja DNA. [w:] *Biologia Molekularna*, red. Z. Lassota, PWN, 1980, 101-166.
- [29] KAISER-Mc CAW B., LATT S. A., X chromosome replication in parthenogenetic benign ovarian teratomas, *Hum. Genet.*, **38**: 253-264, 1977.
- [30] KAŁUŻEWSKI B., BrdU-Hoechst-Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocyte culture. Study of human X and Y chromosomes Abstracts of the 7th International Chromosome Conference, Oxford 1980.
- [31] KAPP L. N., PAINTER R. B., DNA fork displacement rates in synchronous aneuploid and diploid mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **562**: 222-230, 1979.
- [32] KATO H., Mechanisms for SCE's and their relation to the production of chromosomal aberrations, *Chromosoma*, **59**: 179-191, 1977.
- [33] KATO H., Preferential occurrence of SCE at heterochromatin-euchromatin

- junctions in the Wallaby and Hamster chromosomes, *Chromosoma*, **74**: 307-316, 1979.
- [34] KIM M. A., JOHANNSMANN R., GRZESCHIK K. H., Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 363-371, 1975.
- [35] KIMURA S., YAMAZAKI K., KATO Y., Kinetics of DNA replication in the Indian Muntjac chromosomes as studied by quantitative autoradiography, *Chromosoma*, **77**: 309-324, 1980.
- [36] KUREK M. P., BILLIG D., STAMBROOK P., Size classes of replication units in DNA from sea urchin embryos, *J. Cell Biol.*, **81**: 698-703, 1979.
- [37] KURNIT D. M., Improving measurements of the relative times of synthesis of specific DNA fractions, *Exp. Cell Res.*, **86**: 63-68, 1974.
- [38] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **70**: 3395-3399, 1973.
- [39] LATT S. A., Microfluorometric analysis of DNA replication in human X chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **86**: 412-415, 1974.
- [40] LATT S. A., Fluorescent probes of chromosome structure and replication, *Can. J. Genet. Cytol.*, **19**: 603-623, 1977.
- [41] LATT S. A., SCHRECK R. R., Sister chromatid exchange analysis, *Am. J. Hum. Genet.*, **32**: 297-313, 1980.
- [42] LATT S. A., SCHRECK R. R., LOVEDAY K. S., DOUGHERTY C. P., SHULER C. F., Sister chromatid exchanges, [w:] *Advances in Human Genetics 10*, red. H. Harris, K. Hirschhorn, Plenum Press, New York, London 1980, 267-331.
- [43] LAUGHLIN T. J., TAYLOR J. H., Initiation of DNA replication in chromosomes of CHO cells, *Chromosoma*, **75**: 19-35, 1979.
- [44] LIMA de FARIA A., A differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanopus* and *Secale*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 457-466, 1959.
- [45] LIMA de FARIA A., Incorporation of tritiated thymidine into meiotic chromosomes, *Science*, **130**: 503-506, 1959.
- [46] LIMON J., GIBAS Z., KAŁUŻEWSKI B., MORUZGAŁA T., Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosomes, *Hum. Genet.*, **51**: 247-252, 1979.
- [47] LIN M. S., LATT S. A., DAVIDSON R. L., Microfluorometric detection of asymmetry in the centromeric region of mouse chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **86**: 392-397, 1974.
- [48] LOZOVSKAYA E. R., SLESINGER S. J., PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA A. A., Comparative study of chromosome replication in primary cultures of embryonic fibroblasts and the cultures of peripheral blood lymphocytes, *Chromosoma*, **60**: 69-79, 1977.
- [49] LOZOVSKAYA E. R., SLESINGER S. J., PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA A. A., Comparative study of human chromosome replication in primary cultures of peripheral blood leucocytes, *Chromosoma*, **64**: 85-95, 1977.
- [50] MAGENIS R. E., DOULON T. A., WYANDT H. E., Giemsa-11 staining of chromosome 1, *Science*, **202**: 64-70, 1978.
- [51] MATTERN M. R., PAINTER R. B., A possible difference in the mechanism of replication of moderately repeated nucleotide sequences in Chinese hamster ovary cells, *Exp. Cell Res.*, **111**: 167-173, 1978.

- [52] MOERMAN C., LANOTTE M., PANIJEL J., Comparative study of DNA elongation in mitogen stimulated mouse thymocytes and splenocytes, *Exp. Cell Res.*, **109**: 201-209, 1977.
- [53] MOORE P. D., HOLLIDAY R., Evidence for the formation of hybrid DNA during mitotic recombination in Chinese hamster cells, *Cell*, **8**: 573-579, 1976.
- [54] MUELLER G. C., KAJIWARA K., KIM U. H., GRAHAM J., Proposed coupling of chromatin replication, hormone action and cell differentiation, *Cancer Res.*, **38**: 4041-4045, 1978.
- [55] MULLER M. T., KAJIWARA K., MUELLER G. C., Role of cytosol proteins in DNA chain growth and chromatin replication in Friend erythroleukemia cell nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **653**: 391-407, 1981.
- [56] MURPHY R. F., WALLACE R. B., BONNER J., Altered nucleosome spacing in newly replicated chromatin from Friend leukemia cells, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **75**: 5903-5907, 1978.
- [57] NAGATA K., ENOMOTO T., YAMADA M. A., A system of DNA replication in HeLa nuclei treated with inhibitors of protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **653**: 316-330, 1981.
- [58] OCKEY C. H., Differences between spontaneous and induced SCEs with fixation time and their chromosome localization, *Cytogenet. Cell Genet.*, **26**: 223-235, 1980.
- [59] OCKEY C. H., Autoradiographic evidence of differential loss of BrdU-substituted DNA after UV exposure in FPG harlequin staining, *Exp. Cell Res.*, **125**: 511-514, 1980.
- [60] PARDOLL D. M., VOGELSTEIN B., COFFEY D. S., A fixed site of DNA replication in eukaryotic cells, *Cell*, **19**: 527-536, 1980.
- [61] PERRY P., WOLFF S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**: 156-158, 1974.
- [62] PHILLIPS R. B., New C band markers of human chromosomes: C band position variants, *J. Med. Genet.*, **17**: 380-385, 1980.
- [63] PROBST H., BLÜTTERS R., FIELITZ J., DNA replication in asynchronous and synchronous Ehrlich ascites cells in different conditions of growth, *Exp. Cell Res.*, **130**: 1-13, 1980.
- [64] PRUITT S. C., GRAINGER R. M., A repeating unit of higher order chromatin structure in chick red blood cell nuclei, *Chromosoma*, **78**: 257-274, 1980.
- [65] RAPAPORT E., GARCIA-BLANCO M. A., ZAMECNIK P. C., Regulation of DNA replication in S phase nuclei by ATP and ADP pools, *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **76**: 1643-1647, 1979.
- [66] RATTNER J. B., HAUKALO B. A., Nucleosome packing in interphase chromatin, *J. Cell Biol.*, **81**: 453-457, 1979.
- [67] RICHTER A., HAND R., DNA replication during a serum induced S phase in primate CV-1 cells, *Exp. Cell Res.*, **121**: 363-371, 1979.
- [68] SCHEID W., TRAUPE H., Further studies on the mechanism involved in differential staining of BrdU-substituted *Vicia faba* chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **108**: 440-444, 1977.
- [69] SCHEMPP W., VOGEL W., Decrease of DNA synthesis in amniotic fluid cells during the middle part of S phase revealed by differential chromosome staining after incorporation of BrdU, *Chromosoma*, **67**: 193-199, 1978.
- [70] SCHEMPP W., Asynchrony in late replication between homologous auto-

- somes in primary cultures of Chinese hamster fibroblasts, *Chromosoma*, **79**: 199–206, 1980.
- [71] SCHMIDT M., Two phases of DNA replication in human cells, *Chromosoma*, **76**: 101–110, 1980.
- [72] SCHMIDT M., Cytogenetical aspects of DNA synthesis in the late replicating regions of human genome, *Genet. Polon.*, **21**: 211–220, 1980.
- [73] SCHMIDT M., STOLZMANN W. BARANOVSKAYA L. I., Replication variants of the human inactive X chromosome. I. Variability within lymphocytes of single individuals, *Chromosoma*, w druku.
- [74] SCHWARTZMAN J. B., POSTIGO R., GUTIERREZ C., Analysis of visible light induced SCE in 5-BrdU substituted chromosomes, *Chromosoma*, **74**: 314–328, 1979.
- [75] SHAFER D. A., Replication bypass model of SCE and implication for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia, *Hum. Genet.*, **39**: 177–190, 1977.
- [76] SHELDON S., NICHOLS W. W., Comparison of the pattern of chromosomal late replication. I. Human renal epithelium and lung fibroblasts in vitro, *Cytogenet. Cell Genet.*, **29**: 40–50, 1981.
- [77] SHERRATT D., Replication origin, *Nature*, **271**: 404, 1978.
- [78] SHUN-ICHI SAKANISHI, TAKAYAMA S., Reverse differential staining of sister chromatids after substitution with BrdU and incubation in sodium phosphate solution, *Exp. Cell Res.*, **115**: 448–451, 1978.
- [79] SNEIDER T. W., DNA Replication, Modification and Repair, [w:] *The Molecular Biology of Cancer*, red. H. Busch, Acad. Press, N. York, London 1974.
- [80] STUBBLEFIELD E., Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using 5-BrdU suppression of 33258 Hoechst fluorescence, *Chromosoma*, **53**: 209–221, 1975.
- [81] TAPPER D. P., De PAMPHILIS M. L., Preferred DNA sites are involved in the arrest and inhibition of DNA synthesis during replication of SV 40 DNA, *Cell*, **22**: 97–108, 1980.
- [82] TAYLOR J. H., Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 455–464, 1960.
- [83] WILLARD H. F., LATT S. A., Analysis of DNA replication in human X chromosomes by fluorescence microscopy, *Am. J. Hum. Genet.*, **28**: 213–227, 1976.
- [84] WILLARD H. F., Tissue specific heterogeneity in DNA replication patterns of human X chromosomes, *Chromosoma*, **61**: 61–73, 1977.
- [85] WOODCOCK D. M., COOPER I. A., Aberrant double replication of segments of chromosomal DNA following DNA synthesis inhibition by cytosine arabinoside *Exp. Cell Res.*, **123**: 157–166, 1979.
- [86] Van KESTEREN-van LEEUWEN A. C., NATARAJAN A. T., Localization of 7-12-DMBA induced chromatid breaks and SCE in chromosomes 1 and 2 of bone marrow cells of rat in vivo, *Chromosoma*, **81**: 473–481, 1980.
- [87] VOGELSTEIN B., PARDOLL D. M., COFFEY D. S., Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication, *Cell*, **22**: 79–85, 1980.
- [88] YUROV Y. B., Do clusters of replication units in the mammalian cells exist?, *Exp. Cell Res.*, **123**: 369–374, 1979.
- [89] YUROV Y. B., The rate of fork movement during DNA replication in mammalian cells, *Chromosoma*, **74**: 347–353, 1979.

- [90] YUROV Y. B., Rate of DNA replication fork movement within a single mammalian cell, *J. Mol. Biol.*, **136**: 339–342, 1980.
- [91] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Correlation between patterns of DNA replication and chromosome banding, *Biol. Zbl.*, **95**: 319–326, 1976.

Otrzymano: 16 września 1981.

Przyjęto: 16 października 1981.

Adres autorki: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań.

ZMIANY STRUKTURY JĄDRA A JEGO AKTYWNOŚĆ
REPLIKACYJNA I TRANSKRYPCYJNA W PRZEBIEGU
CYKLU KOMÓRKOWEGO *

CHANGES IN NUCLEAR STRUCTURE AS RELATED
TO NUCLEAR REPLICATIVE AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITIES
DURING THE CELL CYCLE

Maria KWIATKOWSKA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin,
Instytut Fizjologii i Cytologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Na kilku wybranych przykładach wykazano, że zmiany ogólnej organizacji strukturalnej chromatyny w interfazie są dynamiczne i występują w przebiegu każdej z faz cyklu, ich zaś charakter zależy od struktury jądra, zawartości DNA oraz typu cyklu komórkowego. Omówiono zmiany struktury jądra w fazie S na tle dyskusji dotyczącej wczesnej i późnej replikacji heterochromatyny, stanu kondensacji chromatyny w momencie syntezy DNA, lokalizacji miejsc inicjujących replikację w jądrze oraz ich powiązania z matriks jądrową. Przedstawiono obserwacje wskazujące na występowanie okresu dekondensacji chromatyny w fazie G₂ oraz zmiany struktury jądra w okresie przejścia z późnej G₂ do wczesnej profazy. Omówiono lokalizację regionów aktywnych w transkrypcji, związek między zwiększeniem dekondensacji chromatyny w interfazie i wzmożoną syntezą RNA oraz konieczność rozwiązywania tych problemów w powiązaniu z badaniami matriks jądrowej.

Summary. Several chosen examples served to demonstrate that changes in an overall spatial organization of chromatin during interphase are dynamic and they take place in the course of each phase of the cycle, while their character depends upon nuclear structure, DNA content, and the type of the cell cycle. Structural changes of S phase nuclei were discussed in view of the early and late chromatin replication, the state of chromatin condensation during DNA synthesis, the location of replication initiating sites within the nucleus, and their

* Referat wygłoszony na konferencji szkoleniowej, zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki na temat „Struktura chromatyny i replikacja DNA” (Warszawa, 26.11.1980 r.).

connections with nuclear matrix. Observations indicating the occurrence of the period of chromatin decondensation during the G₂ phase, and structural changes of nuclei during late G₂ — early prophase transitory period were presented. Localization of regions active in transcription, the relation between an increased chromatin decondensation in interphase and an enhanced RNA synthesis as well as the necessity of solving the above problems in close connection with studies of nuclear matrix have been presented.

Całkowita kondensacja chromatyny przekształcającej się w chromosomy występująca w okresie mitozy jest tylko jednym z aspektów ciągłego cyklu reorganizacji molekularnej architektury jądra. W okresie interfazy występują bowiem cykliczne zmiany struktury chromatyny, jej lokalna dekonduensacja i ponowna kondensacja, które są istotne dla procesu transkrypcji genów, organizacji replikacji, wzrostu jądra i przygotowania do podziału komórki. Zmiany te przejawiają się w różnej barwliwości chromatyny barwnikami zasadowymi [4, 31, 35, 102, 103, 148], różnej gęstości optycznej jądra [7, 134], różnej zdolności wiązania ³H AMD przez DNA [74, 113, 124], różnej wrażliwości na działanie DNA-zy [123] oraz w zmianach rezonansu magnetycznego jądra [9]. Ujawniają je także obserwacje morfologiczne w mikroskopie świetlnym i elektronowym, które wskazują na istnienie w kolejnych etapach interfazy cyklicznych zmian w ilości chromatyny zwartej oraz jej konfiguracji i lokalizacji w jądrze. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw przekształcania się jednej formy strukturalnej chromatyny w drugą nie są jeszcze dokładnie poznane. Fakty i hipotezy dotyczące tego problemu są przedmiotem artykułu przeglądowego Hübnera i Kononowicza [62].

Stopień upakowania fibryli w chromatynie zwartej jest podobny jak w chromosomach mitotycznych, natomiast chromatyna luźna wykazuje znacznie większe ich rozproszenie. Z punktu widzenia funkcjonalnego i genetycznego chromatyna zwarta jest niejednorodna. Składa się na nią heterochromatyna, uważana za nieaktywną genetycznie [58], oraz okresowo nieaktywna euchromatyna (por. ref. [62, 116]). Ta ostatnia wraz z chromatyną luźną obecną w jądrze interfazowym odpowiada euchromatynie. Heterochromatyna z kolei w pewnych etapach fazy S (punkt 2.2.2) może także okresowo ulegać dekonduensacji i upodabniać się całkowicie do euchromatyny luźnej. Z tych względów na poziomie mikroskopu elektronowego rozróżnienie w jądrze interfazowym heterochromatyny od euchromatyny jest możliwe tylko w niektórych momentach cyklu i u niektórych organizmów, np. u *Fritillaria* [79]. Często konieczne jest więc ograniczenie się do stosowania terminów chromatyna zwarta i luźna, określających jedynie stopień upakowania fibryli chromatynowych.

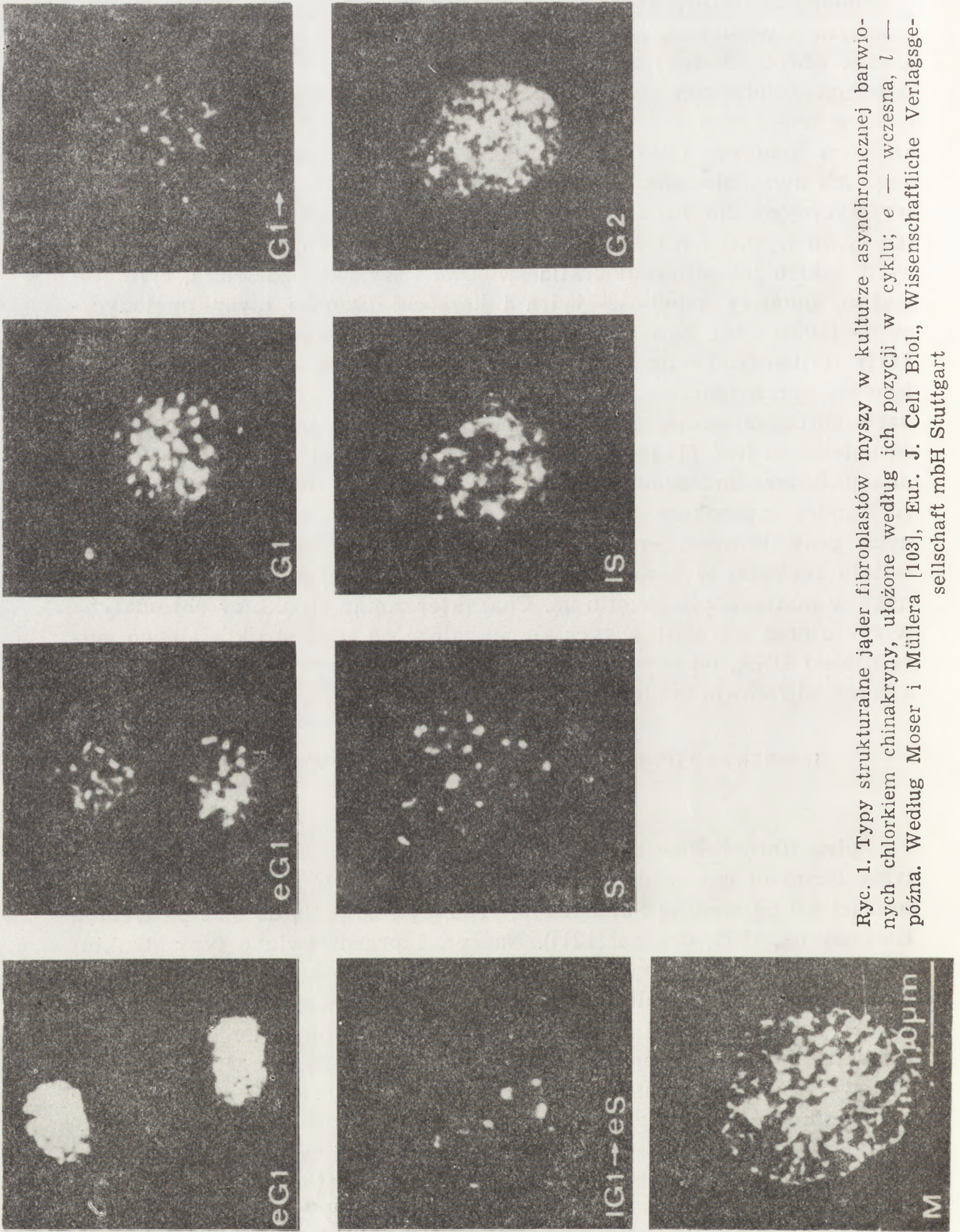
Zmiany struktury jądra w komórkach proliferujących są bardzo dynamiczne i występują nie tylko w przebiegu całej interfazy, lecz również w obrębie każdej z faz cyklu. Mimo licznych badań na ten temat, informacje dotyczące związku tych zmian z poszczególnymi fazami cyklu są w wielu przypadkach fragmentaryczne lub kontrowersyjne. Wynika to w znacznej mierze z trudności metodycznych lub niedostatecznego ich uwzględniania. Powiązanie typów strukturalnych jądra charakterystycznych dla badanego obiektu z określonymi etapami kolejnych faz cyklu wymaga równoległego stosowania różnych technik cytologicznych, takich jak autoradiografia świetlna i wysokorozdzielcza, cytofotometria, pomiary wielkości jądra i komórki (szersze uwagi metodyczne — [105]) i nie zawsze jest konsekwentnie przeprowadzane (np. [67, 141]). Najbardziej odpowiednimi obiektami tych badań są komórki dzielące się synchronicznie. Jednakże nawet przy bardzo subtelnych metodach ich uzyskiwania, takich jak selekcja komórek metafazowych, metoda kofeinowa (ref. [114]), zachodzi stopniowe rozsynchronizowanie się populacji. Rozsynchronizowaniu podlegają wobec tego również zmiany struktury jądra zachodzące w kolejnych fazach cyklu. Dla uchwycenia istotnych prawidłowości konieczna jest więc analiza ogromnej ilości materiału zarówno w badaniach ultrastrukturalnych, jak i przeprowadzanych w mikroskopie świetlnym. Charakter zmian struktury chromatyny w cyklu oraz wyrazistość tych zmian zależy od typu strukturalnego jądra i ilości DNA, od zawartości sekwencji wysokopowtarzalnych w DNA, a także od rodzaju cyklu komórkowego.

1. PRZYKŁADY ZMIAN STRUKTURY JĄDRA W INTERFAZIE

1.1. FIBROBLASTY MYSZY

Jądro fibroblastów myszy wykazuje strukturę siateczkowatą z małymi, licznymi chromocentrami i średnią zawartość DNA (2C DNA wynosi od 6,0 pg według Sandrittera, 1958, cyt. za [121] do 8,52 pg według Bachmanna, 1972, cyt. za [121]). Na ryc. 1 przedstawiono typy strukturalne jąder interfazowych wyróżnione przez Moser i Müllera [103] w asynchronicznej kulturze fibroblastów, po zabarwieniu chlorkiem chinakryny. Sekwencję zmian struktury jądra w odniesieniu do stadiów interfazy ustalono na podstawie równoległych analiz intensywności wyznakowania ^3H tymidyną tych samych typów komórek po różnym czasie inkubacji.

Począwszy od telofazy do późnej G_1 zachodzi wyraźna, postępująca dekondensacja chromatyny prowadząca do niemal całkowitego zanikania fluorescencji sieciowatej chromatyny zwartej. Chromocentry dłużej zachowują zdolność świecenia, chociaż stają się coraz mniejsze, a pod



Ryc. 1. Typy strukturalne jąder fibroblastów myszy w kulturze asynchronicznej barwionych chlorkiem chinakryny, ułożone według ich pozycji w cyklu; e — wczesna, l — późna. Według Moser i Müllera [103], Eur. J. Cell Biol., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

koniec fazy G_1 i na początku fazy S zmniejsza się ich liczba, co zostało potwierdzone przez zastosowanie techniki wykrywającej prążki C. W dalszych etapach fazy S fluorescencja chromatyny, a także liczba i wielkość chromocentrów, stopniowo się zwiększa. W fazie G_2 w miarę zbliżania się profazy zachodzi dalsze nasilanie się fluorescencji chromatynowej sieci i wzrost liczby chromocentrów. Sieć ta stopniowo przekształca się w chromosomy mitotyczne.

Podobny obraz zmian struktury jądra stwierdzono również w synchronizowanych komórkach embrionalnych chomika chińskiego oraz w komórkach HeLa, z zastosowaniem tej samej techniki obserwacji [102]. Są one w głównych zarysach również zgodne z obrazami uzyskanymi na podstawie autoradiografii, cytofotometrii i barwienia orceiną z komórek nabłonka myszy [3] oraz hepatocytów myszy (Müller 1966, cyt. za [105]).

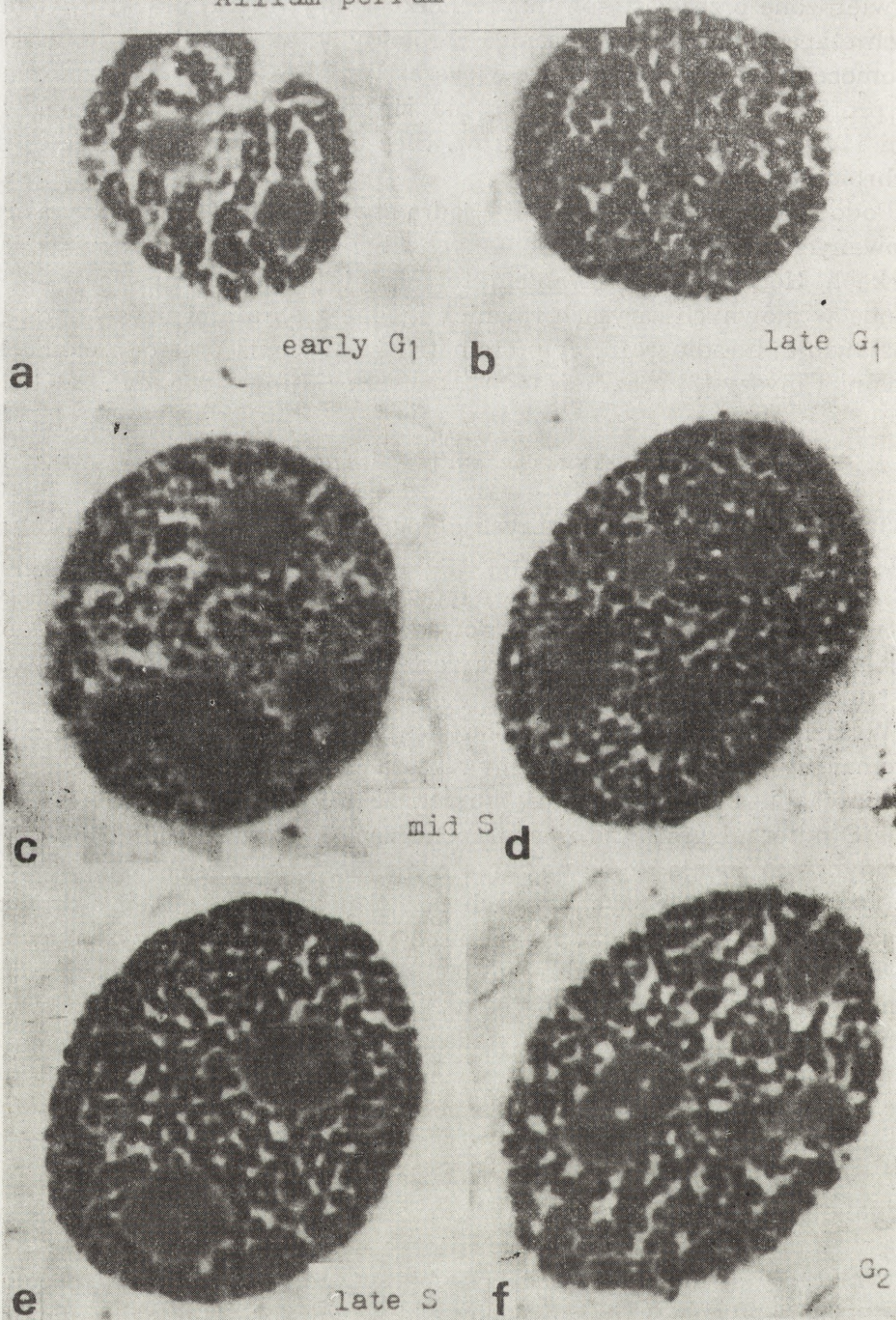
1.2. MERYSTEM KORZENIOWY *ALLIUM PORRUM*

Jądra tej rośliny charakteryzuje regularna siateczkowata struktura z małymi chromocentrami (typ eureticulate) i wysoka zawartość DNA ($2C$ DNA = 68 pg [119]). DNA o powtarzalnych sekwencjach stanowi w tym obiekcie 90% [45]. Przeprowadzona przez Lafontaine'a i Lorda [81] analiza zmian struktury jądra została oparta na autoradiografii ultrastrukturalnej.

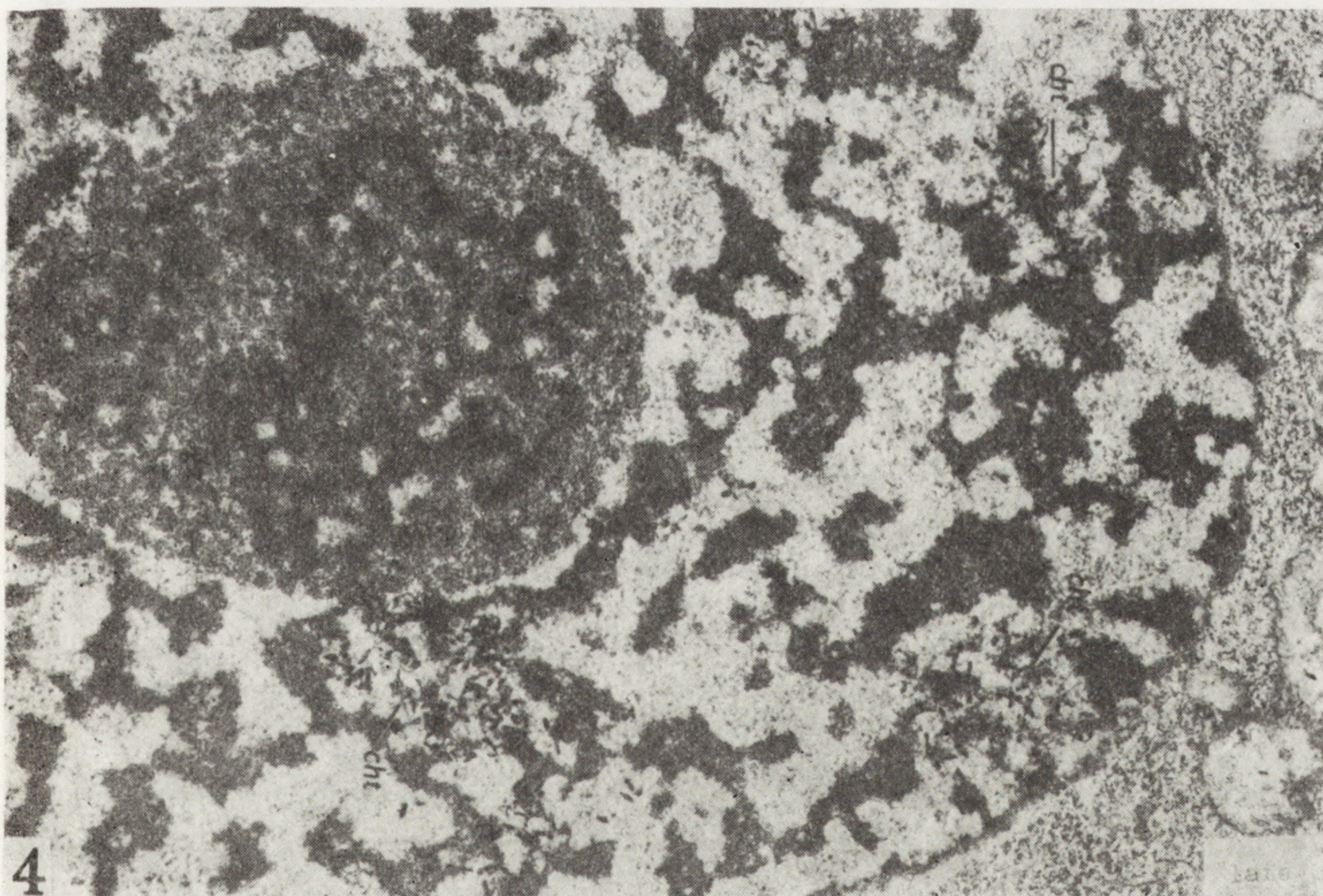
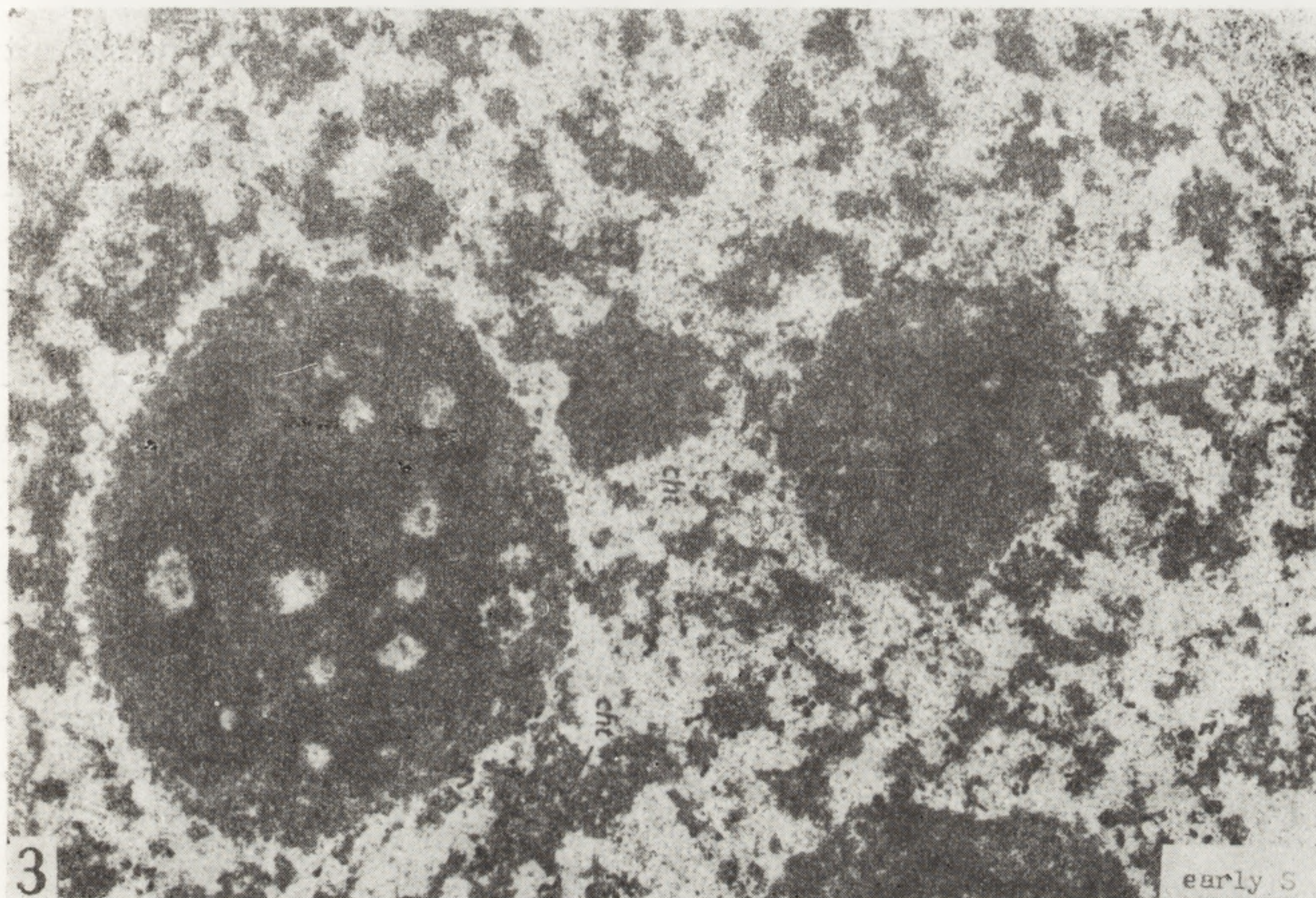
W fazie G_1 chromosomy przekształcają się w sieć utworzoną z pasm chromatyny zwartej (chromonemy), która staje się coraz delikatniejsza w miarę zbliżania się do początku fazy S (ryc. 2 a i b). We wczesnej fazie S autoradiograficzne ziarna pochodzące z pulsowej inkubacji w 3H tymidynie pojawiają się na obszarze wypełnionym przez chromatynę luźną (ryc. 3). W późniejszych etapach fazy S pasma chromonemy stają się coraz grubsze (ryc. 2 c, d). Zewnętrzne strefy tych pasm wyznakowane są 3H tymidyną, chociaż chromatyna luźna jest nadal głównym miejscem występowania autoradiograficznych ziaren. W późnej fazie S grube pasma chromatyny zwartej układają się w luźną sieć (ryc. 2 e), a ziarna autoradiograficzne występują wyłącznie w postaci lokalnych skupisk (ryc. 4). Lokalizacja tych skupisk pozwala sądzić, że znajdują się one nad chromocentrami, które utraciły skondensowaną strukturę i upodobniły się do sieci chromatynowej. W fazie G_2 zachodzi dalsze pogrubianie i oddalanie się pasm chromonemy, które ulegają spiralizacji i przekształcają się stopniowo w chromosomy mitotyczne (ryc. 2 f, por. również [82]). W tym typie strukturalnym jądra zmiany ogólnej organizacji chromatyny obserwowane w mikroskopie elektronowym są bardzo subtelne. Nieco wyraźniej widać je na skrawkach półcienkich w mikroskopie świetlnym (ryc. 2).

Lafontaine J. G., Lord A., 1974

Allium porrum

















Ryc. 2. Jądra merystemu korzeniowego *Allium porrum* barwione metodą Feulgena i 1% błękitem metylenowym; a — wczesna G₁, b — późna G₁, c — wczesna S, d — środkowa do późnej S, e — późna S, f — późna G₂. Pow. około 3800 X. Według Lafontaine'a i Lorda [81], J. Cell Sci., Printed in Great Britain



Ryc. 3 i 4. Autoradiogramy ultrastrukturalne z jąder *Allium porrum* po 10 min inkubacji w ^3H tymidynie. Ryc. 3 — wczesna faza S, ziarna autoradiograficzne zlokalizowane głównie nad chromatyną luźną; Ryc. 4 — późna S, skupienia ziaren autoradiograficznych występują nad zdekondensowanymi chromocentrami. Pow. około $12\,000\times$ (pomniejszone w stosunku do oryginału). Według Lafontaine'a i Lorda [81], J. Cell Sci., Printed in Great Britain

1.3. MERYSTEM KORZENIOWY *ALLIUM CARINATUM*

Zawartość DNA w jądrze *Allium carinatum* jest o połowę niższa niż u tetraploidalnego gatunku *A. porrum* ($2C$ DNA = 32,67 pg [108]). Struktura jądra u obydwu gatunków jest zbliżona (typ eurenticulate), jednakże pasma chromonemy *A. carinatum* są cieńsze i w mikroskopie elektronowym mniej wyraźne [106]. Badania zmian struktury jądra w cyklu *A. carinatum* zostały przeprowadzone przez Nagla [106] z zastosowaniem autoradiografii ultrastrukturalnej i cytofotometrii. Przebieg tych zmian w wielu punktach pokrywa się z opisem przedstawionym przez Lafontaine'a i Lorda [81] dla *A. porrum*. Zasadnicza różnica w obserwacjach dotyczy wczesnej fazy S. Zdaniem Nagla rozpoczyna się ona nie od replikacji euchromatyny luźnej, lecz od wczesnej replikacji heterochromatyny pozostającej w postaci skondensowanej. Ogólna organizacja jądra w tym stadium jest podobna, jak w późnej fazie G_1 i wyraźnie odmienna pod względem grubości i układu pasm chromonemy od struktury jądra w końcowym etapie fazy S, podczas którego zachodzi późna replikacja heterochromatyny związana z dekondensacją chromocentrow (ryc. 5, por. S1 i S4).

Stage	G_1	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	G_2	Z
Structure							
Label							
DNA	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.9 ± 0.4	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.4	
Significance	—	1%	1%	1%	1%	5%	

Ryc. 5. Schemat ilustrujący zmiany struktury jądra oraz rozmieszczenie ziaren autoradiograficznych po podaniu 3H tymidyny, w zestawieniu z poziomem DNA w kolejnych etapach interfazy cyklu *Allium carinatum* (uzupełnione na podstawie tekstu o Z-fazę, ozn. Z). Według Nagla [106], Protoplasma, Springer Verlag

Druga istotna różnica dotyczy okresu przejściowego z późnej G_2 do wczesnej profazy, w którym Nagl [106] stwierdził istnienie drugiego okresu dekondensacji chromocentrow, tj. Z-fazy (por. punkt 2.3). We wczesnej fazie G_2 zaobserwował on ponadto tworzenie się dużych chromocentrow zbiorczych w wyniku łączenia się odcinków heterochromatynowych sąsiednich chromatyd.

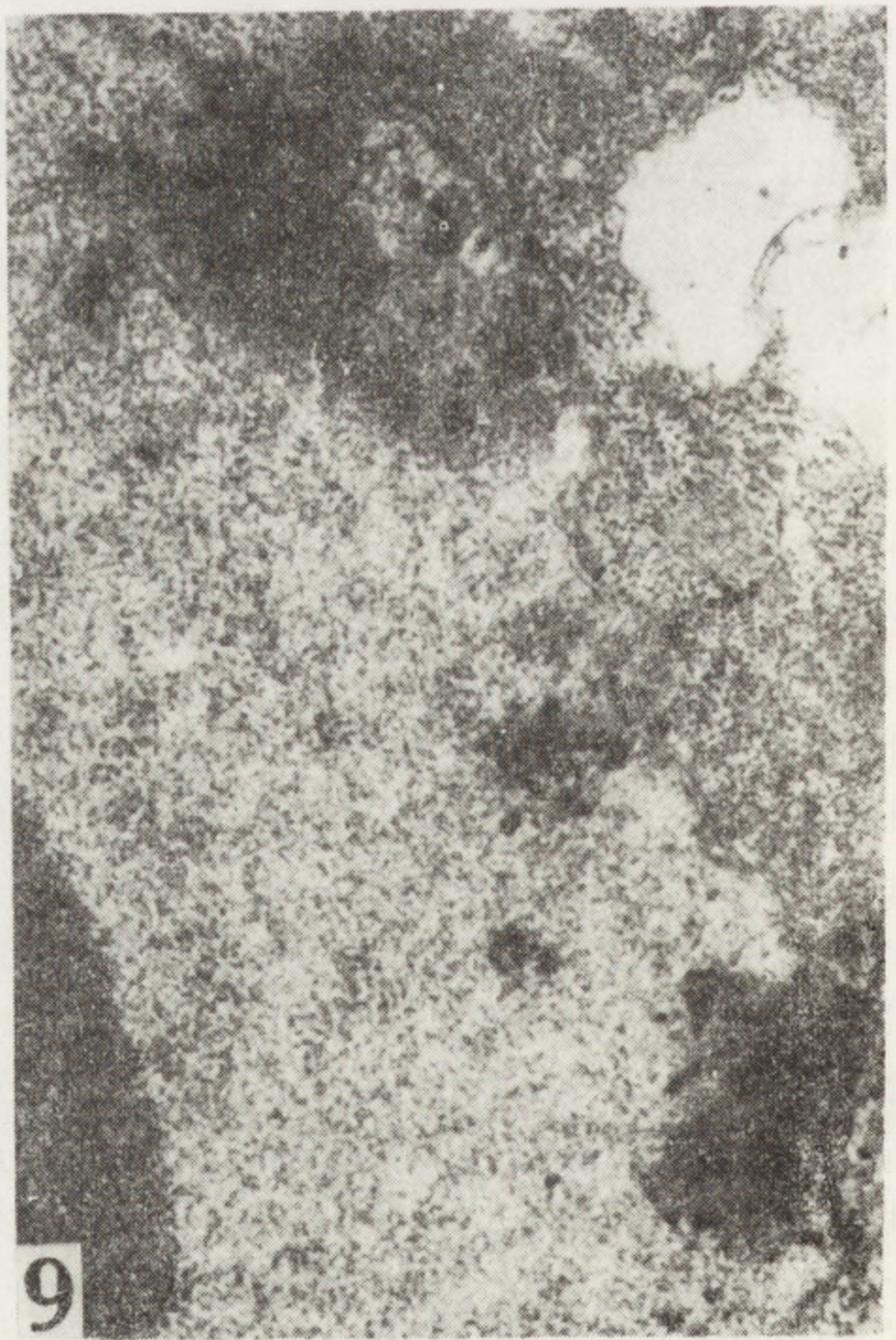
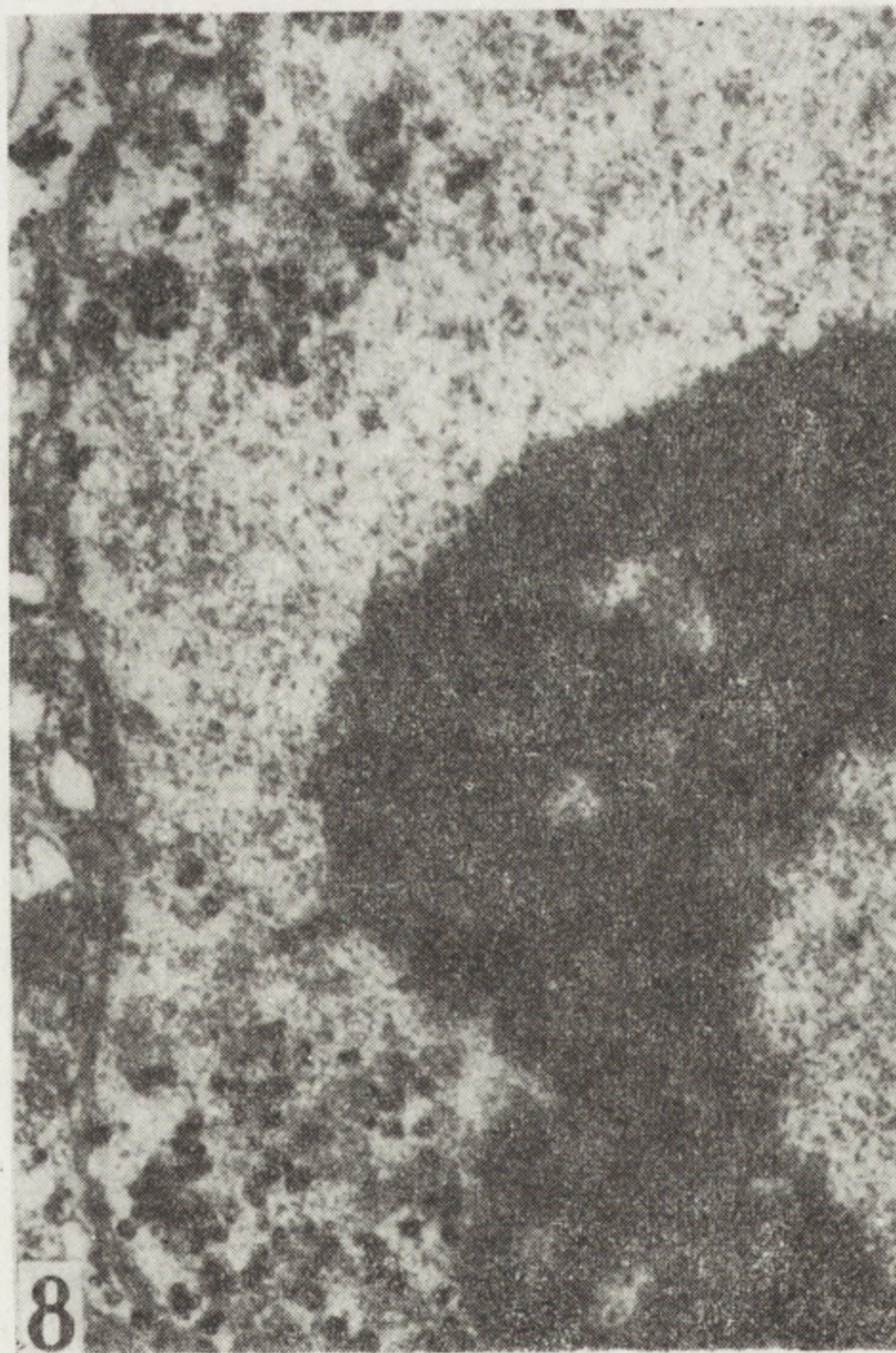
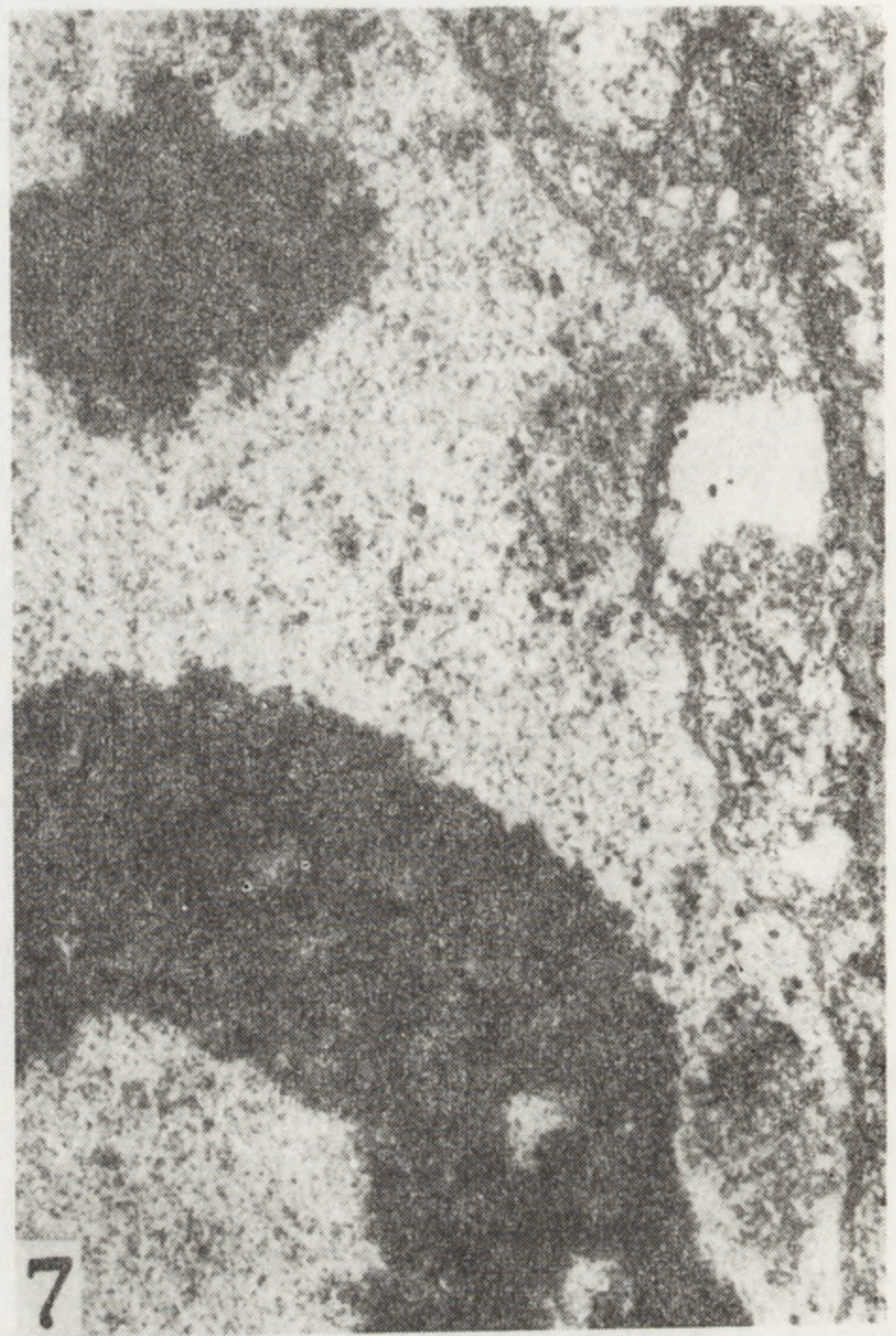
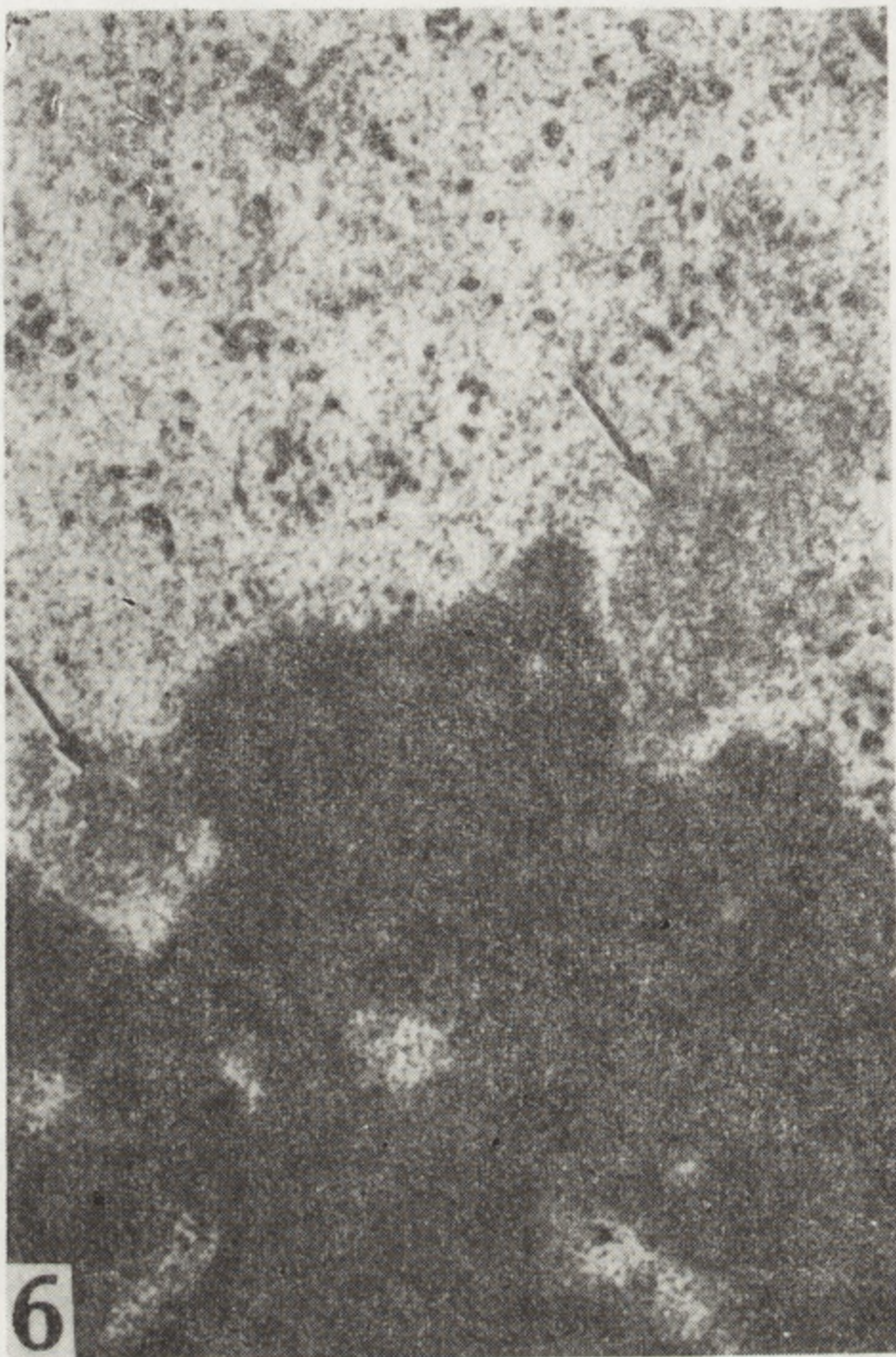
1.4. MERYSTEM KORZENIOWY *RAPHANUS SATIVUS*

Raphanus sativus jest gatunkiem o niskiej zawartości DNA (3,1 pg/komórkę, przy czym powtarzalny DNA stanowi 18% [8]) i typowych jądrach chromocentrycznych (typ areticulate). Duże chromocentry zlokalizowane są na obwodzie jądra oraz przy jąderku; pozostała chromatyna występuje w postaci luźnej. Badania Lorda i Lafontaine'a [88] z zastosowaniem autoradiografii ultrastrukturalnej wykazały, że w tym typie jądra wszelkie zmiany organizacji chromatyny dostrzegalne na poziomie mikroskopu elektronowego i świetlnego w okresie interfazy ograniczają się do chromocentrów. Na początku fazy S po pulsowym, 15 min inkubowaniu w ^3H tymidynie, autoradiograficzne ziarna występują wyłącznie na terenie chromatyny luźnej; chromocentry są niewyznakowane i wykazują strukturę skondensowaną (ryc. 6). W średniopóźnej fazie S intensywność wyznakowania chromatyny rozproszonej zmniejsza się, a jednocześnie ziarna autoradiograficzne pojawiają się na peryferiach chromocentrów, które zatracają ostry kontur (ryc. 7). W okresie późnej fazy S chromocentry ulegają prawie całkowitej dekondensacji i włączają ^3H tymidynę również w strefie centralnej (ryc. 8). Autoradiogramy jąder, które inkubowano w ^3H tymidynie w późnej fazie S, a utrwalono po 4 godz. postinkubacji, tj. w fazie G_2 , dowodzą, że chromocentry po okresowej dekondensacji w momencie replikacji DNA ulegają ponownej kondensacji (ryc. 9). W okresie profazy chromocentry stają się centrum kondensacji chromatyny luźnej, wskutek tego wydłużają się silnie w kierunku równoległym do otoczki jądrowej i przekształcają w chromosomy.

1.5. NICI SPERMATOGENICZNE *CHARA VULGARIS*

W odróżnieniu od poprzednich przykładów, które reprezentują najbardziej rozpowszechniony w przyrodzie typ cyklu komórkowego $G_1 + S + G_2 + M$, cykl nici spermatogenicznych *Chara* należy do typu $S + G_2 + M$, a więc jest pozbawiony fazy G_1 [117]. Nici spermatogeniczne *Chara* wykazują spontaniczną synchronizację podziałów mitotycznych [117, 146] uwarunkowaną obecnością licznych plazmodesm łączących sąsiednie komórki [72]. Jest to obiekt szczególnie dogodny do badania zmian aktywności metabolicznej i struktury komórki w interfazie ze względu na ścisłą korelację długości komórki z określoną fazą cyklu [48, 112, 114, 115, 117]. Charakterystyczną cechą tego obiektu jest zmniejszanie się rozmiarów komórek mitotycznych w kolejnych podziałach w związku z procesem morfogenetycznym prowadzącym do powstania spermatyd [118]. Obiektem badań ultrastrukturalnych były nici w stadium 32-komórkowym [73].

Sekwencję zmian ultrastruktury jądra w cyklu wyznaczano metodą



wyodrębniania komórek o zbliżonej długości i takim samym typie strukturalnym jądra (analizowano wyłącznie podłużne przekroje centralne nici). Średnia długość komórki w każdej populacji, składającej się z 30–65 komórek, wyznaczała kolejność występowania danego typu strukturalnego jądra. Poprawność ustalenia tej kolejności potwierdziła analiza rozkładu długości komórek każdego typu. Rozrzut rozmiarów w kolejnych populacjach jest konsekwencją naturalnej zmienności występującej w rozmiarach komórek mitotycznych. Populację komórek, które kończą fazę S, identyfikowano przez wyznaczanie rozmiarów komórek o charakterystycznym dla późnej fazy S punktowym układzie ziaren autoradiograficznych uzyskanym po podaniu ^3H tymidyny.

Początek fazy S przypada w tym cyklu na wczesną telofazę i poprzedza odtworzenie otoczki jądrowej (ryc. 10). Najintensywniejsza synteza DNA występuje po utworzeniu się ściany komórkowej pomiędzy komórkami potomnymi, w najmniejszych komórkach posttelofazowych (ryc. 12). W średniej fazie S zachodzi znaczna dekondensacja chromatyny i powstają liczne wpuklenia otoczki jądrowej zwiększające powierzchnię jądra (ryc. 13). W późnej fazie S, w której występuje punktowe włączanie ^3H tymidyny, obserwuje się zanikanie chromocentrow i zwiększanie stopnia kondensacji chromatyny. Chromatyna zwarta tworzy charakterystyczną dla jądra retikularnego sieć (ryc. 14). Wczesna faza G_2 wyróżnia się występowaniem dużych, płatowatych skupień chromatyny zwartej (ryc. 15). Wczesnośrodkowa faza G_2 to okres najniższej zawartości chromatyny zwartej (ryc. 16). W średniopóźnej fazie G_2 ponownie pojawia się chromatyna zwarta w postaci dość równomierne rozmieszczonych drobnych grudek układających się w niewyraźną sieć (ryc. 17). W późnej fazie G_2 zawartość chromatyny skondensowanej jest wysoka, sieciowata struktura jądra wyraźna, a obrys jądra silnie zaakcentowany przez przylegającą do otoczki chromatynę zwartą (ryc. 18). Przejście z późnej fazy G_2 do profazy jest zauważalne dzięki po-

Ryc. 6–9. Autoradiogramy ultrastrukturalne z jąder merystemu korzeniowego *Raphanus sativus* inkubowanych 15 min w ^3H tymidynie. Ryc. 6 — wczesna do środkowej fazy S, ziarna autoradiograficzne zlokalizowane nad chromatyną luźną, chromocentry — ozn. strzałką — nie wyznakowane, pow. około 28 000 \times ; Ryc. 7 — środkowa do późnej S, ziarna autoradiograficzne widoczne na peryferiach chromocentrow o niewyraźnych konturach i nad chromatyną luźną, pow. około 22 000 \times ; Ryc. 8 — późna faza S, skupienia autoradiograficznych ziaren nad chromocentrami, pow. około 30 000 \times ; Ryc. 9 — fragment jądra utrwalonego w 4 godz. po inkubacji w ^3H tymidynie, która miała miejsce w okresie późnej fazy S, tj. po przejściu w fazę G_2 , chromocentry ponownie skondensowane, pow. około 31 000 \times . Według Lorda i Lafontaine'a [88], J. Cell Sci., Printed in Great Britain

jawianiu się cienkiej, jasnej przestrzeni pomiędzy chromatyną zwartą i otoczką jądrową, które łączą się ze sobą przez delikatne fibryle (por. ryc. 19a i 19b).

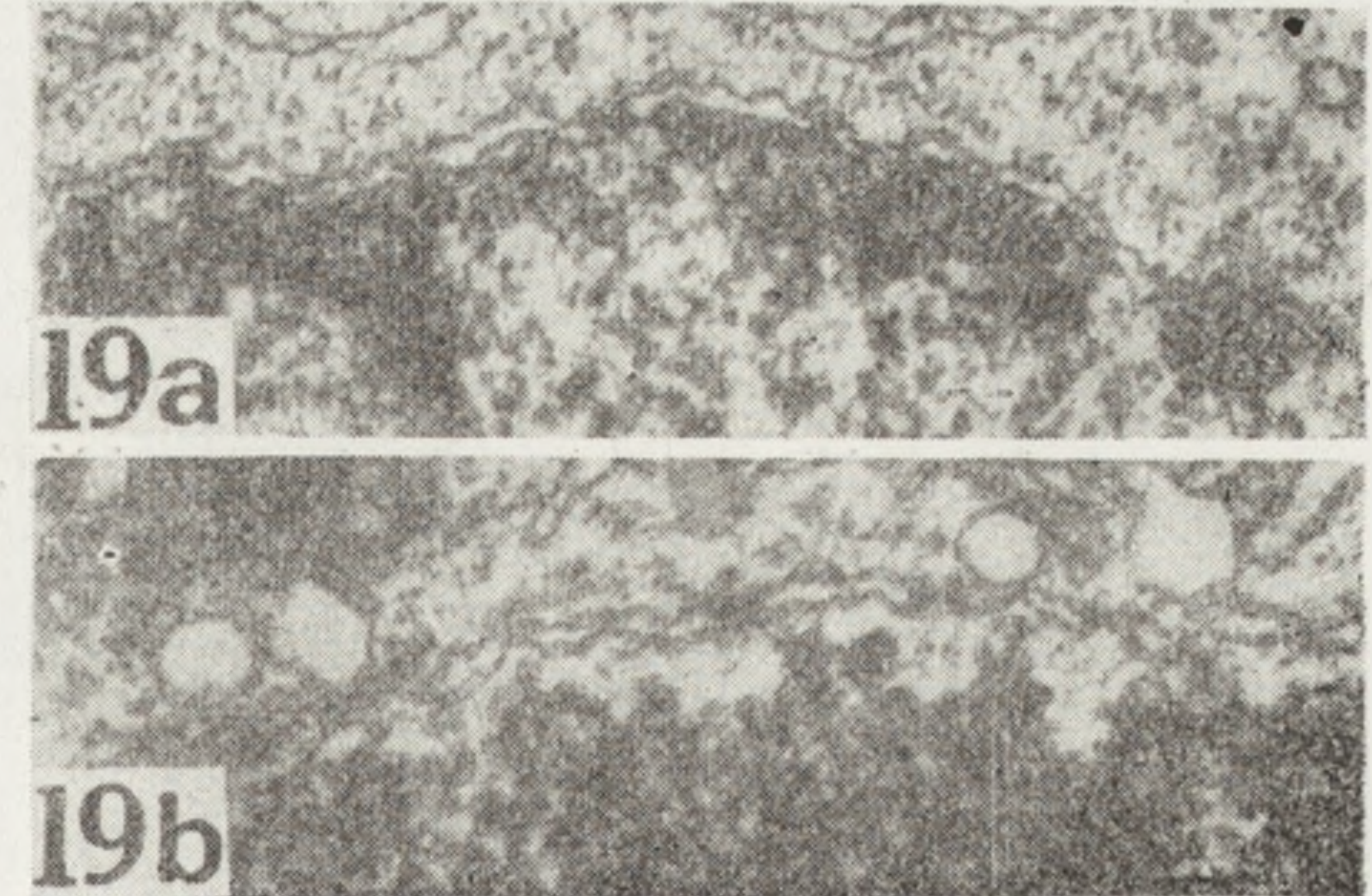
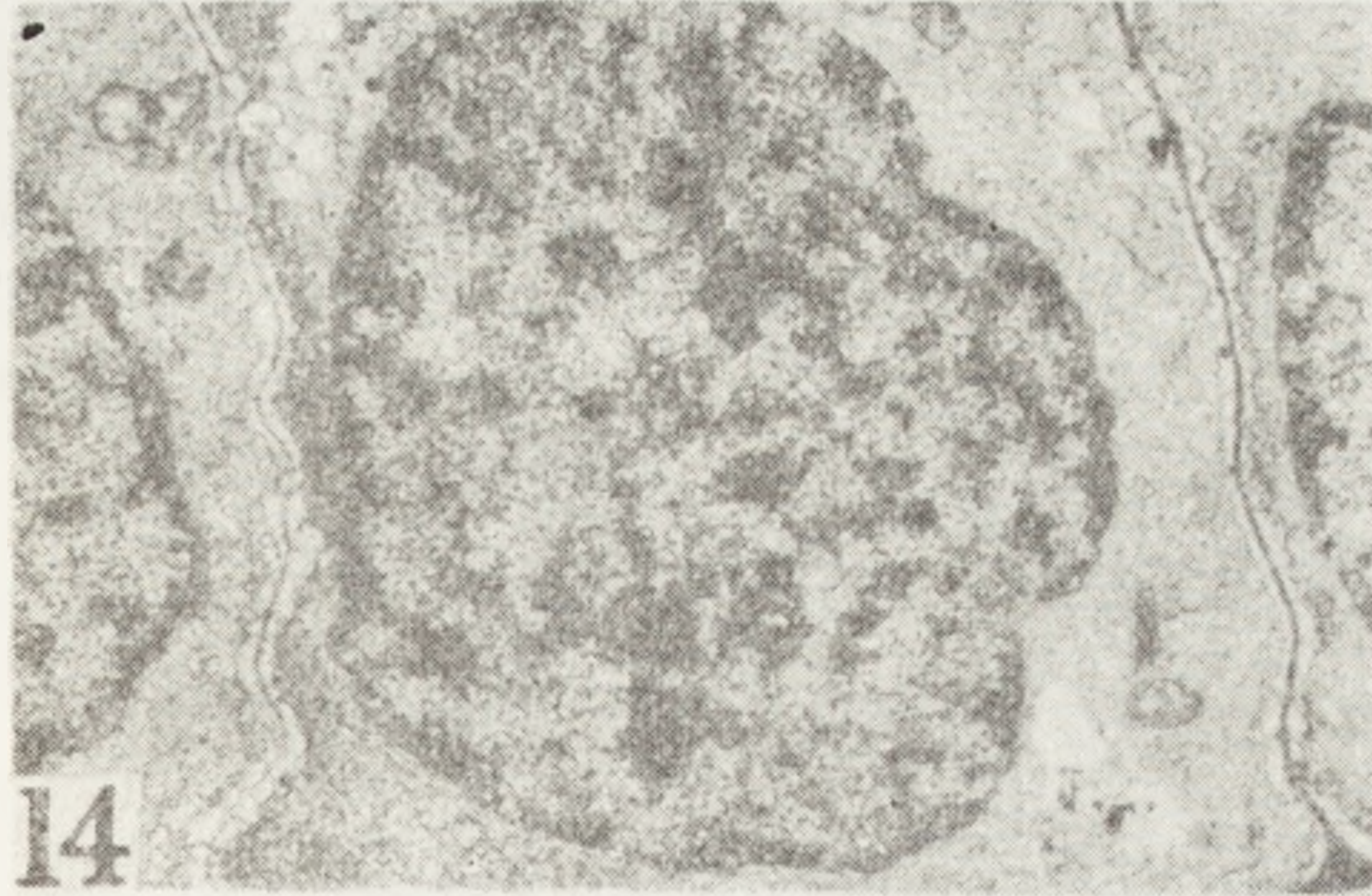
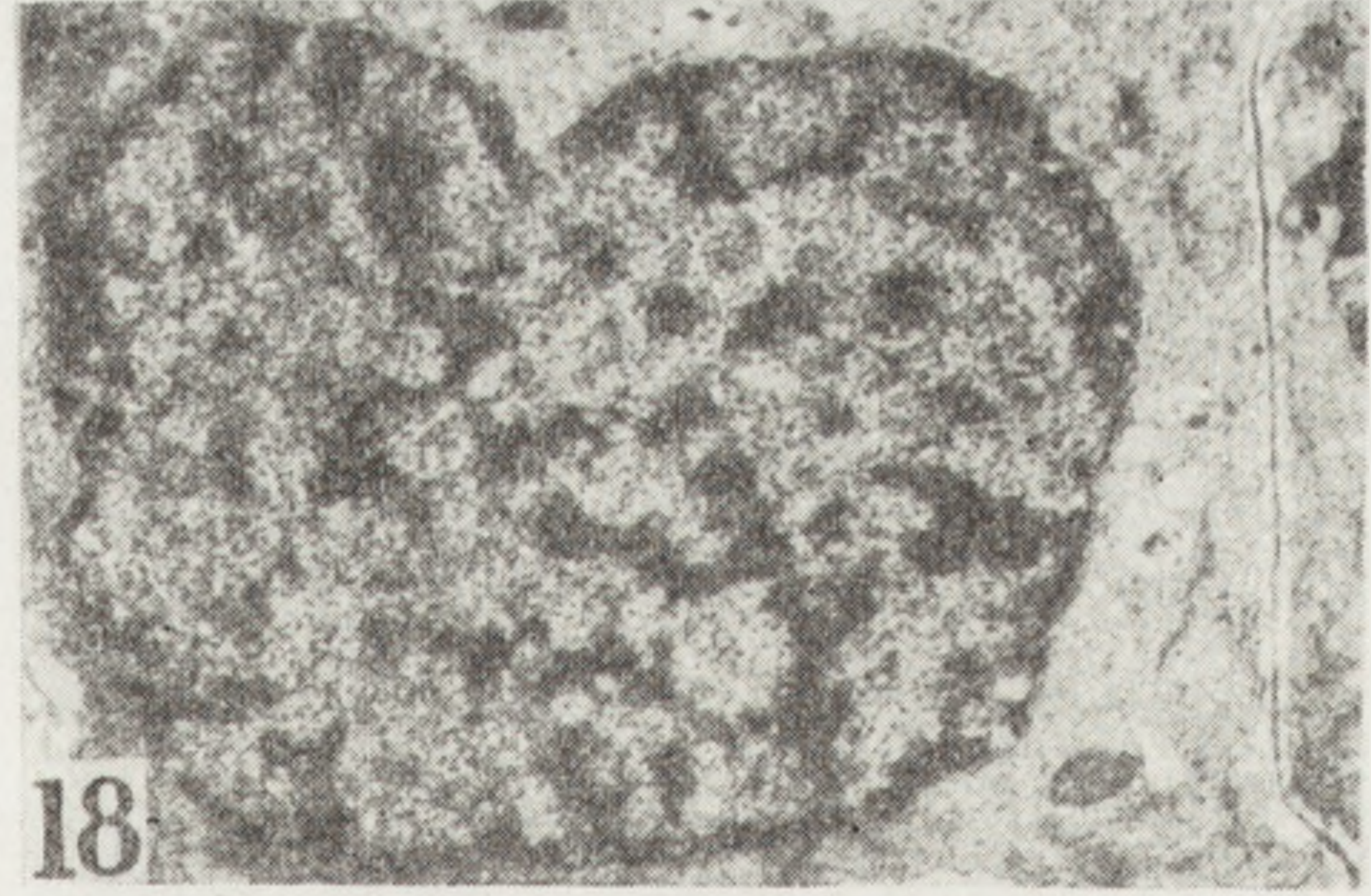
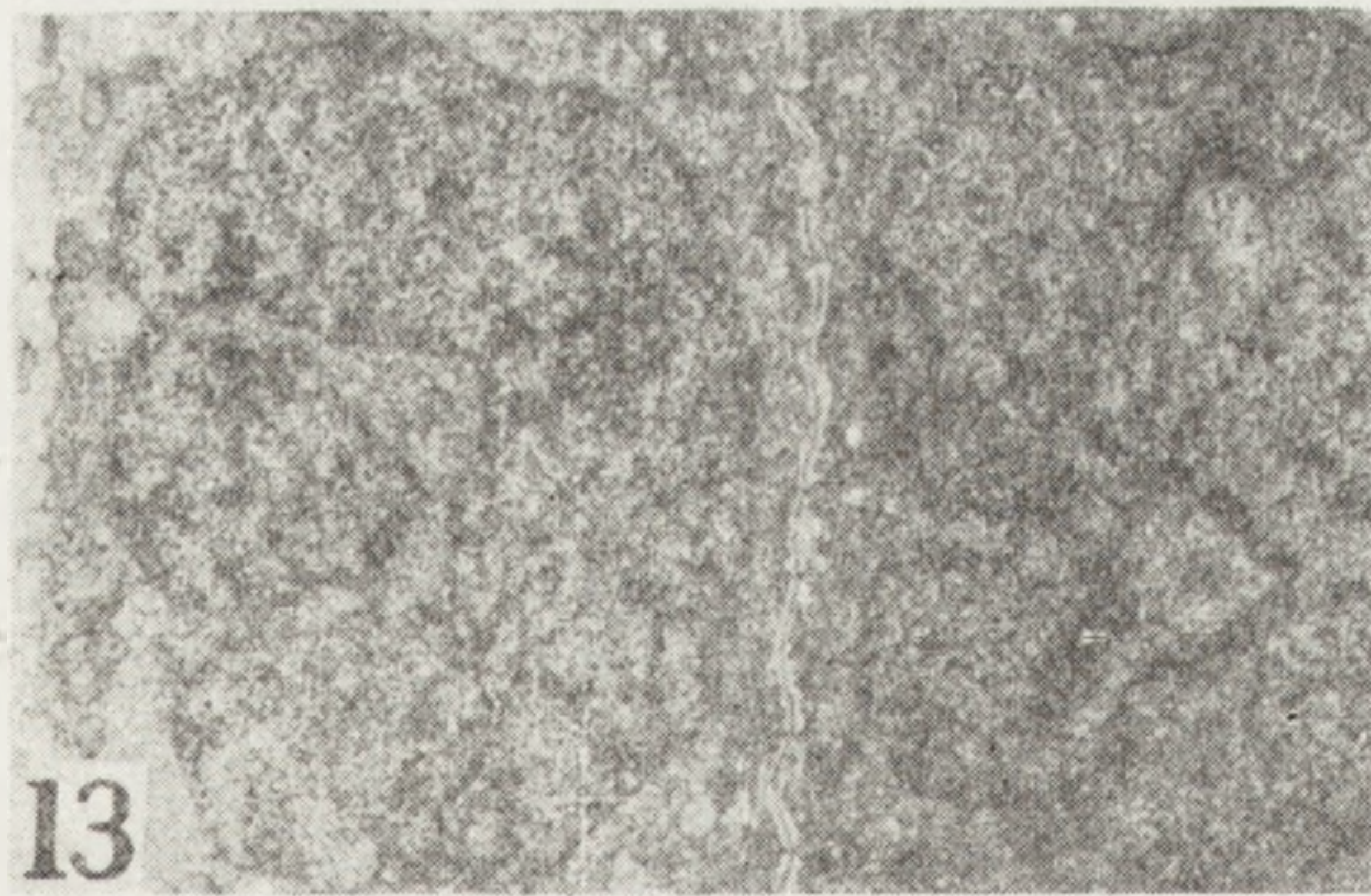
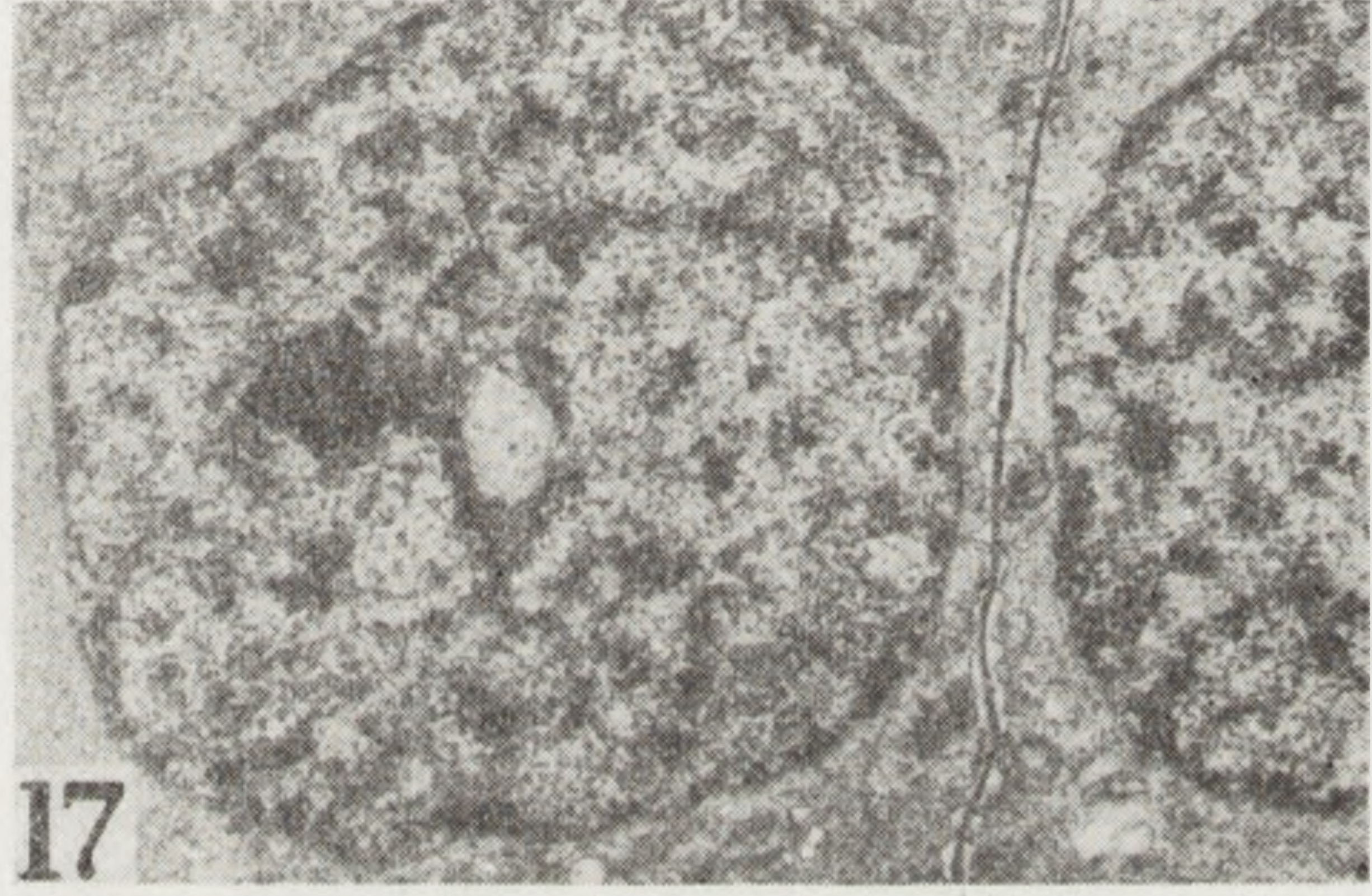
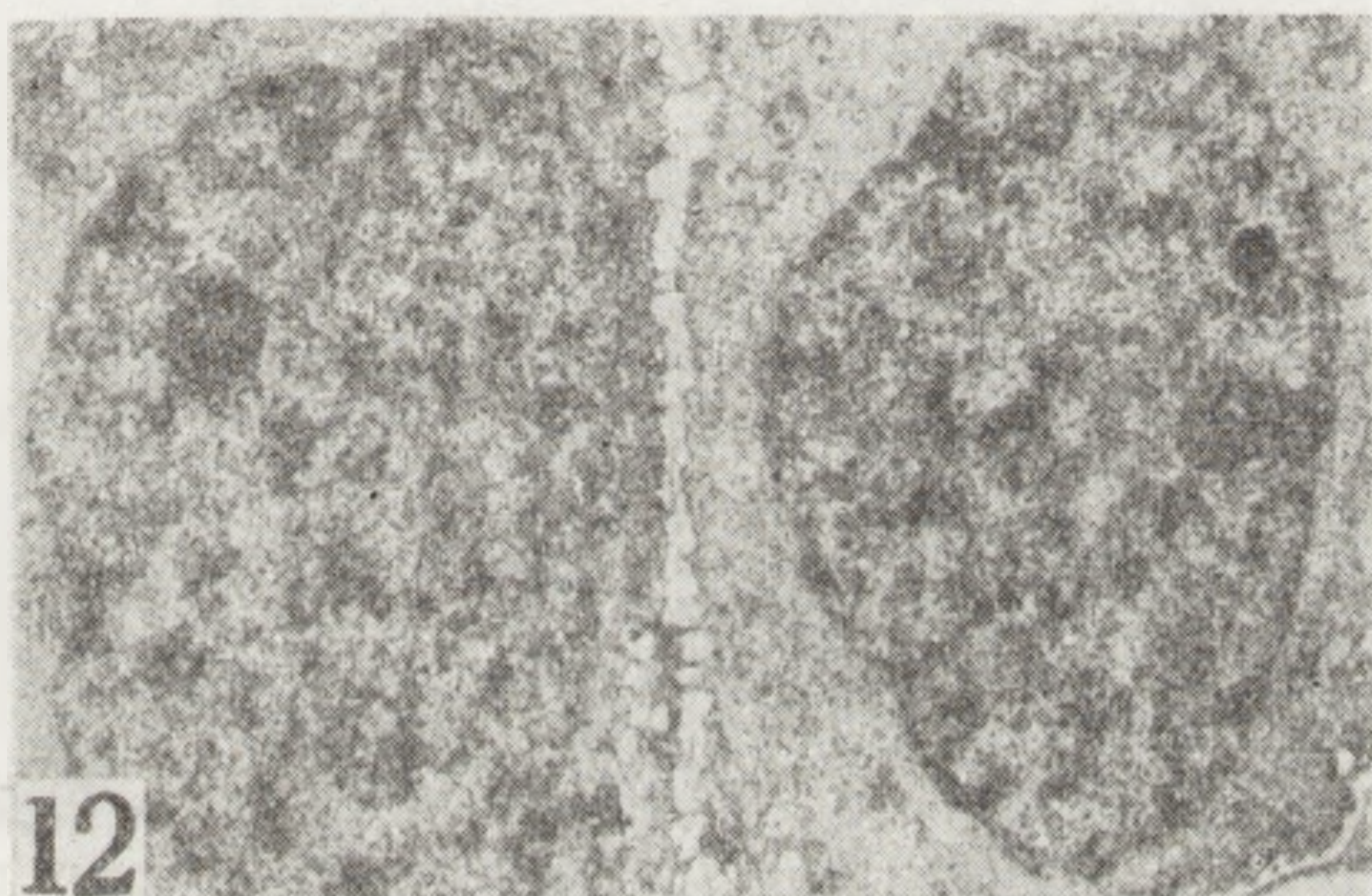
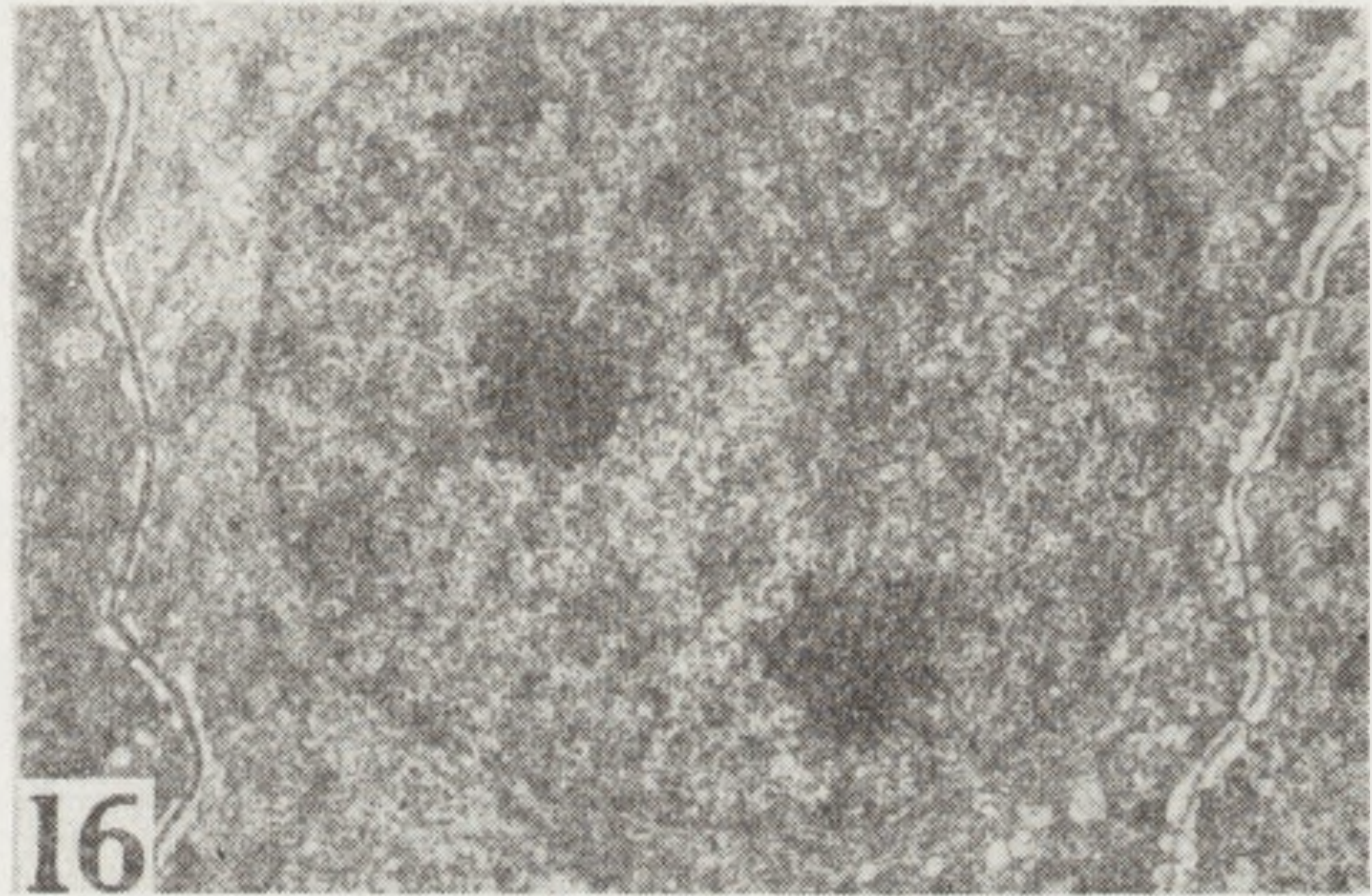
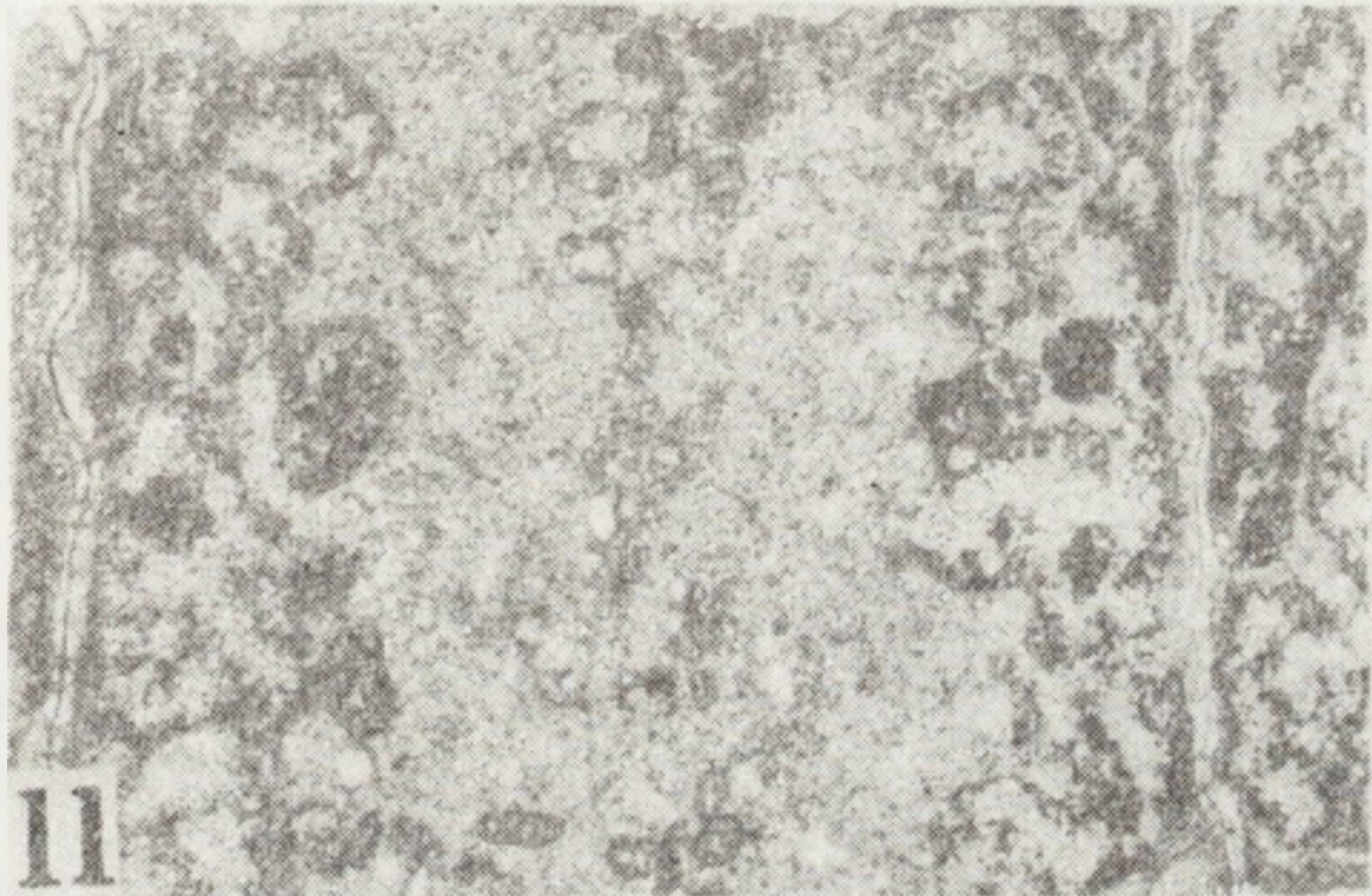
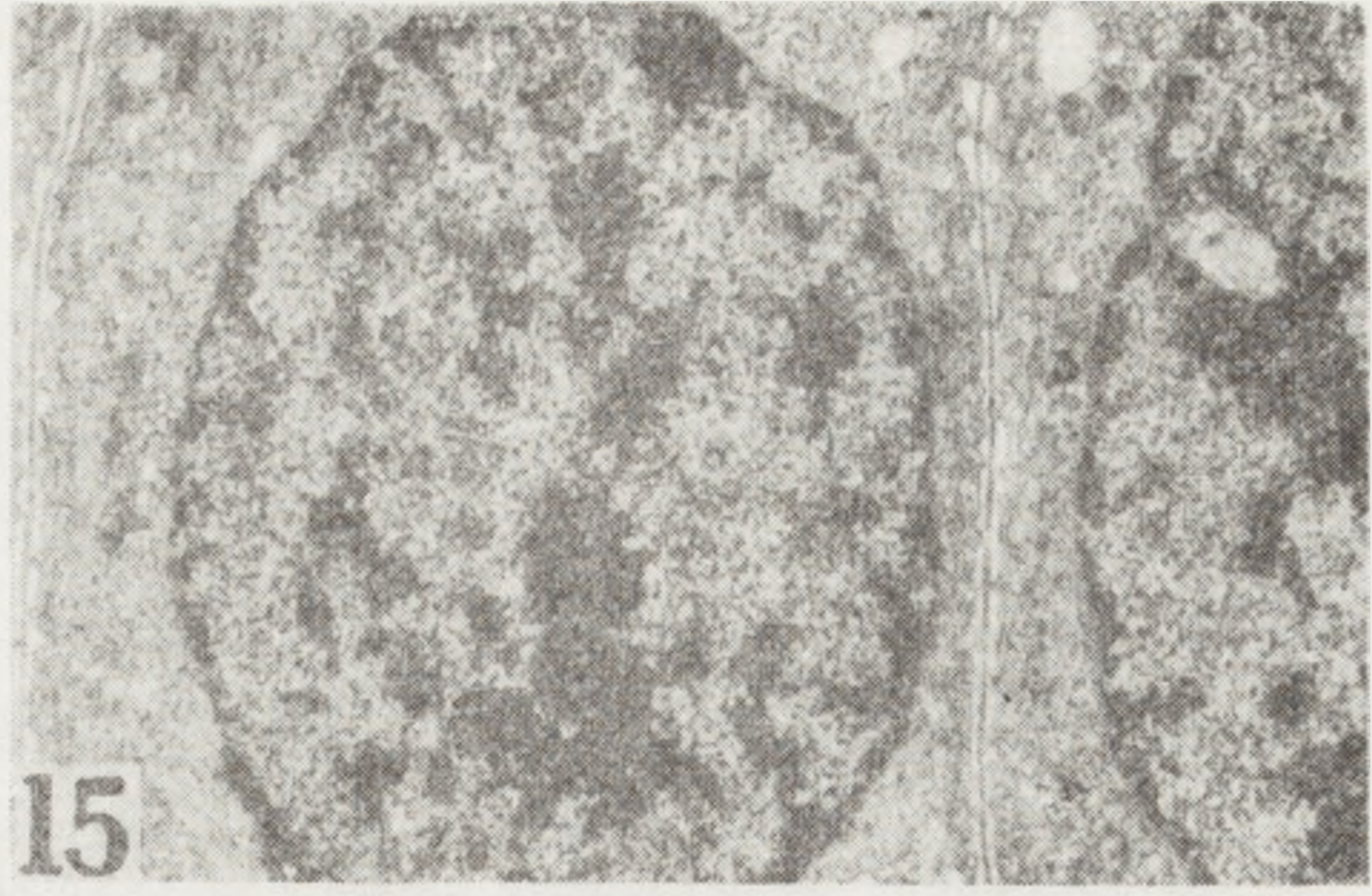
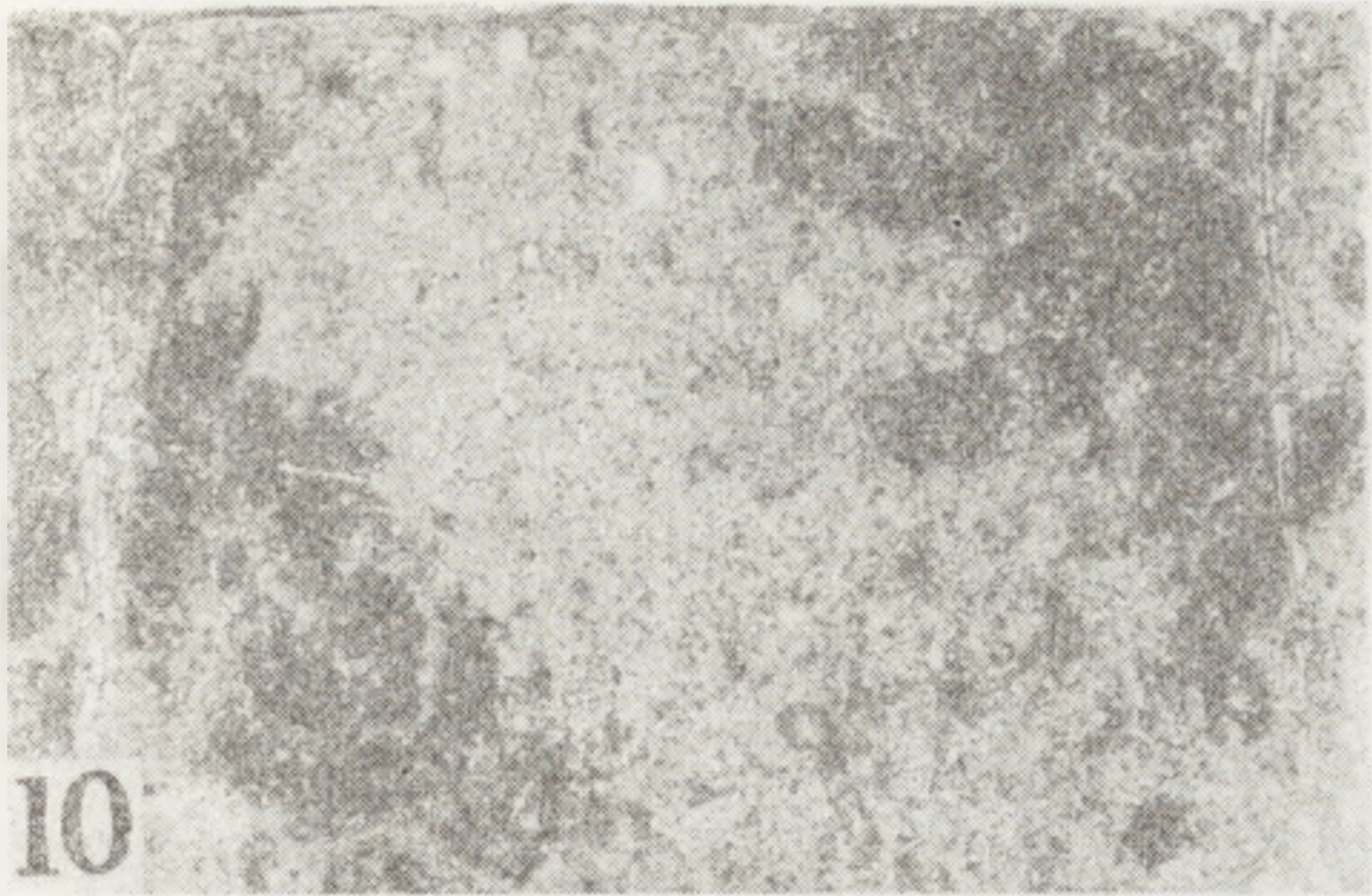
1.6. WIELOJĄDROWE PLAZMODIUM *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

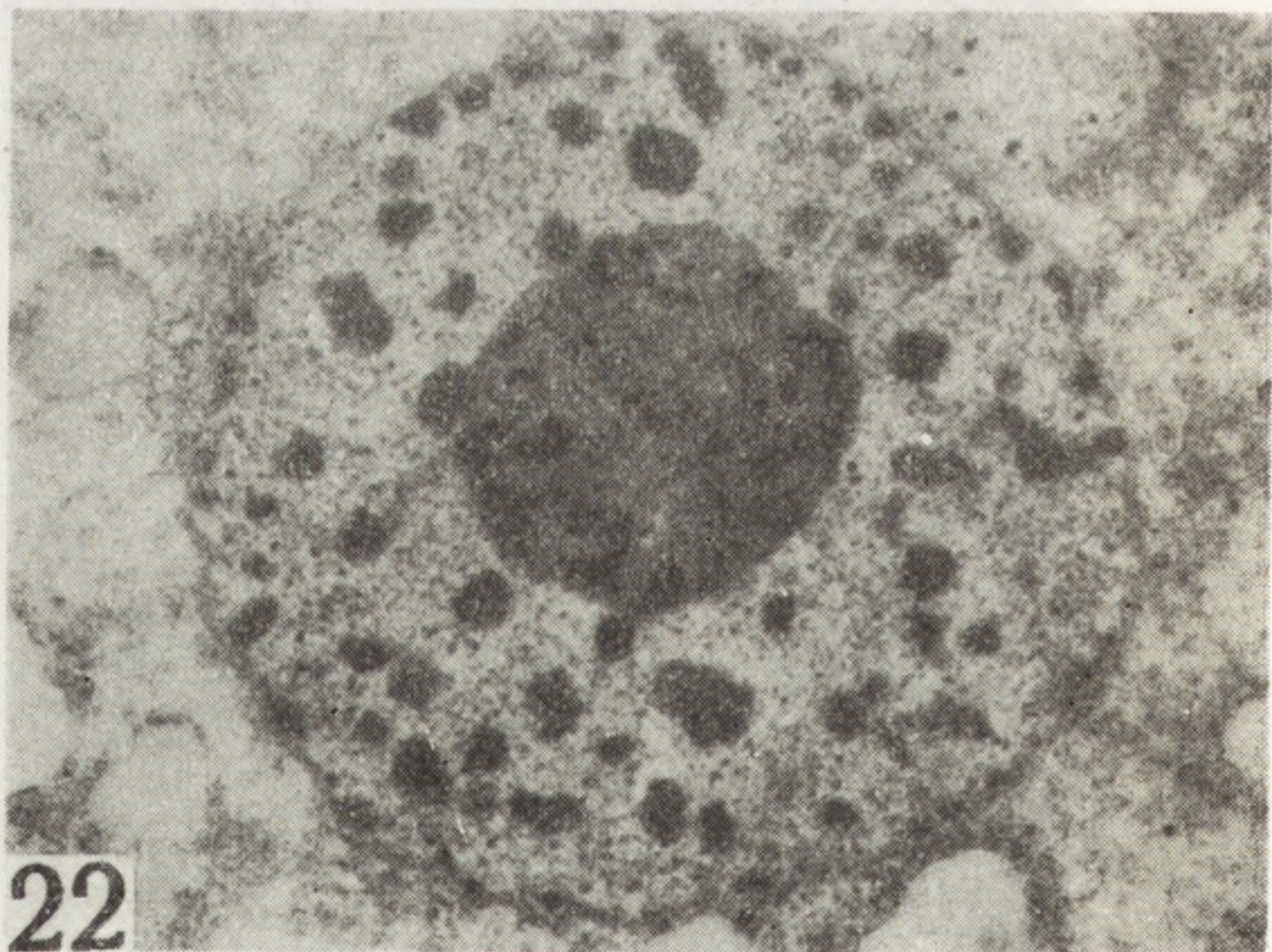
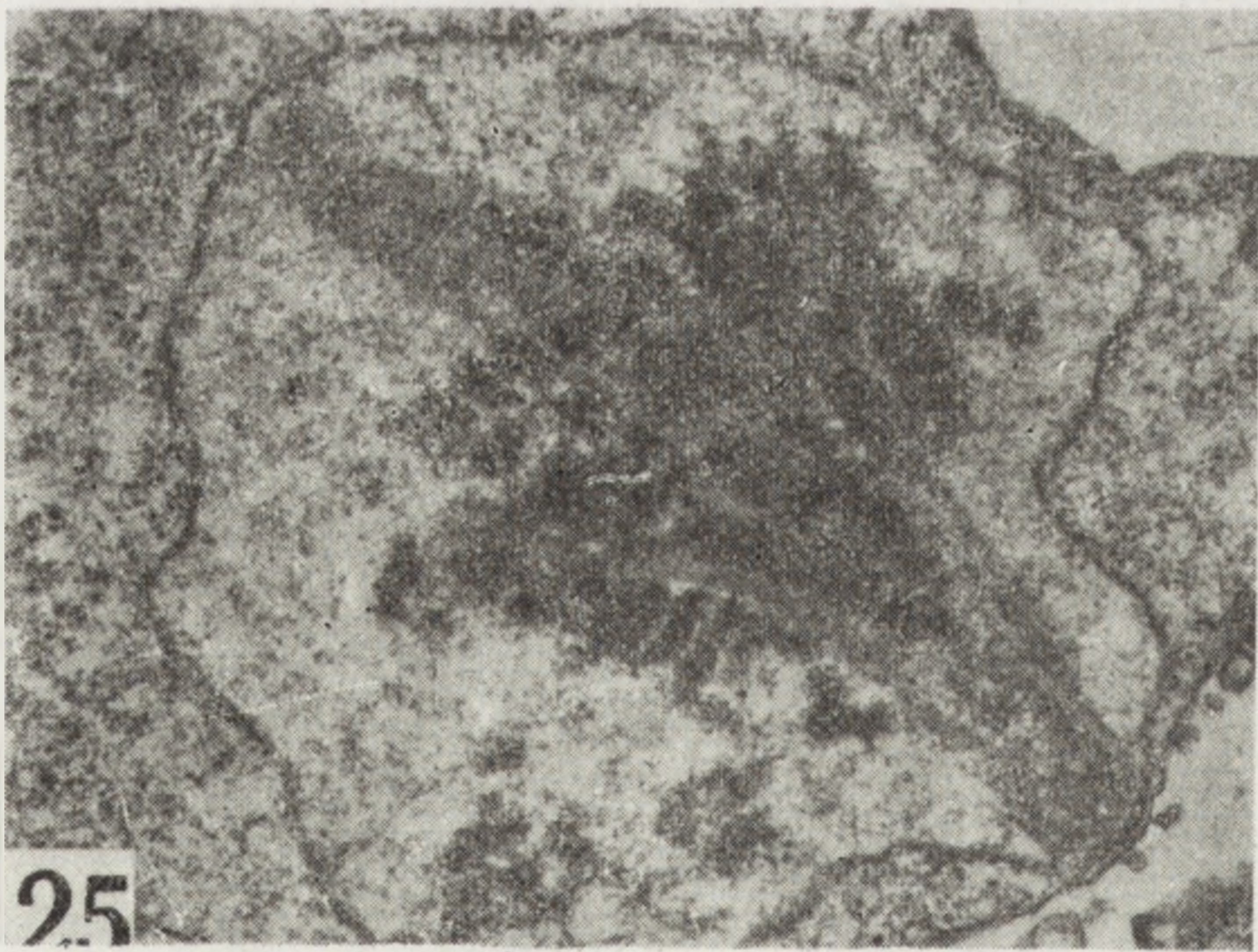
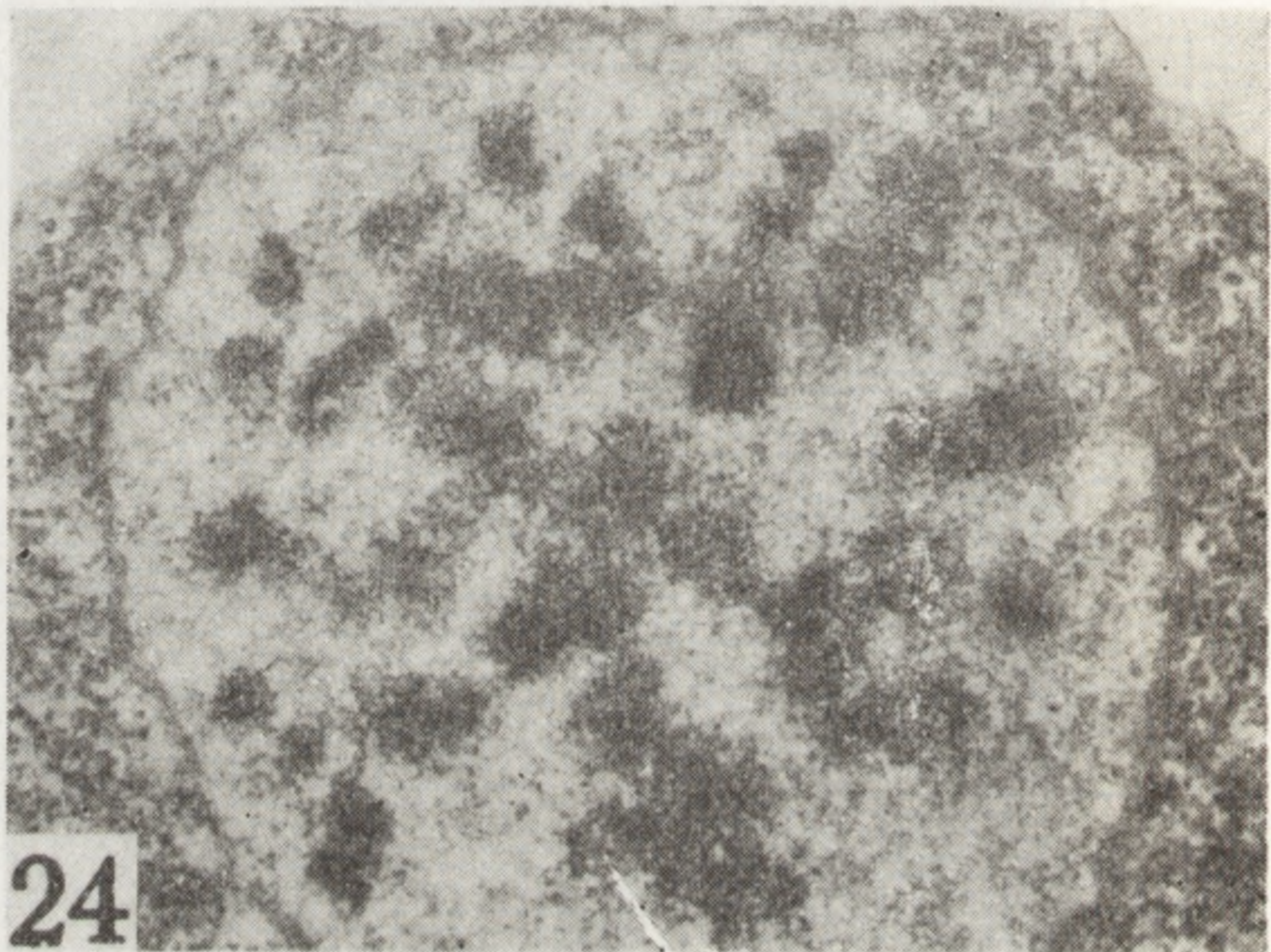
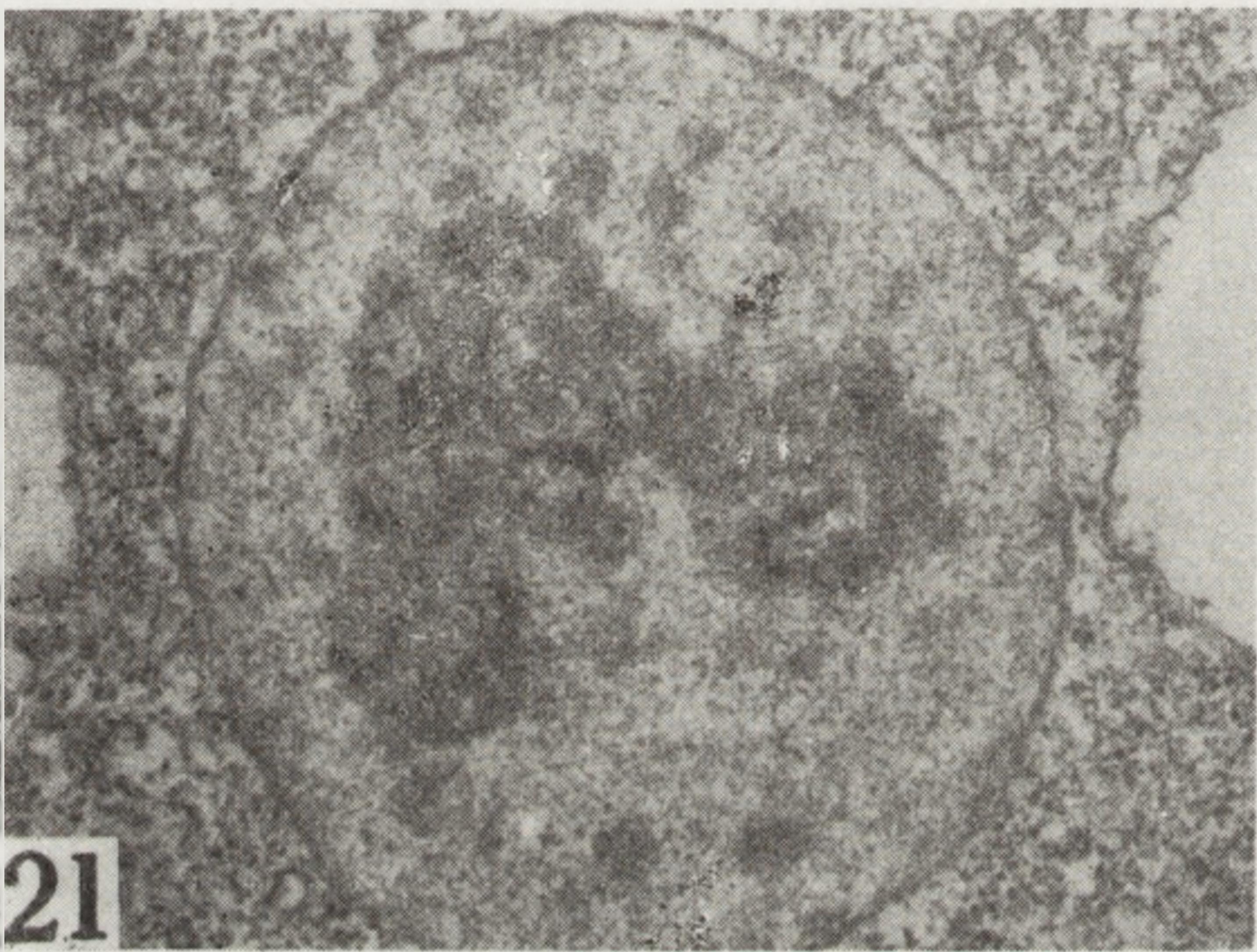
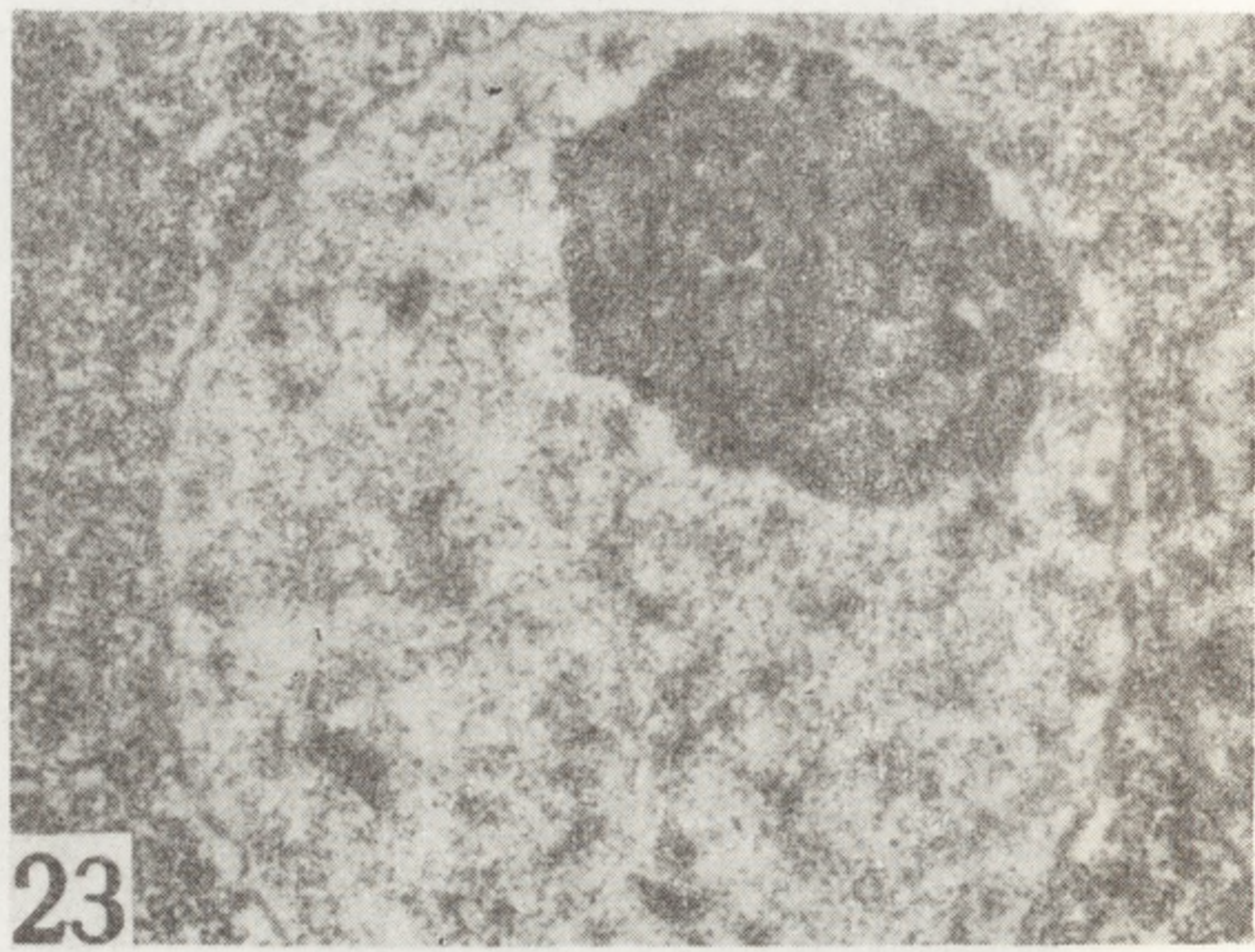
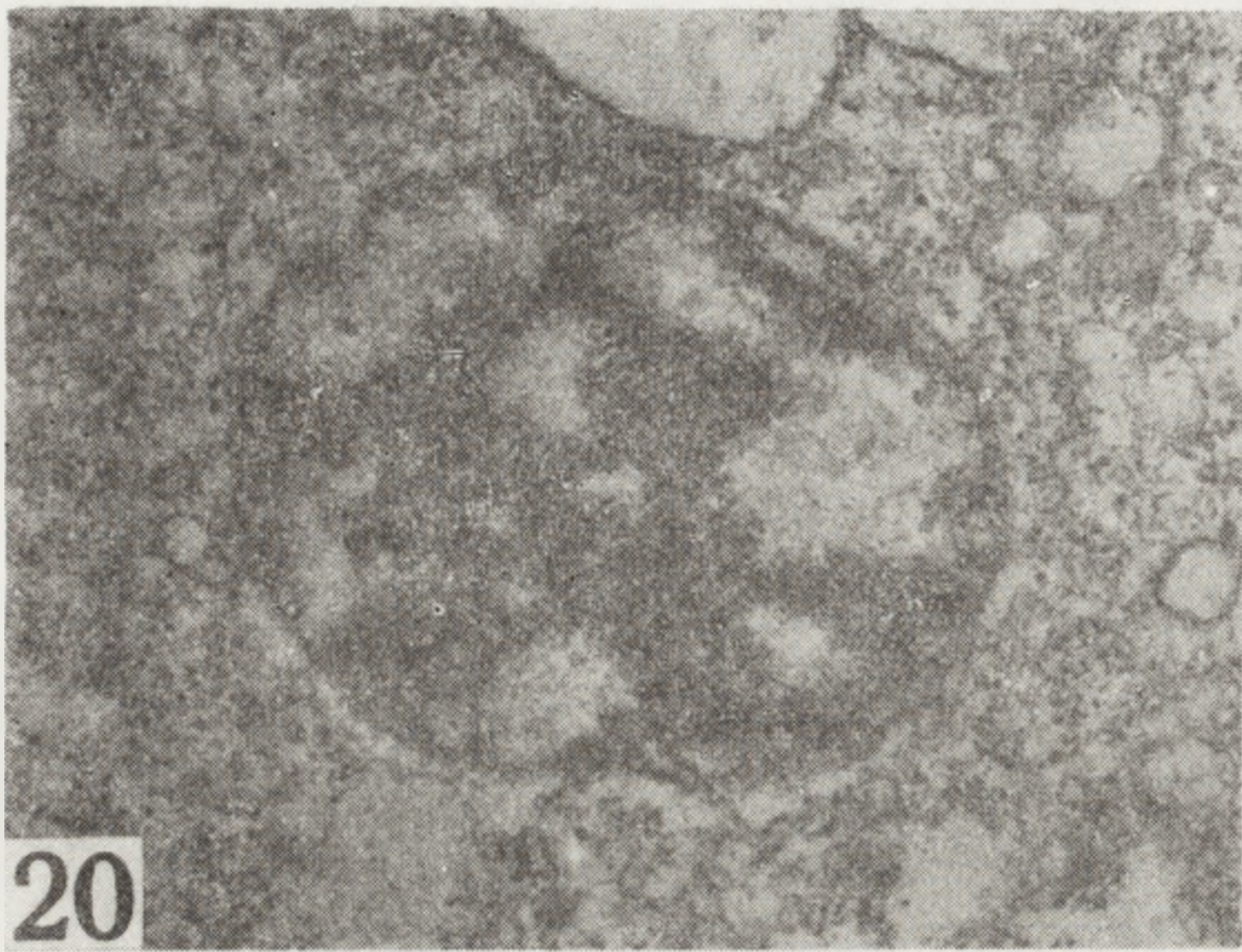
Cykl *Physarum polycephalum* podobnie, jak *Chara vulgaris*, jest pozbawiony fazy G_1 (typ $S + G_2 + M$). Szczególną cechą tego cyklu jest tzw. mitoza zamknięta, tj. wewnątrz otoczki jądrowej. Ze względu na naturalną synchronizację cyklu umożliwiającą oznaczanie poszczególnych jego faz, a także uzyskiwanie materiału w ilościach odpowiednich do badań biochemicznych, jest to obiekt szeroko stosowany w badaniach biologii cyklu komórkowego (ref. [143]).

Ultrastrukturalne badania zmian struktury jądra w cyklu, uwzględniające różne jego aspekty, były przeprowadzane w różnych ośrodkach [22, 36, 51, 52, 68, 89]. Wykazano, że faza S, zajmująca około 2,5–3 godz. z 8-godzinnego cyklu, rozpoczyna się tuż po zakończeniu mitozy (ryc. 20) w jądrach zawierających dużą ilość chromatyny zwartej [68, 89]. Włączenie 3H tymidyny obserwowano na całym obszarze jądra nad chromatyną luźną przylegającą do chromatyny zwartej [68]. W bardziej zaawansowanej fazie S dominuje chromatyna luźna, chromatyna zwarta zaś tworzy niewielkie grudki o stosunkowo małej gęstości elektronowej (ryc. 21). W tym okresie włączenie 3H tymidyny odbywa się na terenie chromatyny luźnej bądź na brzegu chromatyny zwartej [68]. W późnej fazie S grudki chromatyny zwartej stają się bardziej kontrastowe. W fazie G_2 (ryc. 22) zawartość chromatyny skondensowanej jest wyższa niż w późnej fazie S [22]. Przejście do wczesnej profazy wyznacza przemieszczanie się jąderka ku otoczce jądrowej i zmiana jego struktury [51, 89]. Otoczka jądrowa w kolejnych fazach mitozy staje się coraz bardziej pofałdowana (ryc. 23–25).

W profazie u tego obiektu nie obserwuje się wyraźnego zwiększania się stopnia kondensacji chromatyny, charakterystycznego dla kolejnych etapów profazy innych organizmów, lecz proces odwrotny — zmniejszanie stopnia kondensacji chromatyny. W późnej profazie formujące się chromosomy są mniej gęste elektronowo niż grudki chromatyny zwar-

Ryc. 10–19. Nici spermatogeniczne *Chara vulgaris* w stadium 32-komórkowym. Ryc. 10–14 — kolejne etapy fazy S; Ryc. 15–18 — kolejne typy strukturalne jądra w fazie G_2 (objaśnienia w tekście). Pow. około $4800 \times$ (pomniejszone w stosunku do oryginału); Ryc. 19a — chromatyna przylegająca do otoczki jądrowej w późnej fazie G_2 ; Ryc. 19b — wczesna profaza — chromatyna oddzielona od otoczki jądrowej (pow. około $30\,000 \times$). Według Kwiatkowskiej i Maszewskiego [73], Protoplasma, Springer Verlag





Ryc. 20-25. Jądra plazmodium *Physarum polycephalum* w różnych fazach cyklu. Ryc. 20 i 21 — faza S; Ryc. 22 — faza G₂; Ryc. 23 — późna profaza; Ryc. 24 — prometafaza; Ryc. 25 — metafaza. Według Lorda i wsp. [89], J. Cell Sci., Printed in Great Britain

tej w późnej interfazie (ryc. 22 i 23). Wyodrębniają się one jako wyraźnie gęste struktury w okresie prometafazy (ryc. 24). Inną szczególną cechą tego cyklu jest replikacja rDNA w fazie G_2 [52, 89].

2. OGÓLNY CHARAKTER ZMIAN STRUKTURY JĄDRA W INTERFAZIE

2.1. FAZA G_1

Zarówno w przedstawionych przykładach, jak i w innych obiektach [3, 66, 67, 148, 149] przebieg zmian ogólnej architektury jądra w fazie G_1 jest w zasadzie podobny. Zmiany te polegają na zwiększaniu się stopnia dekondensacji chromatyny do poziomu charakterystycznego dla danego typu strukturalnego oraz wzroście rozmiarów jądra. Co się tyczy chromocentrów, to zdaniem niektórych autorów [102, 103] ich liczba i wielkość zmniejsza się pod koniec fazy G_1 . Rozważana jest zarówno możliwość ich dekondensacji, jak i częściowego łączenia się ze sobą.

2.2. FAZA S

W typowym cyklu komórkowym, składającym się z fazy G_1 , S, G_2 , w jądrach o strukturze siateczkowatej, chromatyna zwarta ulega na początku fazy S znacznej dekondensacji, która nie obejmuje chromocentrów. W jądrach o wysokiej zawartości DNA stopień dekondensacji chromatyny jest niższy niż w jądrach o niskiej zawartości DNA. W dalszych etapach fazy S struktura jądra zmienia się w odwrotnym kierunku niż w fazie G_1 , zachodzi bowiem zwiększanie się stopnia kondensacji chromatyny i pogrubianie pasm chromonemy osiągające maksimum w późnej fazie S [3, 66, 81, 102, 103, 106]. W jądrach o dużej zawartości DNA i wysokiej zawartości sekwencji powtarzalnych, zmiany te są niewielkie [81]. Skrajny przypadek stanowią jądra euchromocentryczne, w których euchromatyna występuje w postaci całkowicie zdekondensowanej przez całą fazę S [88].

W cyklu pozbawionym fazy G_1 , u *Chara vulgaris* [73] i *Physarum polycephalum* [51, 68, 89] w fazie S najpierw zachodzi zwiększanie stopnia dekondensacji chromatyny, analogicznie jak w fazie G_1 , a dopiero w końcu fazy S rozpoczyna się kondensacja chromatyny, podobnie jak w końcowych etapach fazy S cyklu o typowym przebiegu.

Zagadnienie zmian struktury chromocentrów w fazie S jest związane z dwoma odrębnie dyskutowanymi w piśmiennictwie problemami, wymagającymi szerszego omówienia, tj. asynchroniczność replikacji hetero- i euchromatyny oraz stopień kondensacji chromatyny w momencie syntezy DNA.

2.2.1. Asynchroniczność replikacji heterochromatyny i euchromatyny. Lima de Faria [85] po raz pierwszy wykazał, że heterochromatynowe

odcinki chromosomów replikują DNA w późnej fazie S. Liczne badania autoradiograficzne nad przebiegiem cyklu komórkowego są zgodne z tą obserwacją (m. in. [6, 7, 39, 69, 81, 88, 117]). Znalazła ona także potwierdzenie w precyzyjnych badaniach cytogenetycznych opierających się na wzorach prążkowych chromosomów. Skojarzenie tych badań z techniką znakowania ^3H tymidyną lub bromodezoksyurydyną umożliwiło wykazanie, że heterochromatynowe prążki Q lub G ulegają replikacji w późnej fazie S (ref. [61, 138]). Istnieje jednak szereg doniesień o występowaniu wczesnej replikacji heterochromatyny inicjującej fazę S. Opisano ją u storczyka i wątrobowca [90, 91, 144, 145], u myszy [59], a także u *Allium carinatum* ([106], por. ryc. 5). Podobne obserwacje pojawiły się również w pracach cytogenetycznych, gdyż niektórzy autorzy podają, iż część prążków C uważanych za heterochromatynowe ulega replikacji we wczesnej fazie S (ref. [61]). Z kolei nieheterochromatynowe, przycentromerowe obszary chromosomów replikują DNA w późnej fazie S (ref. [116]).

Na podstawie ultrastrukturalnych badań autoradiograficznych cyklu komórkowego wielu autorów przyjmuje, że na początku fazy S włączanie ^3H tymidyny odbywa się na obszarach euchromatyny (m. in. [19, 81, 88]). Obserwacje te są zgodne z wynikami badań chromosomów człowieka, które wskazują, że faza S rozpoczyna się od replikacji euchromatynowych prążków R (ref. [138]). Nie wiadomo więc, czy wczesna replikacja heterochromatyny jest zjawiskiem występującym tylko w niektórych organizmach, czy też rozbieżność obserwacji jest spowodowana niedostateczną ich precyzją.

2.2.2. Stan kondensacji chromatyny a synteza DNA. W przypadku euchromatyny związek stopnia jej kondensacji z procesem replikacji jest trudny do wykazania ze względu na to, że jest ona aktywna w procesie transkrypcji (odbywającym się również w fazie S), któremu towarzyszy dekondensacja (por. rozdz. 3). Problem ten jest natomiast szczególnie wyrazisty w odniesieniu do heterochromatyny, gdyż zgodnie z definicją, zawiera ona sekwencje DNA o wysokiej powtarzalności, nie przejawia aktywności transkrypcyjnej i w trakcie interfazy nie ulega dekondensacji związanej z transkrypcją [116]. W licznych publikacjach przytaczane są obserwacje mające świadczyć o tym, że również podczas replikacji heterochromatynowe odcinki zachowują stan skondensowany. Przykładów takich dostarczyły badania chromosomów gruczołów ślinowych *Diptera*, w których replikacja, w przeciwieństwie do transkrypcji, zachodzi, zdaniem szeregu autorów, wyłącznie w prążkach skondensowanych [10, 47, 128, 132, 133]. Za taką możliwością zdawały się przemawiać również niektóre obserwacje dotyczące chromatyny płciowej oraz

chromocentrów, w których włączanie ^3H tymidyny obserwowano w stanie skondensowanym [24–26, 65, 86, 99, 104, 125, 139, 140, 153, 154]. Odrębne stanowisko zajmuje Nagl [105, 106], który uważa, że wczesna replikacja heterochromatyny u *Allium carinatum* nie jest związana z dekondensacją chromocentrów, natomiast późna replikacja heterochromatyny odbywa się w chromocentrach zdekondensowanych. Badania większości autorów dowodzą jednak, że zarówno euchromatyna, jak heterochromatyna replikuje DNA w stanie zdekondensowanym [6, 7, 19, 42, 54, 68, 69, 71, 81, 88, 94, 95]. Istotnych danych na ten temat dostarczyły m. in. eksperymenty Kuroiwy [68, 69] przeprowadzone na komórkach *Crepis capilaris* i *Physarum polycephalum* z zastosowaniem autoradiografii wysokorozdzielczej. Autor stwierdził, że po 6 min pulsowej inkubacji w ^3H tymidynie, we wczesnej i środkowej fazie S, niemal wszystkie ziarna autoradiograficzne znajdują się nad chromatyną luźną przylegającą do chromatyny skondensowanej. Jeśli przed utrwaleniem komórki zostały przeniesione na 15 min do środowiska nieradioaktywnego, procent ziaren przypadających na chromatynę zwartą znacznie się zwiększa. W okresie późnej replikacji heterochromatyny ta prawidłowość występuje jeszcze wyraźniej. W komórkach utrwalonych bezpośrednio po inkubacji w ^3H tymidynie wyznakowane chromocentry wykazują strukturę zdekondensowaną, ale już po 15 min postinkubacji przekształcają się ponownie w chromatynę zwartą. Do podobnych wniosków prowadzą również wcześniejsze badania Milnera [94] prowadzone na ludzkich normoblastach, a także obserwacje Lafontaine'a i Lorda [81], a w szczególności [88]. Obserwacje te dowodzą, że dłuższa inkubacja w ^3H tymidynie może dać mylne wyobrażenie o strukturze chromatyny w momencie replikowania zawartego w niej DNA, gdyż dekondensacja związana z tym procesem jest krótkotrwała i odbywa się stopniowo, w niewielkich segmentach. Na przykład w przypadku chromocentru w pierwszym etapie rozluźnieniu ulega jego strefa peryferyczna, od której rozpoczyna się replikacja [88]. Następnie fala replikacji i proces dekondensacji przemieszcza się w głąb chromocentru, obejmując prawdopodobnie nie wszystkie replikony jednocześnie, gdyż na obszarze zdekondensowanego chromocentru widoczne są lokalne zagęszczenia chromatyny [81, 88, 106].

Obserwacje Fakana i Hancock [42] dokonane na komórkach myszy z zastosowaniem autoradiografii wysokorozdzielczej i techniki EDTA Bernharda [17] umożliwiającej różnicujące rozjaśnienie chromatyny zwartej wskazują, że miejscem replikacji są obszary chromatyny luźnej oraz obrzeżenie chromatyny zwartej. Wyniki te są więc zgodne z wcześniejszymi obserwacjami prowadzonymi na komórkach zwierzęcych [54, 94, 95], a także pracami dotyczącymi komórek roślinnych. Lokalizacja

replikujących odcinków DNA na peryferiach pasm chromatyny zwartej lub chromocentrów, której dowodzą jednoznacznie obserwacje autoradiograficzne w mikroskopie elektronowym, praktycznie wyklucza możliwość prawidłowej oceny w mikroskopie świetlnym, ze względu na jego niską zdolność rozdzielczą, stanu kondensacji chromatyny, nad którą występują autoradiograficzne ziarna. Ponadto zwarte na pozór grudki chromatyny, np. ciała Barra, w rzeczywistości są przenizane kanałami i wpukleniami wypełnionymi chromatyną luźną. Ich obecność ujawniła analiza seryjnych ultracienkich skrawków ciała Barra kotki [135]. Do wnętrza tych kanałów wnikają fibryle perichromatynowe wykontrastowane techniką Bernharda odpowiadające HnRNA. W tych samych miejscach, jak tego dowodzą badania Fakana i Hancock [42], może się także dokonywać synteza DNA, dając lokalizację ziaren autoradiograficznych sugerującą pozorną możliwość odbywania się replikacji w całości skondensowanej chromatynie.

Przedstawione fakty przemawiają więc za tym, że replikacji ulegają te odcinki chromatyny, w których pojedyncze replikony lub ich skupiska mogą się swobodnie rozkręcać, a więc znajdujące się na obszarze chromatyny luźnej albo na brzegach chromatyny zwartej. Miejsca te są prawdopodobnie również bardziej dostępne dla enzymów biorących udział w procesach przygotowawczych do replikacji oraz modyfikacjach postreplikacyjnych. Po zakończeniu replikacji odcinki te mogą ponownie ulegać kondensacji i przekształcać się w grudki chromatyny zwartej. Proces ten jest najszybszy w obszarze heterochromatyny. Ponieważ replikacja poszczególnych skupisk replikonów dokonuje się w różnych momentach fazy S (por. 2.2.1 i ref. [138]), lokalna i przejściowa modyfikacja struktury jądra związana z syntezą DNA może być mało dostrzegalna dla obserwatora. Nie ma też prostej zależności pomiędzy intensywnością syntezy DNA i stopniem dekondensacji chromatyny, gdyż ta ostatnia związana jest również i to w głównej mierze z procesem transkrypcji (por. rozdz. 3).

2.2.3. Lokalizacja miejsc inicjujących replikację. Comings i Kakefuda [28] wysunęli przypuszczenie, że replikacja DNA w komórkach eukariotycznych jest, podobnie jak u bakterii, zapoczątkowywana w miejscach połączenia fibryli chromatynowych z błoną, tj. w tym przypadku z otoczką jądrową. Przypuszczenie to zostało sformułowane na podstawie lokalizacji przy otoczce jądrowej autoradiograficznych ziaren po krótkotrwałej inkubacji komórek we wszystkich etapach fazy S w ^3H tymidynie. Za tą możliwością przemawiały także obserwacje innych autorów [53, 60, 109]. Również wyniki uzyskane metodą izolowania frakcji jądrowych wskazywały, że ^3H DNA po krótkiej inkubacji w ^3H ty-

midynie występowało we frakcji zawierającej błony. Po przeniesieniu korzeni inkubowanych w ^3H tymidynie do ^{14}C tymidyny stwierdzono zmniejszenie się we frakcji zawierającej błony ^3H DNA i zwiększenie ilości ^{14}C DNA. Jednocześnie ^3H DNA pojawiał się we frakcji pozbawionej błon [63]. Podobne wyniki uzyskano również w komórkach zarodków jeżowca [57]. Eksperymenty te wskazywały, że odcinki replikonów aktualnie replikujące DNA znajdują się przy otoczce jądrowej, a następnie ulegają przesunięciu w głąb jądra. Koncepcja ta nie znalazła jednak potwierdzenia w badaniach innych autorów [19, 29, 30, 44, 60, 69, 110, 150, 151]. Wysoka radioaktywność w peryferycznej strefie jądra została zinterpretowana jako wyraz wyższej koncentracji DNA w tym regionie [42, 44].

Zdaniem Berezney'a i Buchholtza [12] obecnie jest już oczywiste, że miejsca replikujące nie są preferencyjnie związane z otoczką jądrową. Przyjmuje się natomiast, że istotne dla organizacji procesu replikacji jest zakotwiczenie pętli DNA w matriks jądrowej ([13–16, 29] oraz ref. [2, 27, 64]). Pod tym pojęciem rozumiane są struktury pozostające w jądrze po usunięciu otoczki jądrowej, histonów oraz DNA i RNA, utworzone z białka określanego nazwą matriksyna lub matricyna [11, 27]. Badania ultrastrukturalne wykazały, że składają się na nią włóknista warstwa sąsiadująca z otoczką jądrową łącznie z kompleksem por (pore lamina), resztkowe jąderko (jąderkowa kora) oraz matriks wewnątrzjądrowa. Matriks wewnątrzjądrowa składająca się z delikatnych włókienek i ziarnistości, w jądrze utrwalanym *in vivo* klasycznymi metodami, odpowiada jak przypuszczają Bouvier i wsp. [20], wyróżnionym przez Bernharda [17] ziarnistościom interchromatynowym połączonym fibrylami. Zastosowanie techniki seryjnych skrawków do badań izolowanych jąder zawierających jedynie matriks jądrową (nuclear matrix III) i pozbawiony białka DNA wykazało, że wszystkie elementy matriks są ze sobą połączone w jeden spójny system przestrzenny składający się na rusztowanie jądra [20]. Do tego rusztowania (z wyjątkiem pore lamina) podczepione są nici DNA [20, 27]. Pęczki pozbawionego białka DNA w formie przypominającej pufy obserwowano szczególnie często przy „szypułkach” łączących resztkowe jąderka z peryferyczną warstwą włóknistą [20]. Obecne poglądy na temat strukturalnej organizacji chromosomów w jądrach interfazowych odbiegają więc znacznie od modelu Brascha i Setterfielda [21], w którym główną rolę w stabilizacji replikonów przypisywano ich połączeniu z otoczką jądrową.

Zaproponowano dwa modele replikacji DNA w skupiskach replikonów powiązanych z matriks jądrową: 1. model stabilny matriks, w którym pętle DNA przesuwają się przez parzyste kompleksy replikacyjne zakotwiczone w matriks ulegając replikacji równocześnie z dwu stron

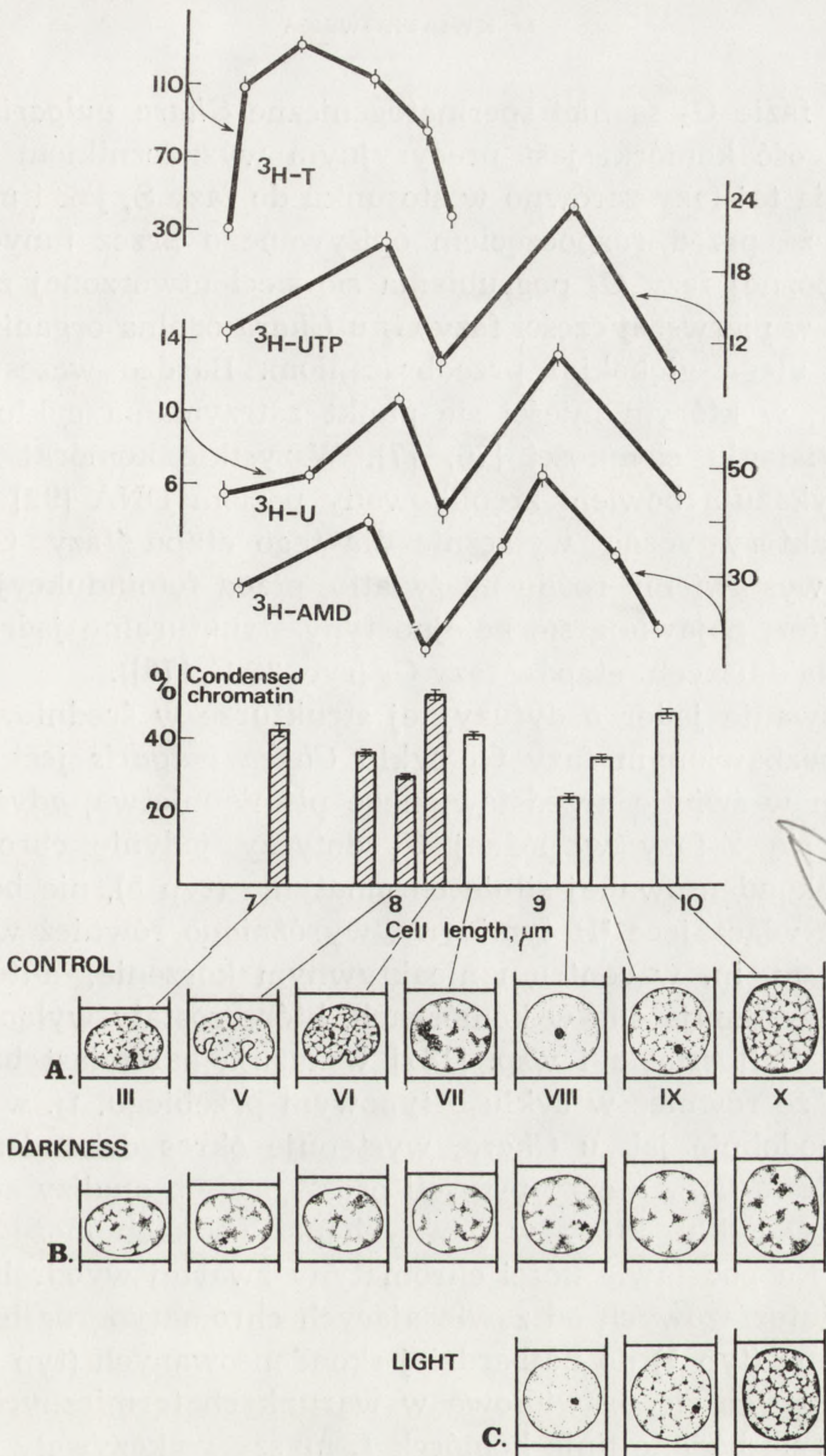
przesuwającej się pętli [12, 122, 138], oraz 2. model ślizgania, w którym przyjmuje się, że końce pętli zakotwiczone są na stałe w matriks nie biorącej udziału w replikacji, która jest organizowana przez parzysty kompleks replikacyjny związany z innym fragmentem matriks, ślizgającym się od szczytu pętli do jej nasady, przy udziale którego zachodzi równocześnie replikacja obydwu ramion pętli DNA [12].

2.3. ZMIANY STRUKTURY JĄDRA ZWIĄZANE Z FAZĄ G_2

Zmiany struktury jądra w okresie fazy G_2 są stosunkowo słabo zbadane ze względu na trudności w ocenie stopnia zaawansowania tej fazy. Wielkość komórki i stopień kondensacji chromatyny nie zawsze są precyzyjnymi wyznacznikami, w kulturach synchronizowanych zaś stopień asynchroniczności jest najwyższy właśnie w późnej interfazie. Na ogół stwierdzano, że w jądrach o strukturze siateczkowatej po zakończeniu fazy S pasma chromonemy stają się grubsze i wyraźniejsze w miarę zbliżania się profazy, ulegając dalszej kondensacji i spiralizacji, przekształcają się w chromosomy mitotyczne [38, 66, 81, 102, 103, 106, 142]. Dla wczesnej fazy G_2 charakterystyczne jest powstawanie chromocentrorów zbiorczych stanowiących zlepek kilku chromocentrorów sąsiednich [81, 102, 103, 106]. Badania z zastosowaniem techniki barwienia prążków C wykazały, że pod koniec fazy G_2 liczba chromocentrorów zwiększa się i osiąga najwyższą wartość w cyklu [103].

Jednym z kontrowersyjnych problemów dotyczących fazy G_2 jest występowanie wyróżnionej po raz pierwszy przez Heitza [55] tzw. Z-fazy („Zerstäubungsstadium”), w której występuje dyspersja chromocentrorów. Według Heitza Z-faza zaobserwowana u wątrobowca *Pellia* przypada na bardzo wczesną profazę. Barlow [6, 7] na podstawie badań autoradiograficznych i cytofotometrycznych uważa natomiast, że Z-faza odpowiada okresowi dyspersji chromocentrorów w późnej fazie S związanej z późną replikacją heterochromatyny. Pewne wątpliwości budzi jednak fakt, że 20% jąder o zdecondensowanych chromocentrach u *Bryonia dioica* nie było wyznakowanych 3H tymidyną po 30 min inkubacji, co autor interpretuje jako skutek opóźnionej rekonstrukcji chromocentrorów po okresie replikacji zawartego w nich DNA. Z badań innych autorów wiadomo zaś, że kondensacja zreplikowanej heterochromatyny może następować bardzo szybko [69, 71]. Według Nagla [106] decondensacja chromocentrorów prawdopodobnie zachodzi w cyklu dwukrotnie: w późnej fazie S i w późnej fazie G_2 bądź na początku profazy, tj. w okresie Z-fazy (por. ryc. 5). Problem ten nie jest więc rozstrzygnięty i wymaga dalszych dokładnych badań.

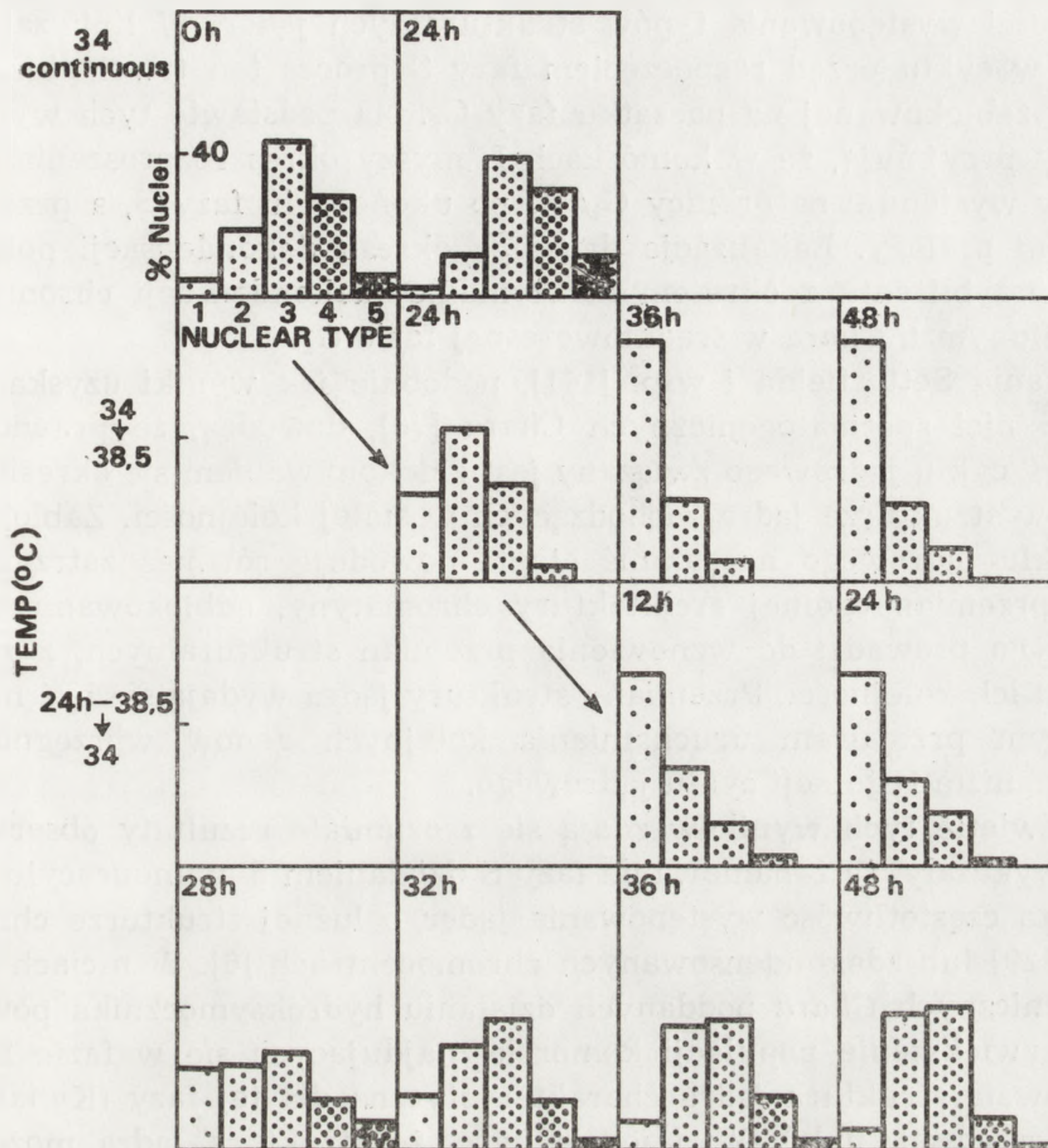
Obiektem szczególnie dogodnym do analizy sekwencji zmian struktury-



Ryc. 26. Zaobserwowane w przebiegu interfazy nici spermatogenicznych *Chara vulgaris* zmiany: intensywności włączania ³H tymidyny (³H-T) i ³H urydyny (³H-U), aktywności polimeraz RNA wykrywanych in situ metodą Moora (³H-UTP) oraz dostępności wzorca mierzonej wiązaniem ³H aktynomycyny D (³H-AMD), w zestawieniu z zawartością chromatyny skondensowanej, według [74] i odpowiadającymi kolejnym etapom interfazy typami strukturalnymi jądra według [73] (A); B — struktura jądra po zablokowaniu cyklu w fazie G₂ długotrwałym działaniem ciemności według [77]; C — typy strukturalne jądra pojawiające się w okresie poprzedzającym fotoindukcyjne wznowienie podziałów mitotycznych według [76]. Według Kwiatkowskiej i Maszewskiego [73, 74] — Protoplasma, Springer Verlag; [76] — Biol. Cellulaire, Imp. C. I. B. Paris; [77] — Folia Histochem. Cytochem., Pol. Sc. Publishers, Warszawa, Kraków (zmodyfikowane)

ry jądra w fazie G_2 są nici spermatogeniczne *Chara vulgaris* dzięki temu, że długość komórki jest precyzyjnym wyznacznikiem stopnia zaawansowania tej fazy zarówno w stosunku do fazy S, jak i mitozy [117]. Wykazano, że przed rozpoczęciem opisywanego przez innych autorów w okresie późnej fazy G_2 pogrubiania się sieci utworzonej z chromatyny zwartej, w pierwszej części fazy G_2 u *Chara* ogólna organizacja struktury jądra ulega głębokim przeobrażeniom. Bardzo wczesna faza G_2 jest etapem, w którym mieści się punkt zatrzymania cyklu po długotrwałym działaniu ciemności [76, 77]. Wszystkie komórki zatrzymane w cyklu wykazują bowiem zreplikowany poziom DNA [92] i strukturę jądra charakterystyczną wyłącznie dla tego etapu fazy G_2 (ryc. 26 A i B). Po wystawieniu roślin na światło, przed fotoindukcyjnym wznowieniem mitoz, pojawiają się kolejno typy strukturalne jądra charakterystyczne dla dalszych etapów fazy G_2 (ryc. 26 C, [76]).

Występowanie jąder o dyfuzyjnej strukturze w średniowczesnej fazie G_2 w pozbawionym fazy G_1 cyklu *Chara vulgaris* jest zjawiskiem nietypowym w świetle przedstawionego piśmiennictwa, gdyż możliwość pojawiania się Z-fazy w późnej G_2 dotyczy jedynie chromocentrów. Jądra o zdecondensowanej silnie chromatynie (typ 5), nie będące w fazie G_1 i nie włączające 3H tymidyny, wyróżniono również w *Crepis capilaris* [70], m. in. w centrum nieaktywnym korzenia, autorzy uznali jednak, że występują one w komórkach, które zostały wyłączone z cyklu. Badania Setterfielda i wsp. [141] wskazują natomiast bardziej jednoznacznie, że również w cyklu o typowym przebiegu, tj. w komórkach L myszy, podobnie jak u *Chara*, występuje okres decondensacji chromatyny w fazie G_2 . Autorzy przyjęli prosty sposób analizy zmian struktury jądra w cyklu, który w pewnych przypadkach może być bardzo przydatny. Na podstawie ilości chromatyny zwartej wyodrębniono 5 typów jąder interfazowych od zawierających chromatynę najbardziej zdecondensowaną (typ 1) do najbardziej skondensowanych (typ 5). Dla kultur rozwijających się prawidłowo w warunkach termicznych permissyjnych wszystkie badane linie komórek L myszy wykazywały charakterystyczną częstotliwość występowania 5 typów jąder, analogiczną, jak na ryc. 27. Najliczniejsze były jądra o średniej zawartości chromatyny skondensowanej, najmniej liczne — typy skrajne jąder. W temperaturze $38,5^\circ C$ linie termowrażliwe przestają proliferować. Badania cytofotometryczne wykazały, że jedna z linii blokowana jest na granicy G_1/S , zaś druga — po zreplikowaniu DNA, na granicy S/G_2 . Analiza ultrastruktury jądra komórek przebywających w temperaturze $38,5^\circ C$ linii termostabilnych nie wykazywała odchyień w stosunku do kultur hodowanych w temperaturze $34^\circ C$, natomiast w obydwu liniach termowrażli-



Ryc. 27. Histogramy ilustrujące częstotliwość występowania jąder o różnym stopniu dekondensacji chromatyny wyróżnionych na podstawie zdjęć mikroskopowo-elektronowych komórek L myszy szczepu TS A 159, hodowanych w różnych temperaturach. Szereg górny — komórki hodowane w temperaturze 34°C przez 24 i 48 godz.; szereg drugi — komórki hodowane w 38,5° przez 24, 36 i 48 godz.; szereg trzeci i czwarty — kultura hodowana 24 godz. w temperaturze 38,5°, przeniesiona następnie do temperatury 34°C na 12, 24, 28, 32, 36 i 48 godz. Gęstość kropek na histogramach proporcjonalna do zawartości chromatyny skondensowanej w jądrach 5 typów strukturalnych. Według Setterfielda i wsp. [141] (zmodyfikowane), J. Cell Biol., The Rockefeller University Press

wych stwierdzono zmianę częstotliwości występowania wyodrębnionych typów jąder, polegającą na bezwzględnym dominowaniu typu 1 o maksymalnie zdekondensowanej chromatynie (ryc. 27). Po przeniesieniu kultur linii termowrażliwych do temperatury 34°C, przed pojawieniem się mitoz obserwowano stopniowy powrót do typowej dla kontroli czę-

stotliwości występowania typów strukturalnych jąder. W linii zablokowanej w cyklu przed rozpoczęciem fazy S proces ten trwał dłużej niż w linii zablokowanej na początku fazy G_2 . Na podstawie tych wyników autorzy przyjmują, że w komórkach L myszy okres rozproszenia chromatyny występuje na granicy G_1/S i po ukończeniu fazy S, a przed początkiem profazy. Lokalizacja drugiego okresu dekondensacji pokrywa się w przybliżeniu z okresem maksymalnej dekondensacji chromatyny wyróżnionym u *Chara* w średniowczesnej fazie G_2 .

Badania Setterfielda i wsp. [141], podobnie jak wyniki uzyskane na modelu nici spermatogenicznych *Chara* [76], dowodzą, że prawidłowy przebieg cyklu jądrowego związany jest z dokonywaniem się określonych zmian w strukturze jądra zachodzących w stałej kolejności. Zablockowanie cyklu jądrowego na jakimś etapie powoduje również zatrzymanie cyklu przemian ogólnej architektury chromatyny, odblokowanie cyklu jądrowego prowadzi do wznowienia przemian strukturalnych, z zachowaniem ich kolejności. Przemiany struktury jądra wydają się być morfologicznym przejawem uruchamiania kolejnych genów wprzęgniętych w mechanizm regulacji cyklu jądrowego.

W świetle tych wyników zdają się zrozumiałe rezultaty obserwacji, które wykazały, że zahamowanie fazy S działaniem 5-aminouracylu [136] zwiększa częstotliwość występowania jąder o luźnej strukturze chromatyny [129] lub zdekondensowanych chromocentracach [6]. W niciach spermatogenicznych *Chara* poddanych działaniu hydroksymocznika powodującego zwiększenie populacji komórek znajdujących się w fazie S [18] dominowała struktura jądra charakterystyczna dla tej fazy (Kwiatkowska, Maszewski, npb.). Wydaje się więc, że struktura jądra może być w pewnym stopniu wyznacznikiem fazy cyklu zarówno prawidłowo przebiegającego, jak i zablokowanego.

2.4. STRUKTURA JĄDRA W OKRESIE PRZEJŚCIA Z PÓŻNEJ FAZY G_2 DO PROFAZY

Na ogół sieć utworzona z chromatyny zwartej przekształca się w chromosomy mitotyczne w drodze stopniowego pogrubiania i spiralizacji (por. 2.3). Z tego względu odróżnienie jąder znajdujących się jeszcze w późnej G_2 od jąder we wczesnej profazie jest trudne i wymaga odwoływania się do dodatkowych znaków rozpoznawczych, takich np. jak obecność wiązek preprofazowych mikrotubul [126], zmiany w położeniu i strukturze jąderka [89]. Badania na niciach spermatogenicznych wskazują, że najwcześniejszą oznaką rozpoczęcia się profazy jest zmiana układu chromatyny zwartej przy otoczce jądrowej [73]. W późnej fazie G_2 przylega ona bezpośrednio do wewnętrznej błony otoczki (ryc. 18 i 19a), w momencie zaś rozpoczęcia się profazy pomiędzy chromatyną zwartą i otoczką pojawia się wąska, jasna przestrzeń, przez którą biegną

cieniutkie fibryle łączące chromatynę zwartą z błoną (ryc. 19b). Przestrzeń ta rozszerza się stopniowo w dalszych etapach profazy. Podobne subtelne powiązania odsuniętych od otoczki jądrowej kondensujących chromosomów z wewnętrzną błoną tej otoczki można odnaleźć na licznych zdjęciach mikroskopowo-elektronowych profazowych komórek roślinnych i zwierzęcych [5, 29, 93, 126, 127, 131, 142].

Również u *Physarum* w okresie profazy grudki chromatyny zwartej nie przylegają bezpośrednio do otoczki jądrowej [89]. Podobnie Zatssepina i wsp. [152] w komórkach HeLa wykazali, że w bardzo wczesnej profazie zanika warstwa włóknista (fibrous lamina) dająca się w tym obiekcie wyróżnić pomiędzy chromatyną i błoną otoczki jądrowej. Pojawianie się jasnej przestrzeni oddzielającej chromatynę skondensowaną od błony wewnętrznej otoczki jądrowej wydaje się być uniwersalnym przejawem rozpoczęcia profazy. Obserwacja ta pozostaje w pewnym związku z wynikami badań Gerace i wsp. [49], którzy metodą immunochemiczną wykazali, że we wczesnej profazie rozpoczyna się dezagregacja warstwy włóknistej (pore complex-lamina) pośredniczącej w wiązaniu chromatyny do wewnętrznej błony otoczki jądrowej, prawdopodobnie wskutek przechodzenia tworzących ją polipeptydów w formę rozpuszczalną. Antygeny wiążące się z tymi białkami zlokalizowane w okresie interfazy wyłącznie przy otoczce jądrowej, podczas profazy przemieszczają się bowiem stopniowo do cytoplazmy. Ich całkowite równomierne rozproszenie w cytoplazmie stwierdzono w stadium metafazy i anafazy [49].

3. STAN KONDENSACJI CHROMATYNY

A AKTYWNOŚĆ TRANSKRYPCYJNA JĄDRA W INTERFAZIE

W punkcie 2.2.2 przedstawione zostały obserwacje dotyczące związku procesu dekondensacji chromatyny w interfazie z syntezą DNA. Dekondensacja chromatyny, jak wiadomo, towarzyszy również syntezie RNA [19, 32–34, 40, 41, 58, 87, 95]. Synteza RNA odbywa się przez cały okres interfazy, chociaż z różną intensywnością [37, 46, 74, 75, 111, 120]. Oczywisty i znany powszechnie przykład związku dekondensacji chromatyny z aktywnością syntezy RNA stanowią pufy chromosomów politeicznych. Przez analogię do nich zaobserwowane w jądrach interfazowych regiony pasm chromatyny zwartej tworzące charakterystyczne nabrzmienia o bardziej rozluźnionej strukturze, otrzymały nazwę „mikropufy” [80]. Początkowo sądzono, że są one uaktywnionymi regionami chromatyny zwartej, gdyż zawierają RNA [80, 105]. Ostatnie szczegółowe badania Lafontaine’a i wsp. [83, 84] potwierdziły interpretację zaproponowaną wcześniej przez Church i Moens [23, 100], iż są to centromery chromosomów, charakteryzujące się odmienną strukturą niż

pozostałe pasma chromatyny zwartej. Zmiany liczby i wielkości mikropufów, traktowane jako wyraz zmian aktywności transkrypcyjnej [105, 130], mogą być rezultatem fuzji centromerów sąsiednich chromosomów [84]. Nie jest jednak wykluczone, że niektóre struktury opisywane jako mikropufy lub podobne do mikropufów [101, 130] mają inną naturę i nie odpowiadają centromerom, dla których istotnym kryterium rozpoznawczym jest występowanie DNA wykazanego cytochemicznie m.in. metodą włączania ^3H tymidyny [83].

Autoradiograficzne badania Fakana i Nobis [43] przeprowadzone na synchronizowanych w drodze selekcji metafaz komórkach chomika chińskiego wykazały, że podobnie jak replikacja, inicjacja transkrypcji nie wymaga dekondensacji dużych obszarów chromatyny. Włączanie ^3H urydyny zachodzi na powierzchni chromosomów we wczesnej anafazie już po 2 min inkubacji pulsowej izolowanych komórek metafazowych. W telofazie włączanie ^3H urydyny jest znacznie intensywniejsze i odbywa się w regionach chromatyny luźnej sąsiadujących z chromatyną zwartą. W jądrach interfazowych ziarna autoradiograficzne najczęściej zgrupowane są wokół skupień chromatyny zwartej, w strefie, która jest pierwotnym miejscem pojawiania się fibryli perichromatynowych odpowiadających hnRNA w jądrach stymulowanych (np. [17, 33, 34, 78] i ref. [40]).

Szczegółowe badania ilościowe zależności stopnia dekondensacji chromatyny oraz aktywności transkrypcyjnej i replikacyjnej w cyklu zostały przeprowadzone w niciach spermatogenicznych *Chara* [74]. Pomiarzy morfometryczne względnej zawartości chromatyny zwartej przeprowadzone na elektronogramach centralnych przekrojów komórek [73] wykazały, zgodnie z obserwacjami morfologicznymi, występowanie dwu okresów maksymalnej dekondensacji chromatyny zbiegające się z dwoma szczytami zwiększonej dostępności wzorca mierzonej wiązaniem ^3H aktynomycyny D (ryc. 26). Pierwszy okres wzmożonej dekondensacji przypada na średnią fazę S i nie jest związany z nasileniem aktywności replikacyjnej, która w tym okresie się zmniejsza, lecz ze wzrostem aktywności syntezy RNA. Drugi szczyt aktywności transkrypcyjnej przypada na średnią fazę G_2 i podobnie jak pierwszy również pokrywa się z maksymalną dekondensacją chromatyny w tej fazie (ryc. 26). Pod koniec fazy S i w późnej fazie G_2 , tj. w okresach zwiększonej zawartości chromatyny zwartej, aktywność transkrypcyjna obniża się wyraźnie. Dalsze badania wykazały, że w cyklu komórkowym *Chara* dwufazowy przebieg zmian aktywności transkrypcyjnej występuje zarówno w nukleoplazmie pozająderekowej, jak i w jąderku (w tym ostatnim z niewielkim wyprzedzeniem w czasie) [75].

Ostatnio podjęta została również próba odniesienia zmian ogólnej

struktury jądra w interfazie do jego aktywności transkrypcyjnej w cyklu *Physarum polycephalum* [22]. Zdaniem autorek najwyższa aktywność transkrypcyjna występuje u *Physarum* w późnej fazie G₂, w okresie zwiększonej zawartości chromatyny skondensowanej. Obserwacja ta jest tylko pozornie sprzeczna z wynikami uzyskanymi u *Chara*, gdyż w cyklu *Physarum* wzrost syntezy RNA w fazie G₂ dotyczy głównie frakcji rRNA, wrażliwej na AMD, niewrażliwej na α -amanitynę [50, 98], natomiast aktywność pozająderekowa jest najwyższa pod koniec fazy S, kiedy chromatyna występuje głównie w formie rozproszonej [22, 68]. Można więc przyjąć, że cykle kondensacji i dekondensacji chromatyny w interfazie są związane głównie ze zmianami aktywności transkrypcyjnej jądra, podobnie jak w jądrach stymulowanych [32–34, 78], a także w procesie różnicowania tkanek (np. [137]). Badania Derenziniego i wsp. [34] wykazały jednak, że pod względem ilościowym zależność między stopniem dekondensacji chromatyny i aktywnością syntezy RNA nie zawsze jest prosta. Na przykład w hepatocytach stymulowanych kortyzolem redukcja syntezy RNA powodowana działaniem α -amanityny wyprzedza w czasie zwiększenie ilości chromatyny zwartej. Na podstawie swoich badań autorzy opowiadają się za poglądem, w myśl którego dekondensacja chromatyny jest raczej skutkiem, a nie przyczyną uaktywniania genów. Możliwość udziału cyklicznej dekondensacji chromatyny w kontroli aktywności transkrypcyjnej postulowana przez niektórych autorów [74, 107, 137] jest więc nadal dyskutowana.

Rozstrzygnięcie problemu przyczynowo-skutkowego związku między procesami transkrypcji i replikacji a strukturą chromatyny, jak się wydaje, nie jest możliwe bez powiązania zmian ultrastruktury jądra z wynikami badań matriks jądrowej. W szeregu laboratoriów wykazano, że szybko znakujący się hnRNA, podobnie, jak nowo syntetyzowany DNA, występuje w wysokooczyszczonej frakcji matriks jądrowej [1, 56, 96, 97, 147]. Zakotwiczone w matriks fragmenty DNA zawierają więc prawdopodobnie sekwencje promotorowe. Jednakże sposób powiązania chromatyny z matriks oraz związek pomiędzy zmianami struktury chromatyny, procesem pęcznienia i kurczenia się matriks oraz zmianami aktywności transkrypcyjnej i replikacyjnej jest na razie niejasny [2].

LITERATURA

- [1] AGUTTER P. S., BIRCHALL K., Functional differences between mammalian nuclear matrix and pore-lamina preparations, *Exp. Cell Res.*, **124**: 453–460, 1979.
- [2] AGUTTER P. S., RICHARDSON J. C. W., Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus, *J. Cell Sci.*, **44**: 395–435, 1980.

- [3] ALTMANN H. W., Der Zellersatz insbesondere an den parenchymatösen Organen, Verhdl. Deutsch. Ges. Pathol., **50**: 15–51, 1966.
- [4] ALVAREZ Y., VALLADARES Y., Differential staining of the cell cycle, Nature New. Biol., **238**: 279–280, 1972.
- [5] BAJER A., MOLÈ-BAJER J., Formation of spindle fibers, kinetochore orientation, and behaviour of the nuclear envelope during mitosis in endosperm, Chromosoma, **27**: 448–484, 1969.
- [6] BARLOW P. W., The relationship of the dispersion phase of chromocentric nuclei in the mitotic cycle to DNA synthesis, Protoplasma, **90**: 381–392, 1976.
- [7] BARLOW P. W., Changes in chromatin structure during the mitotic cycle, Protoplasma, **91**: 207–211, 1977.
- [8] BARLOW P. W., Determinants of nuclear chromatin structure in Angiosperms, Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., **18**: 193–206, 1977.
- [9] BEALL P. T., HAZLEWOD C. F., RAO P. N., Nuclear magnetic resonance patterns of intracellular water as a function of HeLa cell cycle, Science, **192**: 904–907, 1976.
- [10] BERENDES H. D., Synthetic activity of polytene chromosomes, Int. Rev. Cytol., **35**: 61–116, 1973.
- [11] BEREZNEY R., Fractionation of the nuclear matrix. I. Partial separation into matrix protein fibrils and a residual ribonucleoprotein fraction, J. Cell Biol., **85**: 641–650, 1980.
- [12] BEREZNEY R., BUCHHOLTZ L. A., Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver, Exp. Cell Res., **132**: 1–13, 1981.
- [13] BEREZNEY R., COFFY D. S., Identification of a nuclear protein matrix, Biochem. Biophys. Res. Comm., **60**: 1410–1417, 1974.
- [14] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA, Science (Wash. D. C.), **189**: 241–243, 1975.
- [15] BEREZNEY R., COFFEY D. S., The nuclear protein matrix: isolation, structure and function, Advances in Enzyme Regulation, **14**: 63–100, 1976.
- [16] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei, J. Cell Biol., **73**: 616–637, 1977.
- [17] BERNHARD W., A new staining procedure for electron microscopical cytology, J. Ultrastr. Res., **27**: 250–265, 1969.
- [18] BILECKA A., Effect of hydroxyurea on mitotic activity, ³H thymidine and ³H phenylalanine incorporation in the antheridial filaments cells of *Chara vulgaris* L., Acta Soc. Bot. Pol., **48**: 179–193, 1979.
- [19] BLONDEL B., Relation between nuclear fine structure and ³H thymidine incorporation in a synchronous cell culture, Exp. Cell Res., **53**: 348–356, 1968.
- [20] BOUVIER D., DUPUY-COIN A.-M., BOUTEILLE M., MOENS P., Three-dimensional electron microscopy of the nuclear matrix components of HeLa cells, Biol. Cellulaire, **39**: 121–124, 1980.
- [21] BRASCH K., SETTERFIELD G., Structural organization of chromosomes in interphase nuclei, Exp. Cell Res., **83**: 175–185, 1974.
- [22] CHERNY N. E., BELYAEVA N. N., DOLYDZE M. G., Ultrastructure of nuclei *Physarum polycephalum* at different phases of the mitotic cycle, Proc. VII European Congress on Electron Microscopy, Haga **2**: 212, 1890.

- [23] CHURCH K., MOENS P. P., Centromere behaviour during interphase and meiotic prophase in *Allium fistulosum* from 3-D. E.M. reconstruction, *Chromosoma*, **56**: 249-263, 1976.
- [24] CITOLER P., GROPP A., DNS-Replikation von autosomal Heterochromatin, *Exp. Cell Res.*, **54**: 337-346, 1969.
- [25] COMINGS D. E., The duration of replication of the inactive X-chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA synthesis, *Cytogenetics*, **6**: 20-37, 1967.
- [26] COMINGS D. E., Sex chromatin, nuclear size, and the cell cycle, *Cytogenetics*, **6**: 120-144, 1967.
- [27] COMINGS D. E., Compartmentalization of nuclear and chromatin proteins, [w:] *The Cell Nucleus. Chromatin, Part A*, ed. H. Busch pp 345-371, Acad. Press, New York 1978.
- [28] COMINGS D. E., KAKEFUDA T., Initiation of deoxyribonucleic acid replication of the nuclear membrane in human cells, *J. Molec. Biol.*, **33**: 225-229, 1968.
- [29] COMINGS D. E., OKADA T. A., Condensation of chromosomes into the nuclear membrane during prophase, *Exp. Cell Res.*, **63**: 471-473, 1970.
- [30] COMINGS D. E., OKADA T. A., DNA replication and the nuclear membrane, *J. Mol. Biol.*, **75**: 609-618, 1973.
- [31] DARŻYŃKIEWICZ Z., TRAGANOS F., SHARPLESS T., MELAMED M. R., Interphase and metaphase chromatin. Different stainability of DNA with acridine orange after treatment at low pH, *Exp. Cell Res.*, **110**: 201-214, 1977.
- [32] DERENZINI M., Fine structure of chromatin as visualized in thin sections with the Gautier selective stain for DNA, *J. Ultrastr. Res.*, **69**: 239-248, 1979.
- [33] DERENZINI M., LORENZONI E., MARINOZZI V., BARSOTTI P., Ultrastructural cytochemistry of active chromatin in regenerating rat hepatocytes, *J. Ultrastruct. Res.*, **59**: 250-262, 1977.
- [34] DERENZINI M., PESSION-BRIZZI A., BONETTI E., NOVELLO F., Relationship between ultrastructure and function of hepatocyte chromatin: a study with adrenalectomized rats after cortisol administration, *J. Ultrastruct. Res.*, **67**: 161-179, 1979.
- [35] DEWSE C. D., Observations on the technic for differential staining of the cell cycle using safranin and indigo picrocarmine, *Stain Technol.*, **49**: 57-60, 1974.
- [36] DOLYDZE M. G., TIKHONENKO A. S., BIELAYEVA N. N., TRACHT I. N., SEVERIN E. S., Izuchenie struktury chromatina miksomiceta *Physarum polycephalum* v mitotichieskom cyklic, *Citologia*, **23**: 901-906, 1981.
- [37] ENGER M. D., TOBEY R. A., RNA synthesis in Chinese hamster cells II. Increase in rate of RNA synthesis during G₁, *J. Cell Biol.*, **42**: 308-435, 1969.
- [38] ERLANDSON R. A., HARVEN E., The ultrastructure of synchronized HeLa cells, *J. Cell Sci.*, **8**: 353-397, 1971.
- [39] EVANS H. J., Uptake of ³H thymidine and patterns of DNA replication in nuclei and chromosomes of *Vicia faba*, *Exp. Cell Res.*, **35**: 381-393, 1963.
- [40] FAKAN S., High resolution autoradiography studies on chromatin functions, [w:] *The Cell Nucleus, Chromatin part B*, ed. H. Busch, pp 3-53, Acad. Press, New York 1978.

- [41] FAKAN S., BERNHARD W., Localization of rapidly and slowly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography, *Exp. Cell Res.*, **67**: 126-141, 1971.
- [42] FAKAN S., HANCOCK R., Localization of newly-synthesized DNA in a mammalian cell as visualized by high resolution autoradiography, *Exp. Cell Res.*, **83**: 95-102, 1974.
- [43] FAKAN S., NOBIS P., Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells, *Exp. Cell Res.*, **113**: 327-337, 1978.
- [44] FAKAN S., TURNER G. N., PAGANO J. S., HANCOCK R., Site of replication of chromosomal DNA in a eukaryotic cell, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **69**: 2300-2305, 1972.
- [45] FLAVELL R. B., BENNETT M. D., SMITH J. B., SMITH D. B., Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants, *Biochem. Genet.*, **12**: 257-279, 1974.
- [46] FRASER R. S. S., MORENO F., Rates of synthesis of polyadenylated messenger RNA and ribosomal RNA during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Cell Sci.*, **21**: 497-521, 1976.
- [47] GABRUSEWYCZ-GARCIA N., Cytological and autoradiographic studies in *Sciara coprophila* salivary gland chromosomes, *Chromosoma*, **15**: 312-344, 1964.
- [48] GODLEWSKI M., OLSZEWSKA M. J., Comparison of the duration of the cell cycle in successive generation of synchronously dividing antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. as measured with ³H thymidine, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **42**: 121-131, 1973.
- [49] GERACE L., BLUM A., BLOBEL G., Immunochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution, *J. Cell Biol.*, **79**: 546-566, 1978.
- [50] GRANT W. D., The effect of α -amanitin and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on RNA synthesis in nuclei and nucleoli isolated from *Physarum polycephalum* at different times during the cell cycle, *Eur. J. Biochem.*, **29**: 94-98, 1972.
- [51] GUTTES S., GUTTES E., ELLIS R. A., Electron microscope study of mitosis in *Physarum polycephalum*, *J. Ultrastruct. Res.*, **22**: 509-529, 1968.
- [52] GUTTES E., GUTTES S., Replication of nucleolus-associated DNA during 'G₂phase' in *Physarum polycephalum*, *J. Cell Biol.*, **43**: 229-236, 1969.
- [53] HANOOKA F., YAMADA M., Localization of the replication point of mammalian cell DNA at the membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**: 646-647, 1971.
- [54] HAY E. D., REVEL J. P., The fine structure of the DNP component of the nucleus. An electron microscopic study utilizing autoradiography to localize DNA-synthesis, *J. Cell Biol.*, **16**: 29-51, 1963.
- [55] HEITZ E., Heterochromatin, chromocentren, chromomeren, *Ber. dtsh. bot. Ges.*, **47**: 276-284, 1929.
- [56] HERMAN R., WEYMOUTH L., PENMAN S., Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin-depleted nuclei, *J. Cell Biol.*, **78**: 663-674, 1978.
- [57] HOBART P., DUNCAN R., INFANTE A. A., Association of DNA synthesis with the nuclear membrane in sea urchin embryos, *Nature (London)*, **267**: 542-544, 1977.
- [58] HSU T. C., Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin, *Exp. Cell Res.*, **27**: 332-334, 1962.

- [59] HSU T. C., MARKVONG A., Chromosomes and DNA of *Mus* terminal DNA synthetic sequences in three species, *Chromosoma*, **51**: 311–322, 1975.
- [60] HUBERMAN J. A., TSAI A., DEICH R. A., DNA replication sites within nuclei of mammalian cells, *Nature (London)*, **241**: 32–36, 1973.
- [61] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych, *Post. Biol. Kom.*, **4**: 399–370, 1977.
- [62] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota. I. Struktura chromatyny, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 131–146, 1982.
- [63] JERZMANOWSKI A., TOCZKO K., Association of DNA replication with the nuclear membrane-like complex in pea cells, *Bull. Ac. Pol. Sci. Sér. biol., Cl. II*, **21**: 405–408, 1973.
- [64] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., Matriks jądrowa, *Post. Biochem.*, **24**: 431–442, 1978.
- [65] KLINGER M. P., SCHWARZACHER H. G., WEISS J., DNA content and size of sex chromatin positive female nuclei during the cell cycle, *Cytogenetics*, **6**: 1–19, 1967.
- [66] KLUEVA T. S., ONISCHENKO G. E., POLIAKOV V. Yu., CHENTSOV Yu. S., Ultrastruktura interfaznych kłietok niekórych rastienij na raznyh stadiach kłietochnogo cikla, *Citologia*, **14**: 1465–1469, 1974.
- [67] KUPILA-AHVENNIENNI S., Structure of interphase nuclei and scarcity of nucleoli in Scotch pine from northern locations, *Ann. Bot. Fennici*, **15**: 92–100, 1978.
- [68] KUROIWA T., Fine structure of interphase nuclei. VI. Initiation and replication sites of DNA synthesis in the nuclei of *Physarum polycephalum* as revealed by electron microscopic autoradiography, *Chromosoma*, **44**: 291–299, 1973.
- [69] KUROIWA T., Fine structure of interphase nuclei. III. Replication site analysis of DNA during the S period of *Crepis capillaris*, *Exp. Cell Res.*, **83**: 387–398, 1974.
- [70] KUROIWA T., TANAKA N., Fine structure of interphase nuclei. I. The morphological classification of nucleus in interphase of *Crepis capillaris*, *Cytologia*, **36**: 143–160, 1971.
- [71] KUROIWA T., TANAKA N., Fine structure of interphase nuclei. IV. The behaviour of late replicating chromatin during a late portion of the S period as revealed by electron microscope radioautography, *J. Cell Biol.*, **49**: 939–942, 1971.
- [72] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Plasmodesmata between synchronously and asynchronously developing cells of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Protoplasma*, **87**: 317–327, 1976.
- [73] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Ultrastructure of the nuclei during different phases of the cell cycle in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Protoplasma*, **96**: 59–74, 1978.
- [74] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Changes in the content of condensed chromatin during the cell cycle in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. as related to DNA and RNA synthesis, ^3H actinomycin D binding and RNA polymerase activity, *Protoplasma*, **98**: 363–367, 1979.
- [75] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Changes in the activity of RNA polymerase detected in situ and the intensity of ^3H uridine incorporation into

- the nucleolus and the nucleus of interphase cells in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Folia Histochem. Cytochem.*, **17**: 275–284, 1979.
- [76] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Ultrastructure of nuclei and nucleoli after cell cycle blocking and prior to mitotic reactivation, *Biol. Cellulaire*, **39**: 151–154, 1980.
- [77] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., MASZEWSKA M. M., Ultrastructure of cells after reversible dark-induced blocking of mitotic divisions in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **49**: 169–186, 1980.
- [78] KWIATKOWSKA M., PUVION E., MOYNE G., Additive effects of cortisol and calf serum on RNA synthesis in isolated rat hepatocytes. Autoradiographic studies with the light and electron microscope, *Folia Histochem. Cytochem.*, **18**: 249–258, 1980.
- [79] La COUR L. F., WELLS B., Fine structure and staining behaviour of heterochromatic segments in two plants, *J. Cell Sci.*, **14**: 505–521, 1974.
- [80] LAFONTAINE J.-G., Ultrastructural organization of plant cell nuclei, [w:] *The Cell Nucleus* vol. I pp 149–185, Acad. Press, Inc., New York 1974.
- [81] LAFONTAINE J.-G., LORD A., An ultrastructural and radioautographic study of the evolution of the interphase nucleus in plant meristematic cells (*Allium porrum*), *J. Cell Sci.*, **14**: 263–287, 1974.
- [82] LAFONTAINE J.-G., LORD A., A correlated light and electron microscope investigation of the structural evolution of the nucleolus during the cell cycle in plant meristematic cells (*Allium porrum*), *J. Cell Sci.*, **16**: 63–94, 1974.
- [83] LAFONTAINE J.-G., LUCK B. T., DONTIGNY D., A cytochemical and radioautographic study of the ultrastructural organization of puff-like fibrillar structures in plant interphase nuclei (*Allium porrum*), *J. Cell Sci.*, **39**: 13–27, 1979.
- [84] LAFONTAINE J.-G., LUCK B. T., An ultrastructural study of plant cell (*Allium porrum*) centromeres, *J. Ultrastruct. Res.*, **70**: 298–307, 1980.
- [85] LIMA de FARIA A., Differential uptake in tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 457–466, 1959.
- [86] LIMA de FARIA A., JAWORSKA H., Late DNA synthesis in heterochromatin, *Nature*, **217**: 138–141, 1968.
- [87] LITTAU V. C., ALFREY V. G., FRENSTER J. H., MIRSKY A. E., Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope autoradiography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **52**: 93–100, 1964.
- [88] LORD A., LAFONTAINE J.-G., An ultrastructural and radioautographic study of the chromocentric interphase nucleus in plant meristematic cells (*Raphanus sativus*), *J. Cell Sci.*, **21**: 193–207, 1976.
- [89] LORD A., NICOLE L., LAFONTAINE J.-G., Ultrastructural and radioautographic investigation of the nucleolar cycle in *Physarum polycephalum*. Characterization of DNA-containing subunits, *J. Cell Sci.*, **23**: 25–42, 1977.
- [90] MASUBUCHI M., Evidence of early replicating DNA in heterochromatin, *Bot. Mag. (Tokyo)*, **86**: 319–322, 1973.
- [91] MASUBUCHI M., Early replicating DNA in heterochromatin of *Plagiochila ovalifolia* (Liverworts), *Bot. Mag. (Tokyo)*, **87**: 229–235, 1974.
- [92] MASZEWSKI J., KWIATKOWSKA M., Heterogeneity of the early G₂ phase arrested cells. Cytophotometric, interferometric, and E. M.-morphometric studies, *Folia Histochem. Cytochem.*, **20**: 171–188, 1982.

- [93] MATSUI S. I., YOSIDA H., WEINFELD H., SANDBERG A. A., Induction of prophase in interphase nuclei by fusion with metaphase cells, *J. Cell Biol.*, **54**: 120–132, 1972.
- [94] MILNER G. R., Nuclear morphology and the ultrastructural localization of deoxyribonucleic acid synthesis during interphase, *J. Cell Sci.*, **4**: 569–582, 1969.
- [95] MILNER G. R., HAYHOE G. J., Ultrastructural localization of nucleic acid synthesis in human blood cells, *Nature (London)*, **218**: 785–787, 1968.
- [96] MILLER T. E., HUANG G. Y., POGO A. O., Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing HnRNA, *J. Cell Biol.*, **76**: 675–691, 1978.
- [97] MILLER T. E., HUANG C. Y., POGO A. O., Rat liver nuclear skeleton and small molecular weight RNA species, *J. Cell Biol.*, **76**: 692–704, 1978.
- [98] MITTERMAYER C., BRAUN R., RUSCH H. P., RNA synthesis in the mitotic cycle of *Physarum polycephalum*, *Biochem. Biophys. Acta*, **91**: 399–405, 1964.
- [99] MITTWOCH U., Barr bodies in relation to DNA values and nuclear size in cultured human cells, *Cytogenetics*, **6**: 38–50, 1967.
- [100] MOENS P., CHURCH K., Centromere sizes, position, and movements in the interphase nucleus, *Chromosoma*, **61**: 41–48, 1977.
- [101] MORENO DIAZ de la ESPINA S., FERNANDEZ-GOMEZ M. E., RISUEÑO M. C., Nuclear micropuffs in *Allium cepa* cells. II. Behaviour under the influence of RNA and protein synthesis inhibitors, *Biol. Cellulaire*, **32**: 175–186, 1978.
- [102] MOSER G. C., MÜLLER H., ROBBINS E., Differential nuclear fluorescence during the cell cycle, *Exp. Cell Res.*, **91**: 73–78, 1975.
- [103] MOSER G. C., MÜLLER H., Cell cycle dependent changes of chromosomes in mouse fibroblasts, *Eur. J. Cell Biol.*, **19**: 116–119, 1979.
- [104] NAGL W., Correlation of chromatin structure and interphase stage in nuclei of *Allium flavum*, *Cytobiologie*, **1**: 395–398, 1970.
- [105] NAGL W., Nuclear structures during cell cycles [w:] *Mechanisms and Control of Cell Division*, red T. L. Rost, E. M. Gifford, Jr, pp 147–193, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania, 1977.
- [106] NAGL W., Early and late DNA replication in respectively condensed and decondensed heterochromatin of *Allium carinatum*, *Protoplasma*, **91**: 389–407, 1977.
- [107] NAGL W., Condensed interphase chromatin in plant and animal cell nuclei: fundamental differences, *Pl. Syst. Evol., Suppl.* **2**: 247–260, 1979.
- [108] NAGL W., FUSENING H.-P., Types of chromatin organization in plant nuclei, *Pl. Syst. Evol., Suppl.* **2**: 221–233, 1979.
- [109] O'BRIEN R. L., SANYAL A. B., STANTON R. H., Association of DNA-replication with the nuclear membrane of HeLa cells, *Exp. Cell Res.*, **70**: 106–112, 1972.
- [110] OCKEY C. H., Distribution of DNA replicator sites in mammalian nuclei, *Exp. Cell Res.*, **70**: 203–213, 1972.
- [111] OLSZEWSKA M. J., Double autoradiographie des noyaux en interphase, *Exp. Cell Res.*, **33**: 571–574, 1964.
- [112] OLSZEWSKA M. J., Antheridial filaments of *Chara vulgaris* — a model for study of mitotic cycle and cell differentiation, *Portug. Acta Biol. Sér. A.*, **14**: 313–322, 1974.

- [113] OLSZEWSKA M. J., The binding of ^3H actinomycin D in synchronously dividing cells of antheridial filaments and during spermatids differentiation of *Chara vulgaris* L., Bull. Ac. Pol. Sci. Sér. Biol. Cl. II, **22**: 347–350, 1974.
- [114] OLSZEWSKA M. J., Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego u roślin, Post. Biol. Kom., **4**: 141–183, 1977.
- [115] OLSZEWSKA M. J., 1978, Chromatin condensation in late G_2 phase as a factor related to the earlier initiation of mitosis in successive generations of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., Microscopica Acta, **80**: 115–126, 1978.
- [116] OLSZEWSKA M. J., Heterochromatyna w genomie roślin, Post. Biol. Kom., **9**: 241–256, 1982.
- [117] OLSZEWSKA M. J., GODLEWSKI M., An autoradiographic study of the synthesis of nucleic acids and protein during the cell cycle of synchronously dividing antheridial filaments in *Chara vulgaris* L., Folia Histochem. Cytochem., **10**: 245–256, 1972.
- [118] OLSZEWSKA M. J., GODLEWSKI M., A cytochemical study of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L., Folia Histochem. Cytochem., **11**: 9–20, 1973.
- [119] OLSZEWSKA M. J., OSIECKA R., The relationship between 2C DNA content, life cycle type, systematic position, and the level of DNA endoreplication in nuclei of parenchyma cells of roots in some monocotyledonous species, Biochem. Physiol. Pflanzen, **177**: 319–336, 1982.
- [120] OLSZEWSKA M. J., RODKIEWICZ B., Autoradiographic and doubleautoradiographic studies of the incorporation of nucleic acids and protein precursors in the interphasic cells, Folia Histochem. Cytochem., **2**: 247–256, 1964.
- [121] OLSZEWSKA M. J., SYSA P. S., Struktura genomu [w:] Metody badania chromosomów, red. M. J. Olszewska, PWRiL, Warszawa 1981.
- [122] PARDOLL D. M., VOGELSTEIN B., COFFEY D. S., A fixed site of DNA replication in eukaryotic cells, Cell, **19**: 527–536, 1980.
- [123] PEDERSON T., Chromatin structure and the cell cycle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**: 2224–2228, 1972.
- [124] PEDERSON T., ROBBINS E., Chromatin structure and the cell division cycle, J. Cell Biol., **55**: 322–327, 1972.
- [125] PERA F., WOLF U., DNS-Replikation und morphologie der X-chromosomen während der syntheseperiode bei *Microtus agrestis*, Chromosoma, **22**: 378–389, 1967.
- [126] PICKETT-HEAPS J. D., Preprophase microtubule bands in some abnormal mitotic cells of wheat, J. Cell Sci., **4**: 397–420, 1969.
- [127] PICKETT-HEAPS J. D., NORTHCOTE D. H., Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristem, J. Cell Sci., **1**: 109–120, 1966.
- [128] PLAUT W., On ordered DNA replication in polytene chromosomes, Genetics, **61**: Suppl., 239–244, 1969.
- [129] RESCH A., SCHROETER D., Der Einfluss von 5-Aminouracil auf die Interphase-kerne der Wurzelspitzen von *Vicia faba*, Planta (Berl.), **89**: 342–351, 1969.
- [130] RISUENO M. C., MORENO DIAZ de la ESPINA S., FERNANDEZ-GOMEZ M. E., GIMENEZ-MARTIN G., Nuclear micropuff in *Allium cepa* cells. I. Quantitative ultrastructural and cytochemical study, Cytobiologie, **16**: 209–224, 1978.

- [131] ROBBINS E., GONTAS N. K., The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle, *J. Cell Biol.*, **21**: 429–463, 1964.
- [132] RODMAN T., Relationship of developmental stage to initiation of replication in polytene nuclei, *Chromosoma*, **23**: 271–287, 1968.
- [133] RUDKIN G. T., The structure and function of heterochromatin, *Genetics Today*, **2**: 359–374, 1963.
- [134] SAWICKI W., ROWIŃSKI J., SWENSON R., Change of chromatin morphology during the cell cycle detected by means of automated image analysis, *J. Cell Physiol.*, **84**: 423–428, 1974.
- [135] SCHELLENS J. P. M., JAMES J., HOEBEN K. A., Some aspects of the sex chromatin body, *Biol. Cellulaire*, **35**: 11–14, 1979.
- [136] SCHEUERMANN W., KLAFFKE-LOBSIEN G., On the influence of 5-aminouracil on the cell cycle of root tip meristems, *Exp. Cell Res.*, **76**: 428–436, 1973.
- [137] SCHMALENBERGER B., Differentiation of the guinea pig eye: nuclear ultrastructure, template activity and DNA content, *Protoplasma*, **103**: 377–391, 1980.
- [138] SCHMIDT M., Replikacja w komórce eukariotycznej, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 175–195, 1982.
- [139] SCHNEDL W., Die DNS-Synthese in Sexchromatin, *Cytobiologie*, **1**: 115–120, 1969.
- [140] SCHWARZACHER H. G., SCHNEDL W., Elektronenmikroskopische Untersuchungen menschlicher Metaphase-Chromosomen, *Humangenetik*, **4**: 153–165, 1967.
- [141] SETTERFIELD G., SHEININ R., DARDICK I., KISS G., DUBSKY M., Structure of interphase nuclei in relation to the cell cycle, *J. Cell Biol.*, **77**: 246–263, 1978.
- [142] STACK S. M., BROWN D. B., DEWEY W. C., Visualization of interphase chromosomes, *J. Cell Sci.*, **26**: 281–299, 1977.
- [143] STAROŃ K., JERZMANOWSKI A., *Physarum polycephalum* jako model do badań biochemicznych cyklu komórkowego, *Post. Biochem.*, **21**: 359–368, 1975.
- [144] TANAKA R., ³H-thymidine autoradiographic studies on the heteropycnosis, heterochromatin and euchromatin in *Spiranthes sinensis*, *Bot. Mag. (Tokyo)*, **78**: 50–62, 1965.
- [145] TATUNO S., TANAKA R., MASUBUCHI M., Early DNA synthesis in the X-chromosome of *Pellia neesiana*, *Cytologia*, **35**: 220–226, 1970.
- [146] TELEŻYŃSKI H., Garnitures des chromosomes et synchronisme des divisions dans les filaments d'antherozoides chez certaines espèces du genre *Chara* Vaill., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **6**: 230–247, 1929.
- [147] TODOROV I. N., GALKIN A. P., SHEN R. A., ZHELIABOVSKAIA S. M., Change in the RNA synthesizing ability of isolated nuclei and in the matrix activity of rat liver chromatin during cycloheximide suppression of protein synthesis, *Doklady Acad. Nauk SSSR*, **223**: 1488–1491, 1975.
- [148] TORRE de la C., NAVARRETE H. M., Estimation of chromatin pattern at G₁, S, G₂ of the cell cycle, *Exp. Cell Res.*, **26**: 171–174, 1974.
- [149] TORRE de la C., SACRISTÁN-GÁRATE A., NAVARRETE M. H., Structural changes in chromatin during interphase, *Chromosoma*, **51**: 183–198, 1975.
- [150] WILLIAMS C. A., OCKEY C. H., Distribution of DNA replicator sites in

- mammalian nuclei after different methods of cell synchronization, *Exp. Cell Res.*, **63**: 365–372, 1970.
- [151] WISE G. E., PRESCOTT D. M., Initiation and continuation of DNA replication are not associated with the nuclear envelope in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 714–717, 1973.
- [152] ZATSEPINA O. V., POLYAKOV V. Yu., CHENTSOV Yu. S., Some structural aspects of the fate of the nuclear envelope during mitosis, *Cytobiologie*, **16**: 130–144, 1977.
- [153] ŻUK J., Analysis of Y chromosome heterochromatin in *Rumex thyrsoiflorus*, *Chromosoma (Berl.)*, **27**: 338–353, 1969.
- [154] ŻUK J., Structure and function of sex chromosomes in *Rumex thyrsoiflorus*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **39**: 539–564, 1970.

Otrzymano: 10 grudnia 1981.

Przyjęto: 20 grudnia 1981.

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

ON THE IDENTIFICATION OF ACTIVE NUCLEOLUS-ORGANIZING REGIONS (NOR) IN INTERPHASE *

IDENTYFIKACJA AKTYWNYCH ORGANIZATORÓW JĄDERKOWYCH (NOR) PODCZAS INTERFAZY

Franz WACHTLER

Department of Histology and Embryology,
University of Vienna

Summary. Nucleoli are the morphological expression of the activity of Nucleolus-Organizing Regions of chromosomes in interphase. In somatic mammalian cells three types of nucleoli are observed: ring-shaped nucleoli, nucleoli with nucleolonema and compact nucleoli. They are composed of fibrillar centers, dense fibrillar material and dense granular material in various spatial relationships. Frequently the view is encountered that fibrillar centers correspond to active NORs in interphase. It is shown that this cannot be the case. It is suggested that rather the dense fibrillar component of nucleoli corresponds to the active NORs plus their transcriptional product than any other nucleolar component. Fibrillar centers are supposed to be a store of specific nucleolar protein(s).

Streszczenie. Jąderka są morfologicznym wyrazem aktywności organizatorów jąderkowych (NOR) w chromosomach interfazowych. W somatycznych komórkach ssaków występują trzy typy jąderek: pierścieniowe, z nukleolonemą i zwarte. Zawierają one centra fibrylarne, gęsty materiał fibrylarny oraz gęsty materiał granularny w rozmaitych względem siebie układach przestrzennych. Rozpowszechniony jest pogląd, w myśl którego centra fibrylarne odpowiadają NOR aktywnym w interfazie. Na podstawie wyników przedstawionych w niniejszej pracy sugeruje się, że aktywnym NOR wraz z produktem ich transkrypcji odpowiada raczej gęsty składnik fibrylarny niż jakikolwiek inny składnik jąderka. Centra fibrylarne są przypuszczalnie miejscami nagromadzenia specyficznych białek jąderkowych.

NUCLEOLI AND CHROMOSOMES

Nucleoli are structures regularly present in eukaryotic cells and generally are considered as the source of cytoplasmatic ribosomes. (For reviews on nucleolar structure and function see [4-6, 12, 15, 21, 22,

* Delivered at the V Polish Cytogenetical Conference, Łódź, September 17-18, 1981.

29]. Nucleoli were first described by Fontana [11] in 1781 who described and depicted them as spots ("tâches") in the epidermal cell nuclei of eels. Heitz [16] observed in 1931 that nucleoli are formed at specific regions of chromosomes which he called the nucleolar chromosomes. The chromosomal regions, where nucleoli were formed he named SAT-regions (sine acido thymonucleinico), since they did not take up as much stain as did the rest of the chromatids. Synonyma for SAT-regions are "secondary constrictions" or "satellite stalks" and the more general term "nucleolus organizing region" (abb. "NOR"). By in-situ hybridization of RNA to DNA it was shown that the genes for r(ibosomal)-RNA are located at the NOR [10]. It is generally accepted that the rRNA is coupled to ribosomal proteins within the nucleolus [5, 34]. The genes for these proteins are not localized necessarily at the NOR and are translated within the cytoplasm. From there they are transported to and accumulated within the nucleolus [34].

FINE STRUCTURE OF NUCLEOLI

The structure of nucleoli in various mammalian somatic cells is quite different. According to their morphological appearance nucleoli are grouped into three different types [5, 6]:

1. ring-shaped nucleoli (Fig. 1a),
2. nucleoli exhibiting a nucleolonema (Fig. 1b),
3. compact nucleoli (Fig. 1c).

Ring-shaped nucleoli exhibit a centrally located area of relatively low electron-density, which is composed of delicate fibers and granules, a so called "fibrillar center" [24] (see Fig. 2). This fibrillar center is surrounded by a loose network of predominantly dense fibrillar material.

Nucleoli with nucleolonema exhibit a three-dimensional network of dense fibrillar material. The term "nucleolonema" was introduced by Estable and Sotelo in 1950 [9]. These nucleoli very often lack fibrillar centers.

Compact nucleoli exhibit several fibrillar centers, each of which is surrounded by a shell of dense fibrillar material, which itself lies embedded in a zone of granular material.

There are three morphological compartments to be recognized within the nucleoli: fibrillar centers, dense fibrillar component and dense granular component. Eventually condensed chromatin is seen within or surrounding the nucleoli. Chromatin within the nucleoli requires special techniques to be visualized [1, 7, 17].

In a variety of species active nucleolus-organizing regions (NOR) may be demonstrated by comparatively simple silver staining procedures [2].

The species accessible by these techniques comprise not only man and other mammals but even for example teleost fishes [19]. The material visualized by this procedure is an acidic protein resistant to DNA-, RNA- and histone-extraction [26]. It may be observed by light- as well as by electron-microscopy that this component is localized around and beside the arms of chromosomes, but not within the chromatids proper [26]. This material may also be traced in sections of metaphase chromosomes [14] demonstrating an ultrastructural appearance quite different from that of chromatin, being composed of delicate fibers and granules. Within the nucleoli of cells in interphase the above mentioned fibrillar centers exhibit striking ultrastructural similarities to the silver-stainable material on chromosomes (see Fig. 3). Fibrillar centers were also found to be intensely silver-stainable [3, 8, 13, 33]. This renders possible to identify fibrillar centers by light microscopy. The first to observe silver-stainability of nucleoli and very probable also that of fibrillar centers was Ruzicka [25] in 1899, who observed intense silver-staining of "Nucleolar vacuoles". It seems therefore reasonable to assume that the silver-stainable material on chromosomes and the fibrillar centers are identical. This view is also supported by findings on meiotic chromosomes, where a close spatial relationship between fibrillar centers and NORs may be observed [20].

WHAT NUCLEOLAR STRUCTURE CORRESPONDS TO THE NOR?

Many authors in the last years hold the view, that fibrillar centers in interphase were identical with the NORs of chromosomes. It will be shown that this cannot be the case.

First of all, the structure of fibrillar centers is quite different from the structure of chromatin, the term NOR, however, designates a part of a chromosome. It was shown, that fibrillar centers could contain chromatin [1, 5, 17] but to their major part they are evidently not composed of chromatin but of proteins [24].

If the fibrillar centers were the active NOR, this would imply that rDNA would be transcribed there, and hence rRNA found there too. If nucleoli are stained with an RNA-specific fluorochrome the nucleoli exhibit enhanced fluorescence [33]. Within the nucleoli dark, somewhat centrally located areas are to be found (see Fig. 4). By combining silver-staining and fluorescence it can be demonstrated that these dark nucleolar components are the fibrillar centers [31, 33]. It was also shown, that uptake of radioactive-labelled uridine does not take place in the fibrillar centers [4, 20, 21]. These findings are very difficult to reconcile with the view that fibrillar centers are the NORs.

Another argument comes from the comparison of the number of fibrillar centers in interphase nuclei with the number of active and maximal number of NORs in the metaphases of the same population of cells. As is to be seen from Fig. 5, the number of fibrillar centers very often exceeds the maximal number of active NORs and also the average number of active NORs. This is seen both in primary cell cultures like PHA-stimulated human lymphocytes as well as in established cell lines like HeLa-cells. A similar situation was recently reported [21] in mouse oocytes, where the number of fibrillar centers was up to ten times greater than the maximal number of active NOR-bearing chromosomes. The fact that cells are found which do have definitely more fibrillar centers than NOR-bearing chromosomes rules out the possibility that these two structures are identical.

Another evidence comes from the study of human lymphocytes activated by PHA [31]. The nucleoli in these cells are first ring-shaped, then are transformed to nucleoli with nucleolonema and later on to compact nucleoli. These changes are independent from the cell cycle (32). Whereas ring-shaped and compact nuclei contain distinct fibrillar centers, these are lacking in the nucleoli with nucleolonema. Considerable changes in the size of fibrillar centers occur in a circadian rhythm also [27]. The described disappearance and reappearance of fibrillar centers and the existence of nucleoli, which do not exhibit fibrillar centers are not reconcilable with the view that fibrillar centers could correspond to the NOR in the sense of an identity.

If there is any structure to be identified with NOR in interphase it is evident that it must be present in all types of nucleoli. Out of the three morphological compartments of nucleoli (i.e. fibrillar centers, dense fibrillar component and granular component) only the dense fibrillar component is present in all nucleoli. Therefore it might be assumed that the dense fibrillar component of the nucleoli corresponds to the NOR.

This component is indeed the first to be observed after nucleolar reactivation at telophase [12] and also the first structure to take up uridine in ³H-uridine label experiments [20, 21]. There is however no correspondence between the active NOR and the dense fibrillar component in the sense of an identity: Per definitionem the NOR is chromatin and the active (transcribing) NOR is highly dispersed chromatin which cannot be recognized in standard EM-preparations. The dense fibrillar component rather represents the active NOR plus its transcriptional product, the rRNA. Or in other words: the dense fibrillar component is more likely than any other nucleolar compartment to contain the active NOR.

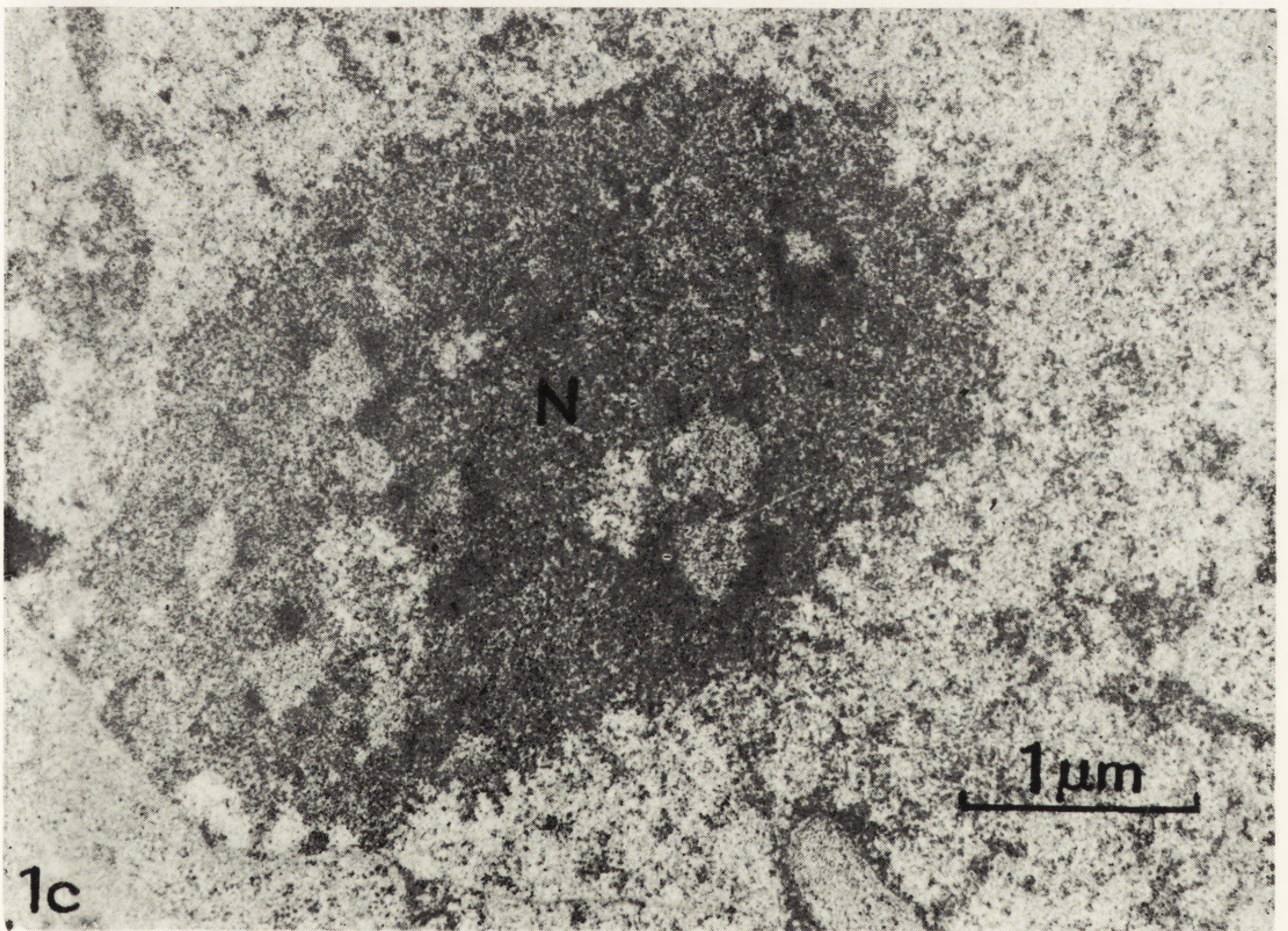
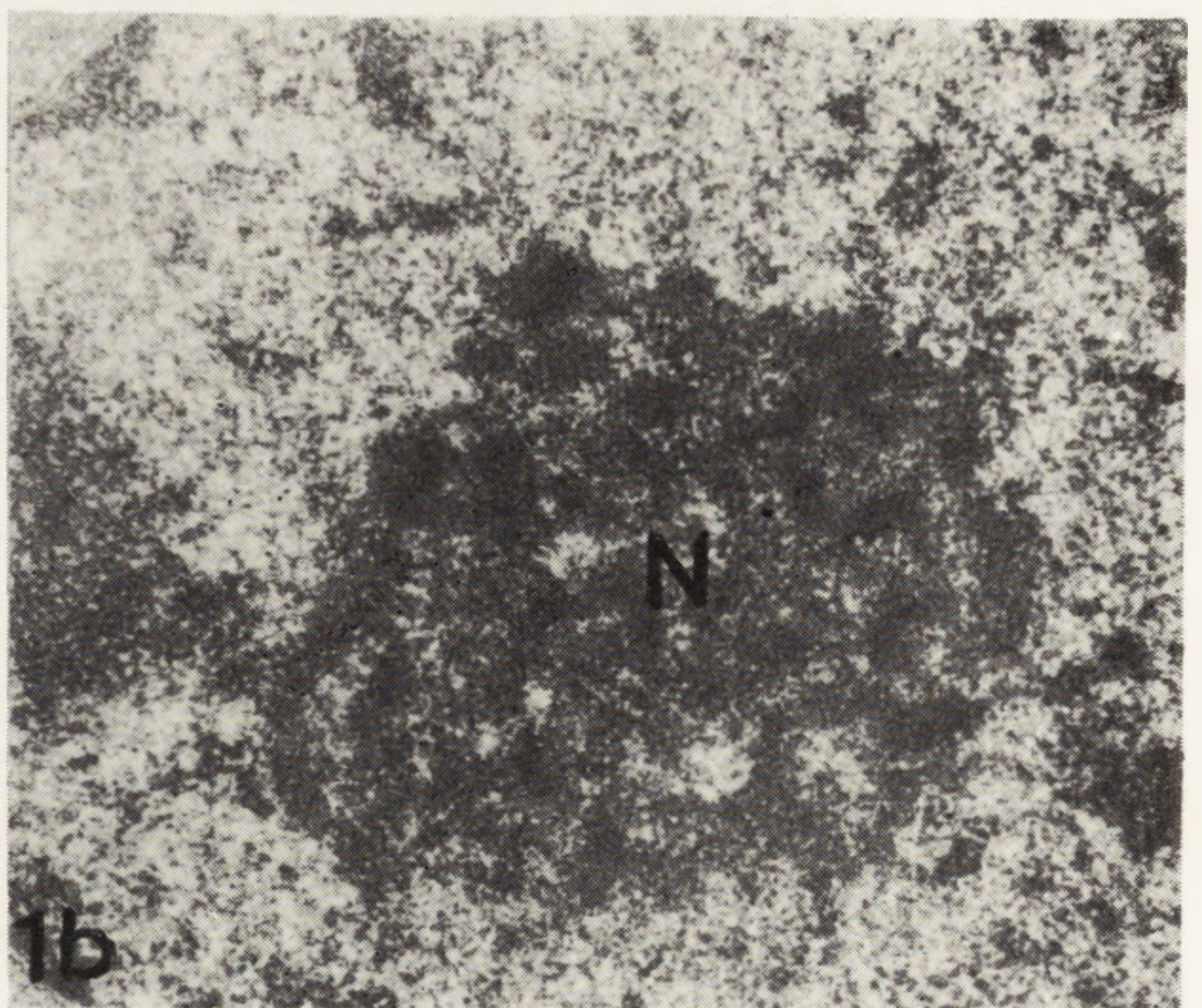
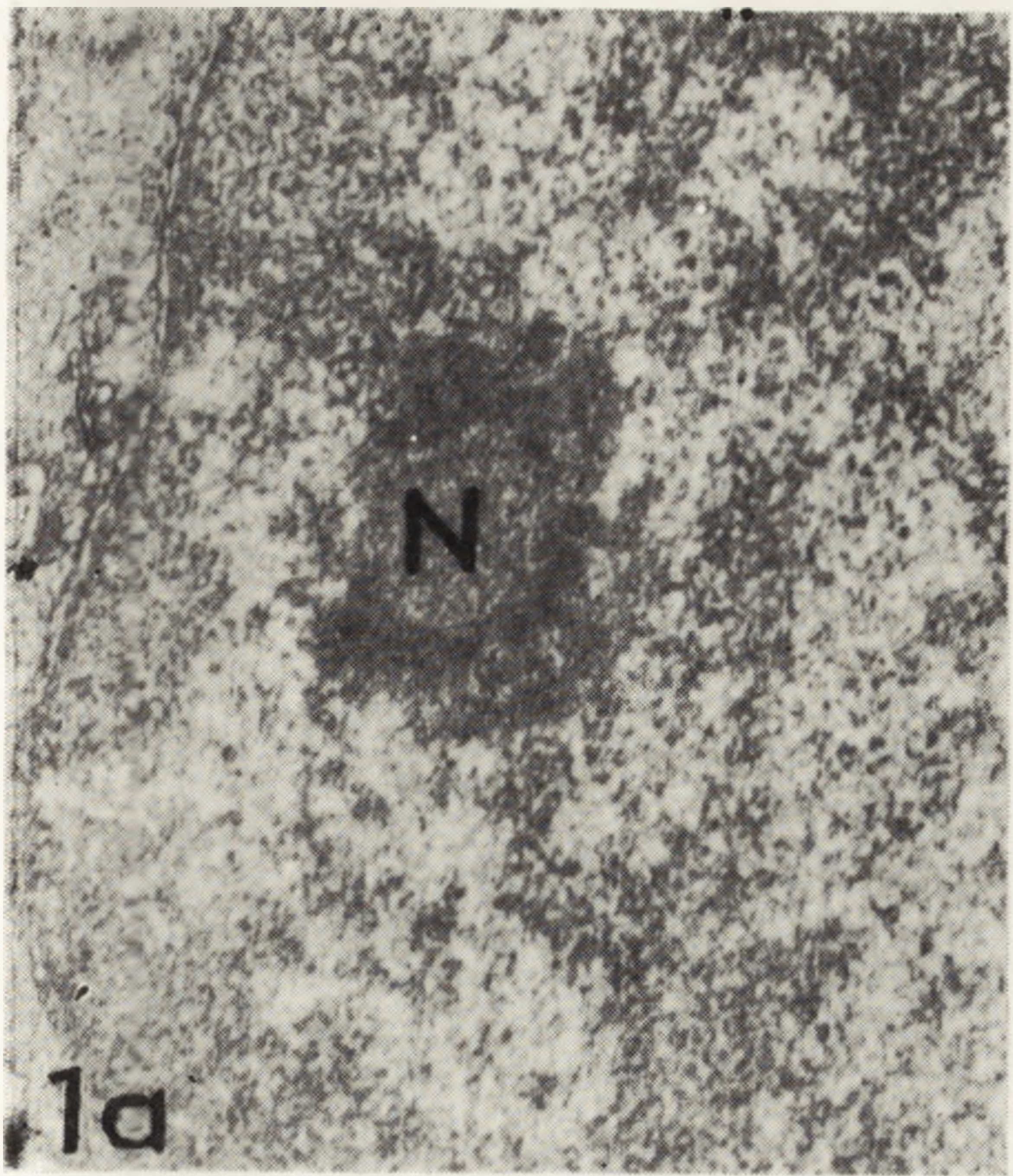


Fig. 1. Different types of nucleoli as seen in electron microscopy; *a* — ring-shaped nucleolus, *b* — nucleolus with nucleolonema, *c* — compact nucleolus; N — nucleolus

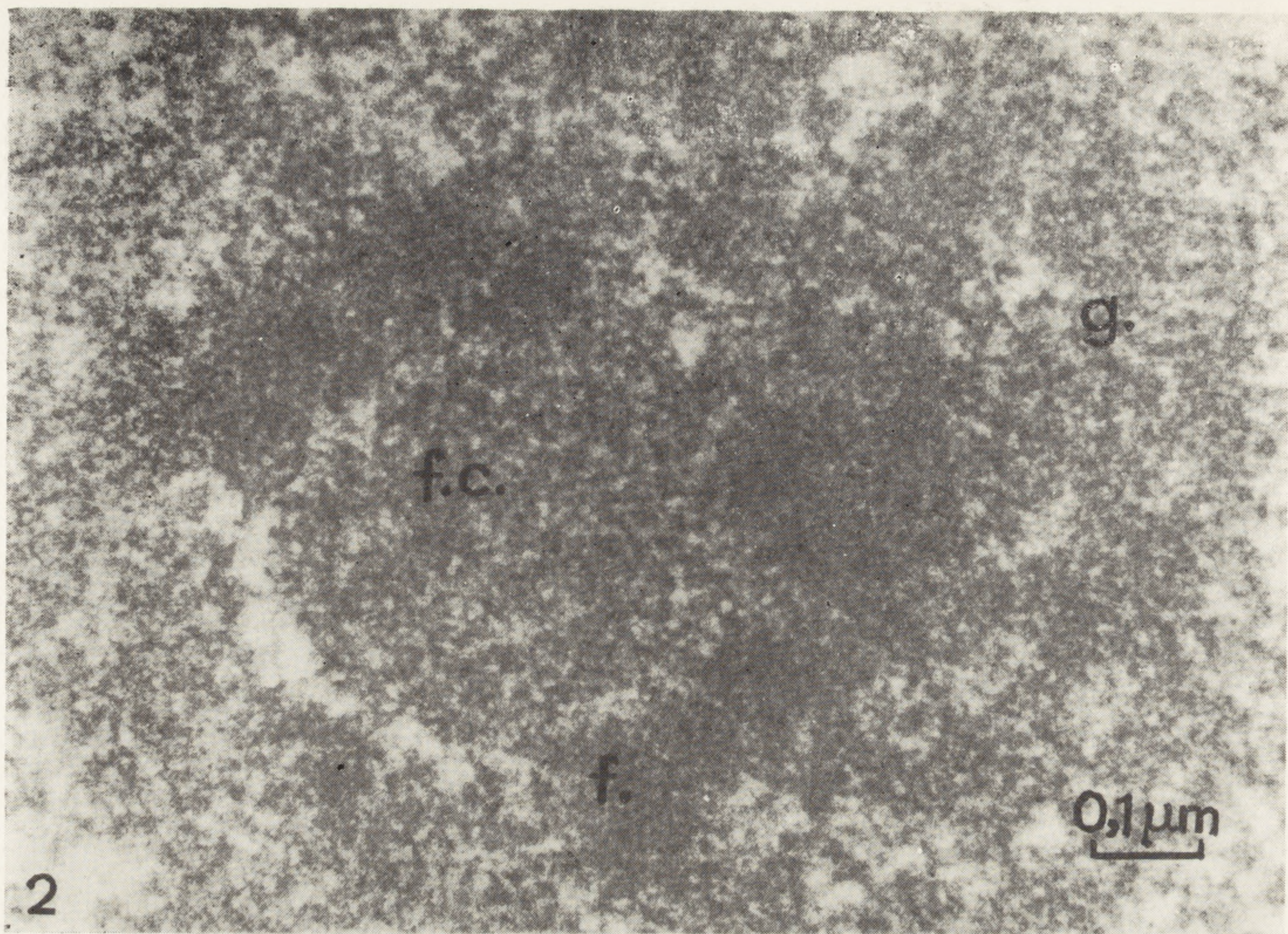


Fig. 2. Nucleolus at high magnification; f.c. — fibrillar center, f. — dense fibrillar component, g. — granular component

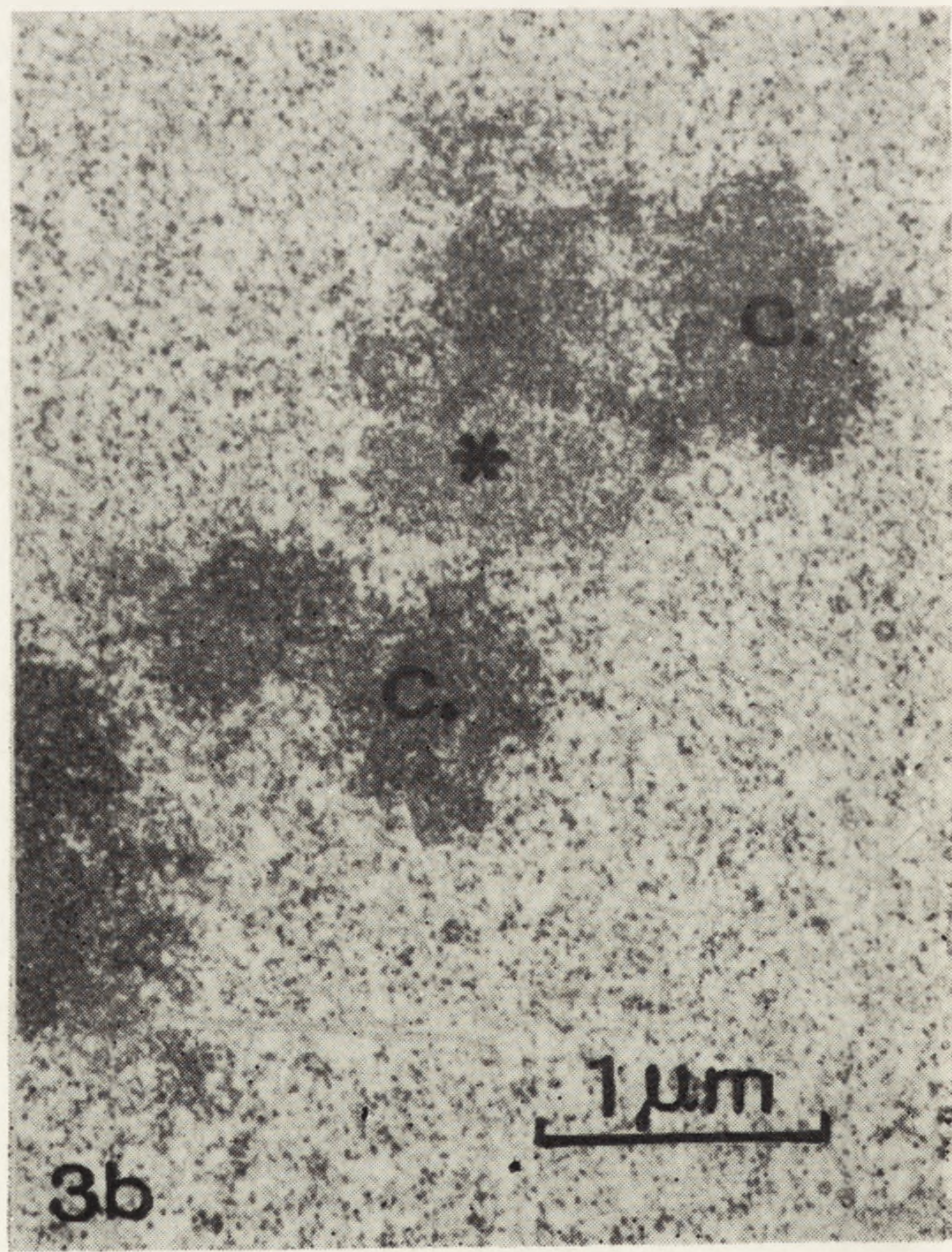
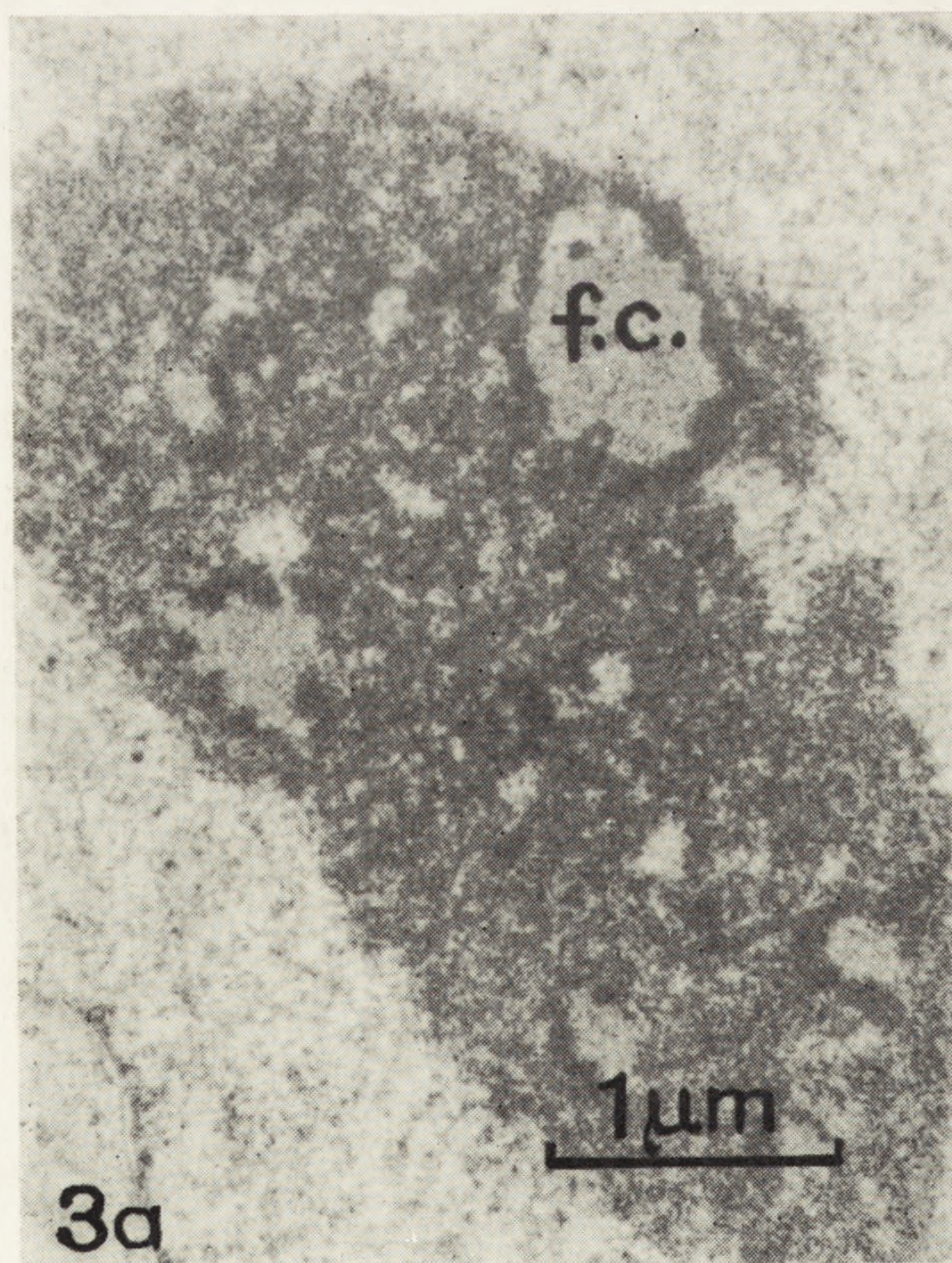


Fig. 3. Similarity in ultrastructural appearance between fibrillar centers and silver-stainable material on chromosomes; *a* — interphase nucleolus, *b* — metaphase chromosomes; f.c. — fibrillar center, c. — chromosomes; asterisk: silver-stainable material

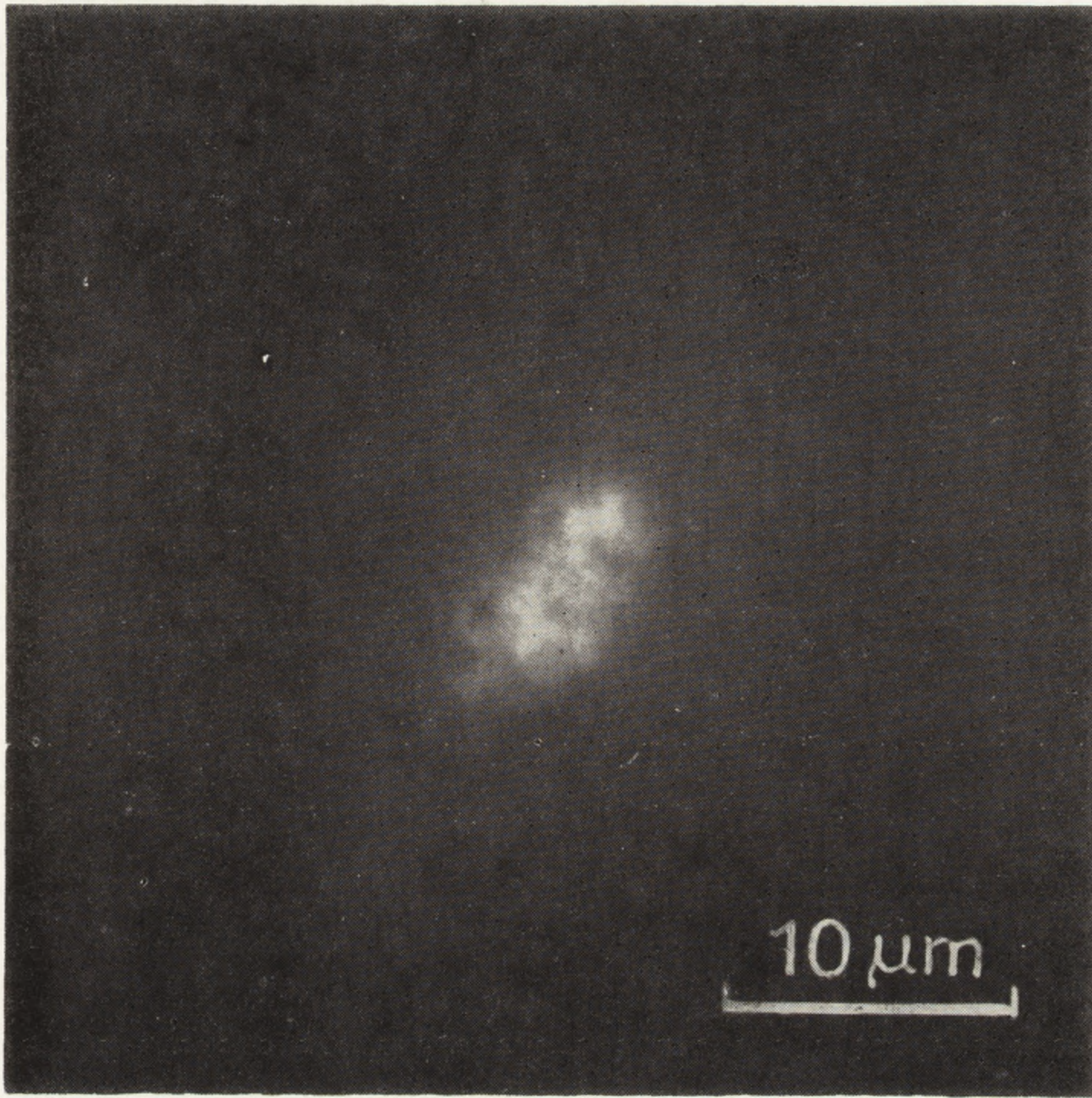


Fig. 4. RNA-distribution within a compact nucleolus, stained according to [32]. Note the dark areas corresponding to fibrillar centers

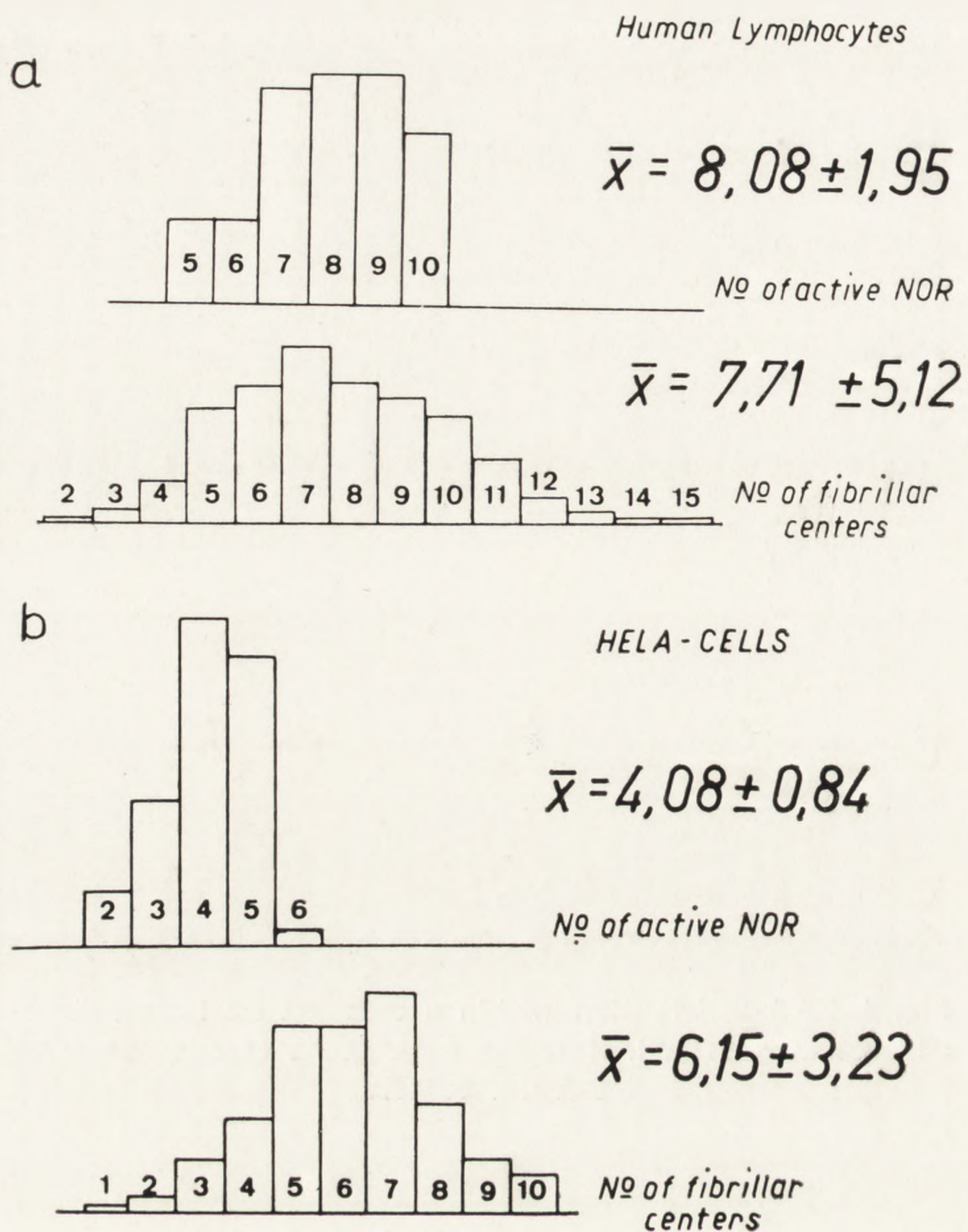


Fig. 5. Comparison between number of active NORs and number of fibrillar centers per cell nucleus in a — human lymphocytes stimulated with PHA, b — HeLa-cells

THE NATURE OF FIBRILLAR CENTERS

But what could be the meaning of fibrillar centers if they are not the interphase counterpart of active NORs? We think there is some evidence for assuming that the fibrillar centers may be a store for some specific nucleolar protein, perhaps with a function in the biosynthesis of ribosomes. This is indicated by the fact, that ribosomes also exhibit an affinity for silver [28], which is caused by their protein component [28]. A further indication is the observed disappearance and reappearance of fibrillar centers in the course of cellular activation [30]: In the course of cellular activation the number of ribosomes increases [23]. This requires synthesis of ribosomal RNA which can be activated very fast [18] and the synthesis of proteins which is less faster activated (reflected by the comparatively slow increase of cytoplasmic ribosomes) [23]. This would mean that in the early phases of cellular activation proteins stored in the fibrillar centers would be consumed and could later on be stored again as the protein synthesis increases. As already mentioned, this is in accordance with our observations.

This concept of the nature of fibrillar centers is for the present hypothetical, but it may serve as a stimulus for future research in this field.

LITERATURE

- [1] ANTEUNIS A., POUICHELET M., GANSMÜLLER A., ROBINEAUX R., Organization of nucleolar DNA in resting lymphocytes as revealed by the diaminobenzidine technique, *J. Ultrastruct. Res.* **69**: 22, 1979.
- [2] BLOOM S. E., GOODPASTURE C., An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes, *Human. Genet.*, **34**: 199, 1976.
- [3] BOURGEOIS C. A., HERNANDEZ-VERDUN D., HUBERT J., BOUTEILLE M., Silver staining of NOR in electron microscopy, *Exptl. Cell Res.*, **123**: 449, 1979.
- [4] BOUTEILLE M., DUPUY-COIN A. M., Localization of nuclear functions at the cellular and molecular level. [In:] BUSCH H., CROOKE S. T., DASKAL Y., *Effects of drugs on the cell nucleus*, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco 1979.
- [5] BUSCH H., *The cell nucleus*, vol. 1, Academic Press, New York, San Francisco, London 1974.
- [6] BUSCH H., SMETANA K., *The nucleolus*, Academic Press, New York, San Francisco, London 1970.
- [7] DERENZINI M., HERNANDEZ-VERDUN D., BOUTEILLE M., Relative distribution of DNA and NOR-proteins in nucleoli visualized by simultaneous Feulgen-like and Ag-NOR-staining procedures, *Biol. Cell.*, **40**: 147, 1981.

- [8] ELLINGER A., WACHTLER F., Über eine Methode zur Darstellung des Nucleolus im Licht- und Elektronenmikroskop, *Mikroskopie*, **36**: 330, 1980.
- [9] ESTABLE C., SOTELO J. R., Una nueva estructura celular: el nucleolonema, *Publ. Inst. Investigaciones Ciencias. Biolog.*, **1**: 105, 1950.
- [10] EVANS H. J., BUCKLAND R. A., PARDUE M. L., Location of genes coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome, *Chromosoma*, **48**: 405, 1974.
- [11] FONTANA F., *Traité sur le venin de la vipère, avec des observations sur la structure primitive du corps animal*, Florence 1781.
- [12] GHOSH S., The nucleolar structure, *Int. Rev. Cytol.*, **44**: 1, 1976.
- [13] GOESSENS G., Localization of NOR in interphase cells, *Cell. Tissue Res.*, **200**: 159, 1979.
- [14] GOESSENS G., LEPOINT A., The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich-tumour cells cultivated in vitro, *Exptl. Cell. Res.*, **87**: 63, 1974.
- [15] GOESSENS G., LEPOINT A., The nucleolus-organizing regions (NOR's): recent data and hypotheses, *Biol. Cell.*, **35**: 211, 1979.
- [16] HEITZ E., Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nucleolen, *Planta*, **12**: 775, 1931.
- [17] HERNANDEZ-VERDUN D., DERENZINI M., BOUTEILLE N., Mise en évidence de l'association des protéines argentaffines nucléolaires avec la chromatine dispersée, *Biol. Cell.*, **41**: 17a, 1981.
- [18] KAY J. E., Early effects of phytohaemagglutinin on lymphocyte RNA-synthesis, *Europ. J. Biochem.*, **4**: 225, 1968.
- [19] MICHELMANN H. W., WACHTLER F., Unpublished observations, 1981.
- [20] MIRRE C., HARTUNG M., STAHL A., Association of ribosomal genes in the fibrillar center of the nucleolus: A factor influencing translocation and non-disjunction in the human meiotic oocyte, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**: 6017, 1980.
- [21] MIRRE C., STAHL A., Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centers in the nucleolus of the mouse oocyte, *J. Cell Sci.*, **48**: 105, 1981.
- [22] MONTGOMERY T. H., Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus, *J. Morph.*, **15**: 265, 1899.
- [23] PETRZILKA G. E., SCHROEDER H. E., Activation of human T-lymphocytes. A kinetic and sterological study, *Cell Tissue Res.*, **201**: 101, 1979.
- [24] RECHER L., WHITESCARVER J., BRIGGS L., Fine structure of a nucleolar constituent, *J. Ultrastruct. Res.*, **29**: 1, 1969.
- [25] RUZICKA V., Zur Geschichte und Kenntnis der feineren Struktur der Nucleolen centraler Nervenzellen, *Anat. Anz.*, **16**: 557, 1899.
- [26] SCHWARZACHER H. G., MIKELSAAR A. V., SCHNEDL W., The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell Genet.*, **20**: 24, 1978.
- [27] SEITE R., PEBUSQUE J. M., ROBAGLIA A., Stereological analysis of circadian rhythms of nucleolar fibrillar centers in neurons of the rat superior cervical ganglion, *Europ. J. Cell Biol.*, **22**: 499, 1980.
- [28] SMITH J. W., STUART R. J., Silver staining of ribosomal proteins, *J. Cell Sci.*, **9**: 253, 1971.
- [29] VINCENT W. S., Structure and chemistry of nucleoli, *Int. Rev. Cytol.*, **4**: 269, 1955.

- [30] WACHTLER F., ELLINGER A., Zur funktionellen Morphologie des Nucleolus, Anat. Anz., **149**: 107, 1981.
- [31] WACHTLER F., ELLINGER A., SCHWARZACHER H. G., Nucleolar changes in human PHA-stimulated lymphocytes, Cell Tiss. Res., **213**: 351, 1980.
- [32] WACHTLER F., MUSIL R., Nucleoli visualized by silver-staining combined with a new RNA-specific fluorochrome, Stain Technol., **54**: 265, 1979.
- [33] WACHTLER F., SCHWARZACHER H. G., ELLINGER A., Zur Morphologie des Nucleolus bei Aktivierung und Inaktivierung von Zellen: Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten in vitro. Acta anat., **111**: 158, 1981.
- [34] WARNER J. R., Distribution of newly formed ribosomal proteins in Hela cell fractions, J. Cell. Biol., **80**: 767, 1979.

Received: November 2th, 1981.

Accepted: November 10th, 1981.

Author's address: Schwarzspanierstr. 17, A-1090, Vienna, Austria.

HETEROCHROMATYNA W GENOMIE ROŚLIN *

HETEROCHROMATIN IN PLANT GENOME

Maria J. OLSZEWSKA

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin,
Instytut Fizjologii i Cytologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Przedstawiono dane wskazujące na zależność między układem heterochromatyny w jądrze interfazowym a obecnością satelitarnego DNA lub zawartością DNA o powtarzalnych sekwencjach oraz na zależność między ilością DNA o powtarzalnych sekwencjach i ilością heterochromatyny. Wskazano na znaczenie analizy liczby i rozmieszczenia prążków C w badaniach ewolucji kariotypów. Omówiono zróżnicowaną replikację heterochromatyny w trakcie endoreplikacji DNA podczas różnicowania komórek oraz modyfikacje w zawartości chromatyny związanej spowodowane przez kondensację euchromatyny związaną ze stanem funkcjonalnym komórki. Wysłunięto postulat zaniechania terminu „heterochromatyna fakultatywna” i „heterochromatyzacja”.

Summary. Relationship between the arrangement of heterochromatin in interphase nuclei and the presence of satellite DNA or the content of repetitive DNA, as well as the relationship between repetitive DNA and heterochromatin content is presented. The importance of the determination of both the number and localization of C-bands in the studies of karyotype evolution is indicated. Differential heterochromatin replication in the course of DNA endoreplication during cell differentiation as well as modifications in the condensed chromatin content related to the functional state of cells is discussed. Abandon of the term „facultative heterochromatin” and „heterochromatization” is postulated.

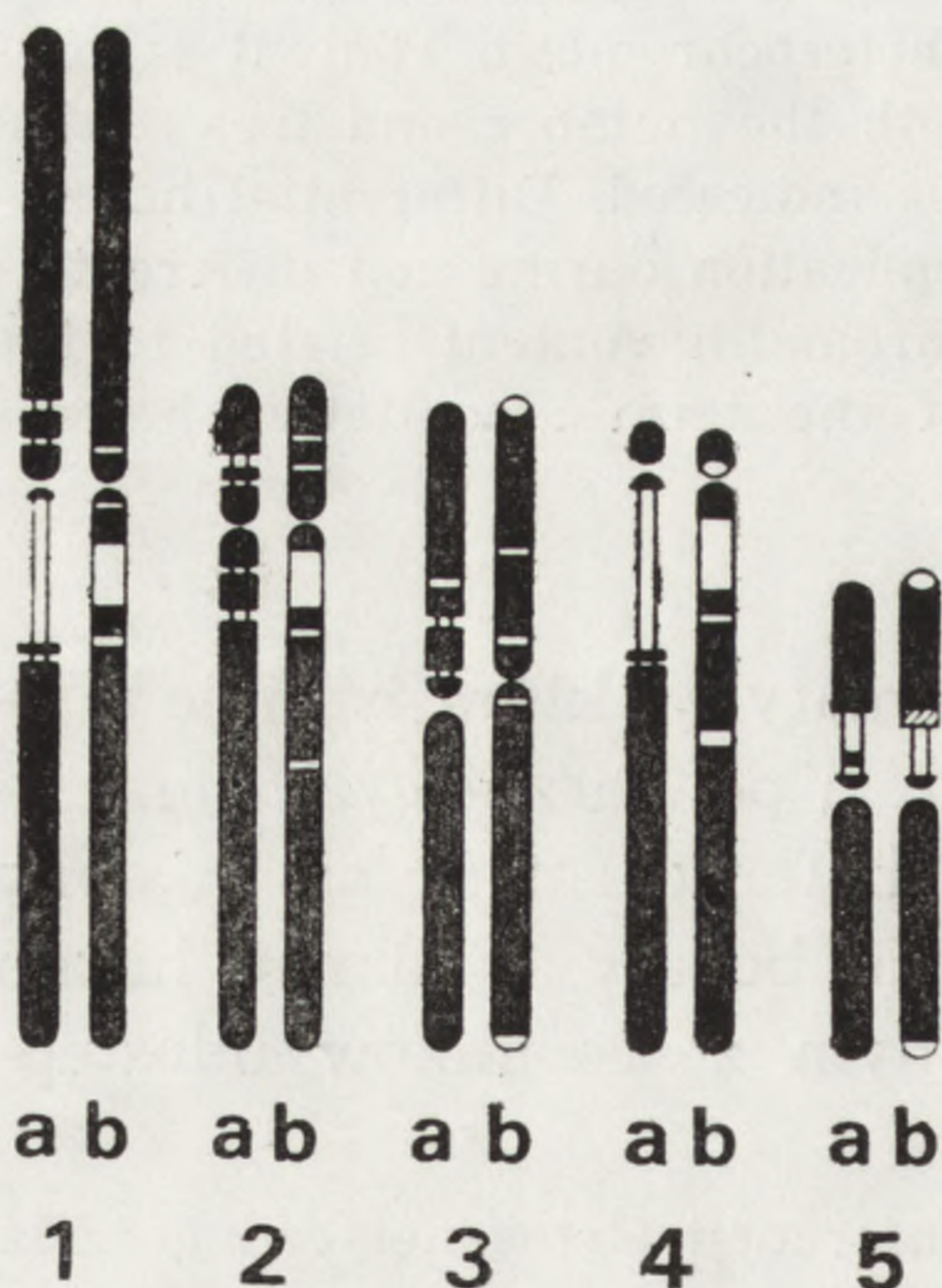
Heterochromatyna stanowi tę frakcję chromatyny, która istnieje zawsze w stanie skondensowanym i zawiera DNA o powtarzających się sekwencjach, nie transkrybowany *in vivo*. W heterochromatynie histony argininowe (H3 i H4), a także umiarkowanie bogaty w lizynę histon H2B, nie ulegają acetylacji, która jest jednym z warunków udostęp-

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981 r.

nienia wzorca (DNA) do transkrypcji [19]. DNA heterochromatyny jest zwykle replikowany w późnej fazie S cyklu komórkowego. Ilość i rozmieszczenie heterochromatyny stanowi stałą cechę genomu, która może być analizowana w chromosomach mitotycznych metodą prążków C.

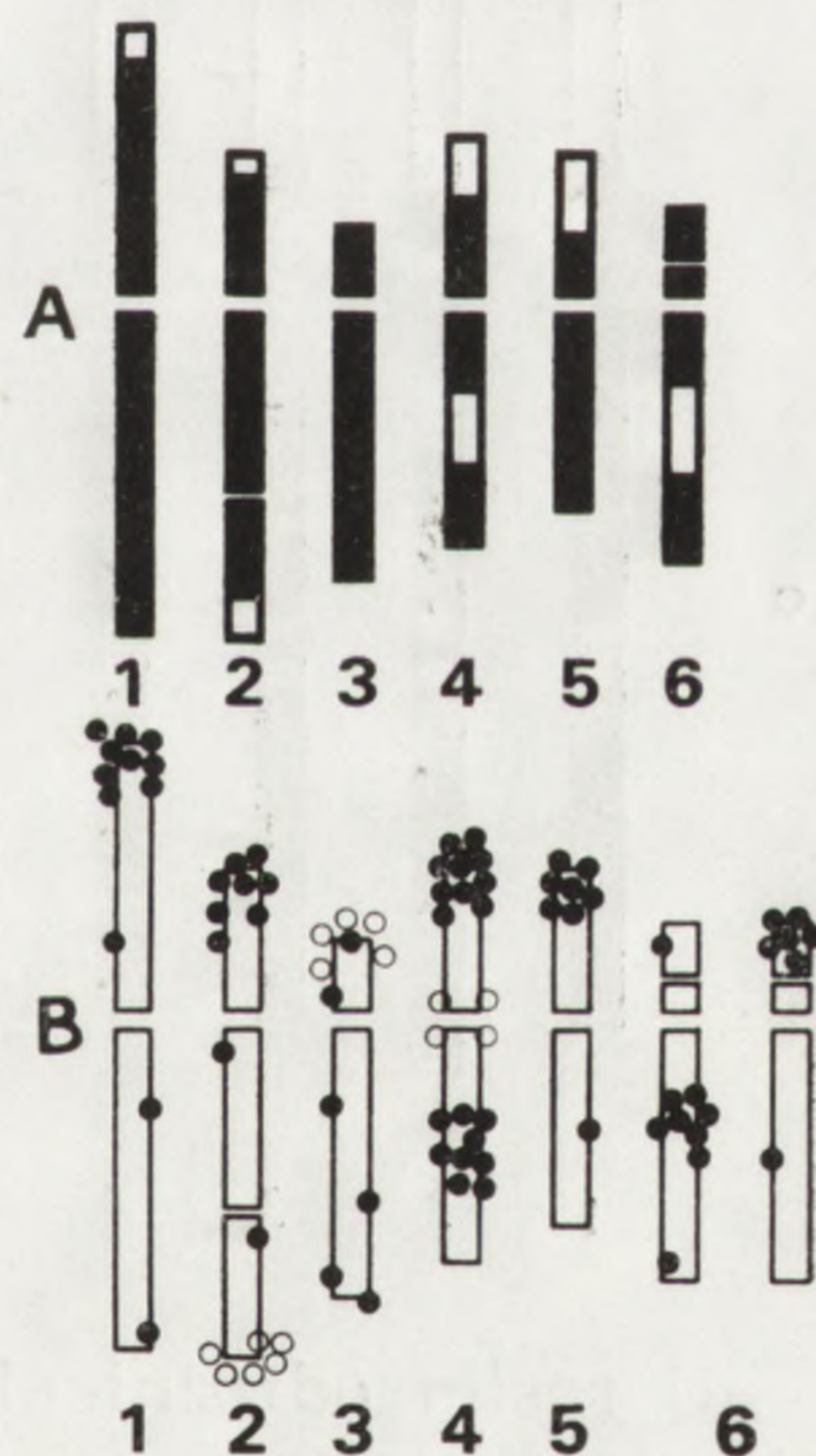
Od reguł tych, chociaż powszechnie przyjętych przy definicji heterochromatyny, istnieją pewne wyjątki. Postulowany przez Heitza [20] w 1929 r. trwały stan kondensacji heterochromatyny (z wyjątkiem krótkiego okresu wczesnej profazy), odpowiadający kondensacji w chromosomach metafazowych, ulega rozluźnieniu w okresie replikacji DNA w tej frakcji chromatyny [24, 31]. Nie zawsze replikacja heterochromatyny odbywa się w późnej fazie S; u *Allium carinatum* rozpoczyna się ona już we wczesnej fazie S [31]. U *Rumex thyrsoiflorus*, gatunku dwupiennego ($\text{♀ XX} + 12\text{A} = 14$, $\text{♂ XY} + 12\text{A} = 15$), oba chromosomy Y są całkowicie heterochromatynowe i widoczne w jądrze interfazowym w postaci grudek skondensowanej chromatyny; ich DNA jest replikowany pod koniec fazy S. Jednakże w premejotycznym okresie w komórkach macierzystych pyłku heterochromatyna chromosomów Y ulega de-kondensacji, co zbiega się z intensywną syntezą RNA i może pośrednio świadczyć o aktywności genetycznej heterochromatyny Y [54].

Pierwszą metodą umożliwiającą lokalizację obszarów heterochromatynowych w chromosomach metafazowych było wprowadzone przez Darlingtona i La Coura w 1938 r. [10] wstępne chłodzenie roślin przed utrwaleniem. Po przeprowadzeniu reakcji Feulgena zostają uwidocznione obszary nie barwiące się, odpowiadające strefom heterochromatyny (ryc. 1 i 2). Zasadniczy zwrot w możliwości oceny rozmieszczenia heterochromatyny w chromosomach metafazowych nastąpił w wyniku wpro-



Ryc. 1. Lokalizacja segmentów heterochromatynowych w chromosomach metafazowych *Trillium camschatcense* wykryta metodą wstępnego chłodzenia (a) i metodą prążków C (b) [50]

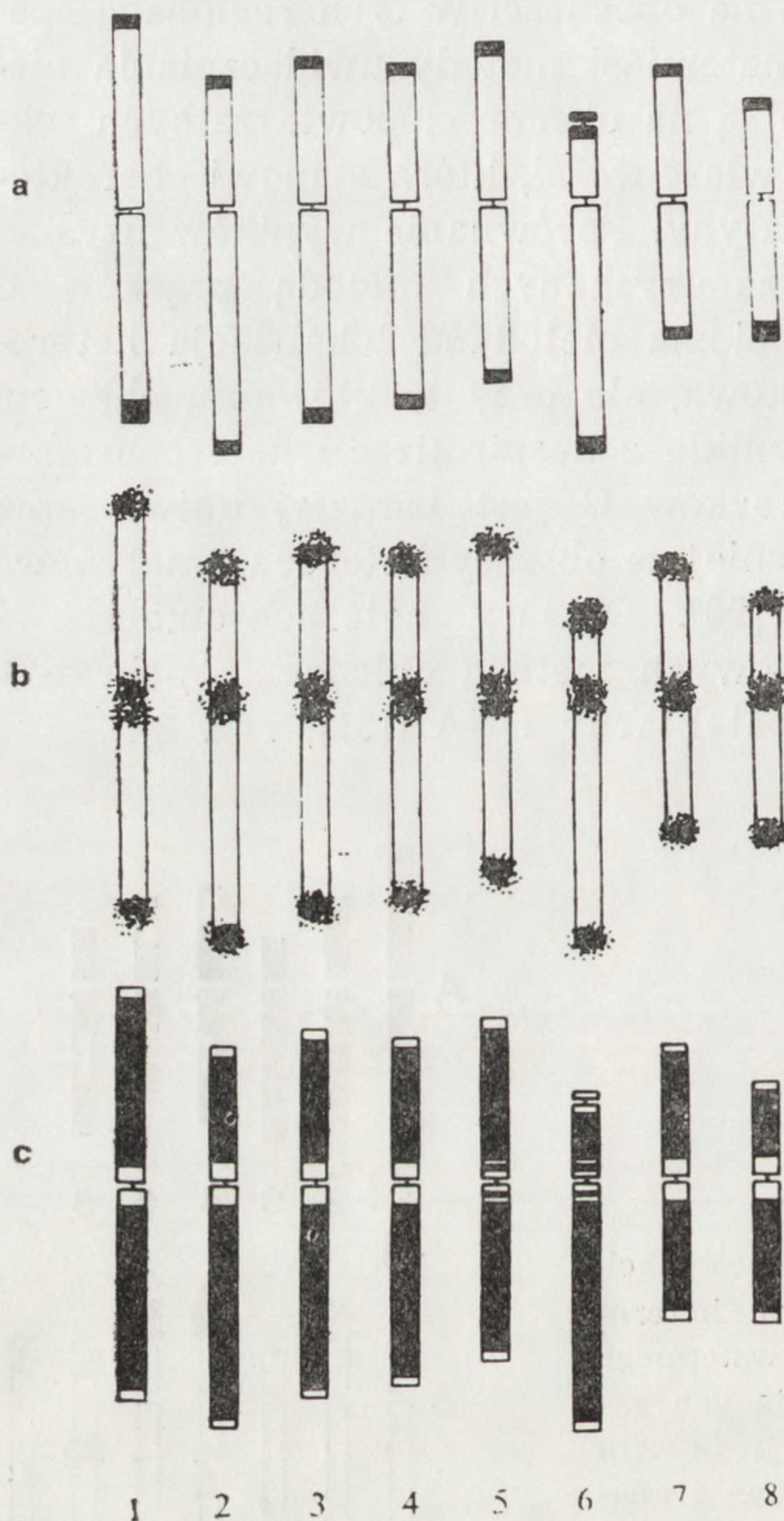
wadzenia tzw. metod prążkowych, umożliwiających zróżnicowane barwienie chromosomów metafazowych. Obecnie przyjmuje się, że metoda prążków C jest specyficzna dla heterochromatyny oraz, w mniejszym stopniu, dla chromatyny przycentromerowej. Mechanizm powstawania prążków C centromerowych polega na obecności w tych regionach specyficznych białek niehistonowych, natomiast metody uwidaczniania niecentromerowych prążków C oparte są na obecności powtarzalnych sekwencji w DNA [22], a więc na tej właściwości, która stanowi charakterystyczną cechę DNA heterochromatyny. Porównanie wyników uzyskanych przez wstępne chłodzenie oraz uzyskanych metodą prążków C (ryc. 1) wykazuje, że ujawniona obiema metodami lokalizacja heterochromatyny jest w zasadzie jednakowa, ale przy traktowaniu chłodem ujawniają się dłuższe segmenty wynikłe z despiralizacji heterochromatyny [16, 50]. Ponadto metoda prążków C jest bardziej uniwersalna i specyficzna, ponieważ ujawnia liczniejsze obszary heterochromatynowe niż metoda wstępnego chłodzenia [50]. Obszary heterochromatynowe wykryte w chromosomach metafazowych metodą chłodzenia pokrywają się z obszarami zawierającymi satelitarny DNA ([51], ryc. 2).



Ryc. 2. Porównanie lokalizacji w chromosomach metafazowych *Scilla sibirica* segmentów heterochromatynowych wykrytych metodą wstępnego chłodzenia (A) oraz segmentów zawierających satelitarny DNA (B) (metodą hybrydyzacji *in situ* komplementarnego RNA, uzyskanego drogą transkrypcji *in vitro* satelitarnego DNA); chromosom 6 wykazywał dwie rozmaite pozycje segmentów zawierających satelitarny DNA [51]

U *Allium cepa* [47] późno replikujący DNA wykryty metodą włączania ^3H -tymidyny obejmuje obszary telomerowe i przycentromerowe (ryc. 3b). Metoda o większej zdolności rozdzielczej, a mianowicie inkubacja z bromodezoksyurydyną podczas fazy S, pozwoliła na wykrycie u tego gatunku dodatkowych obszarów późno replikujących DNA ([7], ryc. 3c). Porównanie lokalizacji w chromosomach metafazowych stref zawierających późno replikujący DNA z lokalizacją prążków C (ryc. 3) wyka-

zuje, że późno replikująca chromatyna przycentromerowa nie jest heterochromatyną; heterochromatyna znajduje się tylko w obszarach telomerów oraz przewężenia wtórnego. U *Vicia faba* interstycjalne prążki C zawierają późno replikujący DNA [11].

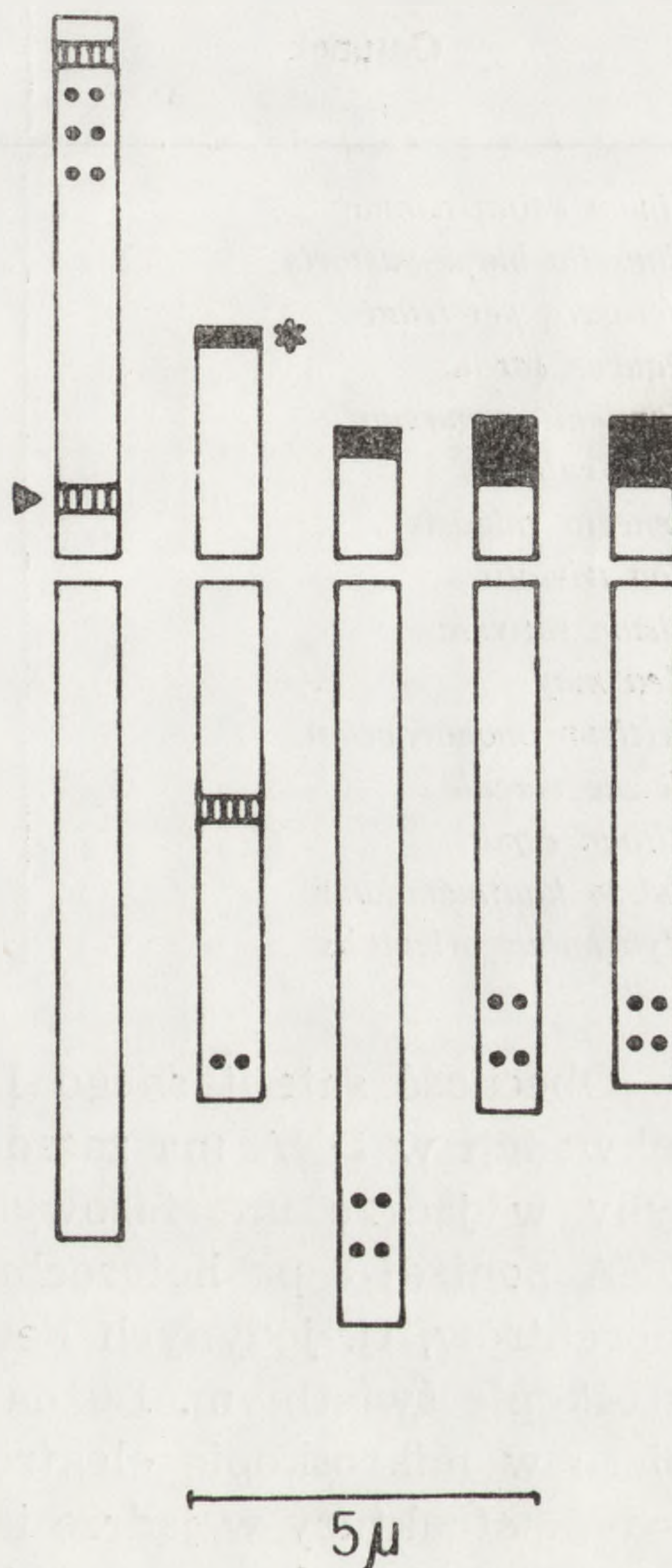


Ryc. 3. Porównanie lokalizacji w chromosomach metafazowych *Allium cepa*: a — prążków C, b — późno replikującego DNA metodą włączania ^3H -tymidyny, c — późno replikującego DNA metodą włączania bromodezoksyurydyny [7]

U roślin odróżnienie w heterochromatynie rozmaitych jej rodzajów zostało umożliwione dzięki wprowadzeniu przez Greilhubera metody wykrywania prążków Hy [22]. Ujawnienie tych prążków polega na odmiennej odporności poszczególnych rodzajów heterochromatyny na hydrolizę HCl w temp. 60–80°C. U *Vicia faba* prążki te stanowią nieznaczną tylko część heterochromatyny ujawnionej metodą prążków C [16], u *Vicia melanops* zaś lokalizacja telomerowych prążków Q, C i Hy pokrywa się ([9], ryc. 4).

Obszary chromatyny C w chromosomach metafazowych wykazują

jaskrawą fluorescencję typową dla prążków Q (ryc. 4). Natomiast wykrywanie prążków G u roślin napotyka trudności spowodowane przez daleko bardziej posuniętą kondensację chromatyny w chromosomach metafazowych u roślin niż u zwierząt [17].



Ryc. 4. Lokalizacja trzech rodzajów prążków heterochromatynowych w chromosomach metafazowych *Vicia melanops*: prążki N (przewężenie wtórne) — zakreskowane, prążki Q, C i Hy — czarne, przybliżona pozycja interkalarnych prążków Q — czarne kropki; trójkąt wskazuje prążek N nie barwiący się metodą prążków C i nie zawsze metodą prążków Hy; gwiazdka wskazuje prążek ujawniany metodą Q i C, lecz z trudem metodą Hy [9]

Rośliny wyższe różnią się znacznie rozmiarami genomu, tj. zawartością podstawową (2C) DNA; rozpiętość ilości 2C DNA wynosi od 0,5 pg do 120 pg (u gatunków diploidalnych). Zawartość wszystkich frakcji powtarzalnego DNA zwiększa się w miarę zwiększania zawartości 2C DNA [2, 13, 34] (tab. 1 i 3). Satelitarny DNA został stwierdzony tylko u gatunków z zawartością 2C DNA do 3 pg [21]; stanowi on 10–30% całkowitej zawartości DNA. Wyjątek od tej reguły stanowi *Datura innoxia* zawierający 4,6 pg 2C DNA [4], w którym wykryto 2 pasma satelitarnego DNA [46], oraz *Scilla sibirica* — 63,4 pg 2C DNA [18] i *Vicia faba* — 26,7 pg 2C DNA [4], jak to wykazał ten sam zespół, który wysunął koncepcję o występowaniu satelitarnego DNA tylko u gatunków z zawartością 2C DNA do 3 pg [51].

TABELA 1

Ilość DNA (pg) i zawartość powtarzalnych sekwencji DNA u niektórych gatunków roślin okrytozalążkowych (według [13])

Gatunek	Ploidalność	2C DNA	Zawartość powtarzalnych sekwencji DNA (%)
<i>Linum usitatissimum</i>	2x	1,5	59
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	4x	1,7	46
<i>Veronica persicum</i>	4x	1,9	63
<i>Daucus carota</i>	2x	2,1	62
<i>Lamium purpureum</i>	2x	2,7	60
<i>Beta vulgaris</i>	2x	2,7	63
<i>Senecio vulgaris</i>	8x	3,5	74
<i>Poa trivialis</i>	2x	6,9	82
<i>Pisum sativum</i>	2x	9,9	75
<i>Zea mays</i>	2x	11,0	78
<i>Triticum monococcum</i>	2x	14,0	80
<i>Secale cereale</i>	2x	18,9	85
<i>Allium cepa</i>	2x	33,5	95
<i>Tulipa kaufmanniana</i>	2x	62,5	73
<i>Hyacinthus orientalis</i>	4x-1	98,1	75

Obecność satelitarnego DNA oraz zawartość innych powtarzalnych sekwencji w DNA ma zasadnicze znaczenie dla wyglądu heterochromatyny w jądrze interfazowym. W jądrach gatunków z zawartością 2C DNA poniżej 3 pg heterochromatyna występuje w postaci tzw. euchromocentków, tj. jedynych Feulgen-dodatnich struktur widocznych w mikroskopie świetlnym. Luźna euchromatyna może być uwidoczniiona dopiero w mikroskopie elektronowym (ryc. 5). Euchromocentry stanowią jedyne struktury w jądrze interfazowym wybarwiające się metodą prążków C. Heterochromatyna identyfikowana tą metodą w chromosomach metafazowych może być zlokalizowana tylko przycentromerowo (*Cucumis sativus* [49]) lub przycentromerowo i w obszarze telomerów (*Trigonella foenumgraecum* [27]). Ten typ struktury jąder nosi nazwę areticulate (Delay, ref. [3]) i skorelowany jest z obecnością satelitarnego DNA (tab. 2). Zawartość DNA/chromatydy wynosi w tym typie struktury jąder 0,042 do 0,193 pg [3].

U gatunków z zawartością 2C DNA od 4 pg do 33,5 pg (tab. 2) struktura jąder jest typu reticulate (Delay, ref. [3]). W jądrach takich obok nieregularnych w kształcie obszarów heterochromatynowych — chromocentków — widoczna jest w mikroskopie świetlnym luźna euchromatyna, znacznie bardziej obfita niż w typie areticulate (ryc. 6). Zawartość DNA/chromatydy wynosi od 0,171 do 0,939 pg [3]. Heterochromatyna

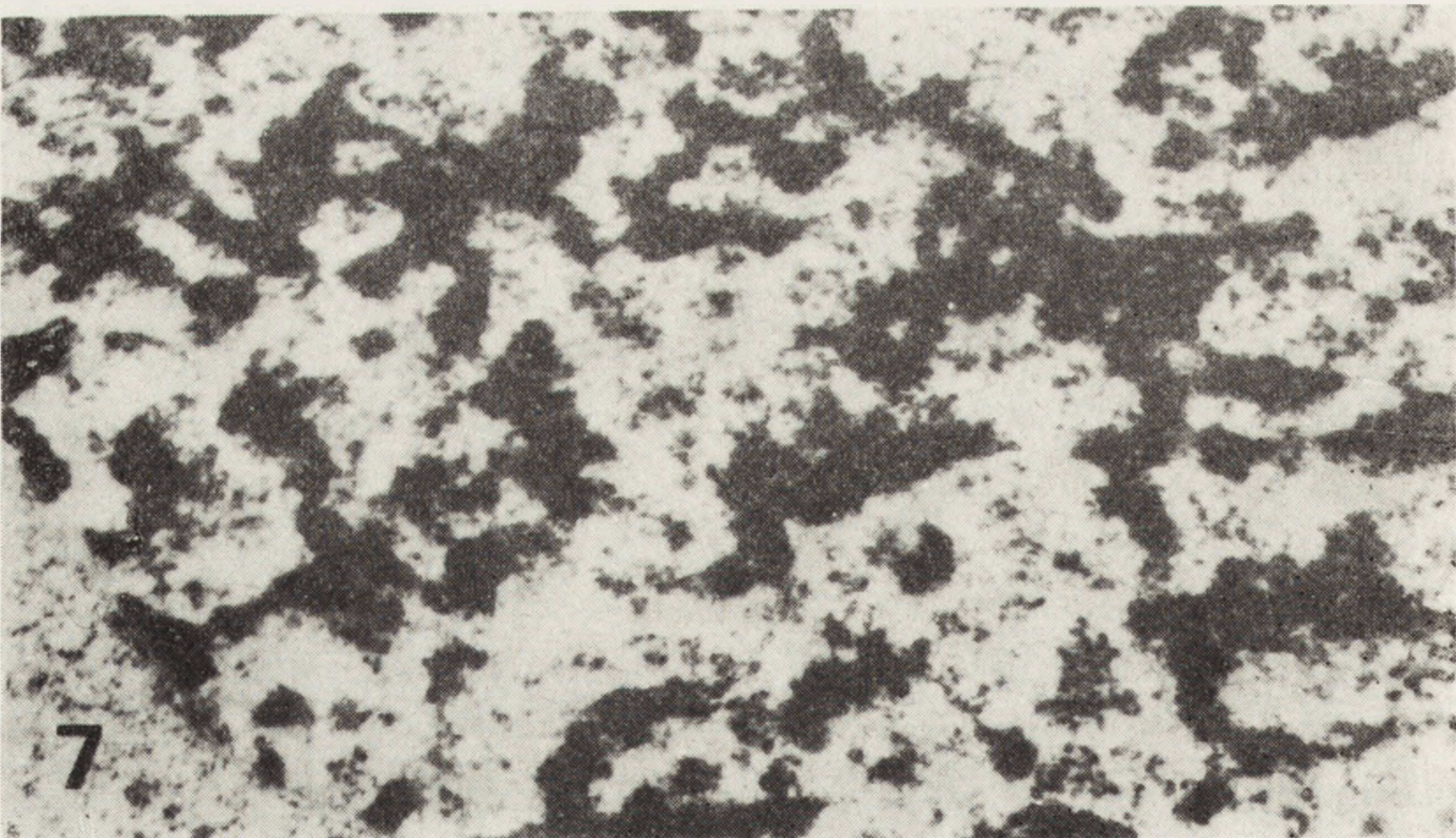
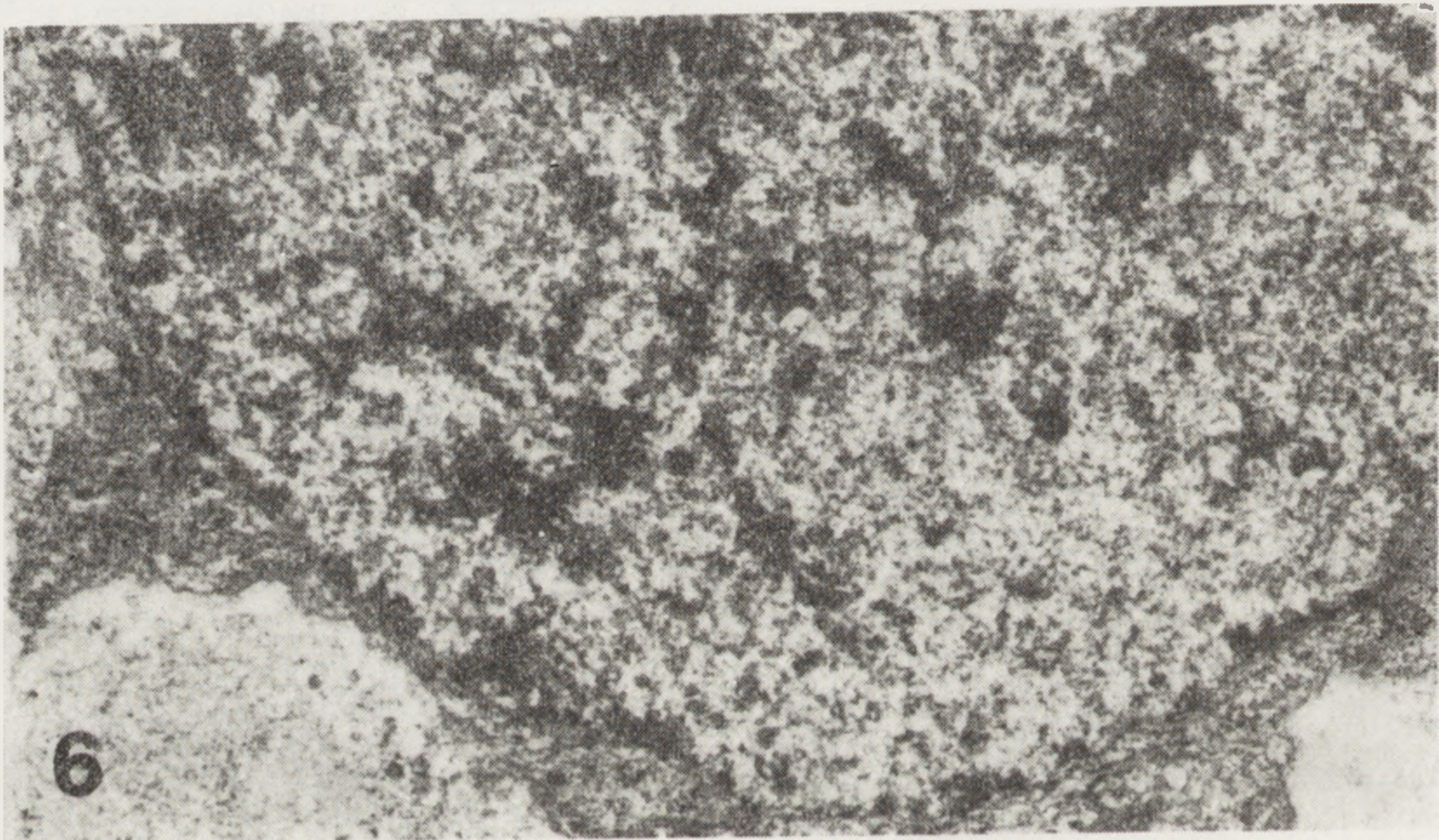
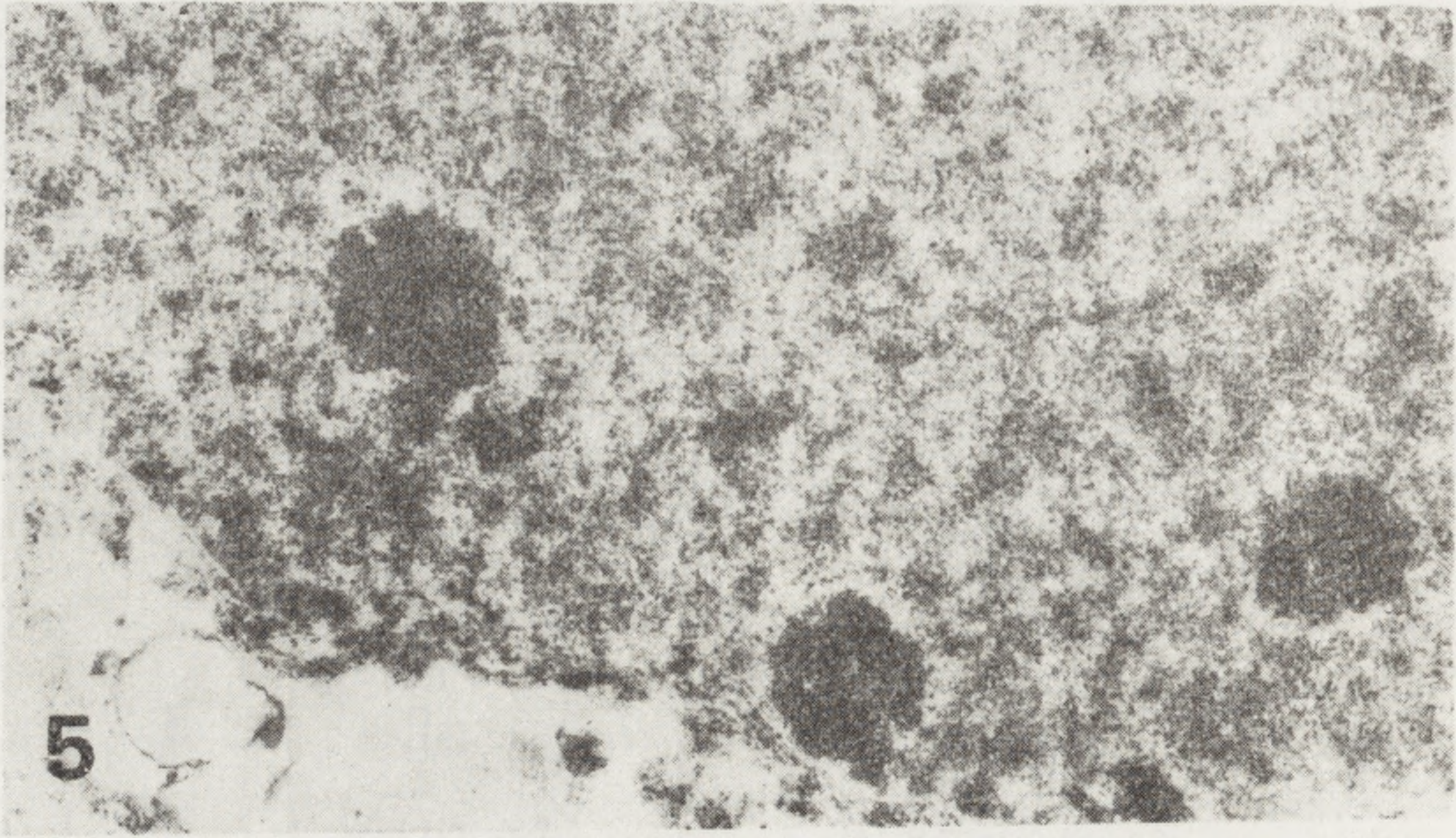
TABELA 2

Zależność między zawartością 2C DNA, obecnością satelitarnego DNA a typem struktury jądra (według [3], zmodyfikowane)

Gatunek	Zawartość 2C DNA (pg), autor	Typ struktury jądra, autor	Obecność satelitarnego DNA, autor
<i>Cucumis melo</i>	1,9 [21]	areticulate [43]	+ [43]
<i>Daucus carota</i>	2,0 [4]	areticulate [3]	+ [12]
<i>Cucumis sativus</i>	2,1 [4]	areticulate [3]	+ [21]
	2,7 [21]		
<i>Beta vulgaris</i>	2,5 [4, 21]	areticulate [3]	— [21]
<i>Cucurbita pepo</i>	2,6 [21]	areticulate [37]	+ [21]
<i>Nicotiana silvestris</i>	4,2 [4]	reticulate [3]	— [21]
	4,4 [21]		
<i>Nicotiana tabacum</i>	7,8 [4]	reticulate [3]	— [21]
	9,6 [21]		
<i>Nicotiana rustica</i>	8,2 [4]	reticulate [3]	— [21]
	9,6 [21]		
<i>Zea mays</i>	5,8 [41]		
	6,5 [4]		
	7,5 [21]	reticulate [3]	— [21]
<i>Helianthus annuus</i>	8,4 [4]	reticulate [3]	— [21]
	8,8 [21]		
<i>Pisum sativum</i>	9,8 [4]	reticulate [3]	— [21]
	10,0 [21]		
<i>Vicia faba</i>	26,7 [4]	reticulate [3]	+ [51]
<i>Allium cepa</i>	33,5 [52]	eureticulate [3]	— [21]
<i>Tradescantia virginiana</i>	56,0 [4]	eureticulate [3]	— [21]
	62,0 [21]		
<i>Hyacinthus orientalis</i>	49,0 [21]	eureticulate [3]	— [21]
(2x)	49,7 [4]		

identyfikowana metodą prążków C zlokalizowana jest w różnych strefach chromosomów — przycentromerowych, telomerowych i interstycjalnych (np. gatunki rodzaju *Vicia* [9, 11, 16]).

U gatunków z zawartością 2C DNA od 10 do 120 pg jądra są typu eureticulate (Delay, ref. [3]), a zawartość DNA/chromatydy wynosi od 0,428 do 2,333 pg [3]. W takich jądrach niewidoczne są obszary heterochromatyny; fibryle chromatynowe układają się w zwarte pasma (ryc. 7), widoczne w mikroskopie świetlnym w postaci nici zwanych chromonemami. U *Haemanthus katharinae* (2C DNA — 118 pg [41]), późno replikujący DNA, poza położeniem przycentromerowym, zlokalizowany jest również interstycjalnie [44]. Jednak zawartość heterochromatyny ujawnianej metodą prążków C i Q u gatunków rodzaju *Haemanthus* jest nieznaczna, występuje ona bowiem tylko przy przewężeniu wtórnym [53].



Średnica fibryli chromatynowych w obu krańcowo odmiennych typach struktury jądra, uwarunkowanych przez różnice w zawartości 2C DNA (areticulate i eureticulate), w chromatynie luźnej jest podobna i wynosi 2,3–3,0 nm [35].

Obecnie istnieją dowody świadczące o identyczności heterochromatyny chromosomów metafazowych z chromocentrami jąder interfazowych w merystemie. Metodą hybrydyzacji *in situ* DNA jąder interfazowych z komplementarnym RNA (cRNA), transkrybowanym *in vitro* z satelitarnego DNA, wykazano że hybrydyzacja zachodzi wybiórczo na terenie chromocentrow [51]. Analogicznie udowodniono, że obszary chromosomów metafazowych uwidocznione metodą prążków C przekształcają się w jądrze interfazowym w chromocentry, również intensywnie barwiące się tą metodą. U szeregu gatunków roślin stwierdzono, że rozmiary i liczba prążków C w chromosomach metafazowych jest skorelowana z rozmiarami chromocentrow; liczba ich w jądrze interfazowym może być nieco mniejsza niż w chromosomach metafazowych w wyniku połączenia blisko położonych stref heterochromatynowych [14, 28]. Stwierdzenie to ma duże znaczenie metodyczne, ponieważ umożliwia badanie zależności między zawartością powtarzalnych sekwencji DNA a ilością heterochromatyny oraz analizę zmian w zawartości heterochromatyny podczas różnicowania komórek.

Związek jaki zachodzi między zawartością powtarzalnych sekwencji w DNA, zawartością heterochromatyny w jądrze interfazowym i rozmiarami prążków C w chromosomach metafazowych został wykazany u kilku gatunków rodzaju *Lathyrus* [26, 34] (tab. 3). Mimo że ilość heterochromatyny nie jest całkowicie skorelowana z zawartością DNA o powtarzalnych sekwencjach, można stwierdzić istnienie zależności między tymi dwiema właściwościami genomu. Zależności takiej nie udało się wykazać u gatunków z rodzaju *Anemone* (tab. 4), u których zawartość DNA o powtarzalnych sekwencjach nie jest skorelowana ani z zawartością całkowitego DNA, ani z ilością heterochromatyny [8]. Brak zależności między ilością DNA o powtarzalnych sekwencjach a ilością heterochromatyny został również stwierdzony u 4 gatunków z podrodziny *Anthemideae* (*Compositae* = *Asteraceae* [15]). Jest prawdopodobne, że u podstaw tego zjawiska leżą odrębne szlaki ewolucyjne poszczególnych

Ryc. 5. *Cucurbita pepo*, mikrofotografia elektronowa fragmentu jądra typu areticulate; pow. 15 000× [35]

Ryc. 6. *Helianthus annuus*, mikrofotografia elektronowa fragmentu jądra typu reticulate; pow. 15 000× (Damsz, npbl.)

Ryc. 7. *Haemanthus katharinae*, mikrofotografia elektronowa fragmentu jądra typu eureticulate; pow. 15 000× [35]

TABELA 3

Zależność między zawartością powtarzalnych sekwencji DNA, ilością heterochromatyny i rozmiarami prążków C u gatunków z rodzaju *Lathyrus*

Gatunek	2C DNA pg*	Zawartość powtarzalnych sekwencji*		% heterochromatyny w jądrze interfazowym	Rozmiary prążków C (% całkowitej długości chromosomów metafazowych)**
		% całkowitego DNA	pg		
<i>L. clymenum</i>	13,75	62	8,52	15,62*	19,97 ± 0,20
<i>L. aphaca</i>	13,97	63	8,80		17,30 ± 0,09
<i>L. cicera</i>	14,18	58	8,22	19,45***	21,30 ± 0,30
<i>L. tingitanus</i>	17,88	59,5	10,95	29,0*	32,45***
<i>L. sativus</i>	17,15	66	11,90	25,95*	
<i>L. hirsutus</i>	20,27	70	14,10	30,25*	
<i>L. silvestris</i>		70***		35,86***	29,15 ± 0,08

* [34], ** [26], *** ref. [26]

TABELA 4

Zależność między ilością DNA, zawartością powtarzalnego DNA i heterochromatyny u gatunków z rodzaju *Anemone*

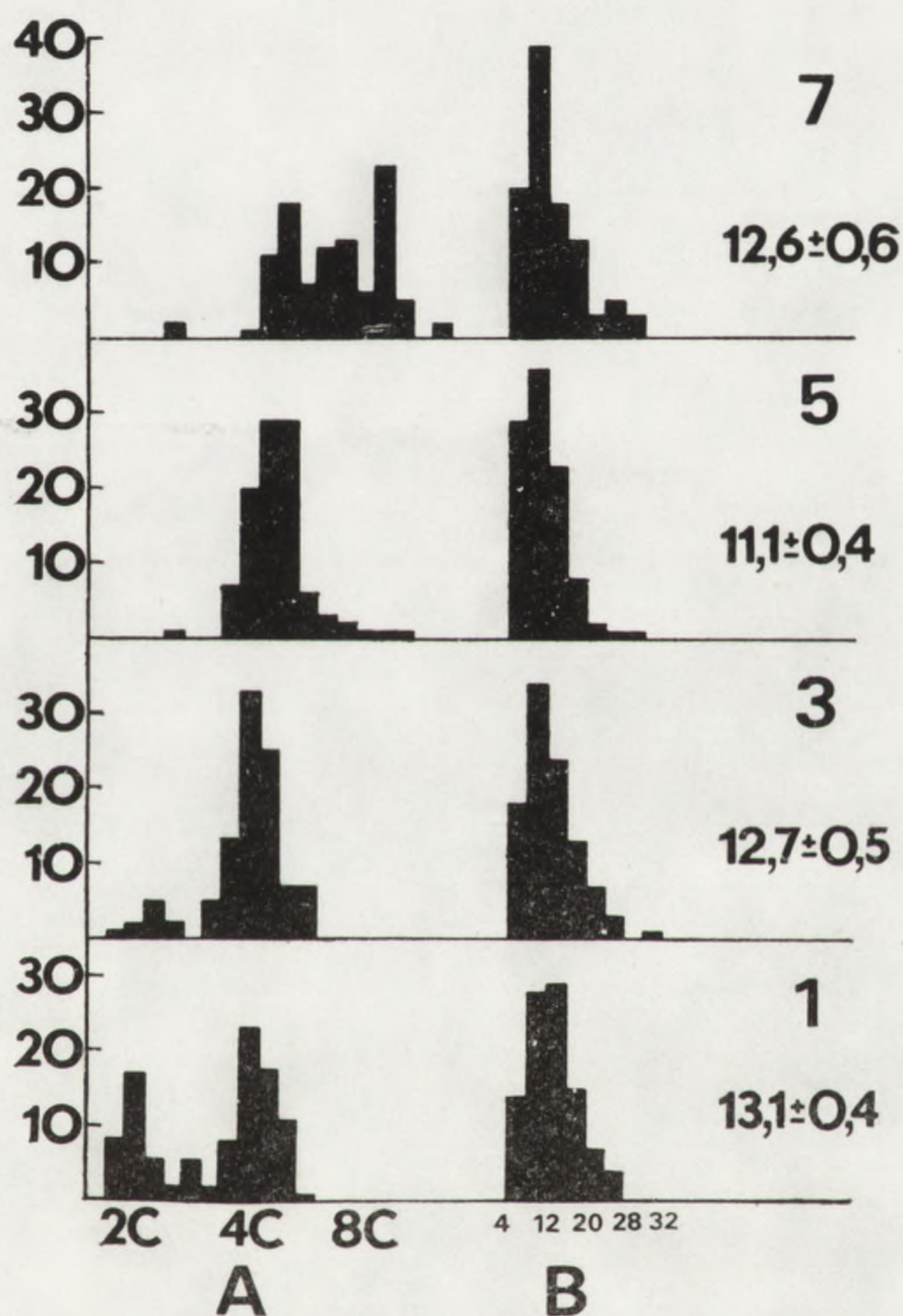
Gatunek	DNA/komórkę, pg [45]	% powtarzalnego DNA [8]	% heterochromatyny [28]
<i>A. coronaria</i>	19,9	53	8
<i>A. virginiana</i>	21,0	67	< 2
<i>A. riparia</i>	21,0	67	< 2
<i>A. cylindrica</i>	21,9	65	< 2
<i>A. pavonina</i>	29,3	62	11
<i>A. blanda</i>	32,0	57	22

gatunków, w obrębie których następują skokowe zmiany w zawartości heterochromatyny [2, 15, 18].

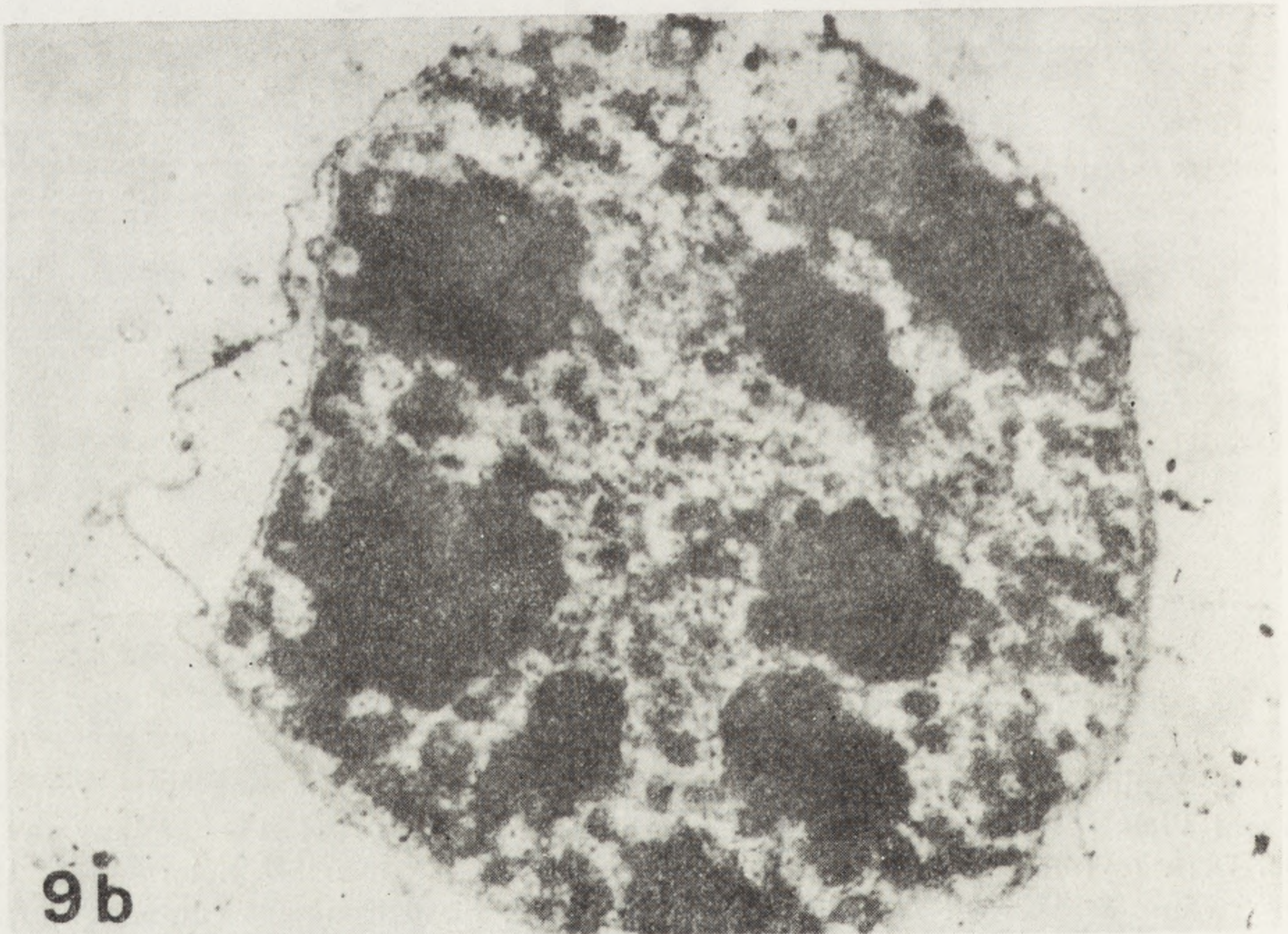
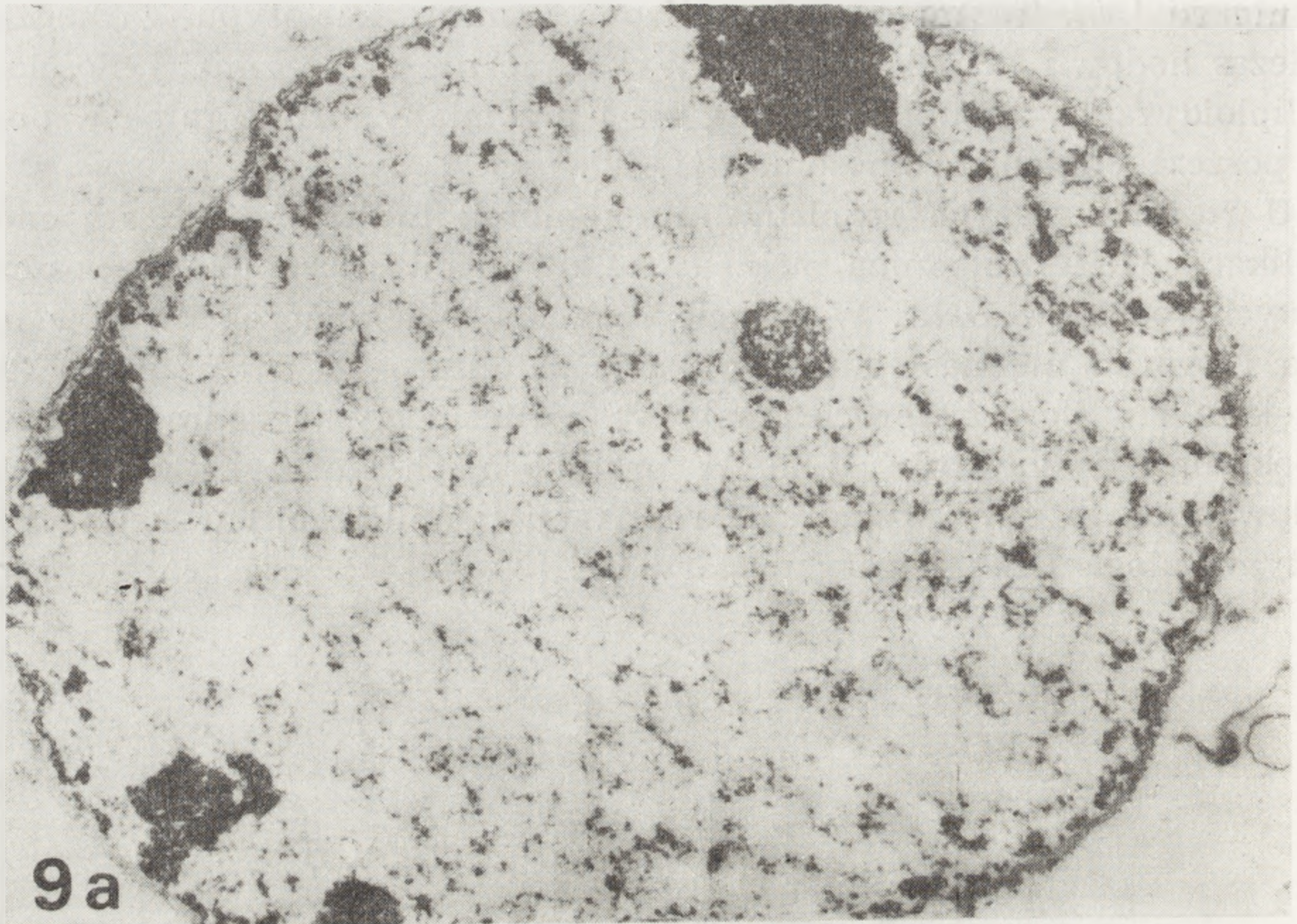
Pomiary ilości heterochromatyny identyfikowanej metodą prążków C oraz analiza jej lokalizacji w chromosomach metafazowych są pomocne w badaniach mechanizmów uczestniczących w ewolucji kariotypów. Badania takie są zaledwie rozpoczęte, jednak ze względu na ich znaczenie i perspektywy warto przytoczyć niektóre wyniki. U rodzaju *Lathyrus* w toku ewolucyjnej specjalizacji następuje stopniowe zmniejszanie ilości heterochromatyny i zawartości DNA o powtarzalnych sekwencjach. Gatunki wieloletnie różnią się od jednorocznych liczbą i lokalizacją prążków C: prymitywne gatunki wieloletnie zawierają więcej prążków C niż jednoroczne [26]. Lokalizacja prążków C ujawniła różnice między osobnikami *Galanthus nivalis* pochodzącymi z europejskiej części ZSRR

i Bułgarii [50]. Tą metodą stwierdzono zmiany kariotypu zachodzące podczas hodowli tkanek *in vitro*. Wykazano nie tylko zmiany ilościowe (poliploidyzacja, aneuploidyzacja), ale i przemiany strukturalne w obrębie poszczególnych chromosomów [1, 42].

U roślin wyższych różnicowaniu komórek towarzyszy często endoreplikacja DNA, połączona niekiedy ze zróżnicowaną replikacją poszczególnych rodzajów DNA. W trakcie różnicowania komórek owoców melona i ogórka nie następuje replikacja satelitarnego DNA, a więc nie zwiększa się ilość heterochromatyny; nieliczne tylko jądra wykazują zwiększoną jej zawartość [43]. W protokormach storczyka *Cymbidium* hodowanych *in vitro* wybiórczej replikacji (amplifikacji) w heterochromatynie ulega DNA bogaty w pary GC [30, 48]. Podczas różnicowania



Ryc. 8. Zmiany zawartości DNA i heterochromatyny w jądrach miękiszu kory korzeni *Vicia faba* var. *major* podczas różnicowania komórek; A — zmiany zawartości DNA (cytofotometria po reakcji Feulgena), B — zawartość heterochromatyny wykrywanej w jądrach metodą prążków C; obok histogramów średnia powierzchnia heterochromatyny w jednostkach roboczych; odcięta: A — zawartość DNA, B — heterochromatyny (w jednostkach roboczych); rzędna — liczba jąder; 1, 3, 5, 7 — kolejne 1 mm odcinki korzenia licząc od szczytu merystemu (A — Olszewska i Osiecka, npbl., B — Kononowicz i Wałdoch, npbl.)



Ryc. 9. Mikrofotografie elektronowe jąder z komórek merystematycznych *Lupinus albus* (typ areticulate); a — kontrola, b — z roślin głodzonych przez odcięcie liścieni; pow. 15 000 \times [23]

komórek epikotyli grochu obniżenie replikacji DNA o powtarzalnych sekwencjach jest tylko przejściowe [5]. W komórkach miękiszu kory korzeni *Vicia faba* L. var. *major*, mimo zwiększenia zawartości DNA z 2C-4C, ilości charakterystycznej dla komórek merystemu, do 4C-8C w strefie zróżnicowanej, zawartość heterochromatyny identyfikowanej metodą prążków C jest taka sama jak w merystemie, co wskazuje na obniżoną jej replikację (ryc. 8).

Zwiększenie zawartości chromatyny zwartej bez towarzyszącej replikacji DNA jest zjawiskiem stosunkowo częstym i ma miejsce podczas niektórych szlaków różnicowania komórek, jak np. przy różnicowaniu plemników. W niciach spermatogenicznych *Chara vulgaris* ilość chromatyny zwartej w późnej fazie G₂ zwiększa się trzykrotnie po 5 podziałach komórek, stanowiących pierwszy etap różnicowania plemników [38], i wiąże się z obniżaniem aktywności transkrypcyjnej [39]. W merystemach eksperymentalne, odwracalne obniżenie aktywności transkrypcyjnej — np. w wyniku działania oktynomycyny C [36] lub głodzenia roślin [23] — powoduje trzykrotne zwiększenie powierzchni zajętej przez chromatynę zwartą (ryc. 9). U roślin uprzednio głodzonych, a następnie przeniesionych na pożywkę z sacharozą, wznowieniu aktywności transkrypcyjnej towarzyszy zmniejszenie obszarów chromatyny zwartej [23]. Przytoczone fakty ilustrują, znaną głównie z badań komórek zwierzęcych, zależność między zawartością chromatyny zwartej a aktywnością transkrypcyjną (por. [25]) i nie są związane z jakąkolwiek modyfikacją ilościową lub jakościową DNA.

Brown [6] wprowadził pojęcie heterochromatyny konstytucyjnej, zlokalizowanej w obszarze przycentromerowym i telomerowym, będącej trwałą cechą genomu, oraz heterochromatyny fakultatywnej, tj. ulegającej kondensacji euchromatyny. Mimo zależności między zawartością chromatyny zwartej a aktywnością transkrypcyjną, terminy „heterochromatyna fakultatywna”, „heterochromatyzacja” są powszechnie stosowane. Spotkały się one z trafną krytyką Nagla [32, 33]. Terminy te powinny być odrzucone, ponieważ w świetle obecnych danych ilość heterochromatyny jest stałą cechą genomu zdeterminowaną przypuszczalnie przez ilość DNA zawierającego powtarzalne sekwencje, podczas gdy kondensacja euchromatyny, powodująca zwiększenie ilości chromatyny zwartej, jest powodowana przez rozmaite modyfikacje w obrębie jej białek niehistonowych, m.in. przez zwiększenie ilości mostów S—S kosztem grup —SH (ref. [29]; [40]).

LITERATURA

- [1] ASHMORE S. E., GOULD A. R., Karyotype evolution in a tumour derived plant tissue culture analysed by Giemsa C-banding, *Protoplasma*, **106**: 297-308, 1981.
- [2] BACHMANN K., PRICE H. J., Repetitive DNA in *Cichorieae* (*Compositae*), *Chromosoma* (Berl.), **61**: 267-275, 1977.
- [3] BARLOW P. W., Determinants of nuclear chromatin structure in Angiosperms, *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.*, **18**: 193-205, 1977.
- [4] BENNETT M. D., SMITH J. B., Nuclear DNA amounts in angiosperms, *Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B*, **274**: 227-274, 1976.
- [5] BROEKAERT D., Van OOSTVELDT P., Van PARIJS R., Differential DNA replication in *Pisum sativum* L. seedlings at the onset of germination, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **174**: 629-640, 1979.
- [6] BROWN S. W., Heterochromatin, *Science*, **151**: 417-425, 1966.
- [7] CORTES F., GONZALES-GIL G., LOPEZ-SAEZ J. F., Differential staining of late replicating DNA-rich regions in *Allium cepa* chromosomes, *Caryologia*, **33**: 193-202, 1980.
- [8] CULLIS C. A., SCHWEITZER D., Repetitious DNA in some *Anemone* species, *Chromosoma* (Berl.), **44**: 417-426, 1974.
- [9] D'AMATO G., BIANCHI G., CAPINERI R., MARCHI P., Heterogeneity of heterochromatin segments and karyotype definition in *Vicia melanops* Sibth. and Sm., *Caryologia*, **33**: 347-351, 1980.
- [10] DARLINGTON C. D., La COUR L. F., Differential reactivity of chromosomes, *Ann. Bot. N. S.*, **2**: 615-625, 1938.
- [11] DÖBEL P., SCHUBERT I., RIEGER R., Distribution of heterochromatin in a reconstructed karyotype of *Vicia faba* as identified by banding and DNA-late replication patterns, *Chromosoma* (Berl.), **69**: 193-209, 1978.
- [12] DÜHRSEN E., NEUMANN K.-H., Characterization of satellite-DNA of *Daucus carota* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, **100**: 447-454, 1980.
- [13] FLAVELL R. B., BENNETT M. D., SMITH J. B., SMITH D. B., Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence in plants, *Biochem. Genet.*, **12**: 257-269, 1974.
- [14] FRIEBE B., Spezifische Giemsa-Färbung von heterochromatischen Chromosomensegmenten bei *Vicia faba*, *Allium cepa* und *Paeonia tenuifolia*, *Theor. Appl. Genet.*, **47**: 275-283, 1976.
- [15] FUHRMAN B., NAGL W., Chromatin organization and repetitive DNA in *Anacyclus* and *Anthemis* (*Asteraceae*), *Pl. Syst. Evol. Suppl.*, **2**: 235-245, 1979.
- [16] GREILHUBER J., Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C-bands in *Vicia faba*, *Pl. Syst. Evol.*, **124**: 139-156, 1975.
- [17] GREILHUBER J., Why plant chromosomes do not show G-bands, *Theor. Appl. Genet.*, **50**: 121-124, 1977.
- [18] GREILHUBER J., Evolutionary changes of DNA and heterochromatin amounts in the *Scilla bifolia* group (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol. Suppl.*, **2**: 263-280, 1979.
- [19] HALLECK M. S., GURLEY L. R., Histone acetylation and heterochromatin content in cultured *Peromyscus cells*, *Exp. Cell Res.*, **132**: 201-213, 1981.
- [20] HEITZ E., Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **47**: 274-284, 1929.

- [21] INGLE J., TIMMIS J. N., SINCLAIR J., The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genome size in plants, *Plant Physiol.*, **55**: 496–501, 1975.
- [22] KONONOWICZ A. K., HÜBNER H., Wzory prążkowe — przypuszczalne mechanizmy uzyskiwania, [w:] *Metody badania chromosomów*, red. M. J. Olszewska, PWRiL, Warszawa 1981, 35–49.
- [23] KURAN H., KONONOWICZ A. K., Effect of starvation on the genetic activity of nucleus and nucleolar organizer, *Folia Histochem. Cytochem.*, **17**: 59–68, 1979.
- [24] KWIATKOWSKA M., Zmiany struktury jądra a jego aktywność replikacyjna i transkrypcyjna w przebiegu cyklu komórkowego, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 197–232, 1982.
- [25] KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., Changes in the content of condensed chromatin during the cell cycle in antheridial filaments of *Chara vulgaris* as related to the DNA and RNA synthesis, ^3H actinomycin D binding and RNA polymerase activity, *Protoplasma*, **98**: 363–367, 1979.
- [26] LAVANIA U. C., SHARMA A. K., Giemsa C-banding in *Lathyrus* L., *Bot. Gaz.*, **141**, 199–203, 1980.
- [27] LAVANIA U. C., SHARMA A. K., Giemsa C-banding, somatic association and orientation of interphase chromosomes in *Trigonella foenumgraecum* (L.), *Caryologia*, **33**: 17–23, 1980.
- [28] MARKS G. E., SCHWEITZER D., Giemsa banding: karyotype differences in some species of *Anemone* and *Hepatica nobilis*, *Chromosoma (Berl.)*, **44**: 405–416, 1974.
- [29] MENDELSON J., Studies of isolated mammalian chromosomes, [w:] *The Cell nucleus*, red. H. Busch, vol. II, Academic Press, New York — London 1974, 123–147.
- [30] NAGL W., Localization of amplified DNA in nuclei of the orchid *Cymbidium* by in situ hybridization, *Experientia*, **33**: 1040–1041, 1977.
- [31] NAGL W., Early and late DNA replication in respectively condensed and decondensed heterochromatin of *Allium carinatum*, *Protoplasma*, **91**: 389–407, 1977.
- [32] NAGL W., Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York—Oxford 1978.
- [33] NAGL W., Condensed chromatin in plant and animal cell nuclei: fundamental differences, *Pl. Syst. Evol., Suppl.*, **2**: 247–260, 1979.
- [34] NARAYAN R. K. J., REES H., Nuclear DNA variation in *Lathyrus*, *Chromosoma (Berl.)*, **54**: 141–154, 1976.
- [35] OLSZEWSKA M. J., Ultrastructure of the elementary fibril in extended and condensed chromatin and in metaphase chromosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **42**: 265–279, 1973.
- [36] OLSZEWSKA M. J., Effect of actinomycin C on the fine structure of plant cells, *Cytobiologie*, **8**: 371–382, 1974.
- [37] OLSZEWSKA M. J., Autoradiographic and ultrastructural study of *Cucurbita pepo* root cells during their growth and differentiation, *Histochemistry*, **49**: 157–175, 1976.
- [38] OLSZEWSKA M. J., Chromatin condensation in late G₂ phase as a factor related to the earlier initiation of mitosis in successive generations of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Microsc. Acta*, **80**: 115–126, 1978.
- [39] OLSZEWSKA M. J., GODLEWSKI M., An autoradiographic study of the nuc-

- leic acids and protein synthesis during the cell cycle of synchronously dividing antheridial filaments in *Chara vulgaris* L., *Folia Histochem. Cytochem.*, **10**: 245–256, 1972.
- [40] OLSZEWSKA M. J., MARCINIAK K., Role of SS bridges in mitotic condensation of chromatin, *Folia Histochem. Cytochem.*, **18**: 23–32, 1980.
- [41] OLSZEWSKA M. J., OSIECKA R., The relationship between 2C DNA content, life cycle type, systematic position, and the level of DNA endoreplication in nuclei of parenchyma cells of roots in some monocotyledonous species, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 319–336, 1982.
- [42] PAPEŠ D., JELASKA S., TOMASCO M., DEVIDÉ Z., Triploidy in callus culture of *Vicia faba* L. investigated by the Giemsa C-banding technique, *Experientia*, **34**: 1016–1017, 1978.
- [43] PEARSON G. G., TIMMIS J. N., INGLE J., The differential replication of DNA during plant development, *Chromosoma (Berl.)*, **45**: 281–294, 1974.
- [44] RODKIEWICZ B., OLSZEWSKA M. J., Asynchronie intra- et interchromosomique de l'incorporation de la thymidine ³H dans les chromosomes d'*Haemanthus katharinae*, *Chromosoma (Berl.)*, **14**: 568–571, 1963.
- [45] ROTHFELS K., SEXMITH E., HEIMBURGER M., KRAUSE M. O., Chromosome size and DNA content of species of *Anemone* and related genera (*Ranunculaceae*), *Chromosoma (Berl.)*, **20**: 54–74, 1966.
- [46] SAAVEDRA E., BLASCHKE J. R., DÜHRSEN E., NEUMANN K.-H., Comparative investigations of haploid and diploid *Datura innoxia* suspension cultures at the molecular level (DNA and protein), *Z. Pflanzenphysiol.*, **100**: 455–460, 1980.
- [47] SCHVARTZMAN J. B., DIÉZ J. L., Late replicating DNA and the cell cycle of *Allium cepa*, *Cytobiologie*, **14**: 310–317, 1977.
- [48] SCHWEITZER D., NAGL W., Heterochromatin diversity in *Cymbidium*, and its relationship to differential DNA replication, *Exp. Cell Res.*, **98**: 411–423, 1976.
- [49] SEKIOKA T. T., MOK M. C., MOK D. W. S., A modified Giemsa technique for identifying cucumber chromosomes, *Microsc. Acta*, **80**: 277–280, 1978.
- [50] SVESHNIKOVA L. I., GRIF V. G., On using the methods of heterochromatic segments of chromosome discovery in comparative caryology of plants (in Russian), *Bot. J. (USSR)*, **66**: 494–501, 1981.
- [51] TIMMIS J. N., DEUMLING B., INGLE J., Localization of satellite DNA sequences in nuclei and chromosomes of two plants, *Nature (Lond.)*, **257**: 152–155, 1975.
- [52] Van't HOF J., Relationship between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants, *Exp. Cell Res.*, **39**, 48–58, 1965.
- [53] VOSA C. G., MARCHI P. D., Chromosome analysis of *Haemanthus* and *Scaadoxus (Amaryllidaceae)*, *Pl. Syst. Evol.*, **135**: 119–126, 1980.
- [54] ŽUK J., Analysis of Y chromosome heterochromatin in *Rumex thyrsi florus*, *Chromosoma (Berl.)*, **27**: 338–353, 1969.

Otrzymano: 16 września 1981.

Przyjęto: 30 września 1981.

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

WARIANTY STRUKTURALNE CHROMOSOMÓW CZŁOWIEKA. I. POLIMORFIZM PRAŻKÓW C*

THE STRUCTURAL VARIANTS OF HUMAN CHROMOSOMES. I. POLYMORPHISM OF HUMAN C-BANDED HETEROCHROMATIN

Alicja KLECZKOWSKA

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pediatrii Akademii Medycznej,
Kraków

Streszczenie. Omówiono warianty strukturalne prążków C w aspektach częstości występowania w populacjach, zróżnicowania w rasach ludzkich oraz domniemanego patogennego znaczenia tego polimorfizmu chromosomowego. Omówiono także budowę i właściwości ludzkiej konstytucyjnej heterochromatyny oraz oceniono przydatność techniki barwienia prążków C do badań nad polimorfizmem chromosomowym. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa wyznaczono morfologiczne i ilościowe kryteria oceny prążków C. Szczegółowo przedyskutowano wariant strukturalny 1 qh+, który był przedmiotem wcześniejszych badań autorki.

Summary. The frequency of C-banded chromosome variants in general populations, their variability within different human races and probable pathogenic effect of such chromosome polymorphism were discussed. The author presented also the structure and properties of human constitutive heterochromatin as well as evaluated C-banding technique employed in studies of chromosome polymorphism. On the basis of the literature reviewed, the morphologic and quantitative criteria of classification of C-banded chromosome variants were determined. The structural variant 1 qh+, which had been the subject of an earlier study by the present autor, was described in details.

Rozwój nowych technik barwienia chromosomów zwrócił uwagę badaczy na chromosomowe warianty strukturalne w kariotypie człowieka i częstość ich występowania w poszczególnych populacjach i rasach [5, 7, 24, 37, 38, 45, 47]. Zmiany takie są najczęściej interpretowane jako polimorfizm chromosomowy nie mający patogennego znaczenia, a pow-

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981 r.

stały wskutek nagromadzenia się konstytucyjnej heterochromatyny w określonych regionach chromosomów. Polimorfizm chromosomowy cechuje zarówno populację normalną, jak i osobniki uszkodzone genetycznie. Był on opisywany u dzieci z wadami wrodzonymi, u rodziców z obciążającym wywiadem genetycznym [21, 23, 26, 32, 33, 35, 46], a także u osób z niedorozwojem umysłowym o różnej etiologii [19, 41, 56, 59, 63].

Polimorfizm regionów przewężeń wtórnych ujawnia się w postaci 1qh+, 9qh+, 16qh+ oraz Yq+. Rzadziej występuje inwersja odcinka heterochromatynowego inv(1) lub inv(9) [6, 12, 16, 25, 28, 30, 39, 51, 60, 62]. Do równie rzadko obserwowanych wariantów strukturalnych należy zaliczyć 9qh-, 16qh-, oraz 17ph+ [2, 8, 9, 34, 55]. Także chromosom 6 wykazuje czasem polimorfizm w przycentromerowym odcinku heterochromatynowym [18].

LUDZKA KONSTYTUCYJNA HETEROCHROMATYNA

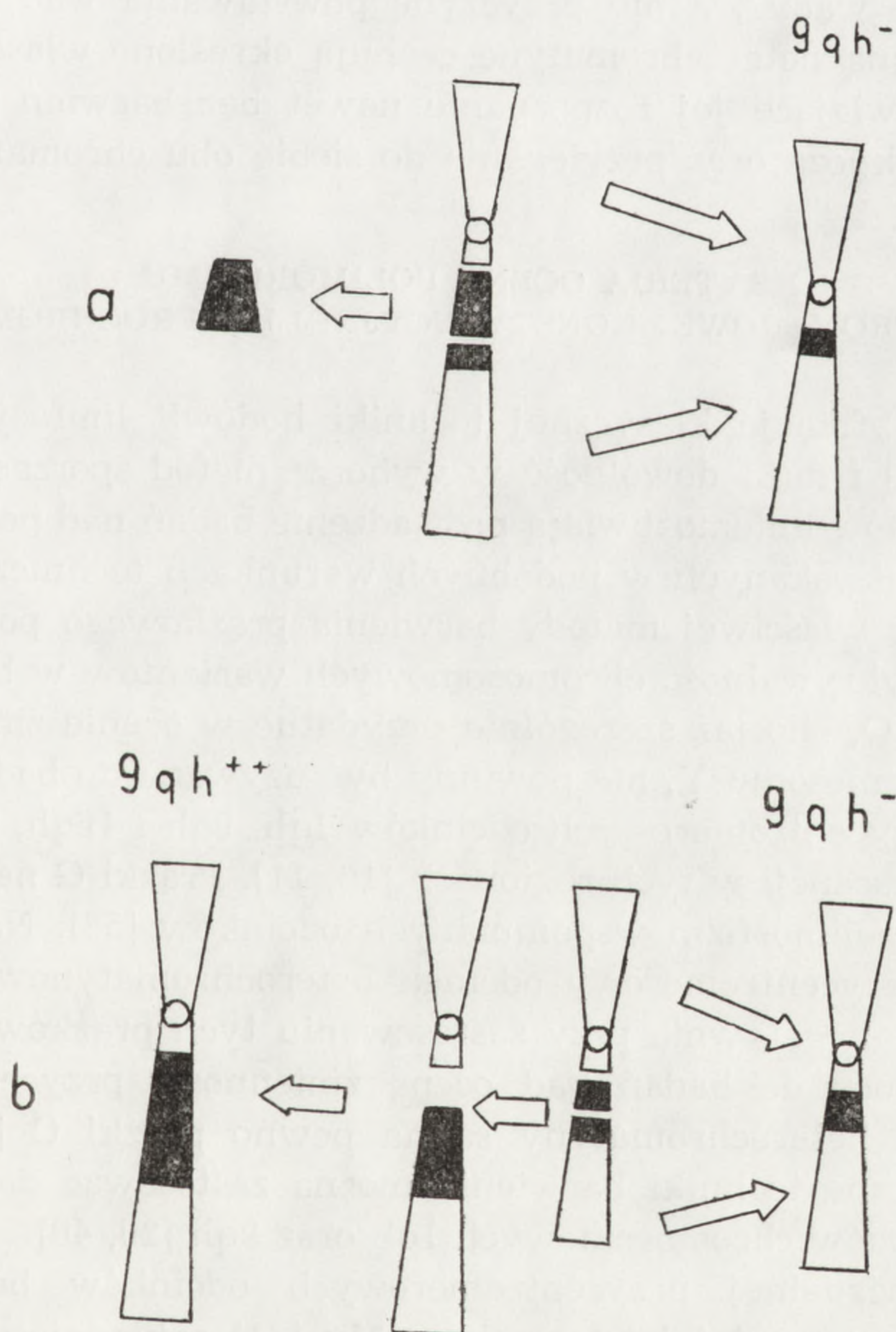
Konstytucyjna heterochromatyna znajduje się we wszystkich chromosomach ludzkiego genomu, głównie w regionach przycentromerowych [1]. Stanowi ona około 20% całego genomu i jest zbudowana z prostych i bardziej złożonych, powtarzających się sekwencji DNA, których rola nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniona [42]. W jej skład wchodzi cztery podstawowe typy satelitarnego DNA, tzn. typ I, II, III i IV, jak również rzadziej spotykane satelitarne DNA (satelitarny DNA H, Eco R I, Hae III). Satelitarny DNA oraz pozostały, niesatelitarny DNA zawarty w konstytucyjnej heterochromatynie, wykazują duże podobieństwa w układzie powtarzających się sekwencji [36, 42].

Poszczególne chromosomy różnią się ilością i składem jakościowym satelitarnego DNA. Największą ilość wszystkich typów satelitarnego DNA mają chromosomy 9 i Y, chromosomy 2, 3, 4, 6, 8 i 11 wykazują brak czterech podstawowych typów satelitarnego DNA, a chromosom 16 ma w swoim przycentromerowym odcinku heterochromatynowym głównie satelitarny DNA II [22, 25, 36, 42].

Według Hansmanna [25] asocjacje pomiędzy satelitami akrocentrycznych chromosomów a przycentromerowymi odcinkami heterochromatynowymi chromosomów 1, 9 lub 16 zachodzą na skutek dużego podobieństwa satelitarnego DNA zawartego w wymienionych regionach. Jest prawdopodobne, że takie podobieństwo może stwarzać warunki do mejozytycznego układania się w pary niehomologicznych chromosomów. Można również przypuszczać, że chromosom 9, który ma wszystkie typy satelitarnego DNA i to w największych ilościach, wchodzi we wspomniane układy z pozostałymi chromosomami szczególnie łatwo. Takie zachowa-

nie się chromosomu 9 mogłoby tłumaczyć jego dużą podatność na aberracje.

Istnieją dwie hipotezy tłumaczące powstawanie polimorfizmu w obrębie przycentromerowych odcinków heterochromatynowych. Według Craig-Holmes i wsp. [14, 15] do zróżnicowania wielkości tych odcinków dochodzi w wyniku nierównego crossing-over występującego tak w mejozie, jak i w mitozie. Należy jednak pamiętać, że wspomniane regiony chromosomowe są miejscami, w których rzadko dochodzi do crossing-over [42]. Zatem bardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza zakładająca wystąpienie podwójnego złamania w obrębie przycentromerowego odcinka heterochromatynowego z następującą insercją lub interstycjalną delecją [25] (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat powstawania polimorfizmu w obrębie przycentromerowych odcinków heterochromatynowych, według Hansmanna [25]

Przypuszcza się, że nieprzypadkowo konstytucyjna heterochromatyna jest miejscem samoistnych złamań w chromosomach [25]. Nieprzypadkowo też właśnie ona ulega przeobrażeniom typu duplikacji, delecji czy inwersji. Według niektórych autorów ma ona służyć jako łącznik („spacer”) dla genów zawartych w euchromatynie [57]. Karmon i wsp. [30] uważają, że konstytucyjna heterochromatyna pełni rolę ochronną („bodyguard”) dla euchromatyny zabezpieczając ją przed niekorzystnym działaniem mutagenów, a powstawanie wariantów strukturalnych może być pierwszą odpowiedzią na zadziaływanie czynników mutagennych. Pewnym poparciem dla takiej hipotezy mogą być badania Kunze i Mau [35], którzy stwierdzili znamienne częstsze występowanie chromosomowych wariantów strukturalnych u dzieci z wadami rozwojowymi. Zdaniem tych autorów chromosomowe warianty strukturalne można interpretować jako „dodatkowe wady”, a nie przyczynę powstawania wad wrodzonych.

Konstytucyjną heterochromatynę cechują określone właściwości morfologiczne ułatwiające jej rozpoznanie nawet bez barwień prążkowych. Są to heteropyknoza oraz przyleganie do siebie obu chromatyd [57].

KRYTERIA OCENY POLIMORFIZMU PRZYCENTROMEROWEJ KONSTYTUCYJNEJ HETEROCHROMATYNY

Liczne modyfikacje klasycznej techniki hodowli limfocytów z krwi obwodowej [43] i duża dowolność w wyborze metod sporządzania i barwienia preparatów uniemożliwiają prowadzenie badań nad polimorfizmem chromosomów uzyskanych w podobnych warunkach techniczno-laboratoryjnych. Dobór właściwej metody barwienia prążkowego pozwala osiągnąć większą wykrywalność chromosomowych wariantów w badanym materiale. Prążki Q, chociaż szczególnie przydatne w ocenie zmienności populacyjnej chromosomu Y, nie powinny być używane do badań nad polimorfizmem przycentromerowych odcinków 1qh, 9qh i 16qh, gdyż nie dają jasnej fluorescencji w tych regionach [10, 11]. Prążki G natomiast pozwalają ocenić polimorfizm wspomnianych odcinków [58]. Należy jednak pamiętać, że przycentromerowy odcinek heterochromatynowy chromosomu 9 barwi się negatywnie przy zastosowaniu tych prążków [17]. Zatem metodą z wyboru do badań nad oceną zmienności przycentromerowej konstytucyjnej heterochromatyny są na pewno prążki C [1]. Ponadto, pewne specyficzne techniki barwienia można zastosować do oceny polimorfizmu regionów chromosomowych 1qh oraz 9qh [20, 40].

W ocenie wizualnej przycentromerowych odcinków heterochromatynowych można przyjąć kryteria Kim My [31] zakładające, że istnieją trzy typy zróżnicowania tych odcinków (typ I, II i III), w których prążki C odpowiadają kolejno 1/6, 1/4 oraz 1/2 długości ramienia q. Długości

prążków C bywają porównywane z określonymi regionami chromosomów. Tak więc Madan i Bobrow [39] odnoszą wielkość odcinków heterochromatynowych do krótkiego ramienia chromosomu 9, Müller i wsp. [44] przyjęli za standard swoich pomiarów długie ramię chromosomu 21, a Patil i Lubs [50] oraz Verma i wsp. [61] krótkie ramię chromosomu 16. Tak przeprowadzone pomiary jednak ani nie uwzględniały stopnia kontrakcji mitotycznej, ani nie pozwalały porównać wyników badań z różnych ośrodków.

Szczególnie godna uwagi wydaje się metoda pomiarów prążków C zastosowana przez Balička i wsp. [3, 4]. Według tych badaczy istnieje liniowa zależność długości prążka C od stopnia kontrakcji euchromatyny. Zależność ta przestaje być liniowa przy wyjątkowo dużym i małym stopniu kontrakcji mitotycznej. Pomiary chromosomów mitotycznych przeprowadzono na negatywach mikrofotografii wykonanych pod stałym powiększeniem. Długość przycentromerowych odcinków heterochromatynowych mierzono oddzielnie w każdej z siostrzanych chromatyd i obliczano średnią arytmetyczną z obu pomiarów. Zmierzone prążki C w chromosomach 1, 9, 16 oraz Y i obliczono wartości $1q - h$, aby ocenić kontrakcję mitotyczną. Tylko te płytki metafazowe były brane pod uwagę, w których średni stopień kontrakcji chromosomów wyznaczony empirycznie dla odcinka $1q - h$ pozostawał w granicach $26-42 \times 10^{-7}m$ ($r = 0,53$; $P < 0,01$). Taki stopień kontrakcji wykazywało aż 80% metafaz. W podanych granicach wyznaczono następnie pięć kolejnych zakresów średnich wartości $1q - h$ i obliczono dla każdego z tych zakresów poprawkę dla średniej długości prążka C (tab. 1).

TABELA 1

Średnia arytmetyczna wartości $1q - h$ z uwzględnieniem stopnia spiralizacji mitotycznej; według Balička i wsp. [4]

Średnia wartość $1q - h$ (w jednostkach długości $10^{-7} m$)	Korekcja średniej długości prążka C
26-28,9	+ 10%
29-31,9	+ 5%
32-35,9	bez poprawki
36-38,9	- 5%
39-42,0	- 10%

Obliczono następnie średnie długości prążków C (w jednostkach: $10^{-7}m \pm SD$) dla chromosomów 1, 9, 16 i Y (tab. 2).

Zgodnie z klasyfikacją Konferencji Paryskiej [48, 49], ustalono pięciostopniową skalę oceny wielkości przycentromerowych odcinków hete-

TABELA 2

Średnie długości prążków C (w 10^{-7} m \pm SD); według Balička i wsp. [4]

Prążek C chromosomu	
1	$\bar{x} = 12,72 \pm 2,30$
9	$\bar{x} = 10,96 \pm 2,02$
16	$\bar{x} = 7,19 \pm 1,43$
Y	$\bar{x} = 10,50 \pm 1,3$

rochromatynowych: bardzo mały, mały, pośredni, duży i bardzo duży. Stosownie do tej morfologicznej klasyfikacji, Baliček i wsp. [4] dobrali odpowiednie zakresy długości prążków C (tab. 3).

TABELA 3

Zakresy długości prążków C (w jednostkach długości 10^{-7} m) w odniesieniu do pięciostopniowej skali Konferencji Paryskiej (1971), Supplement (1975); według Balička i wsp. [4]

Chromosom	Bardzo mały prążek C	Mały prążek C	Pośredni prążek C	Duży prążek C	Bardzo duży prążek C
1	$\leq 7,2$	7,3–10,0	10,1–15,4	15,5–18,4	$\geq 18,5$
9	$\leq 6,2$	6,3– 8,3	8,4–13,6	13,7–15,5	$\geq 15,5$
16	$\leq 3,8$	3,9– 5,3	5,4– 8,9	9,0–10,7	$\geq 10,8$
Y	$\leq 8,0$	8,1– 8,6	8,7–12,2	12,3–12,9	$\geq 13,0$

Opisana przez Balička i wsp. metoda nie jest skomplikowana, nie wymaga specjalnego wyposażenia technicznego i pozwala na porównywanie wyników z różnych laboratoriów.

Podugolnikova i wsp. [52–54] uzyskali wyjątkowo zbieżne wyniki z Baličkem i wsp. [3, 4] w ocenie ilościowej prążków C na chromosomach 1, 9, 16 i Y. Podkreślają jednak, że aby uzyskać stałe i charakterystyczne dane o prążkach C, należy zawsze ocenić kondensację chromosomów. Zwracają również uwagę na konieczność standaryzacji metod barwienia i warunków hodowli w celu wyeliminowania dodatkowych czynników wywołujących zmiany długości prążków C. Zdaniem tych autorów, nawet wewnątrzkomórkowe środowisko może wpływać na zróżnicowanie długości prążków C.

Pozostają do omówienia kryteria oceny zmienności chromosomu Y. Cohen i wsp. [13] zastosowali po raz pierwszy do oceny tej zmienności wskaźnik Y/F. Polimorfizm tego chromosomu dotyczy, jak wiadomo, głównie jego ramienia długiego. Hübner [29] w swoich badaniach nad cechami fenotypowymi u mężczyzn z Yq^+ , oprócz wskaźnika Y/F, podał dodatkowe kryterium morfologiczne do oceny tego chromosomu. Zgodnie z tym kryterium tylko chromosom Y z trzema wyraźnymi chromo-

merami i dwoma przewężeniami wtórnymi można uważać za $Yq+$. Należy dodać, że w zwykłym barwieniu metodą Giemsy można z łatwością rozróżnić wspomniane szczegóły morfologiczne.

CHROMOSOMOWY WARIANT STRUKTURALNY $1qh+$ W BADANIACH GENETYCZNYCH

Do szerszego omówienia wybrano chromosomowy wariant strukturalny $1qh+$, jako rzadko występujący w populacji ogólnej, który w naszym materiale został wykryty u pięciu rodzin obciążonych dużym ryzykiem genetycznym. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wariant ten został wykryty:

1. u dzieci z wadami wrodzonymi i zaburzeniami chromosomowymi w kariotypie,
2. u dzieci z wadami wrodzonymi i prawidłowym kariotypem,
3. u fenotypowo normalnych rodziców z obciążającym wywiadem rodzinnym.

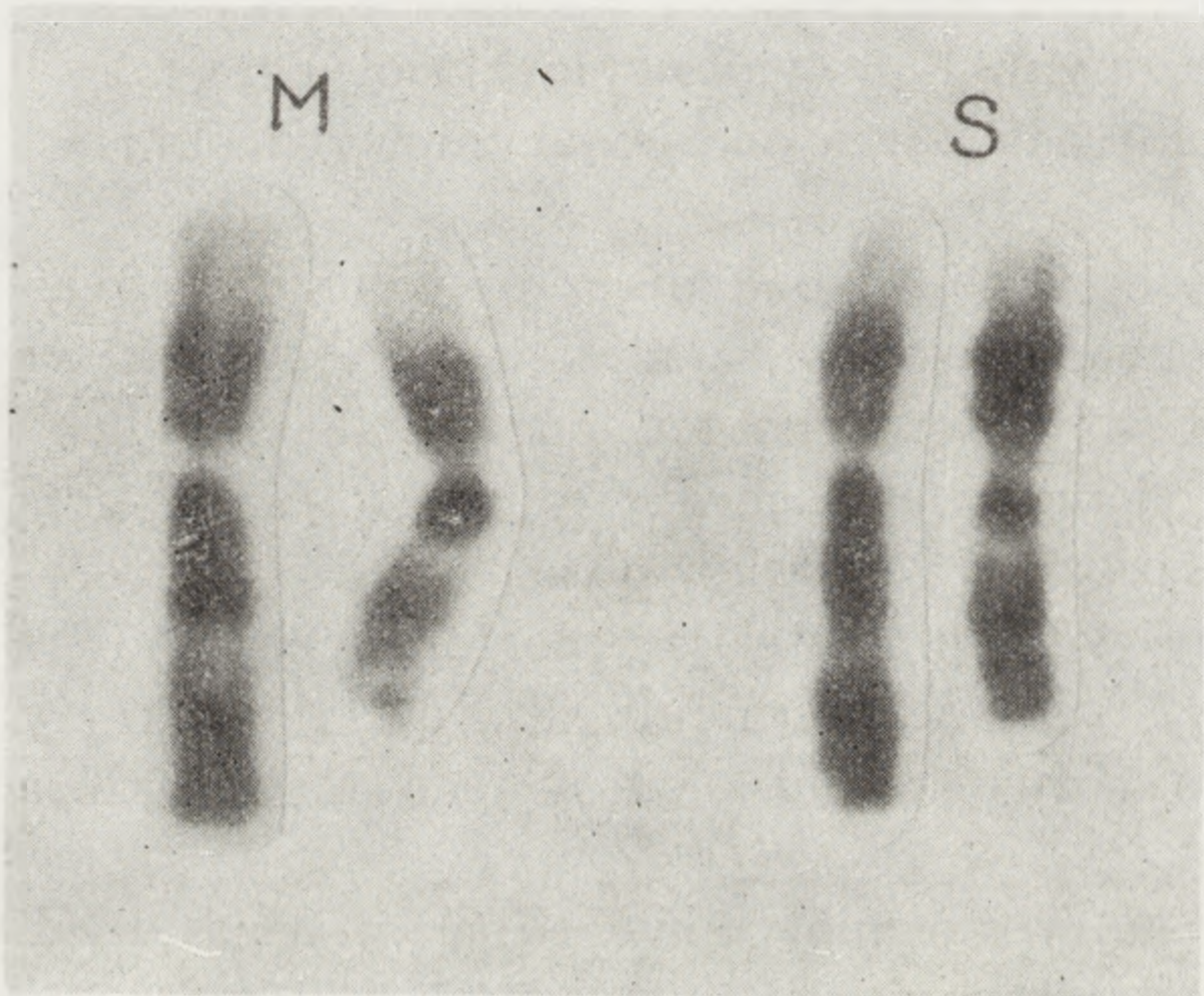
Rodziny te były wyselekcjonowane do badania z określonych powodów genetycznych. Wszystkie zbadane osoby, z wyjątkiem jednej, które posiadały taki wariant okazały się heterozygotami pod względem $1qh+$. Długość przycentromerowego odcinka heterochromatynowego nie ulegała zmianom w obrębie tej samej rodziny. Wyjątkowo duży odcinek heterochromatynowy, sklasyfikowany według kryteriów morfologicznych Kim My [31] jako typ III, tj. $1/2$ długości ramienia $1q$, został wykryty u chłopca z mnogimi wadami rozwojowymi oraz u jego matki, która było fenotypowo normalna (ryc. 2).

Przycentromerowe odcinki heterochromatynowe $1qh+$ u pozostałych pacjentów z tym wariantem określono jako typ II, tj. $1/4$ długości $1q$. Jedna z pacjentek z wrodzonym zwichnięciem stawu biodrowego okazała się homozygotą $1qh+ 1qh+$ (ryc. 3).

Homozygotyczne występowanie wariantu $1qh+$ zostało opisane po raz pierwszy przez Holzera i wsp. [27]. Określili oni częstość występowania w populacji tego wariantu w postaci homozygotycznej jako $1 : 60\ 000$.

Wariant strukturalny $1qh+$ w postaci heterozygotycznej, w porównaniu np. z $9qh+$, występuje również rzadko w populacji ogólnej. Bochkov i wsp. [5] podają jego częstość dla populacji rosyjskiej 2500 dzieci — $0,4\%$, Hamerton i wsp. [24] dla 14 069 dzieci kanadyjskich — również $0,4\%$, Nielsen i Sillesen [47] dla populacji duńskiej 11 148 dzieci — $0,5\%$ oraz Buckton i wsp. [7] dla populacji szkockiej 3993 dzieci — 2% . W populacji amerykańskiej 2440 dzieci wariant ten występuje z największą częstością, tj. $6,1\%$ [37]. Częstość ta została podana zbiorczo dla

rasy białej i czarnej w populacji amerykańskiej, a wiadomo, że ci sami autorzy [38] podkreślają różnice rasowe w występowaniu wariantów strukturalnych w swoim materiale. Istnieje mianowicie przewaga wariantów strukturalnych u murzynów w porównaniu z rasą białą. Podobne



Ryc. 2. Heterochromatynowy odcinek 1qh+ występujący u matki (M) i syna (S) w opisanym przez autorkę i wsp. [32] rodzinie. Odcinek ten dochodzi do $\frac{1}{2}$ długości ramienia 1 q



Ryc. 3. Chromosomowy wariant 1qh+ w postaci homozygotycznej

spostrzeżenia nad różnicami rasowymi w częstości występowania polimorfizmu chromosomowego poczynili Matsuura i wsp. [41]. Również według ich danych, rasa żółta charakteryzuje się częstszym występowaniem 1qh+ w porównaniu z rasą białą. U przedstawicieli rasy białej stwierdzono natomiast częstszą obecność 9qh+ niż u rasy żółtej.

Do tej pory nie uzyskaliśmy żadnych danych co do częstości 1qh+ w populacji polskiej. Należy zaznaczyć, że w opracowanej przez nas na obecność chromosomowego polimorfizmu grupie 200 zdrowych osób obojga płci nie udało nam się wykryć wspomnianego wariantu. Wydaje się,

że celowe byłoby monograficzne opracowanie częstości występowania chromosomowych wariantów w populacji polskiej. Opracowanie takie byłoby możliwe przy współpracy w tym zakresie wszystkich ośrodków cytogenetycznych w Polsce oraz przy ujednoczonym sposobie oceny polimorfizmu chromosomowego.

LITERATURA

- [1] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81–86, 1971.
- [2] AU W., WITEK J. A., Cytochemical analysis of a case of familial 17ps, *Hum. Genet.*, **48**: 195–199, 1979.
- [3] BALIČEK P., ŽIŽKA J., SKALSKÁ H., Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosomal contraction, *Hum. Genet.*, **38**: 189–193, 1977.
- [4] BALIČEK P., ŽIŽKA J., SKALSKÁ H., Variability and familial transmission of constitutive heterochromatin of human chromosomes evaluated by the method of linear measurement, *Hum. Genet.*, **42**: 257–265, 1978.
- [5] BOCHKOV N. P., KULESHOV N. P., CHEBOTAREV A. N., ALEKHIN V. I., MIDIAN S. A., Population cytogenetic investigation of newborns in Moscow, *Hum. Genet.*, **22**: 139–152, 1974.
- [6] BOUÉ J., TAILLEMITE J. L., HAZAEL-MASSIEUX P., LÉONARD C., BOUÉ A., Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families, *Hum. Genet.*, **30**: 217–224, 1975.
- [7] BUCKTON K. E., O'RIORDAN M. L., RATCLIFFE S., SLIGHT J., MITCHELL M., McBEATH S., KEAY A. J., BARR D., SHORT M., A G-band study of chromosomes in liveborn infants, *Ann. Hum. Genet., Lond.*, **43**: 227–239, 1980.
- [8] BUYS C. H. C., YPMA J. M. M., GOUW W. L., Complete deficiency of constitutive heterochromatin on a human chromosome 9, *Hum. Genet.*, **49**: 129–132, 1979.
- [9] BUYS C. H. C., ANDERS G. I. P., GOUW W. L., BORKENT-YPMA J. M. M., BLENKERS-PLATTER J. A. M., A comparison of constitutive heterochromatin staining methods in two cases of familial heterochromatin deficiencies, *Hum. Genet.*, **52**: 133–138, 1979.
- [10] CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Exptl. Cell Res.*, **49**: 219–222, 1968.
- [11] CASPERSSON T., LOMAKKA G., ZECH L., The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes: Distinguishing characters and variability, *Hereditas*, **67**: 89–102, 1971.
- [12] De la CHAPELLE A., SCHRÖDER J., STENSTRAND K., FELLMAN J., HERVA R., SAARNI M., AUTTOLAINEN I., TALLILA I., TERVILÄ L., HUSA L., TALLQUIST G., ROBSON E. B., COOK P. J. L., SANGER R., Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10, *Amer. J. Hum. Genet.*, **26**: 746–766, 1974.
- [13] COHEN M. M., SHAW M. W., McCLUER J. W., Racial differences in the length of the human Y chromosome, *Cytogenetics*, **5**: 34–52, 1966.
- [14] CRAIG-HOLMES A. P., MOORE F. B., SHAW M. W., Polymorphism of hu-

- man C-band heterochromatin. I. Frequency of variants, *Amer. J. Hum. Genet.*, **25**: 181-192, 1973.
- [15] CRAIG-HOLMES A. P., MOORE F. B., SHAW M. W., Polymorphism of human C-banded heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence for somatic crossing-over, *Amer. J. Hum. Genet.*, **27**: 178-189, 1975.
- [16] FAED M. J. W., LAMONT M., MORTON H. G., ROBERTSON J., SMAIL P., An XYY boy with short stature and a case of Klinefelter's syndrome (XXY) in a family with inversion 9, *Clin. Genet.*, **14**: 241-245, 1978.
- [17] FITZGERALD P. H., The nature and inheritance of an elongated secondary constriction on chromosome 9 of man, *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**: 404-413, 1973.
- [18] FRIEDRICH U., C heteromorphism in chromosome No. 6, *Clin. Genet.*, **16**: 295, 1979.
- [19] FUNDERBURK S. J., GUTHRIE D., LIND R. C., MULLER H. M., SPARKES R. S., WESTLAKE J. R., Minor chromosome variants in child psychiatric patients, *Amer. J. Med. Genet.*, **1**: 301-308, 1978.
- [20] GAGNÉ R., LABERGE C., Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 239-242, 1972.
- [21] GARDNER R. J. M., McCREANOR H. R., PARSLOW M. I., VEALE A. M. O., Are 1q+ chromosomes harmless?, *Clin. Genet.*, **6**: 383-393, 1974.
- [22] GOSDEN J. R., MITCHELL A. R., BUCKLAND R. A., CLAYTON R. P., EVANS H. J., The location of four human satellite DNAs on human chromosomes, *Exptl. Cell Res.*, **92**: 148-158, 1975.
- [23] HALBRECHT I., SHABTAY F., Human chromosome polymorphism and congenital malformations, *Clin. Genet.*, **10**: 113-122, 1976.
- [24] HAMERTON J. L., CANNING N., RAY M., SMITH S., A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities, *Clin. Genet.*, **8**: 223-243, 1975.
- [25] HANSMANN I., Structural variability of human chromosome 9 in relation to its evolution, *Hum. Genet.*, **31**: 247-262, 1976.
- [26] HOLBEK S., FRIEDRICH U., LAURITSEN J. G., THERKELSEN A. J., Marker chromosomes in parents of spontaneous abortuses, *Hum. Genet.*, **25**: 61-64, 1974.
- [27] HOLZER S., ROZENKRANZ W., GLATZL J., Homozygous duplication on long arm of chromosome pair No. 1, *Hum. Genet.*, **16**: 341-343, 1972.
- [28] HOWARD-PEEBLES P. N., Familial pericentric inversion of chromosome 1 with a note on reproductive risks, *Hum. Genet.*, **45**: 123-125, 1978.
- [29] HÜBNER H., Karyotype 46, XYq+ and its phenotype, *Bull. l'Acad. Pol. Sciences Cl. VI.*, **19**: 473-477, 1971.
- [30] KARMON G., SAVIR H., SHABTAY F., Chromosome 9 pericentric inversion in familial aniridia, *Metabol. Ophthalmology*, **2**: 213-214, 1978.
- [31] KIM MY A., Polymorphismus des konstitutiven Heterochromatins bei menschlichen A1-Metaphasechromosomen, *Hum. Genet.*, **18**: 213-217, 1973.
- [32] KLECZKOWSKA A., KUBIENŃ E., Genetic aspects of structural variant 1qh+, *Genetica Pol.*, **21**: 119-124, 1980.
- [33] KRAG-OLSEN B., NIELSEN J., DIRDAL M., HOLM V., HAAHR J., RASMUSSEN N. H., VIDEBECH P., YANAGISAWA S., Chromosome variants in children referred for cytogenetic examination from two paediatric departments during a 12-year-period, *Hum. Genet.*, **56**: 67-69, 1980.

- [34] KUBIEŃ E., KLECZKOWSKA A., Familial occurrence of chromosome variant 17ph+, *Clin. Genet.*, **12**: 39-42, 1977.
- [35] KUNZE J., MAU G., A₁ and C₉ marker chromosomes in children with combined minor and major malformations, *Lancet*, **1**: 273, 1975.
- [36] KURNIT D. M., Satellite DNA and heterochromatin variants. The case for unequal mitotic crossing-over, *Hum. Genet.*, **47**: 169-186, 1979.
- [37] LUBS H. A., RUDDLE F. H., Applications of quantitative karyotypy to chromosome variation, [in:] *Human population cytogenetics*, Pfizer Medical Monographs, Edinburgh Univ. Press, **5**: 119-142, 1970.
- [38] LUBS H. A., RUDDLE F. H., Chromosome polymorphism in American negro and white populations, *Nature*, **233**: 134-136, 1971.
- [39] MADAN K., BOBROW M., Structural variation in chromosome No. 9, *Ann. Génét.*, **17**: 81-86, 1974.
- [40] MAGENIS R. E., DONLON T. A., WYANDT H. A., Giemsa 11 staining of chromosome 1: A newly described heteromorphism, *Science*, **202**: 64-65, 1978.
- [41] MATSUURA J., MAYER M., JACOBS P., A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded. II. C-band chromosome heteromorphisms, *Hum. Genet.*, **45**: 33-41, 1978.
- [42] MIKLOS G. L. G., JOHN B., Heterochromatin and satellite DNA in man: Properties and prospects, *Amer. J. Hum. Genet.*, **31**: 264-280, 1979.
- [43] MOORHEAD P. S., NOWELL P. C., MELLMAN W. J., BATTIPS D. M., HUNGERFORD D. A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exptl. Cell Res.*, **20**: 613-616, 1960.
- [44] MÜLLER H. J., KLINGER H. P., GLASSER M., Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 239-255, 1975.
- [45] NIELSEN J., FRIEDRICH U., HREIDARSSON Á. B., Frequency and genetic effect of 1qh+, *Hum. Genet.*, **21**: 193-196, 1974.
- [46] NIELSEN J., FRIEDRICH U., HREIDARSSON Á. B., ZEUTHEN E., Frequency of 9qh+ and risk of chromosome aberrations in the progeny of individuals with 9qh+, *Hum. Genet.*, **21**: 211-216, 1974.
- [47] NIELSEN J., SILLESEN I., Incidence of chromosome aberrations among 11,148 newborn children, *Hum. Genet.*, **30**: 1-12, 1975.
- [48] Paris Conference (1971), Standardization in Human Cytogenetics, *Cytogenetics*, **11**: 313-362, 1972.
- [49] Paris Conference (1971), Supplement (1975), Standardization in Human Cytogenetics, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 201-238, 1975.
- [50] PATIL S. R., LUBS H. A., Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding, *Hum. Genet.*, **38**: 35-38, 1977.
- [51] PESCIA G., GAIDE A. C., JUILLARD E., Trois familles avec inversion péri-centrique du chromosome 9 (inv C 9), *J. Génét. Hum.*, **25**: 121-134, 1977.
- [52] PODUGOLNIKOVA O. A., PARFENOVA I. V., SUSHANLO H. M., PROKOFIEVA-BELGOVSKAJA A. A., The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y, *Hum. Genet.*, **49**: 243-250, 1979.
- [53] PODUGOLNIKOVA O. A., SUSHANLO H. M., PARFENOVA I. V., PROKOFIEVA-BELGOVSKAJA A. A., The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. II. Comparison of the C segments in male and female individuals (group characteristics), *Hum. Genet.*, **49**: 251-260, 1979.
- [54] PODUGOLNIKOVA O. A., The quantitative analysis of polymorphism on hu-

- man chromosomes 1, 9, 16, and Y. III. Study of relationship of C segment's lengths in individual karyotypes, *Hum. Genet.*, **49**: 261-268, 1979.
- [55] SANDSTROM M. McH., JENKINS E. C., Cytological elucidation of a 17p marker chromosome, *Caryologia*, **27**: 307-313, 1974.
- [56] SAY B., CARPENTER N. J., LANIER P. R., BANEZ C., JONES K., COLDWELL J. G., Chromosome variants in children with psychiatric disorders, *Amer. J. Psych.*, **134**: 424-426, 1977.
- [57] SCHWARZACHER H. G., Heterochromatin, Chapter VIII [in:] *Chromosomes in mitosis and interphase*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N. York 1976, 107-123.
- [58] SUMNER A. T., EVANS H. J., BUCKLAND R. A., A new technique for distinguishing between human chromosomes, *Nature, New Biol.*, **232**: 31-32, 1971.
- [59] THARAPEL A. T., SUMMITT R. L., Minor chromosome variations and selected heteromorphisms in 200 unclassifiable mentally retarded patients and 200 normal controls, *Hum. Genet.*, **41**: 121-130, 1978.
- [60] TÜÜR S., KÄOSAAR M., MIKELSAAR A. V. N., 1q+ variants in a normal adult population (one with pericentric inversion), *Hum. Genet.*, **24**: 217-220, 1974.
- [61] VERMA R. S., DOSIK H., LUBS H. A., Size and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9, and 16 as detected by CBG technique in Caucasians: Classification, frequencies, and incidence, *Amer. J. Med. Genet.*, **2**: 331-339, 1978.
- [62] VINE D. T., YARKONI S., COHEN M. M., Inversion homozygosity of chromosome No. 9 in a highly inbred kindred, *Amer. J. Hum. Genet.*, **28**: 203-207, 1976.
- [63] WANG H. S., HAMERTON J. L., C band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population, *Hum. Genet.*, **51**: 269-275, 1979.

Otrzymano: 12 października 1981.

Przyjęto: 7 listopada 1981.

Adres autorki: ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków.

POLIMORFIZM CHROMOSOMÓW ZWIERZĄT DOMOWYCH *

DOMESTIC ANIMALS CHROMOSOME POLYMORPHISM

Paweł Stanisław SYSA

Zakład Histologii i Embriologii Instytutu Fizjologii Zwierząt
Wydziału Weterynaryjnego SGGW — AR

Streszczenie. Dokonano przeglądu polimorfizmu chromosomów u bydła, kozy, owcy i świni. Najczęstszą zmianą chromosomów są różne fuzje centryczne. Translokacja 1/29 występująca często u niektórych ras bydła obniża płodność ze względu na utratę niezbalansowanych zarodków. Natomiast płodność owiec mających translokacje jest prawidłowa. Niewystarczające są informacje o innych fuzjach centrycznych i zmianach chromosomów. Polimorfizm chromosomowy może być wykorzystany do ustalenia zależności filogenetycznych między grupami zwierząt. Podkreśla się, że populacje zwierzęce, na które oddziałuje nowoczesna technologia rozrodu, powinny podlegać rutynowym badaniom cytogenetycznym. Zwrócono uwagę na znaczenie rejestracji polimorfizmu chromosomowego wśród materiału hodowlanego.

Summary. The chromosome polymorphism in cattle, goat, sheep and pig has been reviewed. The most common chromosome changes are due to different centric fusions. Such 1/29 translocation, reported at a high incidence in certain cattle breeds, reduces fertility due to losses of unbalanced embryos. On the other hand the fertility of the translocation sheep is normal. The information about other centric fusions and chromosome variants in livestock is insufficient. The chromosome polymorphism can be used to establish phylogenetic relationship among animal groups. It is stressed that the animal population, while using modern technology of reproduction, should undergo routine cytogenetic investigation. The importance of genetic record of the chromosomal polymorphism in the breeding stock is emphasized.

WSTĘP

Chromosomy zwierząt domowych są przedmiotem badań od początków obecnego stulecia. Dopiero jednak w ostatnich dwóch dziesięciokach lat obserwuje się znaczne zintensyfikowanie studiów nad tymi struktu-

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981 r.

rami. Na przełomie lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych ustalono, a właściwie zweryfikowano, główne cechy kariotypów podstawowych gatunków zwierząt domowych, tj. określono liczbę diploidalną oraz zestawiono chromosomy w grupy meta-, submeta- i akrocentryczne. Równocześnie rozszerzała się nasza wiedza na temat liczby diploidalnej i morfologii chromosomów zwierząt dzikich, w tym gatunków spokrewnionych z gatunkami zwierząt udomowionych [4, 159]. W tym czasie ustalił się pogląd, że współczesne nam zwierzęta ukształtowały swój kariotyp na pewnym poziomie rozwoju i że diploidalna liczba chromosomów w komórkach somatycznych u osobników danego gatunku jest stała i przez to charakterystyczna. Stwierdzono, że $2n$ np. u bydła domowego wynosi 60, u kozy — 60, owcy — 54, konia — 64, świni — 38, psa — 76, kota — 38 itd. [75].

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w poznawaniu chromosomów. Stało się to głównie dzięki coraz powszechniejszemu stosowaniu metod prążkowego barwienia chromosomów. Nieustannie ogłaszane są opracowania na temat rozmaitych technik barwienia umożliwiających coraz precyzyjniejszą ocenę poszczególnych rejonów chromosomów. W miarę obejmowania oceną kariotypu coraz większej grupy zwierząt zaobserwowano, że wśród przedstawicieli danego gatunku, rasy czy ograniczonej terytorialnie populacji, między osobnikami uznanymi za całkowicie fenotypowo prawidłowe, spotyka się zwierzęta o nietypowym kariotypie. Różnice te wyrażały się odmiennością liczby diploidalnej oraz morfologii poszczególnych chromosomów, a czasem wystąpieniem szczególnych cech ich chromatyny. Konieczna więc stała się rewizja dotychczasowego poglądu na gatunkową stałość cech kariotypu. Przy omawianiu zjawiska różnorodności morfologicznej chromosomów pojawił się termin polimorfizm. Określenie to nie ma wyraźnie i jednoznacznie określonego zakresu znaczeniowego. Według Zakharova [161] „polimorfizm chromosomów jest strukturalną zmiennością kariotypu dziedziczącą się według praw Mendla i normalnie nie prowadzącą do fenotypowych nieprawidłowości u nosiciela”. Rozróżnia on dwie formy polimorfizmu. Pierwszą stanowią zbalansowane strukturalne przekształcenia chromosomów, do których zaliczył wzajemne i robertsonowskie translokacje, inwersje i małe dodatkowe heterochromatynowe chromosomy. U ludzi częstość występowania tego typu polimorfizmu szacuje się na niższą niż 1%. Mogą spowodować one jednak poważne konsekwencje u potomstwa. Drugą grupę stanowią zmienności (warianty) w zakresie ilości konstytutywnej heterochromatyny, stąd ich wystąpieniu (sięgającemu od 1,7 do 40,2% wśród różnych badanych populacji) zazwyczaj nie towarzyszą groźne fenotypowe następstwa [161].

Wydaje się jednak, że zaproponowana przez Zakharova [161] defini-

cja polimorfizmu, jak i zasięg form objętych tym terminem są zbyt pojemne i umożliwiają włączenie do tej grupy przypadków typowej patologii genetycznej. Dlatego w dalszym omówieniu pominiemy przykłady wzajemnych translokacji, gdyż są one przyczyną wysokiej śmiertelności zarodkowej, jak ma to miejsce np. u trzody chlewnej [77].

Przed hodowcami, lekarzami weterynarii i biologami zajmującymi się dużymi zwierzętami gospodarskimi powstały pytania, a mianowicie: 1. które z cech kariotypu należy uważać za naturalny polimorfizm, naturalną różnorodność struktury chromosomów? 2. czy zawsze polimorfizm jest obojętny dla istnienia osobnika oraz populacji, a kiedy zamiast neutralnego terminu polimorfizm należy użyć określenia „aberracja” w jego negatywnym znaczeniu?

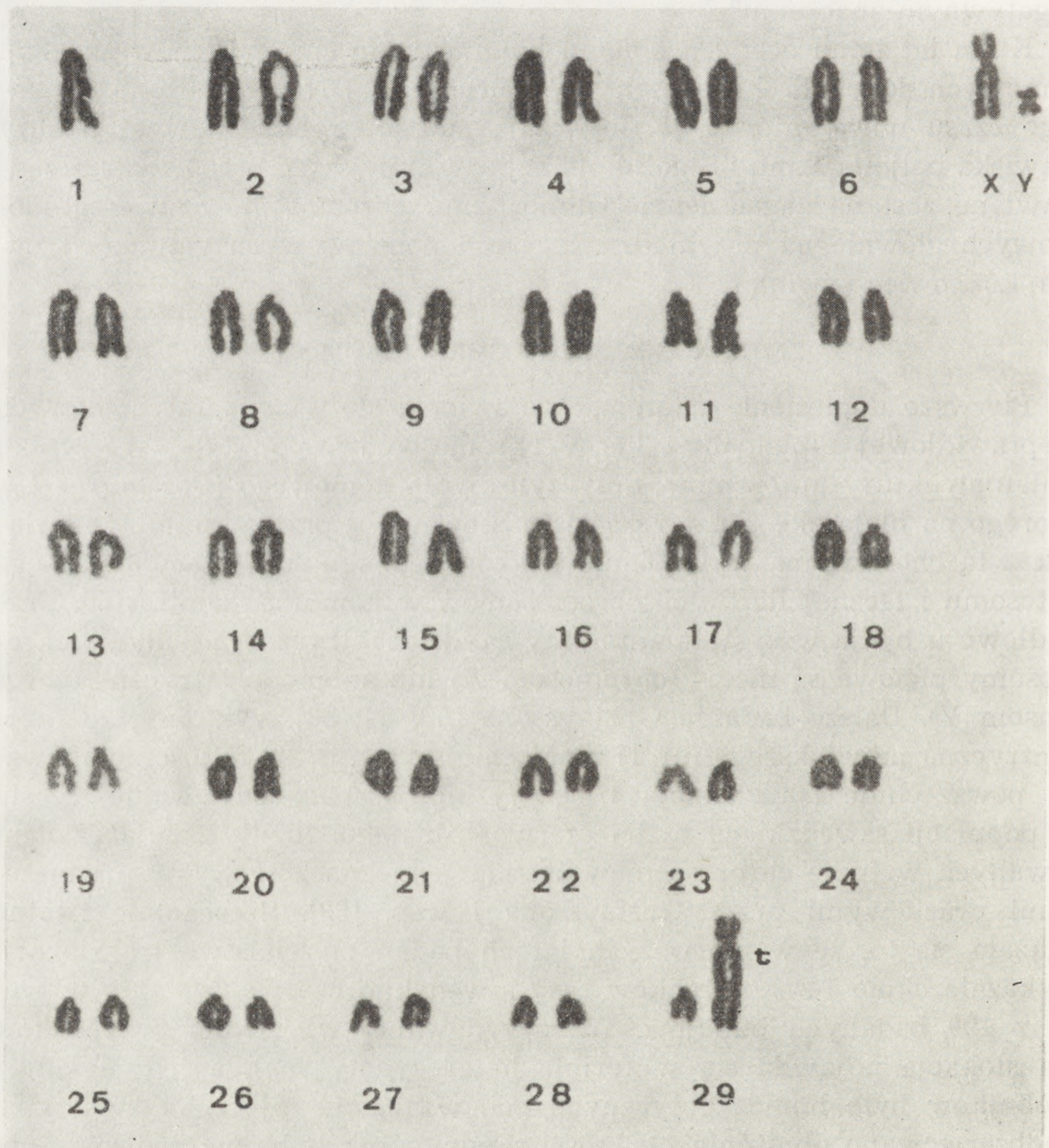
Kilka lat temu oceny problemu polimorfizmu chromosomów zwierząt domowych dokonali Gustavsson [59] i Bruere [10]. Nagromadzone od tamtego czasu nowe informacje pozwalają podjąć próbę ponownej analizy zjawiska polimorfizmu i jego implikacji. W niniejszym przeglądzie przedstawione zostaną zagadnienia polimorfizmu chromosomów zwierząt domowych głównie na przykładzie czterech podstawowych gatunków: bydła, kóz, owiec i świni.

ZMIENNOŚĆ LICZBY CHROMOSOMÓW

Pierwsze doniesienie na temat pojawienia się u zwierząt domowych nieprawidłowej diploidalnej liczby chromosomów, powstałej w wyniku zmian struktury autosomów, dotyczyło bydła domowego (*Bos taurus* L.), chorego na białaczkę. Gustavsson i Rockborn [65] przypuszczali, że związek z tą chorobą ma wystąpienie u krów jednego submetacentrycznego autosomu i łącznej liczby 59 chromosomów w komórce, zamiast 60. Prawidłowo u bydła wszystkie autosomy są akrocentryczne, a jedynie chromosomy płciowe są meta- (chromosom X) lub submetacentryczne (chromosom Y). Dalsze badania Gustavssona [53, 54, 58] wykazały, że fuzja centryczna największego (nr 1) z najmniejszym (nr 29) autosomem, zwana powszechnie translokacją 1/29, występuje nadspodziewanie często w populacji szwedzkiego bydła czerwono-białego. Identyfikacja zaangażowanych w fuzję chromosomów została jednoznacznie wykazana metodami prążkowymi przez Gustavssona i wsp. [63]. Szczególnie istotne okazało się to, że w pierwszych latach badań nosicielstwo translokacji wykazało około 14% osobników rasy szwedzkiej czerwono-białej, w tym 75 z 499 badanych buhajów. W zdecydowanej większości przypadków translokacja pojawiła się w formie heterozygotycznej, a jedynie kilka osobników było homozygotycznych pod względem tej cechy kariotypu. Zaobserwowano obniżenie płodności samic, córek buhajów będących nosicielkami translokacji 1/29; częściej wypadały one z hodowli [54–57, 124].

Od tamtego czasu fuzję centryczną 1/29 wykryto u bydła ponad 30 różnych ras w licznych krajach na wszystkich kontynentach [60, 117, 149]. Nosiciele fuzji centrycznej nie wykazują różnic fenotypowych w stosunku do zwierząt o prawidłowych kariotypach, również parametry jakości nasienia uznawane są za dobre; czasem jest ono o nieco niższej koncentracji plemników [42, 54]. Ostatnio Frank i wsp. [51] zwrócili uwagę na gorsze rezultaty mrożenia nasienia uzyskiwanego od buhajów nosicieli translokacji 1/29. Cecha ta może zostać wykorzystana jako test w selekcji buhajów.

Częstość występowania omawianej fuzji centrycznej w różnych po-



Ryc. 1. Kariotyp buhaja z translokacją 1/29 (t) [143]

populacjach bydła ukształtowała się na różnym poziomie. W Szwecji, jak już wspomniano, wynosiła w 1969 r. 14⁰/₀ wśród bydła czerwono-białego [54], a obecnie spadła poniżej 3⁰/₀ (Gustavsson 1981, niepubl.). Wysoki był odsetek nosicielstwa translokacji 1/29 we Francji — 10–14⁰/₀ [122]; w Norwegii spotykano tę translokację rzadziej, gdyż u około 4⁰/₀ [1, 124]. Szczególnie wysoki odsetek osobników mających translokację 1/29 spotyka się wśród ras mało liczebnych, jak np. u bydła romagnolskiego we Włoszech, gdzie wynosi 22,3⁰/₀ [141], we Francji u Blond d'Aquitaine — 13,5⁰/₀ [30, 34], czy u białej brytyjskiej — aż 60⁰/₀ [44].

W Polsce również sygnalizowano wystąpienie translokacji 1/29 wśród potomstwa buhaja rasy polskiej czerwonej (ryc. 1) [143, 148]. Wyszukiwano przy tym przypuszczenia, że bezpośrednio po wojnie krzyżowanie polskiego materiału hodowlanego z importowanymi osobnikami ze Szwecji mogło wprowadzić fuzję centryczną do populacji naszego bydła [54, 143].

TABELA 1

Fuzje centryczne u bydła

Typ fuzji centrycznej		Rasa	Kraj	Autorzy
według autora	według systemu Reading			
1/29	} 1/29	różne	różne	[60,117, 149]
1/28		romagnolska	Włochy	[130]
1/27		biała brytyjska	USA	[44]
1/25		biało-czerwona	RFN	[140]
2/4		fryzyjska	Anglia	[111]
3/4		limuzyńska	Francja	[119]
3/27		fryzyjska	Rumunia	[133]
5/18	5/18	simentalska	Węgry	[107]
5/21	5/21	czarna japońska	Japonia	[94, 95]
5–6/15–16	6/16	dexter	USA	[43]
5/23		brunatna	Rumunia	[133]
7–11/20–25		blondex, limuzyńska	Francja	[32]
8/9		brunatna szwajcarska	Szwajcaria	[155]
11/16	14/20	simentalska	Węgry	[79]
11–12/15–16	14/20	simentalska	Nowa Zelandia	[12]
			W. Brytania	[71]
11/21		brunatna	Rumunia	[133]
13/21	14/20	simentalska	W. Brytania	[72]
13/21		holszt.-fryzyjska	Węgry	[81, 83]
14/20	14/20	simentalska	W. Brytania	[91]
14/24		podolian	Włochy	[40, 41]
14/28		holsztyńska	USA	[45]
25/27		szara alpejska	Włochy	[36, 37, 141]
27/29		gernzejska	Kanada	[6]

U bydła domowego obserwuje się występowanie znacznej różnorodności typów fuzji centrycznych utworzonych przez autosomy odpowiadające różnym chromosomom w typowym kariotypie tego gatunku. W tabeli 1 zestawiono informacje wskazujące, które autosomy i u jakich ras weszły w fuzję centryczną. Sygnalizowanych wariantów translokacji robertsonowskiej u bydła jest około dwudziestu. Ponieważ większość diagnoz postawiona była na podstawie jednolicie barwionych chromosomów bądź uzyskane prążki były niewystarczająco czytelne, należy z pewną rezerwą przyjmować niektóre diagnozy autorskie. Często niemożliwe jest precyzyjne porównanie przedstawionych fuzji ze standardowym kariotypem bydła, opracowanym w Reading w 1976 r. przy okazji ustalania wzorców kariotypów podstawowych gatunków zwierząt domowych [49, 144]. Można przypuszczać, że doniesienia sygnalizujące istnienie u bydła fuzji centrycznych 1/28, 1/27 czy 1/25 [44, 130, 140] wyniknęły z błędnej diagnozy faktycznej fuzji 1/29. Bez zastosowania barwienia prążków G, Q bądź R niemożliwe jest bowiem u bydła precyzyjne zidentyfikowanie par najmniejszych autosomów. Późniejsze badania osobników należących do tych populacji nie potwierdziły faktu istnienia innych fuzji aniżeli translokacja 1/29 [35]. Częstość występowania u bydła fuzji centrycznych innych niż translokacja 1/29 jest niska. Wykrywa się je u pojedynczych osobników danej rasy. Naturalnie, badając kariotypy osobników spokrewnionych z wcześniej rozpoznanym nosicielem fuzji robertsonowskiej potwierdza się rodowy charakter obecności danej translokacji w badanej rodzinie i wówczas w potomstwie heterozygotycznego nosiciela może ona wystąpić u połowy potomstwa.

Dotychczas nikomu nie udało się wykazać fuzji centrycznej powstałej u bydła *de novo*, choć Basrur sygnalizowała taką możliwość (1977, dane niepubl.). Natomiast w hodowli linii komórkowej zawierającej translokację chromosomową 1/29 obserwowano wystąpienie w kolejnych pasażach spontanicznie powstałych innych translokacji robertsonowskich — 1/2, 3/4 i 15/27 [31].

U kóz (*Capra hircus* L.) mających zwykle kariotyp $2n = 60$, składający się z 58 akrocentrycznych autosomów i dwóch chromosomów płciowych: akrocentrycznego, średniej wielkości chromosomu X i heterochromosomu Y, będącego małym chromosomem metacentrycznym [75], spotyka się również fuzje robertsonowskie.

U fenotypowo normalnych kóz mlecznej rasy Saanen spotkano fuzję centryczną jednej pary autosomów w formie hetero- i homozygotycznej. Precyzyjnej klasyfikacji chromosomów nie można było przeprowadzić [106, 138]. Fuzję wykryto także u heterozygotycznego kozła we Francji [76]. Pomiarzy przeprowadzone na jednorodnie barwionych chromosomach pozwoliły wysunąć Popescu [113] przypuszczenie, że połącze-

niu centrycznemu uległy autosomy 2 i 13 pary. Inny typ fuzji centrycznej, a mianowicie 5/15 zidentyfikowano za pomocą prążków G [46]. W omawianych przypadkach brak informacji wskazujących na związek tych translokacji robertsonowskich z cechami budowy ciała czy płodnością. Za ewentualnym obniżeniem płodności kóz przemawiają natomiast badania Ricordeau [126].

Owca domowa (*Ovis aries* L.) posiada kariotyp $2n = 54$. Większość autosomów jest akrocentrycznych, jedynie trzy pary są metacentryczne. Chromosom płciowy X jest dużym akrocentrycznym, a Y — małym metacentrycznym chromosomem [137]. W Nowej Zelandii u dwóch ras owiec wykazano fuzje centryczne: u rasy Romney translokacje t_1 — 5/26 oraz t_2 — 8/11, natomiast u rasy Drysdale fuzję t_3 — 7/25 [17]. Translokacja t_1 występowała w 4,6% populacji [16], t_2 — u około 4% owiec, a t_3 — u 26,3% osobników rogatej rasy Drysdale oraz u 27,2% w populacji ogólnej tej rasy [10, 14]. W konsekwencji jednego z rodzajów translokacji w formie heterozygotycznej obniża się liczba diploidalna do $2n = 53$. Na drodze krzyżowania owiec będących nosicielami różnych translokacji robertsonowskich uzyskano osobniki posiadające równocześnie wszystkie trzy formy fuzji centrycznej w postaci homozygotycznej [15]. Sprowadziło to u nich liczbę diploidalną do $2n = 48$. Naturalnie liczba fundamentalna (NF) pozostała bez zmian i wynosiła 60, jak w typowych komórkach.

Świnia domowa (*Sus scrofa dom.* L.) posiada najbardziej zróżnicowany morfologicznie kariotyp w porównaniu z omawianymi gatunkami. Pośród 38 chromosomów w komórce somatycznej znajduje się 6 par chromosomów akrocentrycznych. Pozostałe autosomy oraz chromosomy płciowe są różnej wielkości meta- lub submetacentrycznymi strukturami [142]. Dotychczas opisano jeden przypadek pojawienia się fuzji centrycznej u świni domowej [99]. Wystąpiła ona w formie heterozygotycznej, a polegała na połączeniu centrycznym dwóch akrocentrycznych autosomów — 13 i 17. Wprawdzie u jednego z trzech prosiąt będących nosicielami translokacji 13/17, wśród potomstwa liczniejszego miotu, wystąpiły zaburzenia rozwoju somatycznego, lecz można przypuszczać, że przyczyną ich nie była obecność fuzji centrycznej. U europejskiej świni dzikiej (*Sus scrofa ferus* L.) $2n$ wynosi 36 lub 38. Niższa liczba chromosomów u dzika w porównaniu z formą udomowioną wynika z występowania u dzika fuzji centrycznej chromosomów akrocentrycznych 15 i 17 [7, 64, 150], określając zgodnie z numeracją przyjętą dla świni domowej. Z drugiej strony można uważać, że udomowieniu towarzyszyło rozszczepienie metacentrycznego chromosomu na dwie struktury akrocentryczne określane jako zjawisko fizji [64, 98]. U dzików środkowoazjatyckich (*Sus scrofa nigripes*, *S. s. ussuricus* i *S. s. attila*) występuje inny typ fuzji

centrycznej, a mianowicie obejmujący 16 i 17 parę [151]. Natomiast u dzika japońskiego (*Sus vittatus leucomystax*) kariotyp w pełni odpowiada kariotypowi europejskiej świni domowej [104].

Pośród innych gatunków zwierząt domowych natrafiono w dostępnym piśmiennictwie jedynie na opisy kilku przypadków fuzji centrycznej u psów (*Canis familiaris* L.). Zwykle wszystkie autosomy osobników tego gatunku są akrocentryczne o $2n = 78$. Shive i wsp. [135] oraz Patterson i wsp. [110] zaobserwowali fuzję robertsonowską 2 i 10 chromosomu u jednego z 15 osobników obarczonych różnymi defektami układu naczyniowego. Fuzję 1/19 zaobserwowano u miniaturowego pudła i osobnika z chondrodysplazją [69, 70]. Jeszcze inny rodzaj translokacji robertsonowskiej, a mianowicie fuzję centryczną 13/17 stwierdzono u suki i jej miotu [85, 87]. Przypuszcza się, że w tym przypadku doszło do utraty przycentromerowego rejonu autosomu 17 i nastąpiło nieznaczne obniżenie płodności [86].

Wydaje się, że względnie częste i różnorodne objawy defektów fenotypowych u psów z fuzjami centrycznymi wynikają z tego, że ocenę kariotypu u psów podejmowano przede wszystkim u osobników lub grup zwierząt wykazujących wady rozwojowe. Trudno zatem o zdecydowane opinie co do faktycznej zależności między fuzją centryczną a rozwojem somatycznym nosiciela translokacji robertsonowskiej u tego gatunku zwierząt. Defekt somatyczny jest raczej przypadkowo zbieżny z wystąpieniem fuzji. Spotyka się bowiem przypadki klinicznie normalnych psów obarczonych taką zmianą kariotypu [92].

POWSTAWANIE FUZJI CENTRYCZNYCH

Tworzenie się nowych chromosomów na drodze łączenia się centromerami dwóch akrocentrycznych chromosomów nazywane jest fuzją centryczną lub też translokacją robertsonowską, od czasu opisanego tego zjawiska u roślin przez Robertsona [128]. Ogólnie akceptowana jest teza Whita [158], w myśl której dwa akrocentryczne chromosomy pękają w pobliżu centromerów. Drobny fragment centryczny jednego z nich jest tracony, a drugi chromosom wyposażony w centromer łączy się z uwolnioną chromatydą pierwszego chromosomu tworząc chromosom o dwóch ramionach. Hipoteza ta nie wyjaśnia jednak natury wszystkich procesów zjawiska fuzji centrycznej. Z drugiej strony wysuwane są sugestie co do możliwości istnienia również zjawiska przeciwnego, tj. rozdzielania się (fizja) chromosomu metacentrycznego na dwie struktury akrocentryczne. Przypuszczenia takie wysuwają McFee i Banner [98], tłumacząc różnice kariotypu świni domowej i dzika.

W przypadku zwierząt domowych dyskusyjna jest bardzo zasadnicza kwestia, a mianowicie czy ich chromosomy akrocentryczne są typowymi chromosomami telocentrycznymi, czy też obecność małego ramienia „p” nakazuje zaliczyć je do struktur subtelocentrycznych. I tak na przykład u bydła, zdaniem Gustavssona i wsp. [62], Di Berardino i wsp. [38] oraz King [77], występują chromosomy telocentryczne, natomiast Popescu [116] twierdzi, że są one subtelocentryczne. Hansen [67] uważa, że u bydła jedne autosomy są telo-, a drugie subtelocentryczne. Podobne rozbieżności dotyczą kariotypu świni. Hansen [66], Gustavsson i wsp. [61] oraz Miyake i wsp. [99] są zdania, że akrocentryczne chromosomy u tego gatunku są telocentryczne. Madan i wsp. [93] oraz Sysa [145] podają, że są one subtelocentryczne. Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym Comings i Okada [26] uważają, że między innymi u owcy występują telocentryczne chromosomy. Do ostatecznego wyjaśnienia pozostaje więc, czy u bydła oraz innych gatunków zwierząt domowych istnieje zmienność ukształtowania rejonu centromerów oraz czy przy tworzeniu się fuzji centrycznych następuje utrata pewnej ilości materiału genetycznego z rejonu centromerów, a jeśli tak, to jaka oraz jaką informację zawierająca.

Dla porównania warto podać, że u myszy (*Mus musculus*) różniącej się kariotypem od myszy domowej (*Mus musculus*) obecnością 7 par chromosomów metacentrycznych, przy jednakowej liczbie podstawowej (NF) ramion chromosomów, wykazano mniejszą ilość DNA o 0,5%, co odpowiadałoby utracie $1,5 \times 10^7$ par nukleotydów na fuzję [25].

Ciekawe światło na temat rejonu centromerów chromosomów powstałych w wyniku fuzji centrycznych u bydła rzucają wyniki zastosowania metody wybarwiania prążków C. Zdaniem licznych autorów, autosom będący fuzją 1/29 jest chromosomem monocentrycznym [5, 41, 63, 95, 115], natomiast chromosomy powstałe jako translokacja 3/4, 5/18, 5/21, 6/16 oraz 14/24 są dwucentryczne, ponieważ obserwuje się w nich dwa bloki chromatyny centromerowej C [41, 43, 95, 107, 119]. Przyjęte przez tych badaczy mianownictwo wydaje się nietrafne, może z wyjątkiem translokacji 6/16 [43], gdyż obecność dwóch bloków chromatyny C nie przesądza jeszcze o tym, że taki chromosom zawiera dwa centromery. Z drugiej strony badania w mikroskopie elektronowym chromosomów różnych gatunków ssaków potwierdzają możliwość istnienia dwucentrycznych chromosomów [26].

Bongso i Basrur [6] analizując translokację 27/29 sugerują, że połączenie się tych chromosomów odbyło się poprzez delecję telomeru ramienia q chromosomu 27 i jego połączenie się z chromosomem 29 przez zachowany fragment jego ramienia p. Tym sposobem powstały chromo-

som byłyby rzeczywiście dwucentromerowy z centromerami wyraźnie odsuniętymi od siebie choć na niewielką odległość.

Zdaniem Niebur [105] oraz Di Bernardino i wsp. [38] obecność jednego bloku chromatyny centromerowej przemawia za wcześniejszym ewolucyjnie zaistnieniem fuzji robertsonowskiej. Tak mogłoby być w przypadku translokacji 1/29 w przeciwieństwie do pozostałych typów fuzji. Niektórzy autorzy [60] są zdania, że śledząc rozprzestrzenianie się fuzji centrycznej 1/29 wśród różnych ras bydła będzie można wskazywać na powiązania ewolucyjne u *Bovidae*, rekonstruować przebieg procesu udomawiania przedstawicieli tej podrodziny oraz określić zależności między rasami.

Zdaniem autorów [74, 127] niehomologiczne chromosomy mogą tworzyć heterochromatynowe fuzje, asocjacje czy też koniugować odcinkami zawierającymi identyczne sekwencje par nukleotydów. Wydaje się, że sprzyjać temu może obecność sekwencji powtarzalnego DNA na różnych chromosomach. U bydła różne typy powtarzalnych sekwencji stanowią aż 25–30% genomu, a pięć klas satelitarnego DNA stanowi łącznie około 20% genomu [96]. Według Botchan [8] 10% genomu zawiera 4 klasy bogatego w pary G—C satelitarnego DNA i jest on zlokalizowany przy centromerach chromosomów akrocentrycznych bydła. Najlicniejsza jego zdaniem klasa, określana jako satelitarna I, zawiera 6–7% całego DNA łącznie, a powtarzalne odcinki utworzone są z 1400 par nukleotydów. Istnieje wysoka korelacja między lokalizacją satelitarnego wysoce powtarzalnego DNA a konstytutywną heterochromatyną ujawniającą się jako prążek C [2, 108, 109].

Skromne dotychczas obserwacje nielicznych autorów wskazują ponadto, że ilość konstytutywnej chromatyny centromerowej u bydła jest zmienna i różni się między poszczególnymi homologami. Występują też różnice międzyosobnicze. Dotyczy to zwłaszcza chromosomu 1 i 2 [100, 115, 116]. Di Bernardino i wsp. [39] obserwowali polimorfizm chromatyny C w 16 różnych parach autosomów. Podobne spostrzeżenia dotyczą różnej wielkości prążka C w homologicznych chromosomach u świni. Christensen i Smedegard [23, 24] obserwują ten polimorfizm w chromosomach pary 15 i 16, natomiast Sysa [145, 146] zmienność tę zauważa w dalszych pięciu parach chromosomów (nr 1, 7, 12, 13, 15, 16 i 18). Można przypuszczać, że zjawisko to jest powszechniejsze niż wskazują na to dotychczasowe rezultaty. Polimorfizm chromatyny centromerowej oceniany bywa subiektywną oceną wielkości, bezpośrednio okiem obserwatora. Zmienność tę można wykazać w sposób bardziej zobiektywizowany za pomocą automatycznego densytometru, jak w przypadku polimorfizmu prążka C chromosomu 1 u bydła wykazali Moraes i wsp. [100].

PŁODNOŚĆ W PRZYPADKACH FUZZI ROBERTSONOWSKICH

Pierwsze analizy płodności tysięcy krów w Szwecji podjęte w związku z wykryciem w tamtejszej populacji fuzji centrycznej 1/29 wykazały obniżenie płodności krów — córek buhajów będących nosicielami tej translokacji [54]. Wskazywały na to zwłaszcza wyniki niepowtarzalności krycia w 56 dniu. W przypadkach oceny heterozygotycznych samców wyniki były niższe o 4,5%, a w przypadku samic — o 6% [42, 54, 124, 129]. Grupy córek heterozygotycznych buhajów odznaczały się wyższym stopniem brakowania [56]. Częściej też spotykano translokację 1/29 wśród jałówek powtarzających ruję niż wśród samic dobrze zacielających się [57, 125]. Obniżenie płodności obserwowano również w populacjach bydła we Francji, na Węgrzech i w Szwajcarii [29, 80, 82, 114, 122, 139].

Niektórym autorom nie udało się jednak wykazać podobnych skutków u bydła [5, 160]. Nie bez znaczenia jest fakt, że dysponowali oni mniejszymi grupami doświadczalnymi. Wśród informacji o innych translokacjach robertsonowskich niż powszechnie występująca 1/29 brak danych z zakresu zjawisk płodności, co wynika zapewne z krótkiego jeszcze okresu obserwacji nielicznych osobników będących nosicielami rzadkich typów fuzji centrycznych.

Również u kóz fuzja robertsonowska czasem może obniżać płodność [126], jakkolwiek w szeregu przypadków brak sygnałów o bezpośrednich skutkach translokacji robertsonowskich [76, 106, 113, 138].

W przeciwieństwie do rezultatów obserwacji nad translokacją 1/29 u bydła znajdują się wyniki badań wpływu fuzji centrycznych na płodność owiec. Wprawdzie początkowo sądzono, że autosomalna fuzja centryczna wywołuje bezpłodność czy zmiany w gonadach u tryka [9, 16], jednak dalsze wieloletnie badania zespołu Bruere w Nowej Zelandii nad trzema różnymi translokacjami robertsonowskimi dowodzą braku takich zależności [10, 11, 13, 14]. Ukoronowaniem tych obserwacji były badania Bruere i Ellis [15], w których przeprowadzone wielokierunkowe kombinacje krzyżowań nosicieli fuzji centrycznych 5/26, 8/11 i 7/25 w formie homo- i heterozygotycznej nie wykazały wpływu na płodność. Z drugiej strony wykorzystanie do kojarzeń osobników ($2n = 55$) urodzonych w wyniku krzyżowań ze sobą dwóch gatunków owiec o różnej diploidalnej liczbie chromosomów (*Ovis musimus*, $2n = 54$ i *O. ammon*, $2n = 56$) nie daje w potomstwie losowego rozrzutu $2n$ (54–55–56). Następuje zdecydowane ukształtowanie się w potomstwie liczby osobników o $2n = 56$ na niskim poziomie, a rozkład liczby diploidalnej w populacji F_2 wynosi jak 9 : 9 : 1 [20]. Świadczyć to może o naturalnej selekcji gamet lub zygot o wyższym zestawie chromosomów.

Nowe światło na omawiane zagadnienie rzucają badania mejozy

w przypadkach nosicielstwa fuzji robertsonowskich. W spermatocytach I rzędu tworzą się triwalenty z udziałem chromosomów zawierających translokację, a podział redukcyjny bywa czasem nierównomierny [89, 90, 120]. Dalszą konsekwencją jest powstanie niezbalansowanych zygot typu mono- lub trisomii jednego z zaangażowanych w fuzję autosomów [78, 88, 121]. Zarodki takie w bardzo wczesnym okresie zamierają, o czym świadczy również fakt, że nie spotyka się oczekiwanych przypadków w okresie perinatalnym.

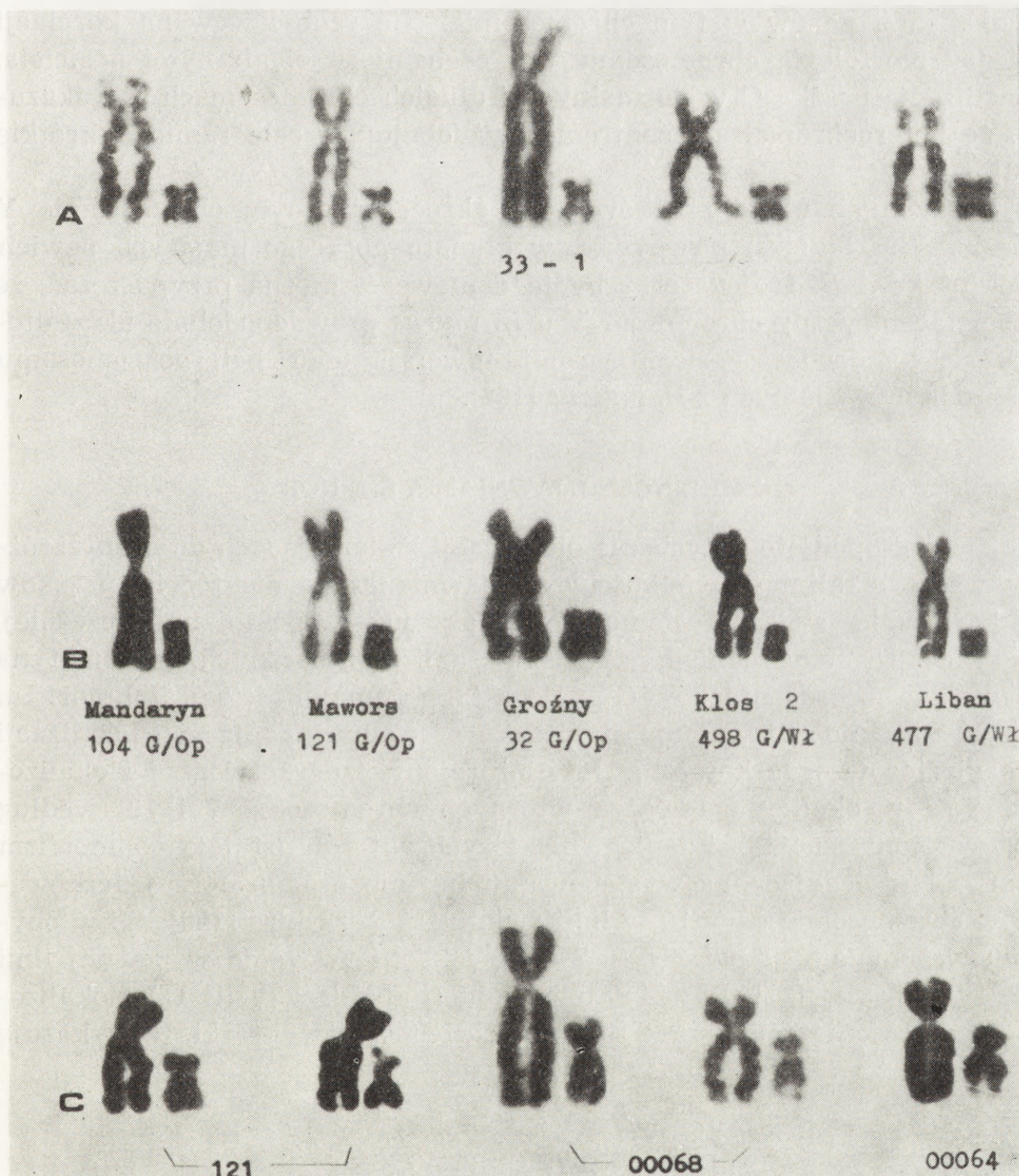
U owiec również obserwowano triwalenty i aneuploidalne spermatocyty u nosicieli fuzji centrycznych [21]. Dlaczego więc nie daje się zauważyć dowodów wskazujących na obniżenie ich płodności? Na to pytanie brak zdecydowanej odpowiedzi. Można zastanawiać się czy u owiec z translokacją robertsonowską zachowany jest sprawniejszy mechanizm segregacji chromosomów w mejozie niż u bydła, może następuje eliminacja niezbalansowanych komórek w czasie spermatogenezy. Należy wziąć jednak pod uwagę również następujący pogląd. Każdy z rodzajów fuzji ma swoje własne ultrastrukturalne podłoże i swój specyficzny *modus vivendi*, tym bardziej że chodzi o występowanie polimorfizmu u różnych gatunków zwierząt. Przykładem jest obserwowane wyraźne obniżenie płodności heterozygotycznych myszy obarczonych translokacją robertsonowską, jak dowiodły klasyczne badania Forda i Evansa [48].

INWERSJE PERICENTRYCZNE

Inną zmianą struktury chromosomu jest przemieszczenie fragmentu ramienia chromatydy z jednej strony centromeru na drugą. Taką właśnie formę chromosomów autosomalnych wykryto jedynie w kilku przypadkach u bydła. Short i wsp. [136] zaobserwowali inwersję w postaci małego metacentrycznego chromosomu. Ponieważ spostrzeżenia tego dokonano w okresie, gdy nie były znane jeszcze metody prążkowe, trudno więc określić, który chromosom uległ tej zmianie. Nie wykazano związku zmienionego chromosomu z płodnością czy organogenezą. Inwersję chromosomu nr 14 u bydła normandzkiego opisał Popescu [112, 118], wskazując na wysokie dziedziczenie tego zmienionego chromosomu w potomstwie (16 na 27 osobników) oraz ostrożnie sugerując obniżenie płodności córek buhaja nosiciela tej inwersji. W linii rasy charolais zaobserwowano inwersję chromosomu nr 16 [101, 103]. Brak informacji o skutkach tej formy kariotypu, choć autorzy zalecają eliminację nosicieli inwersji z programu hodowlanego.

POLIMORFIZM CHROMOSOMU Y

Na zmienność morfologii chromosomu Y u bydła zwrócono uwagę dość dawno, ze względu na łatwość odróżnienia go od autosomów i chromosomu płciowego X. Pomiarów wielkości względnej chromosomu Y wskazują na istnienie różnic długości względnej tego chromosomu między li-



Ryc. 2. Polimorfizm długości chromosomu Y u bydła. Grupa A — chromosomy X i Y z pięciu metafaz buhaja 33-1, grupa B — chromosomy płciowe pięciu różnych buhajów, grupa C — długi chromosom Y u buhaja charolais (121) i dwóch jego synów (00068, 00064). (Sysa i Jaszczak, 1976, niepubl.)

niami różnych buhajów [27, 33, 52]. W pojedynczych przypadkach autorzy donoszą o pojawieniu się długiego lub nawet nienormalnie długiego chromosomu Y buhajów rasy ayshire i charolais (ryc. 2) [28, 47, 147]. Analiza układu prążków G sugeruje, że przyczyna wystąpienia długiego chromosomu Y może leżeć w tendencji do słabszej spiralizacji tego chromosomu w stosunku do pozostałych chromosomów metafazy [28].

Nic dotychczas pewnego nie wiadomo o całkowitej zawartości DNA i lokalizacji genów w tym chromosomie. Nie zaobserwowano korelacji między morfologią chromosomu Y a cechami fizjologicznymi nosiciela. Lokalizacja prążka C w normalnych i długich chromosomach Y wskazuje, że heterochromatyna centromerowa obejmuje całe ramiona krótkie [28].

Porównując układ prążków G w akrocentrycznym chromosomie Y u zebu (*Bos indicus*) i ras rejonów klimatu gorącego mających pewien procent krwi *B. indicus* oraz bydła domowego, można przypuszczać, że submetacentryczny chromosom Y u *B. taurus* prawdopodobnie ukształtował się na drodze pericentrycznej inwersji tego heterochromosomu u przodków wspólnych z *B. indicus* [102].

ZMIENNOŚĆ UJAWNIANIA SIĘ NOR

Niewiele podjęto dotychczas obserwacji zmierzających do oceny zróżnicowania lokalizacji, wielkości czy ujawniania się niektórych prążków w kariotypie zwierząt domowych. Jak już wspomniano wcześniej, w związku z omawianiem zjawiska fuzji centrycznych, chromatyna ujawniana metodą prążków C podlega takim zmiennościom. Polimorfizm dotyczy również ujawniania się prążków N, odpowiadających lokalizacji organizatorów jąderkowych. U świni rejony jąderkotwórcze zlokalizowane są w okolicy przewężeń wtórnych chromosomu 7 i 10 (według wzorca Hansena [66]). Zdaniem niektórych autorów istnieje polimorfizm prążka N polegający na występowaniu lub nie organizatora jąderkowego w chromosomie pary 10 w linii świni rasy yorkshire [156] lub w obydwu wspomnianych parach — 7 i 10, jak obserwowano w pewnej linii trzody duńskiej [22]. Również u bawołu (*Bubalus bubalis* L.) zlokalizowane w rejonie telomerów różnych chromosomów prążki N wykazują zmienność wewnątrzpopulacyjną [132].

DODATKOWE CHROMOSOMY

Dotychczas w trzech pracach zasygnalizowano wystąpienie w kariotypie omawianych gatunków zwierząt domowych morfologicznie nietypowego dodatkowego chromosomu bądź centrycznego fragmentu. Hare [68]

wykrył u rocznego interseksualnego osobnika rasy holsztyńskiej obecność trzech linii komórkowych: 60,XX, 60,XY i trzecią z dodatkowym bardzo małym centrycznym „fragmentem” chromosomu — 60,XX, +cen. Tę ostatnią linię komórkową wykazano wśród komórek jądra, wzgórka nasiennego i gruczołów pęcherzykowych. Zdaniem autora ten centryczny fragment mógł funkcjonować jako chromosom Y lub jako autosomalny modyfikator chromosomu X. Ciekawy przypadek przedstawił Moraes i wsp. [103]. U normalnego fenotypowo buhaja rasy norman w pewnym odsetku komórek (9 na 20 analizowanych płytek) obecny był heterochromatynowy, jak wynika to z analizy wykrywania prążków C, chromosom mniejszy od najmniejszego autosomu. Analizując kariotypy psów z defektem układu naczyniowego, Patterson i wsp. [110] zaobserwowali u cocker-spaniela obecność dodatkowej bardzo małej struktury chromatynowej, wyraźnie mniejszej niż najmniejszy chromosom typowego kariotypu. Chromosom ten obecny był w komórkach wszystkich analizowanych tkanek.

W przedstawionych przypadkach nie podano bliższych informacji na temat kariotypów osobników spokrewnionych. Interesujące byłoby prześledzenie losu tych nietypowych struktur chromatynowych w mejozie oraz sprawdzenie ich odziedziczalności. Godne zastanowienia jest pytanie, czy w którymś z omawianych przypadków nie mamy do czynienia z tzw. chromosomami B opisanymi przez Randolfa [123], czy też dodatkowe struktury były fragmentami uszkodzonych chromosomów. Dotychczas jedynie u kilku gatunków ssaków ustalono fakt występowania takich elementów kariotypu, które można zakwalifikować jako chromosomy dodatkowe zwane inaczej chromosomami B [157].

EWOLUCJA GATUNKÓW I HYBRYDYZACJA

Kształtowanie się gatunków obserwowane przez pryzmat zmian morfologii i struktury chromosomów stanowi bardzo obszerny kompleks problemów, wykraczający poza ramy niniejszego opracowania. Nie sposób jednak zupełnie pominąć tych zagadnień przy omawianiu polimorfizmu chromosomów zwierząt domowych. Dzięki wprowadzeniu analizy układu prążków G, C i N poszczególnych chromosomów stało się możliwe podjęcie prób prześledzenia zmian morfologii aparatu genetycznego komórki towarzyszących kształtowaniu się gatunków. Prześledzono podobieństwo kariotypów bydła, bawołów [38], kozy i owcy [18, 19, 38, 46, 50, 73, 84, 97, 134] wykazując homologiczność przekształceń różnych chromosomów w stosunku do odpowiednich autosomów klasycznego wzorca przygotowywanego dla bydła, aczkolwiek identyfikacja prekursorów

wywołuje spory [137]. Podobne porównania wykonano dla kariotypu koniowatych [131].

Ze zróżnicowaniem się kariotypu i polimorfizmem niektórych ich cech wiążą się zagadnienia istotne dla hodowli, a mianowicie możliwość krzyżowania międzyrasowego i międzygatunkowego, co również zależy od podobieństw i różnic w kariotypach krzyżowanych osobników. Od wieków znane są muły, będące krzyżówką konia z osłem. Ze względu na istotne różnice kariotypów *Equus caballus* i *E. asinus* muły są niepłodne. W zależności od różnic kariotypów krzyżówki mogą być zupełnie niepłodne lub jedynie samice mogą być płodne, a czasem zarówno samce, jak i samice są płodne [3].

Polimorfizm i różnice kariotypów między gatunkami lub podgatunkami mogą być celowo wykorzystane do prac hodowlanych. Wieloletnie prace eksperymentalne prowadzone przez Tikhonova i Troshinę nad wprowadzeniem do kariotypu świni domowej chromosomów typowych dla europejskiej czy azjatyckiej świni dzikiej powiodły się [152–154]. Dzięki efektowi heterozji i wymieszaniu genów szlachetnej formy świni domowej z genami form dzikich uzyskano, zdaniem tych autorów, mieszańce o wysoce wartościowych cechach: żywotności i plenności, wymaganych dla zwierząt utrzymywanych w niekorzystnych warunkach ferm przemysłowych. Chromosomy dzików odpowiadające autosomom świni nr 15 i 17 oraz 16 i 17 stanowią swego rodzaju markery genetycznego wymieszania się genów.

PROBLEMY PRAKTYKI HODOWLANEJ WYNIKAJĄCE Z POLIMORFIZMU CHROMOSOMOWEGO

W działaniach hodowlanych należy liczyć się z negatywnymi skutkami istnienia zjawiska polimorfizmu. Trudno przypuszczać, choć teoretycznie istnieje możliwość uzasadnienia takiego poglądu, aby w widocznej przyszłości wykorzystać w sposób kontrolowany zmienność kariotypu dla poprawienia konstytucji i cech użytkowych zwierząt gospodarskich. Działania takie podjęto w ZSRR [152] krzyżując dziki ze szlachetną rasą świni szwedzkiej. Pozytywne efekty uzyskane w tym eksperymencie niekoniecznie wynikają ze zmian struktury chromosomów objętych fuzją lub fizją.

W świetle dotychczasowych badań bardziej prawdopodobne jest oczekiwanie negatywnych skutków pojawienia się niektórych form polimorfizmu. Istnienie szeregu postaci zmienności struktury chromosomu może być neutralne bądź też rola ich zostanie zauważona i w pełni oceniona dopiero w przyszłości. Przekonywające wyniki badań nad ryzykiem translokacji 1/29 u bydła świadczą o obniżeniu płodności samic i samców

nosicieli translokacji [60, 80, 114]. Wywołane jest ono wczesną śmiercią zarodkową [78, 88, 121]. Straty ekonomiczne są wyliczalne. W 1970 r. szacowano je w Szwecji na 2 mln tamtejszych koron rocznie [55]. Dzięki systematycznej eliminacji translokacji 1/29 z populacji bydła w tym kraju nastąpił wzrost płodności w ciągu 10 lat o około 3,5%, przy szacunkowym zysku rzędu 1 mln dolarów USA przypadających na wzrost płodności o 1% (Gustavsson, 1981 niepubl.).

Konsekwencje aberracji i polimorfizmu chromosomowego zwierząt gospodarskich ściśle związane są z możliwościami współczesnej hodowli polegającymi na produkcji dziesiątków tysięcy porcji nasienia uzyskiwanych od jednego buhaja, możliwości ich długotrwałego przechowywania, a następnie dostarczania w stanie głębokiego zamrożenia do każdego punktu kuli ziemskiej. Opanowano też metody pozyskiwania zwiększonej liczby jaj ssaków poprzez superowulację, jak również wykorzystania u bydła przenoszenia zarodków między dawczynią a biorczynią. Istnieje intensywny międzynarodowy handel materiałem hodowlanym. To wszystko powoduje, że potencjalne defekty tła genetycznego u zwierząt mogą stać się obciążeniem olbrzymiej populacji, proporcjonalnie do stopnia interwencji człowieka w przebieg rozrodu poszczególnych gatunków zwierząt. Uzasadnia to wprowadzenie w wielu krajach o wysokiej kulturze hodowlanej przepisów i praktycznych działań mających na celu eliminację z rozrodu zwierząt gospodarskich osobników z obciążeniami kariotypu, jak to realizuje się w Szwecji, Danii, CSRS, RFN, Austrii czy na Węgrzech.

Wystąpienie fuzji centrycznych i fakt ich szczególnie wielkiego rozpowszechnienia u bydła oraz wysokiej ich częstości u niektórych ras owiec, bez ujawnienia się negatywnych konsekwencji u tego gatunku zwierząt, świadczą o istnieniu naturalnych tendencji również wśród zwierząt udomowionych do zmian kariotypu, dokonujących się głównie poprzez translokacje robertsonowskie. Wskazane jest, aby każdą z fuzji centrycznych traktować oddzielnie, gdyż ich istota molekularna może być unikalna, a więc funkcje tak zmienionych chromosomów mogą być różne. Wynikłe stąd, trudne czasem do prześledzenia, objawy efektów na poziomie komórkowym bądź w sferze rozrodu mogą być biologicznym kosztem toczącego się w naturze procesu ewolucji genetycznej. Nasza wiedza o ultrastrukturze chromosomów zwierzęcych i ich polimorfizmie jest jeszcze bardzo ograniczona. Trzeba również uświadomić sobie, że przebadano dotychczas względnie małe grupy zwierząt pod względem ich kariotypu oraz jego związku z płodnością. Wynika stąd potrzeba rozważnego działania. Należy dążyć do eliminacji osobników z typowymi aberracjami chromosomowymi, jak i nosicieli translokacji 1/29 u bydła, lecz z drugiej strony powinno się umożliwić egzystencję

innych form polimorfizmu, utrzymując je pod uważną kontrolą cytologiczną i w zakresie rozrodu. Konieczne jest wprowadzenie ścisłej ewidencji wykorzystania takiego materiału hodowlanego dla uniknięcia niekontrolowanego propagowania w populacji zwierząt domowych polimorficznie zmienionych kariotypów.

Praca realizowana w ramach tematu MR II/9.4.5.

LITERATURA

- [1] AMRUD J., Centric fusion of chromosomes in Norwegian Red Cattle (NRF), *Hereditas*, **62**: 293–302, 1969.
- [2] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81–86, 1971.
- [3] BENIRSCHKE K., Sterility and fertility of interspecific mammalian hybrids, [w:] *Comparative Aspects of Reproductive Failure*, red. K. Benirschke, Springer-Verlag, Berlin 1967, 218–234.
- [4] BENIRSCHKE K., red., *Comparative Mammalian Cytogenetics*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969.
- [5] BLAZAK W. F., ELDRIDGE F. E., A Robertsonian translocation and its effects upon fertility in Brown Swiss cattle, *J. Dairy Sci.*, **60**: 1132–1142, 1977.
- [6] BONGSO A., BASRUR P. K., Chromosome anomalies in Canadian Guernsey bulls, *Cornell Vet.*, **66**: 476–89, 1976.
- [7] BOSMA A. A., Chromosomal polymorphism and G-banding patterns in the wild boar (*Sus scrofa* L) from the Netherlands, *Genetica*, **46**: 391–399, 1976.
- [8] BOTCHAN M. R., Bovine satellite I DNA consists of repetitive units 1,400 base pairs in length, *Nature*, **251**: 288–92, 1974.
- [9] BRUERE A. N., Male sterility and an autosomal translocation in Romney sheep, *Cytogenetics*, **8**: 209–218, 1969.
- [10] — The discovery and biological consequences of some important chromosome anomalies in populations of domestic animals, *Proc. Ist. Wld. Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.*, Madrid 1974, 151–175.
- [11] BRUERE A. N., Further evidence of normal fertility and the formation of balanced gametes in sheep with one and more different Robertsonian translocations, *J. Reprod. Fert.*, **45**: 323–331, 1975.
- [12] BRUERE A. N., CHAPMAN H. M., Autosomal translocations in two exotic breeds of cattle in New Zealand, *Vet. Rec.*, **92**: 615–618, 1973.
- [13] — Double translocation heterozygosity and normal fertility domestic sheep, *Cytogenet. Cell Genet.*, **13**: 342–351, 1974.
- [14] BRUERE A. N., CHAPMAN H. M., WYLLIE D. R., Chromosome polymorphism and its possible implications in the select Drysdale breed of sheep, *Cytogenetics*, **11**: 233–246, 1972.
- [15] BRUERE A. N., ELLIS P. M., Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations), *J. Reprod. Fert.*, **57**: 363–375, 1979.
- [16] BRUERE A. N., MILLS R. A., Observations on the incidence of Robertsonian translocations and associated testicular changes in a flock of New Zealand Romney sheep, *Cytogenetics*, **10**: 260–272, 1971.

- [17] BRUERE A. N., ZARTMAN D. L., CHAPMAN H. M., The significance of the G-bands and C-bands of three different Robertsonian translocations of domestic sheep (*Ovis aries*), *Cytogenet. Cell Genet.*, **13**: 479-488, 1974.
- [18] BUCLAND R. A., EVANS H. J., Cytogenetic aspects of phylogeny in the bovidae. I. G-banding, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 42-63, 1978.
- [19] — Cytogenetic aspects of phylogeny in the bovidae. II. C-banding, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 64-71, 1978.
- [20] BUNCH T. D., FOOTE W. C., Diploid chromosome frequencies and fertility in hybrid ewes with 2ns of 54 and 55, *Am. Soc. Anim. Sci. 70th Annual Meeting*. July 1978, Mich. State Univ. East Lansing, Abstr. 224, 1978.
- [21] CHAPMAN H. M., BRUERE A. N., The frequency of aneuploid in the secondary spermatocytes of normal and Robertsonian translocation — carrying rams, *J. Reprod. Fert.*, **45**: 333-342, 1975.
- [22] CHRISTENSEN K., Evidence of polymorphism of the nuclear organizer region (N-band) in pig chromosomes, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 464-468, 1980.
- [23] CHRISTENSEN K., SMEDEGARD K., Chromosome marker in domestic pigs. C-band polymorphism, *Hereditas*, **88**: 269-272, 1978.
- [24] — Chromosome markers in domestic pigs. A new C-band polymorphism, *Hereditas*, **90**: 303-304, 1979.
- [25] COMINGS D. E., AVELINO E., DNA loss during Robertsonian fusion in studies of the tobacco mouse, *Nature, New Biol.*, **237**: 199, 1972.
- [26] COMINGS D. E., OKADA T. A., Whole-mount electron microscopy of the centromere region of metacentric and telocentric mammalian chromosomes, *Cytogenetics*, **9**: 436-449, 1970.
- [27] CRIBIU E. P., Variation interraciale de la taille du chromosome Y chez *Bos taurus* L., *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **7**: 139-144, 1975.
- [28] CRIBIU E. P., POPESCU C. P., Un cas de chromosome Y anormalement long chez *Bos taurus* L., *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **6**: 387-390, 1974.
- [29] — La cytogénétique au service de l'élevage. Fertilité du boeuf domestique (*Bos taurus* L.): effet de la fusion centrique, *Rec. Med. vet.*, **156**: 319-322, 1980.
- [30] — Distribution of the 1/29 Robertsonian translocation in France, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 130-135, 1980.
- [31] — The 1/29 Robertsonian translocation in a bovine cell line, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 152-156, 1980.
- [32] DARRE R., BERLAND H. M., QUEINNEC G., Une nouvelle translocation Robertsonienne chez les bovins, *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **6**: 297-303, 1974.
- [33] DARRE R., MUORWELL M., BERLAND H. M., QUEINNEC G., Variation de la longueur relative du chromosome Y chez les bovins, *Proc. Ist. Wld. Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. Madrid*, 125-130, 1974.
- [34] DARRE R., QUEINNEC G., BERLAND H. M., La translocation 1/29 des bovins. Etude générale et importance du phénomène dans le Sud-Ouest, *Revue Méd. Vét.*, **123**: 477-494, 1972.
- [35] De GIOVANNI A., MOLTENI L., Ulteriore indagine citogenetica sulla razza bovina Romagnola. Nota I: nuovi casi di fusione centrica, *Atti. Soc. It. Sci. Vet.*, **30**: 479-481, 1976.
- [36] De GIOVANNI A., POPESCU C. P., SUCCI G., MOLTENI L., Meiotic study of a new autosomal translocation in "Alpine grey cattle", 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 158-163, 1980.

- [37] De GIOVANNI A., SUCCI G., MOLteni L., CASTIGLIONI M., A new autosomal translocation in "Alpine grey cattle", *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **11**: 115-120, 1979.
- [38] Di BERARDINO D., IANNUZZI L., BETTINI T. M., MATASSINO D., Karyotype evolution in cattle (*Bos taurus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*), 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 272-288, 1980.
- [39] Di BERARDINO D., IANNUZZI L., Di MEO G. P., ZACCHI R., Constitutive heterochromatin polymorphism in chromosomes of cattle (*Bos taurus*), 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 438-457, 1980.
- [40] Di BERARDINO D., IANNUZZI L., FERRARA L., MATASSINO D., A new case of Robertsonian translocation in cattle, *J. Hered.*, **70**: 436-438, 1979.
- [41] — Cytogenetic survey on Podolian cattle reared in southern Italy. I. Inventory of chromosome aberrations, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 142-151, 1980.
- [42] DYRENDAHL I., GUSTAVSSON I., Sexual functions, semen characteristics and fertility of bulls carrying the 1/29 chromosome translocation, *Hereditas*, **90**: 281-289, 1979.
- [43] ELDRIDGE F. E., A dicentric Robertsonian translocation in a Dexter cow, *J. Hered.*, **65**: 353-355, 1974.
- [44] — High frequency of a Robertsonian translocation in a herd of British white cattle, *Vet. Rec.*, **97**: 71-73, 1975.
- [45] ELLSWORTH S. M., PAUL S. R., BUNCH T. D., A 14/28 dicentric Robertsonian translocation in a Holstein cow, *Theriogenology*, **11**: 165-168, 1979.
- [46] EVANS H. J., BUCKLAND R. A., SUMNER A. T., Chromosome homology and heterochromatin in goat, sheep and ox studied by banding techniques, *Chromosoma*, **42**: 383-402, 1973.
- [47] FECHHEIMER N. S., A cytogenetic survey of young bulls in USA, *Vet. Rec.*, **93**: 535-536, 1973.
- [48] FORD C. E., EVANS E. P., Robertsonian translocation in mice: segregational irregularities in male heterozygotes and zygotic unbalance, [w:] *Chromosomes Today*, **4**: 387-397, 1973.
- [49] FORD C. E., POLLOCK D. L., GUSTAVSSON I., Proceedings of the First International Conference for the Standardization of Banded Karyotypes of Domestic Animals. University of Reading. Reading, England 2nd-6th August 1976, *Hereditas*, **92**: 145-162, 1980.
- [50] FORSTOVA J., VOTAVOVA H., GUTTMANN T., A comparative study of G + C-rich satellite components of sheep and goat DNA, *Nucl. Acids Res.*, **6**: 57-70, 1979.
- [51] FRANK M., LAURENT C., FROGET J., SURCIN J. M., COURSAT F., Chromosomal abnormalities and fertility of carriers the 1/29 Robertsonian translocation, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 55-62, 1980.
- [52] GERASIMCHUK A. V., Karyogram of the cattle chromosomes, *Tsitol. Genet.*, **9**: 299-302, 1975.
- [53] GUSTAVSSON I., Chromosome abnormality in cattle, *Nature*, **211**: 865-866, 1966.
- [54] — Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle, *Hereditas*, **63**: 68-169, 1969.
- [55] — Economic importance of a translocation in Swedish cattle, 1. Eur. Kolloq. Zytogenet. (Chromosomenpath.) Vet.-med. Säugetierkunde, Giessen, 12-13. Okt. 1970, Sonderheft 1, Giessener Beitr. Erbpath. Zuchthyg., 108-114, 1970.

- [56] — Culling rates in daughters of sires with a translocation of centric fusion type, *Hereditas*, **67**: 65–74, 1971.
- [57] — Chromosomes of repeat-breeder heifers, *Hereditas*, **68**: 331–332, 1975.
- [58] — Distribution of the 1/29 translocation in the A. I. bull population of Swedish red and white cattle, *Hereditas*, **69**: 101–106, 1971.
- [59] — Chromosomal polymorphism, 1st Wld Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. Madrid, **1**: 191–199, 1974.
- [60] — Distribution and effects of the 1/29 Robertsonian translocation in cattle, *J. Dairy Sci.*, **62**: 825–835, 1979.
- [61] GUSTAVSSON I., HAGELTORN M., JOHANSSON C., ZECH L., Identification of the pig chromosomes by the quinacrine mustard fluorescence technique, *Exptl. Cell Res.*, **70**: 471–474, 1972.
- [62] GUSTAVSSON I., HAGELTORN M., ZECH L., Recognition of the cattle chromosomes by the Q- and G-banding techniques, *Hereditas*, **82**: 157–166, 1976.
- [63] — Identification of the 1/29-translocation in the Swedish Red and White (SRB) cattle breed by utilization of new staining techniques, *Hereditas*, **82**: 260–262, 1976.
- [64] GUSTAVSSON I., HAGELTORN M., ZECH L., REILAND S., Identification of the chromosomes in a centric fusion/fission polymorphic system of the pig (*Sus scrofa* L.), *Hereditas*, **75**: 153–155, 1973.
- [65] GUSTAVSSON I., ROCKBORN G., Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle, *Nature*, **203**: 990, 1964.
- [66] HANSEN K. M., Identification of the chromosomes of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). An identification key and a landmark system, *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **9**: 517–526, 1977.
- [67] HANSEN K. M., The G-band karyotype of cattle (*Bos taurus*), 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., 372–376, 1980.
- [68] HARE W. C. D., Congenital retroflexion of the penis and inguinal cryptorchidism in a presumptive bovine twin with a 60, XY/60, XX/61, XX, + cen chromosome constitution, *Can. J. Comp. Med.*, **40**: 429–433, 1976.
- [69] HARE W. C. D., BOVEE K., A chromosomal translocation in miniature poodles? *Vet. Rec.*, **95**: 217–218, 1974.
- [70] HARE W. C. D., WILKINSON J. S., McFEELY R. A., RISER W. H., Bone chondroplasia and a chromosome anomaly in the same dog, *Am. J. Vet. Res.*, **28**: 583–586, 1967.
- [71] HARVEY J. A., Chromosome analysis of cattle populations, *Vet. Rec.*, **94**: 227, 1974.
- [72] HARVEY M. J. A., LOGUE D. N., Studies on the 13/21 Robertsonian translocation in Swiss Simmental cattle, 2. Europ.Kolloq. Zytogenet. (Chromosomenpath.) *Vet.-med., Tierzucht Säugetierkunde*, Giessen, 155–161, 1975.
- [73] HENDENSON L. M., BRUERE A. N., Conservation of nucleolus organizer regions during evolution in sheep, goat, cattle and aoudad, *Can. J. Genet. Cytol.*, **21**: 1–8, 1979.
- [74] HOLMQUIST G., DANCIS B. M., A general model of karyotype evolution, *Genetica*, **52/53**: 151–163, 1980.
- [75] HSU T. C., BENIRSCHKE K., *An Atlas of Mammalian Chromosomes*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1–10**: 1967–1977.
- [76] HULOT F., Nouveau cas de fusion centrique chez la chèvre domestique (*Capra hircus* L.), *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **1**: 175–176, 1969.
- [77] KING W. A., Spontaneous chromosome translocation in cattle and pigs: A stu-

- dy of the causes of their fertility reducing effect, Doctor Diss. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala 1980.
- [78] KING W. A., LINARES T., GUSTAVSSON I., BANE A., Presumptive translocation type trisomy in embryos sired by bulls heterozygous for the 1/29 translocation, *Hereditas*, **92**: 167-169, 1980.
- [79] KOVACS A., Über eine neue autosomale Translokation beim ungarischen Fleckviehrind, 2. Eur. Kolloq. Zytogenet. (Chromosomenpath). Tierzucht. Säugetierkunde, 162-167, 1975.
- [80] KOVACS A., CSUKLY S., Effect of the 1/29 translocation upon fertility in Hungarian Simmentale cattle, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 35-43, 1980.
- [81] KOVACS A., MESZAROS I., SELLYEI M., VASS L., Mosaic centromeric fusion in a Holstein-Friesian bull, *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **24**: 215-220, 1973.
- [82] KOVACS A., NEMETH S., CSUKLY S., Effects of the 1/29 translocation at a state farm, Abstracts, 1st. Int. Symp. Res. Cytogenet. Disease Resist. Anim. Man, Vienna, 18/19 May 1979.
- [83] KOVACS A., PAPP M., Report on chromosomal examination of A. I. bulls in Hungary (Abstr.), *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **9**: 528, 1977.
- [84] KURNIT D. M., BROWN F. L., MAIO J. J., Mammalian repetitive DNA sequences in a stable Robertsonian system. Characterization, in situ hybridizations, and cross-species hybridizations of repetitive DNAs in calf, sheep and goat chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 145-167, 1978.
- [85] LARSEN R. E., DIAS E., CERVENKA J., Centric fusion of autosomal chromosome in a bitch and offspring, *Am. J. Vet. Res.*, **39**: 861-864, 1978.
- [86] LARSEN R. E., DIAS E., FLORES G., Heterozygous and homozygous centric fusion of autosomal chromosomes in dogs, Am. Soc. Anim. Sci. 70th Annual Meeting. July 1978, Mich. State Univ. East Lansing, Abstr. 238, 1978.
- [87] LARSEN R. E., DIAS E., FLORES G., SELDEN J. R., Breeding studies reveal segregation of a canine Robertsonian translocation along Mendelian proportions, *Cytogenet. Cell Genet.*, **24**: 95-101, 1979.
- [88] LINARES T., KING W. A., GUSTAVSSON I., Morphological appearance of bovine embryos sired by bulls heterozygous for the 1/29 translocation, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 188-192, 1980.
- [89] LOGUE D. N., Meiosis in the domestic ruminants with particular reference to Robertsonian translocation, *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **9**: 493-507, 1977.
- [90] LOGUE D. N., HARVEY M. J. A., Meiosis and spermatogenesis in bulls heterozygous for a presumptive 1/29 Robertsonian translocation, *J. Reprod. Fert.*, **54**: 159-165, 1978.
- [91] LOGUE D. N., HARVEY M. J. A., A 14/20 Robertsonian translocation in Swiss Simmental cattle, *Res. Vet. Sci.*, **25**: 7-14, 1978.
- [92] MA N. S. F., GILMORE C. E., Chromosomal abnormality in a phenotypically and clinically normal dog, *Cytogenetics*, **10**: 254-259, 1971.
- [93] MADAN K., FORD C. E., POLGE C., A reciprocal translocation, t/6p+; 14q-/, in the pig, *J. Reprod. Fert.*, **53**: 395-398, 1978.
- [94] MASUDA H., TAKAHASHI T., SOEJIMA A., WAIDE Y., Centric fusion of chromosomes in a Japanese Black bull and his offsprings, *Jap. J. Zootech. Sci.*, **49**: 853-858, 1978.
- [95] MASUDA H., SHIOYA Y., FUKUHARA R., Robertsonian translocation in Japanese Black cattle, *Jap. J. Zootechn. Sci.*, **51**: 26-32, 1980.

- [96] MAYFIELD J. E., McKENNA J. F., LESSA B. S., The sequence organization of bovine DNA, *Chromosoma*, **76**: 277-294, 1980.
- [97] MAYR B., CZAKER R., Variable position of nucleolus organizer regions in *Bovidae*, *Experientia*, **37**: 564-565, 1981.
- [98] McFEE A. F., BANNER M. W., Inheritance of chromosome number in pigs, *J. Reprod. Fert.*, **18**: 9-14, 1969.
- [99] MIYAKE Y. I., KAWATA K., ISHIKAWA T., UMEZU M., Translocation heterosigosity in a malformed piglet and its normal littermates, *Teratology*, **16**: 163-167, 1977.
- [100] MORAES J. C. F., ERDTMANN B., MATTEVI M. S., SALZANO F. M., Den- sitometric analysis of the C-band variability in chromosome 1 of cattle, *Vet. Rec.*, **105**: 102-103, 1979.
- [101] MORAES J. C. F., MATTEVI M. S., ERDTMANN B., POLI J. L. H., Pericen- tric inversion and Robertsonian translocation in a Charolais cattle family, *Am. Soc. Anim. Sci.*, 70th Ann. Meet. July 1978, Mich. State Univ. East Lan- sing, Abstr., 249, 1978.
- [102] MORAES J. C. F., MATTEVI M. S., PINHEIRO L. E. L., ERDTMANN B., Polymorphism of Y chromosome in Ibage breed: G and C banding aspects, *Am. Soc. Anim. Sci.*, 70th Ann. Meeting July 1978, Mich. State Univ. East Lansing, Abstr., 243, 1978.
- [103] MORAES J. C. F., MATTEVI M. S., POLI J. L. E. H., ERDTMANN B., A cytogenetic survey of five breeds of cattle from Brazil, *J. Hered.*, **71**: 146-148, 1980.
- [104] MURAMOTO J., MAKINO S., ISHIKAWA T., KANAGAWA H., On the chro- mosomes of the wild boar and the boar-pig hybrids, *Proc. J. Acad.*, **141**: 236-239, 1965.
- [105] NIEBUR E., Dicentric and monocentric Robertsonian translocation in man, *Hu- manganetik*, **16**: 217-226, 1972.
- [106] PADEH B., WYSOKI M., SOLLER M., Further studies on a Robertsonian translocation in the Saanen dairy goat, *Cytogenetics*, **10**: 61-69, 1971.
- [107] PAPP M., KOVACS A., 5/18 Dicentric Robertsonian translocation in a Sim- mental bull, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 51-54, 1980.
- [108] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, **168**: 1356-1358, 1970.
- [109] PATTHAK K., HSU T. C., ARRIGHI F. E., Chromosome of *Peromyscus* (*Ro- dentia*, *Cricetidae*). IV The role of heterochromatin in karyotype evolution, *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**: 315-326, 1973.
- [110] PATTERSON D. F., HARE W. C. D., SHIVE R. J., LUGINBÜHL H. R., Con- genital malformations of the cardiovascular system associated with chro- mosomal abnormalities, *Zbl. Vet. Med. Reihe A*, **13**: 669-689, 1966.
- [111] POLLOCK D. L., BOWMAN J. C., A Robertsonian translocation in British Friesian cattle, *J. Reprod. Fert.*, **40**: 423-432, 1974.
- [112] POPESCU C. P., Un cas possible d'inversion péricentrique chez les bovins, *Ann. Genet.*, **15**: 197-199, 1972.
- [113] — Mode de transmission d'une fusion centrique dans la descendance d'un bouc (*Capra hircus* L.) hétérozygote, *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **4**: 355-361, 1972.
- [114] — Etude cytogénétique du reproducteur, [w:] U. N. C. E. I. A.: Rapport d'activité des services techniques, 1973.
- [115] — Etude du caryotype bovin par une nouvelle méthode cytogénétique: les

- bandes C, 1st Wld Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid, 3: 159-164, 1974.
- [116] — L'étude du caryotype bovin (*Bos taurus* L.) par les méthodes de bandes, Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 15: 751-756, 1975.
- [117] — Les anomalies chromosomiques des bovins (*Bos taurus* L.). Etat actuel-des connaissances, Ann. Genet. Sel. Anim., 9: 463-470, 1977.
- [118] — Observations sur le caryotype normal et anormal des bovins, Can. Vet. J., 18: 143-149, 1977.
- [119] — A new type of Robertsonian translocation in cattle, J. Heredity, 68: 139-142, 1977.
- [120] — A study of meiotic chromosomes in bulls carrying the 1/29 translocation, Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 18: 383-389, 1978.
- [121] — Cytogenetic study on embryos by a bull carrier of 1/29 translocation, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 182-186, 1980.
- [122] QUEINNEC G., DARRE R., BERLAND H. M., RAYNAUD J. C., Etude de la translocation 1-29 dans la population bovine du Sud-Ouest de la France: conséquences zootechniques, 1st Wld Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. Madrid, 3: 131-151, 1974.
- [123] RANDOLPH L. F., Types of supernumerary chromosomes in maize, Anat. Rec., 41: 102-105, 1928.
- [124] REFSDAL A. O., Low fertility in daughters of bulls with 1/29 translocation, Acta Vet. Scand., 17: 190-195, 1976.
- [125] REFSDAL A. O., LUNAAS T., GARM O., Fertilitetsundersøkelser av kviger og kuer utsjaltet p. g. a. reproduksjonsforstyrrelser, [w:] 12 Nord. Vet-Kongr. Foredrag og rapporter, Reykjavik 1974.
- [126] RICORDEAU G., Observations sur les caractères de reproduction des produits mâles et femelles issus d'un bouc porteur d'une „fusion centrique”, Ann. Genet. Sel. Anim., 4: 593-598, 1972.
- [127] RILEY R., LAW C. N., Genetic variation in chromosome pairing, Adv. Genet., 13: 57-114, 1965.
- [128] ROBERTSON W. R. B. Chromosome studies. I Taxonomic relationship shown in the chromosomes of *Tettigradae* and *Acrididae* V-shaped chromosomes and their significance in *Acrididae*, *Locustidae* and *Gryllida*: chromosomes and variation, J. Morph., 27: 179-331, 1916.
- [129] ROOS A., Fertiliteten hos tjurar med kromosomrubbing, Hosdjur, 5: 20, 1971.
- [130] RUGIATI S., FREDRIGO M., Alterazione cromosomica riscontrata in un toro acondroplasico di razza Romagnola, L'Ateneo Parmense, Acta Bio-Medica, 38: 1-7, 1967.
- [131] RYDER O. A., EPEL N. C., BENIRSCHKE K., Chromosome banding studies of the *Equidae*, Cytogenet. Cell Genet., 20: 323-350, 1978.
- [132] SALERNO A., VALERIO D., SCOGNAMIGLIO F., PELUSO F., Nucleolar organizer region in Italian buffalo (*Bubalus bubalis* L.) chromosomes, 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, 470-472, 1980.
- [133] SAMARINEANU M., LIVESCU B. E., GRANCIU I., Identificarea translocatiei autozomale robertsoniene la unele rase de taurine din Romane, Lucr. Stiint. ICTT Corbeanca, 3: 53-60, 1977.
- [134] SCHNEDL W., CZAKER R., Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat and sheep chromosomes (*Bovidae*), Cytogenet. Cell Genet., 13: 246-255, 1974.

- [135] SHIVE R. J., HARE W. C. D., PATTERSON D. F., Chromosome studies in dogs with congenital cardiac defects, *Cytogenetics*, **4**: 340–348, 1965.
- [136] SHORT R. V., SMITH J., MANN T., EVANS E. P., HALLETT J., FRYER A., HAMMERTON J. L., Cytogenetic and endocrine studies of a freemartin heifer and its bull co-twin, *Cytogenetics*, **8**: 369–388, 1969.
- [137] SŁOTA E., JANICKA-MAZUR W., SYSA P., Stan zaawansowania i możliwości praktycznego wykorzystania badań cytogenetycznych u owiec, *Biul. Inf. Inst. Zootechn.*, **17**: 45–54, 1979.
- [138] SOLLER M., WYSOKI M., PADEH B., A chromosomal abnormality in phenotypically normal Saanen goats, *Cytogenetics*, **5**: 88–93, 1966.
- [139] STRANZINGER G. F., Phenotypic variations in farm animals with chromosomal aberrations, *Am. Soc. Anim. Sci. 70th Annual Meeting*, July 1978, Mich. State Univ. East Lansing, Abstr., 248–249, 1978.
- [140] STRANZINGER G. F., FÖRSTER M., Autosomale Chromosomentranslokationen beim Fleck- und Braunvieh, *Experientia*, **32**: 24–27, 1976.
- [141] SUCCI G., MOLteni L., De GIOVANNI A., Cytogenetical study of some Italian cattle breeds in decreasing or in way of extinction, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 136–140, 1980.
- [142] SYSA P., Badania nad kariotypem świni domowej (*Sus scrofa dom.* L.) przy zastosowaniu technik prążkowego barwienia chromosomów oraz metody autoradiograficznej, *Praca dokt.*, AR, Warszawa, 1974.
- [143] — Translokacja chromosomalna 1/29 u dwóch buhajków rasy polskiej czerwonej, *Medycyna Wet.* **32**: 353–355, 1976.
- [144] — Ustalenie międzynarodowych wzorców kariotypów zwierzęcych na konferencji w Reading (Wielka Brytania), *Medycyna Wet.*, **33**: 597–599, 1977.
- [145] — Chromatin polymorphism of metaphase chromosomes in the pig (*Sus scrofa dom.* L.), XIV Intern. Congr. Genet. Moscow 1978, Abstr., **1**: 278, 1978.
- [146] — Polymorphism of metaphase chromosomes in swine (*Sus scrofa* L.), *Genetica*, **52/53**: 313–315, 1980.
- [147] SYSA P. S., JASZCZAK K., Długi chromosom Y u buhajów rasy Charolais, VI Zjazd PTG Białystok, *Streszczenia*, 134, 1976.
- [148] SYSA P., JASZCZAK K., BAJDECKA J., Geneticka fuze 1/29 u cerveneho polskeho skotu, 8 Dni Genet. Hosp. Zv., *Vysoke Tatry*, **2**: 68–70, 1976.
- [149] SYSA P. S., SŁAWOMIRSKI J., Aberracje chromosomowe u bydła (*Bos taurus* L.) Cz. I. Nieprawidłowości chromosomów somatycznych, *Medycyna Wet.*, **35**: 489–494, 1979.
- [150] SYSA P. S., SŁAWOMIRSKI J., GROMADZKA J., Uwagi na temat badań cytogenetycznych nad krzyżówką dzika (*Sus scrofa ferus*) i świni domowej (*Sus scrofa dom.*), *Pol. Arch. Wet.*, w druku.
- [151] TIKHONOV V. N., TROSHINA A. I., Introduction of two chromosomal translocations of *Sus scrofa nigripes* and *Sus scrofa scrofa* into genome of *Sus scrofa domestica*, *Theor. Appl. Genet.*, **53**: 261–264, 1978.
- [152] — Marker chromosomal translocation in development of commercial landrace × wild boars hybrids and Siberian mini-pigs, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 242–248, 1980.
- [153] TROSHINA A. I., TIKHONOV V. N., The reproductive features of landrace × wild boar hybrids with two chromosomal translocations Tr. 1 /16/17/ and Tr. 2 /15/17/, 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, 250–261.
- [154] — Cytogenetics of five generations of hybrids between wild and domestic pigs differing in karyotype morphology, *Genetica*, **52/53**: 317–326, 1980.

- [155] TSCHUDI P., ZAHNER B., KÜPFER U., STÄMPFLI G., Chromosomenuntersuchungen an schweizerischen Rinderrassen, Schweiz. Arch. Tierheilkd., **119**: 329–336, 1977.
- [156] VEIJALAINEN P., RIMAILA-PÄRNÄNEN E., A case of chromosomal polymorphism in an inbred Yorkshire pig, Hereditas, **88**: 276–279, 1978.
- [157] VOLOBUJEV V. T., The B-chromosome system of mammals, Genetica, **52/53**: 333–337, 1980.
- [158] WHITE M. J. D., Animal Cytology and Evolution, Cambridge Univ. Press, London, 1954.
- [159] WURSTER D. H., BENIRSCHKE K., Chromosome studies in the superfamily *Bovoidea*, Chromosoma (Berl.), **25**: 152–171, 1968.
- [160] ZAHNER B., KÜPFER U., TSCHUDI P., The influence of the 1/29 translocation on fertility of Simmental cows in Switzerland, Zuchthyg., **14**: 49–54, 1979.
- [161] ZAKHAROV A. F., Human chromosome polymorphism and pathology, Proc. XIV Intern. Congr. Genet. Mir Publ. Moscow, **2/1**: 196–207, 1981.

Otrzymano: 25 października 1981.

Przyjęto: 10 listopada 1981.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

POLIMORFIZM KARIOTYPÓW U NIEKTÓRYCH GATUNKÓW Z RODZINY CANIDAE *

KARYOTYPE POLYMORPHISM IN SOME SPECIES OF FAMILY CANIDAE

Marek ŚWITOŃSKI

Instytut Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej,
Zakład Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt,
Akademia Rolnicza, Poznań

Streszczenie. Polimorfizm karyotypów omówiono na przykładzie trzech gatunków z rodziny *Canidae*: lis polarny (*Alopex lagopus*), lis pospolity (*Vulpes vulpes*) i jenot (*Nyctereutes procyonoides*). U lisa polarnego polimorfizm jest wywołany przez fuzję centryczną oraz dimorfizm w wielkości odcinka heterochromatynowego w jednej parze chromosomów (prążki C). W karyotypie lisa pospolitego występuje zmienna liczba mikrochromosomów. Natomiast u jenota opisano dwie formy znacznie różniące się liczbą chromosomów, które to różnice zostały wywołane prawdopodobnie przez system translokacji Robertsona.

Summary. Karyotype polymorphism was showed in family *Canidae* in three species: blue fox (*Alopex lagopus*), red fox (*Vulpes vulpes*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). In the blue fox the polymorphism was caused by centric fusion and dimorphism in the size of heterochromatic segment (C-band) in a pair of chromosomes. In the karyotype of red fox variable numbers of microchromosomes were found, while in raccoon dog there were two forms which differed in diploid number of chromosomes. This difference was caused probably by the system of centric fusions.

WSTĘP

Wśród przyczyn wywołujących polimorfizm karyotypów często wymienia się: fuzje centryczne (translokacje Robertsona), występowanie zmiennej liczby mikrochromosomów oraz zmienność wielkości odcinków

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981 r.

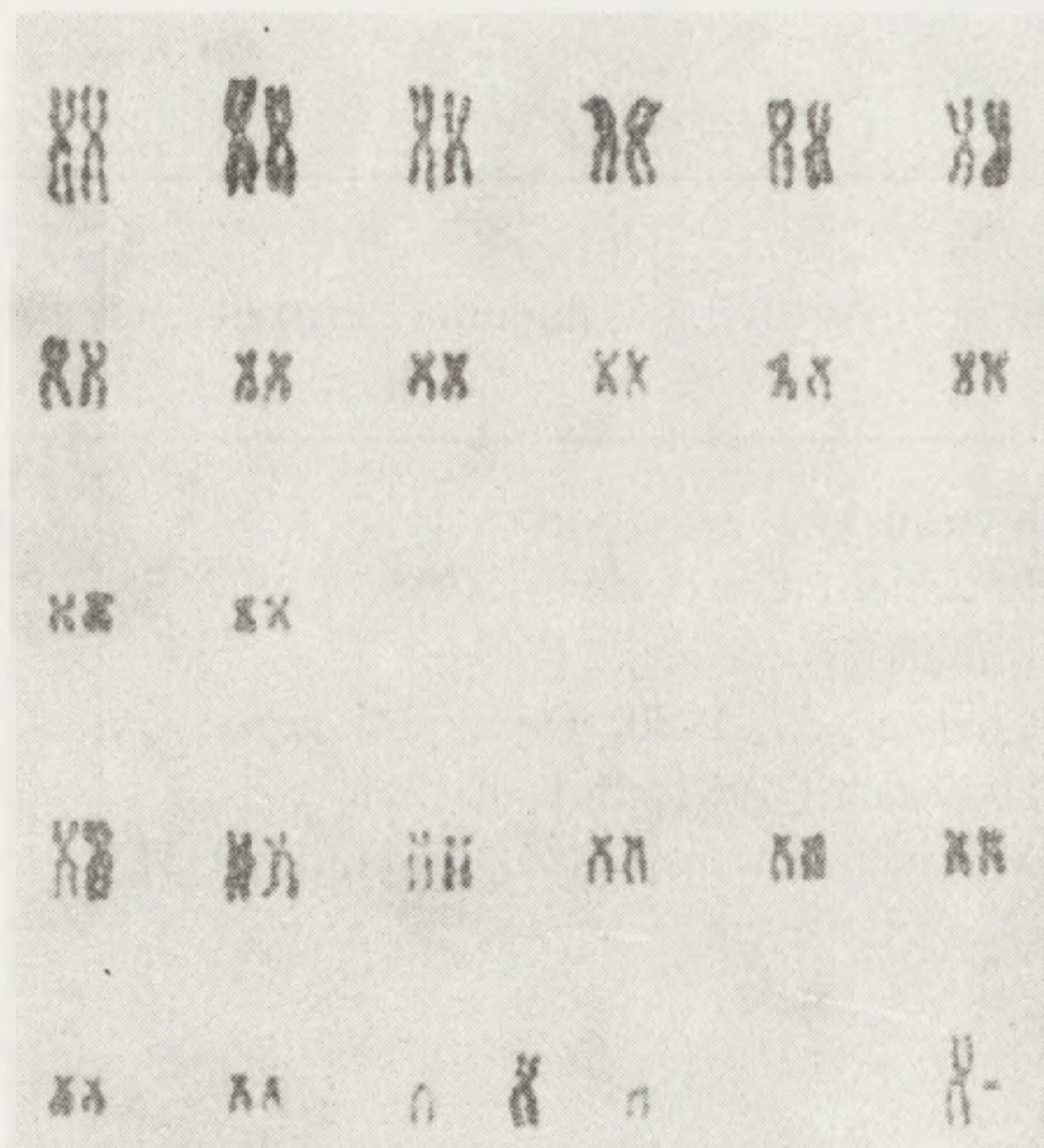
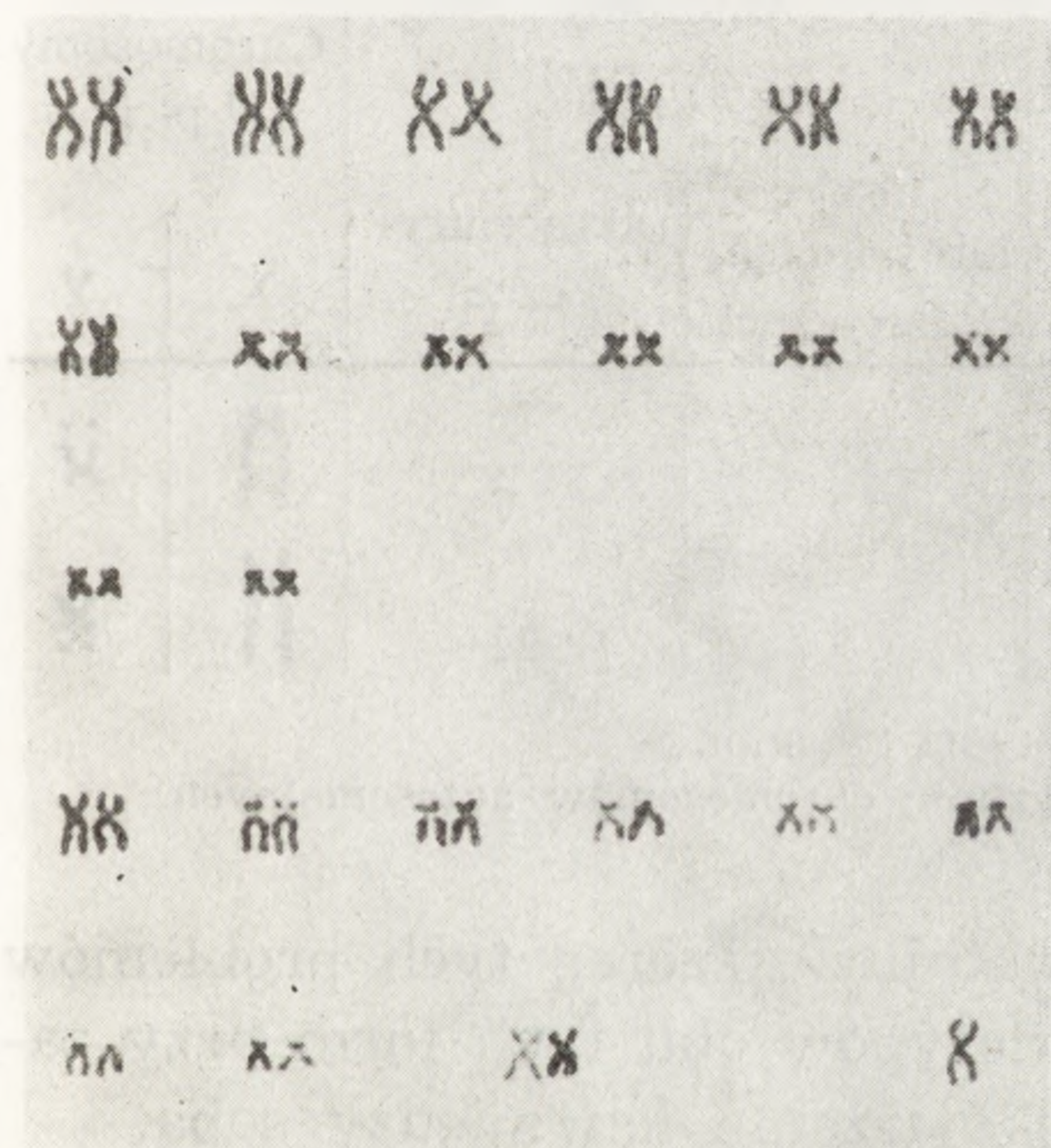
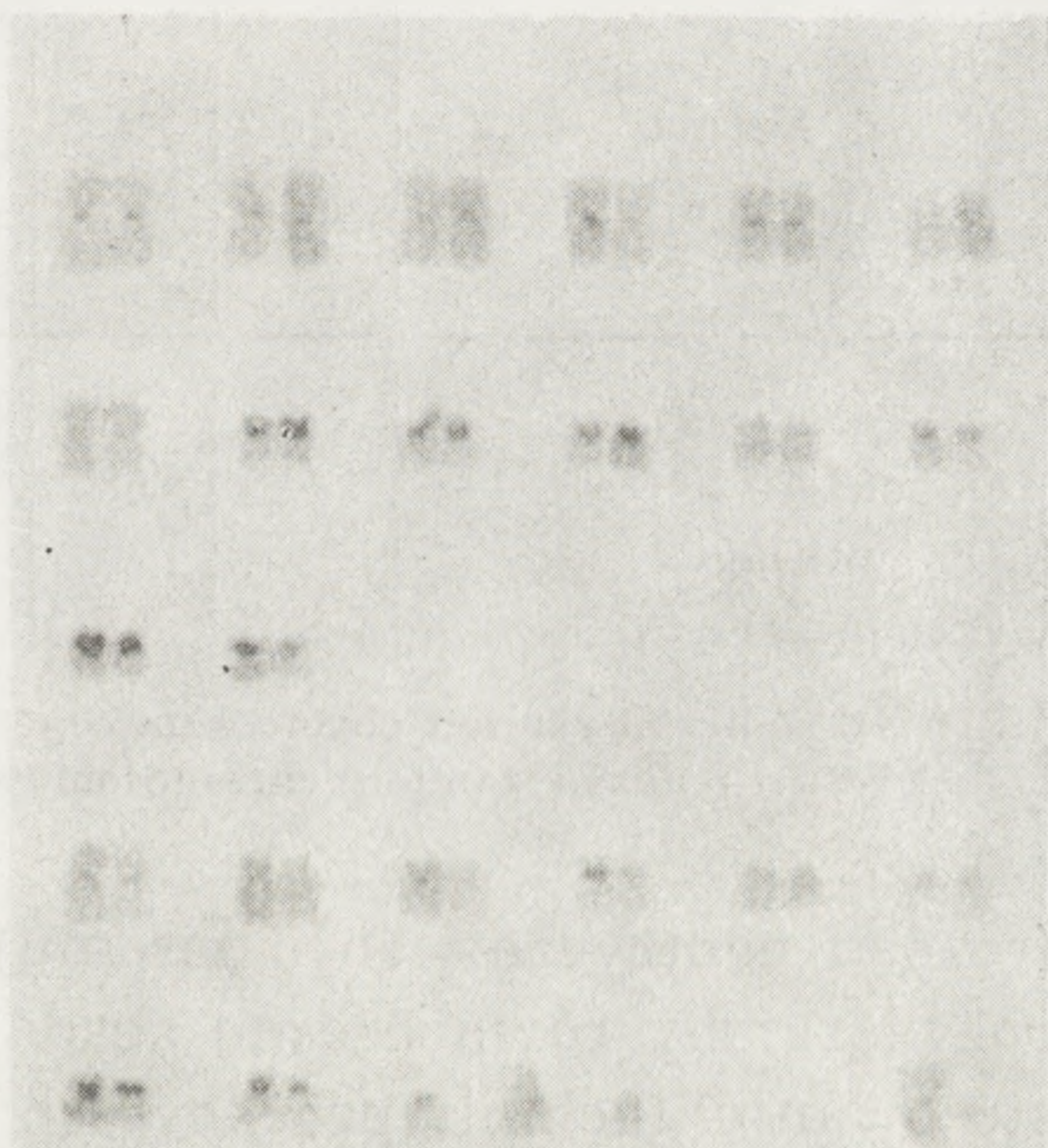
heterochromatynowych (prążki C). Zjawiska tego typu obserwuje się u niektórych gatunków z rodziny *Canidae*: lisa polarnego (*Alopex lagopus*), lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*), jenota (*Nyctereutes procyonoides*) oraz psa domowego (*Canis familiaris*). Ponadto fuzje centryczne, jak i mikrochromosomy można traktować jako mechanizmy ewolucji kariotypów.

POLIMORFIZM WYWOŁANY PRZEZ FUZJE CENTRYCZNE

Fuzje centryczne są przyczyną występowania polimorfizmu u lisa polarnego i jenota. U lisa polarnego występują trzy formy chromosomowe o diploidalnych liczbach chromosomów: 50 (układ normalny), 49 (układ heterozygotyczny ze względu na translokację), 48 (układ homozygotyczny ze względu na translokację) [4, 6, 8, 14, 15, 19–21, 25]. W kariotypie tego gatunku występują, wśród autosomów, 22 pary chromosomów meta- lub submetacentrycznych oraz 2 pary chromosomów akrocentrycznych. Chromosom X jest metacentryczny, a Y — akrocentryczny. Translokacja Robertsona obejmuje chromosomy pochodzące z dwóch par akrocentrycznych (ryc. 1–3). Badania populacyjne prowadzone w różnych państwach, na fermach zwierząt futerkowych ujawniły, że stopień rozprzestrzenienia poszczególnych form chromosomowych jest znaczny (tab. 1). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że najczęściej występowała forma heterozygotyczna ($2n = 49$). Przeprowadzone przez Świtońskiego [20, 21] badania wskazały na związek pomiędzy obserwowanym polimorfizmem a płodnością zwierząt. Analiza liczby żywo urodzonych szczeniąt w miocie (zbadano 227 miotów), we wszystkich możliwych typach kojarzeń wynikających z kombinacji liczby chromosomów wykazała, że samice o diploidalnej liczbie chromosomów 48 dawały istotnie liczniejsze mioty. Natomiast w przypadku samic o $2n = 49$ uzyskane wyniki (obniżona płodność) nie są jednoznaczne. Nie obserwowano wpływu kariotypu na płodność samców.

Podobny typ polimorfizmu chromosomowego obserwował u psa Larsen i wsp. [9, 10]. Autorzy ci dokonali 6 doświadczalnych kojarzeń pomiędzy osobnikami o kariotypach heterozygotycznych ($2n = 77$) w celu ustalenia sposobu dziedziczenia się translokacji Robertsona i ewentualnego wpływu na płodność. Autorzy nie stwierdzili żadnych zmian w płodności zwierząt użytych do kojarzeń. Natomiast w potomstwie pojawiły się trzy formy o diploidalnych liczbach chromosomów: 78, 77, 76 z częstością zgodną z I prawem Mendla. Podobne wnioski dotyczące sposobu dziedziczenia się translokacji Robertsona u lisów polarnych uzyskał Świtoński [21].

Bardziej skomplikowana sytuacja występuje u jenota. Otóż jenoty

Ryc. 1. Lis polarny, $2n = 50$, ♂ [21]Ryc. 2. Lis polarny, $2n = 49$, ♂ [21]Ryc. 3. Lis polarny, $2n = 48$, ♂ [21]Ryc. 4. Lis polarny, $2n = 49$, C-prążki, ♂ [22]

pochodzące z Japonii mają diploidalną liczbę chromosomów $2n = 42$ i $NF = 68$. Natomiast jenoty pochodzące z Finlandii [12, 13, 22] mają diploidalną liczbę chromosomów $2n = 56$ i $NF = 68$. Różnice pomiędzy tymi dwoma karyotypami są zestawione w tabeli 2. Wyjaśnienie tej sytuacji jest trudne. Można założyć, że ewolucja karyotypu przebiegała w kierunku od formy fińskiej do japońskiej (redukcja liczby chromosomów poprzez system fuzji centrycznych). Jednak kwestia chromosomu X jest niejasna. Czyżby u formy fińskiej nastąpiła fizja chromosomu

TABELA 1

Rozprzestrzenienie translokacji Robertsona u lisa polarnego (*Alopex lagopus*)

Autor, rok badania, kraj	Częstość występowania kariotypu (2n)			Liczba zbadanych osobników
	48	49	50	
Świtoński, 1979, Polska [19]	38,6	27,3	34,1	44
Mäkinen, Gustavsson, 1980, Finlandia, Szwecja [14]	9,8	50,0	40,2	82
Christensen, 1980, Dania [4]	20,0	60,0	20,0	5
Świtoński, 1981, Polska [21]	25,2	47,9	26,9	401
Mäkinen i wsp., 1981, Finlandia [15]	26,3	54,7	19,0	95

TABELA 2

Zasadnicze różnice między kariotypem jenotów (*Nyctereutes procyonoides*) pochodzących z Japonii i Finlandii (według Mäkinen i Fredga [13])

Forma	2n	NF*	NFa**	Autosomy (liczba par)		Chromosomy płci	
				meta- lub submeta- centryczne	akrocentry- czne	X	Y
<i>N. procyonoides</i> (Japonia)	42	68	66	13	7		
<i>N. procyonoides</i> (Finlandia)	56	68	68	5	22		

* NF — liczba ramion chromosomowych w kariotypie żeńskim.

** NFa — liczba ramion chromosomowych w grupie chromosomów autosomalnych.

(rozpad centryczny chromosomu)? Niewątpliwie szereg tych problemów rozwiązałoby równoczesne zbadanie kariotypów obu tych form przy zastosowaniu technik prążkowych oraz skojarzenie ich między sobą.

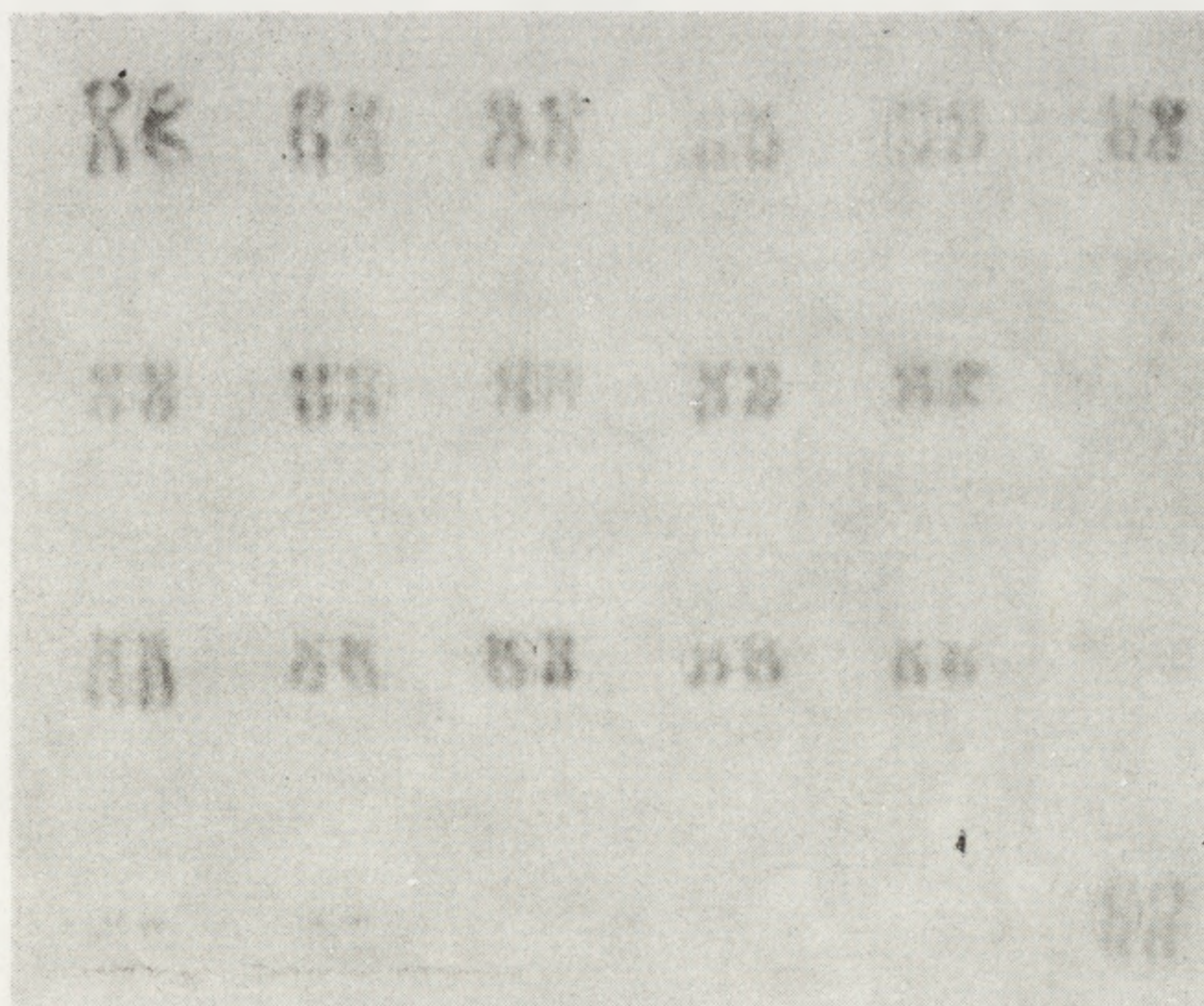
PILIMORFIZM WYWOŁANY OBECNOŚCIĄ MIKROCHROMOSOMÓW

W kariotypie lisa pospolitego wyróżnia się dwie grupy chromosomów: makrochromosomy (o typie morfologicznym meta- lub submeta-centrycznym), do których zalicza się także chromosom X, oraz mikrochromosomy wraz z chromosomem Y. O ile liczba makrochromosomów jest dla tego gatunku wielkością stałą i wynosi 32 autosomy plus odpowiednia dla płci liczba chromosomów X, to liczba mikrochromosomów jest wielkością zmienną mieszczącą się w granicach 0–7, nie uwzględniając chromosomu Y (tabela 3, ryc. 5–7). Zmienność tę obserwuje się nie

TABELA 3

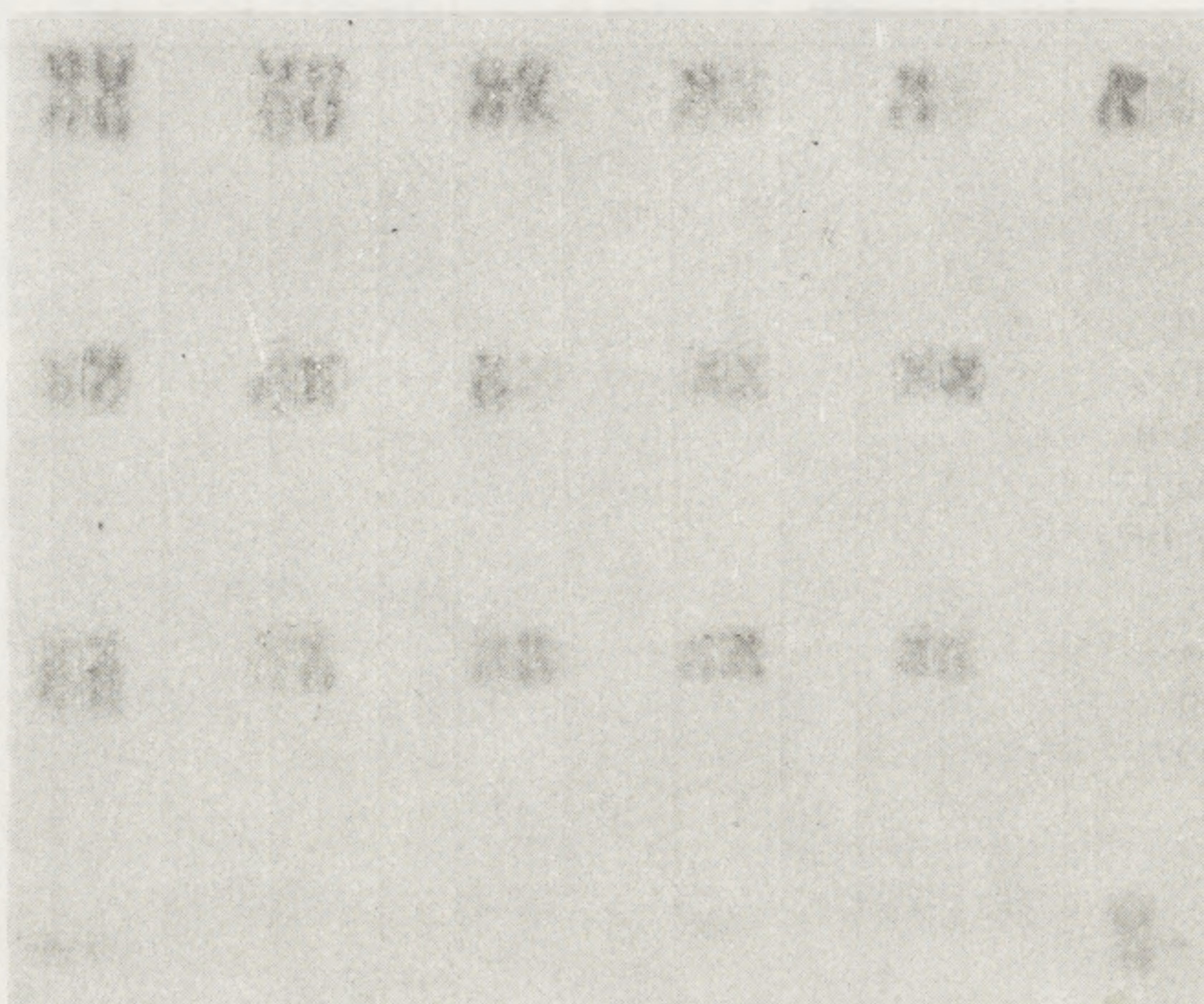
Występowanie zmiennej liczby mikrochromosomów u lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*)

Autor, rok badania, kraj	Liczba zbadanych osobników	Osobniki o kario- typie ustabilizowanym					Osobniki z mozaikami chromo- somowymi						
		liczba mikrochromo- somów					liczba mikrochromosomów						
		0	1	2	3	4	0/1	1/2	2/3	3/4	4/5	inne	
Gustavsson, 1964, Szwecja [5]	2					2							
Moore, Elder, 1965, USA [16]	1												1
Gustavsson, Sundt, 1967, Szwecja [7]	4		1	2	1								
Bucton, Cunningham, 1971, W. Brytania [3]	5			3				1				1	
Low, Benirschke, 1972, USA [11]	6		1			1			1			1	2
Renzoni, Omodeo, 1972, Włochy [18]	15		1	2	4	1	1	2	1	2			1
Belyaev i wsp., 1974, ZSRR [1]	80	1	14	14	11	6	1	7	11	5	2		8
Świtoński, 1981, Polska [22]	6		2	1		1			1	1			

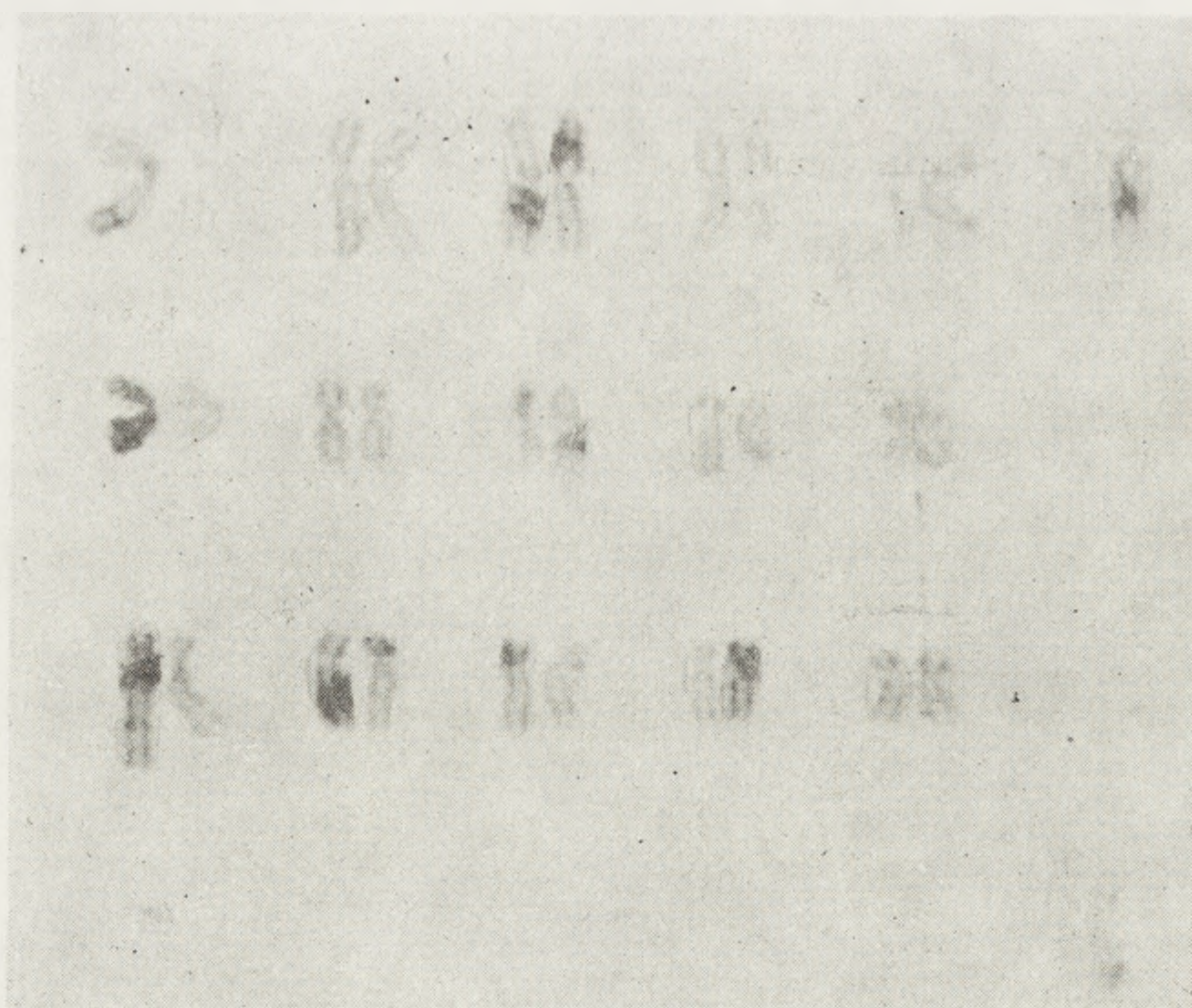
Ryc. 5. Lis pospolity, $2n=34 + 4M$, ♀ [22]

tylko pomiędzy osobnikami, ale także w obrębie jednego osobnika, czyli występuje zjawisko mozaikowości chromosomów [1, 3, 11, 16, 18, 22, 23].

Z powodu bardzo małych rozmiarów trudnym problemem jest określenie typów morfologicznych mikrochromosomów. Belyaev i wsp. [1] wyróżnili mikrochromosomy: meta-, submeta- i akrocentryczne. Ponie-



Ryc. 6. Lis pospolity, $2n=34 + 2M$, ♂ [22]



Ryc. 7. Lis pospolity, $2n=34 + 1M$, ♀ [22]

waż jednak bardzo często precyzyjne określenie morfologii mikrochromosomów jest niemożliwe, może się okazać, że dwa osobniki o identycznej liczbie mikrochromosomów zawierają całkowicie różne mikrochromosomy, a wówczas opis polimorfizmu chromosomowego, oparty jedynie na liczbie mikrochromosomów, jest niewystarczający i nieprecyzyjny.

Nie wyjaśnione pozostaje zagadnienie pochodzenia mikrochromosomów. Low i Benirschke [11], a także Ward i wsp. [24] uważają, że te struktury chromosomowe mogą powstawać w wyniku fragmentacji telomerowych końcówek makrochromosomów. Przy tym założeniu trudno jednak wytłumaczyć obecność centromeru w mikrochromosomach. Według innej hipotezy, którą omawiali m. in. Belyaev i wsp. [1], mikrochromosomy mogą być centrycznymi pozostałościami po translokacjach robertsonowskich. Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego akurat u tego gatunku centryczne struktury nie uległy zagubieniu, tak jak to się zwykle dzieje. Nie ułatwia także odpowiedzi fakt, że barwienie metodą prążków C daje wynik negatywny w przypadku kariotypu lisa pospolitego [15, 22]. Obserwacje podziału mejotycznego także nie dostarczyły jednoznacznych wniosków. Ranzoni i Omodeo [18] oraz Radjabli i wsp. [17] wykazali, że mikrochromosomy w profazie I najczęściej występują w formie uniwalentów. Nie potwierdzili tych obserwacji Ward i wsp. [24], według których mikrochromosomy koniugują ze sobą w postaci biwalentów. Należy jednak zaznaczyć, że swoje obserwacje przeprowadzili właściwie tylko na przykładzie jednego samca, u którego występowały 4 mikrochromosomy. Jeżeli przyjmie się brak koniugacji mikrochromosomów, to należy się spodziewać losowego rozchodzenia się tych struktur do gamet [17]. Potwierdzenie takiej sytuacji można by znaleźć w porównaniu kariotypów rodziców i potomstwa. Jednak jak dotąd takich obserwacji nie poczyniono.

Inną ciekawą obserwacją jest to, że liczba mikrochromosomów w kariotypach ustabilizowanych nigdy nie przekracza 4; wyższe liczby spotykane są tylko w przypadku mozaikowości chromosomów.

W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono wyraźnych różnic fenotypowych pomiędzy osobnikami różniącymi się liczbą mikrochromosomów poza informacją Belyaeva i wsp. [2], która sugeruje związek między kariotypem a stopniem udomowienia zwierząt.

Omówione cechy charakterystyczne mikrochromosomów: mała wielkość, morfologia, zmienność liczby pomiędzy osobnikami, jak i w obrębie jednego osobnika, zachowanie się w mejozie i ewentualny ich wpływ na zachowanie się zwierząt pozwalają traktować te struktury jako chromosomy B.

ZMIENNOŚĆ WIELKOŚCI ODCINKÓW HETEROCHROMATYNOWYCH
(PRAŻKI C)

Zastosowanie metody prążków C w odniesieniu do kariotypu lisa polarnego ujawniło, że w kariotypie tego gatunku 10 par chromosomów posiada duże odcinki heterochromatynowe obejmujące całe ramiona krótkie (ryc. 4). Analiza tych prążków przez Mäkinen i Gustavssona [14] oraz Mäkinen i wsp. [15] doprowadziła do wniosku, że w jednej z takich par występuje dimorfizm w wielkości odcinka heterochromatynowego. Pierwsze badania [14] ujawniły wśród 82 osobników 7 lisów, u których w danej parze jeden z chromosomów był pozbawiony ramion heterochromatynowych. W dalszych badaniach [15] taka sytuacja wystąpiła u 4 osobników spośród 95 zbadanych. Nie znaleziono jednak dotychczas osobnika, u którego wystąpiłby brak ramion heterochromatynowych w obu chromosomach (układ homozygotyczny).

Ponadto ciekawy przypadek zaobserwowali autorzy [15] u jednego samca. Mianowicie w kariotypie tego osobnika występował duży nadliczbowy chromosom całkowicie heterochromatynowy (pozytywny prążek C). Badania potomstwa tego samca nie ujawniły obecności w kariotypach tego chromosomu, czyli nie był on przekazywany na następne pokolenie.

Podobny przypadek wystąpił u dwóch jenotów [13], z tym że wówczas u badanych osobników wystąpiły dwie linie komórkowe, jedna z dodatkowym heterochromatynowym chromosomem, a druga o normalnym kariotypie.

Z uwagi na jednostkowe obserwacje trudno powiedzieć, czy w tych przypadkach mamy do czynienia z polimorfizmem.

Tak więc zjawiska polimorfizmu chromosomowego w rodzinie *Canidae* są różnorodne, ale jednocześnie dalekie od całkowitego wyjaśnienia ich pochodzenia i roli.

LITERATURA

- [1] BELYAEV D. K., VOLOBUEV V. T., RADJABLI S. J., TRUT L. N., Polymorphism and mosaicism for additional chromosomes in silver foxes, *Genetics (USSR)*, **10**: 58-67, 1974.
- [2] BELYAEV D. K., VOLOBUEV V. T., RADJABLI S. J., TRUT L. N., Investigations of the nature and the role of additional chromosomes in silver fox. II. Additional chromosomes and breeding of animals for behaviour, *Genetics (USSR)*, **10**: 83-91, 1974.
- [3] BUCTION K. E., CUNNINGHAM C., Variations of chromosome number in the red fox (*Vulpes vulpes*), *Chromosoma*, **33**: 268-272, 1971.

- [4] CHRISTENSEN K., informacja osobista, 1980.
- [5] GUSTAVSSON I., Karyotype of the fox, *Nature*, **201**: 950–951, 1964.
- [6] GUSTAVSSON I., SUNDT C. O., Chromosome complex of the family *Canidae*, *Hereditas*, **54**: 249–254, 1965.
- [7] GUSTAVSSON I., SUNDT C. O., Chromosome elimination in the evolution of the silver fox, *J. Heredity*, **58**: 75–78, 1967.
- [8] HSU T. C., BENIRSCHKE K., *An Atlas of Mammalian Chromosomes*, vol. 7, folio 333, 1973.
- [9] LARSEN R. E., DIAS E., CERVENKA J., Centric fusion of autosomal chromosomes in a bitch and offspring, *Am. J. Vet. Res.*, **39**: 861–864, 1978.
- [10] LARSEN R. E., DIAS E., FLORES G., SELDEN J. R., Breeding studies reveal segregation of a canine Robertsonian translocation along Mendelian proportions, *Cytogenet. Cell Genet.*, **24**: 95–101, 1979.
- [11] LOW R. J., BENIRSCHKE K., Microchromosomes in the American red fox (*Vulpes fulva*), *Cytologia*, **37**: 1–11, 1972.
- [12] MÄKINEN A., Exceptional karyotype in a raccoon dog, *Hereditas*, **78**: 150–152, 1974.
- [13] MÄKINEN A., FREDGA K., Banding analyses of the somatic chromosomes of raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*), from Finland, *Proceedings of 4th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*, Uppsala (Sweden), 420–430, 1980.
- [14] MÄKINEN A., GUSTAVSSON I., Centric fusion polymorphism and size heteromorphism in the karyotype of the blue fox (*Alopex lagopus*), *Proceedings of 4th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*, Uppsala (Sweden), 398–405, 1980.
- [15] MÄKINEN A., LOHI O., JUVONEN M., Supernumerary chromosome in the chromosomally polymorphic blue fox (*Alopex lagopus*), *Hereditas*, **94**: 277–279, 1981.
- [16] MOORE W., ELDER R. L., Chromosomes of the fox, *J. Heredity*, **56**: 142–143, 1965.
- [17] RADJABLI S. J., ISAENKO A. A., VOLOBUEV V. T., Investigation of the nature and the role of additional chromosomes in silver fox. IV. B-chromosomes behaviour in meiosis, *Genetics (USSR)*, **14**: 438–443, 1978.
- [18] RENZONI A., OMODEO P., Polymorphic chromosome system in the fox, *Caryologia*, **25**: 173–187, 1972.
- [19] ŚWITOŃSKI M., Translokacja Robertsona u lisów polarnych (*Alopex lagopus*) z fermy Czerniejewo, *Materiały VII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Genetycznego*, Poznań, 113, 1979.
- [20] ŚWITOŃSKI M., Robertsonian translocation in arctic fox (*Alopex lagopus*) and its effect on fertility, *Proceedings of 4th European Colloquium on Cytogenetics in Domestic Animals*, Uppsala (Sweden), 45–49, 1980.
- [21] ŚWITOŃSKI M., Translokacja Robertsona u lisów polarnych (*Alopex lagopus*) i jej wpływ na płodność, praca doktorska, Akademia Rolnicza, Poznań 1981.
- [22] ŚWITOŃSKI M., dane niepublikowane, 1981.
- [23] VOLOBUEV V. T., RADJABLI S. J., Investigation of the nature and the role of additional chromosomes in different tissues and types of preparations and at different seasons, *Genetics (USSR)*, **10**: 77–82, 1974.
- [24] WARD E. J., LIN C. C., JOHNSTON D. H., Meiotic study on supernumerary microchromosomes of red fox (*Vulpes vulpes*), *Can. J. Genet. Cytol.*, **15**: 825–830, 1973.

- [25] WURSTER D. H., BENIRSCHKE K., Comparative cytogenetic studies in the order Carnivora, *Chromosoma*, 24: 336-382, 1968.

Otrzymano: 16 września 1981.

Przyjęto: 30 października 1981.

Adres autora: ul. Jawornicka 15B/7, 60-161 Poznań.

KOMPUTEROWA ANALIZA I KLASYFIKACJA CHROMOSOMÓW CZŁOWIEKA *

COMPUTER ANALYSIS AND CLASSIFICATION OF HUMAN CHROMOSOMES

Józef JAGIELSKI, Olga HAUS i Leszek NOGA

Zakład Patofizjologii AM we Wrocławiu

Streszczenie. Celem artykułu jest przedstawienie przeglądu matematycznych metod i systemów komputerowych stosowanych do analizy i klasyfikacji chromosomów człowieka oraz uzyskiwanych wyników. Początkowo automatyczna klasyfikacja chromosomów oparta była na analizie długości ramion, indeksu centromeru oraz konturu chromosomu. Po wprowadzeniu technik prążkowych klasyfikacja chromosomów polega głównie na badaniu profili densytometrycznych przekształconych na postać numeryczną. Metoda ta znacznie poprawiła wyniki klasyfikacji. Do klasyfikacji chromosomów najczęściej stosuje się model dyskryminacyjny Bayesa. W pracy przedstawiono również wyniki badań własnych.

Summary. The main goal of this paper is a review of mathematical methods and computer systems used to human chromosome analysis and classification and the results obtained by them. At the beginning automatic chromosome classification was based on the analysis of arm length, centromeric index and the outline of chromosome. After introducing banding techniques chromosome classification is performed by analysis of densitometric profiles transformed into numerical form with usual application of Bayes discriminant model. This new approach improved considerably the results of classification. In this paper our own results are also presented.

WSTĘP

Podstawy klasyfikacji chromosomów człowieka ustalone zostały w 1960 r. na Konferencji Cytogenetycznej w Denver.

Klasyfikacja ta opierała się na określeniu długości ramion chromosomu i położenia centromeru, a więc na cechach wymiernych, uzyska-

* Referat wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Cytogenetycznej, Łódź, 17-18 września 1981 r.

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 06.1.

nych z badań rozkładów statystycznych. Chromosomy zaliczono do siedmiu grup (A–G), w obrębie których wyodrębniono 22 pary chromosomów autosomalnych oraz dwa chromosomy płciowe X i Y. Duże podobieństwo chromosomów zaliczanych do tej samej grupy było przyczyną trudności w jednoznacznym zaszeregowaniu ich do 24 klas (odpowiadających parom chromosomów). Nowe techniki barwienia, uwidoczniające prążkową strukturę chromosomów pozwoliły na lepsze rozpoznawanie poszczególnych klas.

Prążkową strukturę chromosomów uwidocznili po raz pierwszy pod koniec lat sześćdziesiątych Caspersson i wsp. [10, 11] w mikroskopie fluorescencyjnym i nazwali je prążkami Q [13]. W 1971 r. Summer i wsp. [76], uzyskali prążkowanie podobne widoczne w mikroskopie świetlnym (prążki G). W tym samym roku prążki o analogicznym rozkładzie otrzymali Dutrillaux i wsp. [18], Finaz i de Grouchy [20] oraz Seabright [71]. Metoda otrzymywania prążków G rozpowszechniła się w wielu laboratoriach cytogenetycznych świata [31, 56, 78]. Równocześnie Dutrillaux i Lejeune [19] uzyskali prążki R, odpowiadające, z nielicznymi wyjątkami, niewybarwionym miejscom w prążkowaniu G. Metoda ta pozwalała na dokładniejsze określenie końcowych odcinków ramion chromosomów oraz położenia centromeru [48].

Odmianą prążków R są prążki T, opisane po raz pierwszy przez Dutrillaux w 1973 r. [16].

Na początku lat siedemdziesiątych otrzymano intensywne wybarwienie heterochromatyny konstytutywnej, czyli tzw. prążki C [2, 7, 17, 24, 81]. Technika wybarwiania została podana w 1970 r. przez Pardue i Galla [68]. Do badań u ludzi adaptowali ją Arrighi i Hsu [2] oraz Yunis i wsp. [81]. Freeman i wsp. [22] uwidaczniali prążkową strukturę chromosomów za pomocą znakowanych fluoresceiną przeciwciał skierowanych przeciwko określonym nukleozydom łańcucha DNA.

Poznanie prążkowej struktury chromosomów uściśliło klasyfikację opartą na pomiarze długości ramion i położeniu centromeru. W 1971 r. na konferencji w Paryżu [69] ustalono wzorce prążków G chromosomów. W 1975 r. Seabright i wsp. na podstawie pomiaru wielkości i położenia prążków G w chromosomach pochodzących z 15 metafaz o różnym stopniu kontrakcji utworzyli ideogramy chromosomów, będące modyfikacją wzorców paryskich [72]. W 1966 r. Mendelsohn i wsp. [57] badali także fotometrycznie zawartość DNA w chromosomach.

Zastosowanie nowych technik barwienia ułatwia identyfikację chromosomów. Mimo to o ich uporządkowaniu w znacznej mierze decyduje subiektywna ocena badacza analizującego daną płytkę metafazalną.

Badania ludzkich chromosomów można podzielić na następujące dyscypliny:

- cytogenetykę kliniczną badającą związki między aberracjami chromosomów a patologicznymi odchyleniami (np. badania prenatalne, diagnozowanie zespołów klinicznych),
- cytogenetykę populacyjną badającą chromosomy i ich aberracje w populacji,
- cytogenetykę środowiskową badającą wpływ chemicznych i fizycznych czynników na aberracje chromosomów,
- cytogenetykę rodzinną badającą rodzinne występowanie zaburzeń przekazywania informacji genetycznej.

Jedną z pobudek automatyzowania badań chromosomów jest stale wzrastająca liczba analiz cytogenetycznych. Lubs [50] zakłada, że w przyszłości około 10% ludzi każdej generacji powinno być przebadanych genetycznie. Celowa zatem staje się budowa systemów wspomagających lub zastępujących czasochłonne czynności całego sztabu ludzi pracujących w tej dziedzinie. Zobjektywizowanie badań może być pomocne cytogenetykom przy ustalaniu diagnozy. Jednocześnie prowadzi to do tworzenia banków genetycznych, na podstawie których można charakteryzować określone populacje ludzkie pod względem genetycznym.

Analizy matematyczno-komputerowe chromosomów człowieka wychodzą z założenia istnienia rozkładów normalnych mierzalnych cech w obrazach chromosomów i są uwarunkowane następującymi czynnościami:

- uzyskiwaniem czytelnych obrazów chromosomów,
- wyszukiwaniem metafaz nadających się do analizy,
- odwzorowaniem i matematycznym opisem obrazu chromosomu,
- wyborem modelu matematycznego do analizy i klasyfikacji,
- wykrywaniem aberracji liczbowych i strukturalnych,
- sposobem przedstawiania wyników komputerowej analizy i klasyfikacji.

Najbardziej obiecująca jest analiza wielokomórkowa, która obecnie przysparza wiele trudności technicznych [5, 35].

Pierwsze próby analizy komputerowej chromosomów podjął Ledley w latach 1962–1964 [47]. Pierwsze pełne wzorce matematyczne chromosomów oparte na pomiarach długości ramion podali Bender i Kastenbaum w 1969 r. [4]. Obecnie wiele ośrodków pracuje nad rozkładami statystycznymi cech mierzalnych w obrazie chromosomu [33, 39, 40], wypracowuje modele matematyczne klasyfikacji chromosomów i poszukuje komputerowych rozwiązań technicznych nadających się do stosowania w badaniach genetycznych [14, 25, 31].

Nasze badania we Wrocławiu rozpoczęliśmy na początku lat siedemdziesiątych opracowaniem matematycznego wzorca chromosomów oparte na pomiarze długości ramion oraz zastosowaniem modelu teorio-decyzyjnego Bayesa do klasyfikacji komputerowej [3, 44].

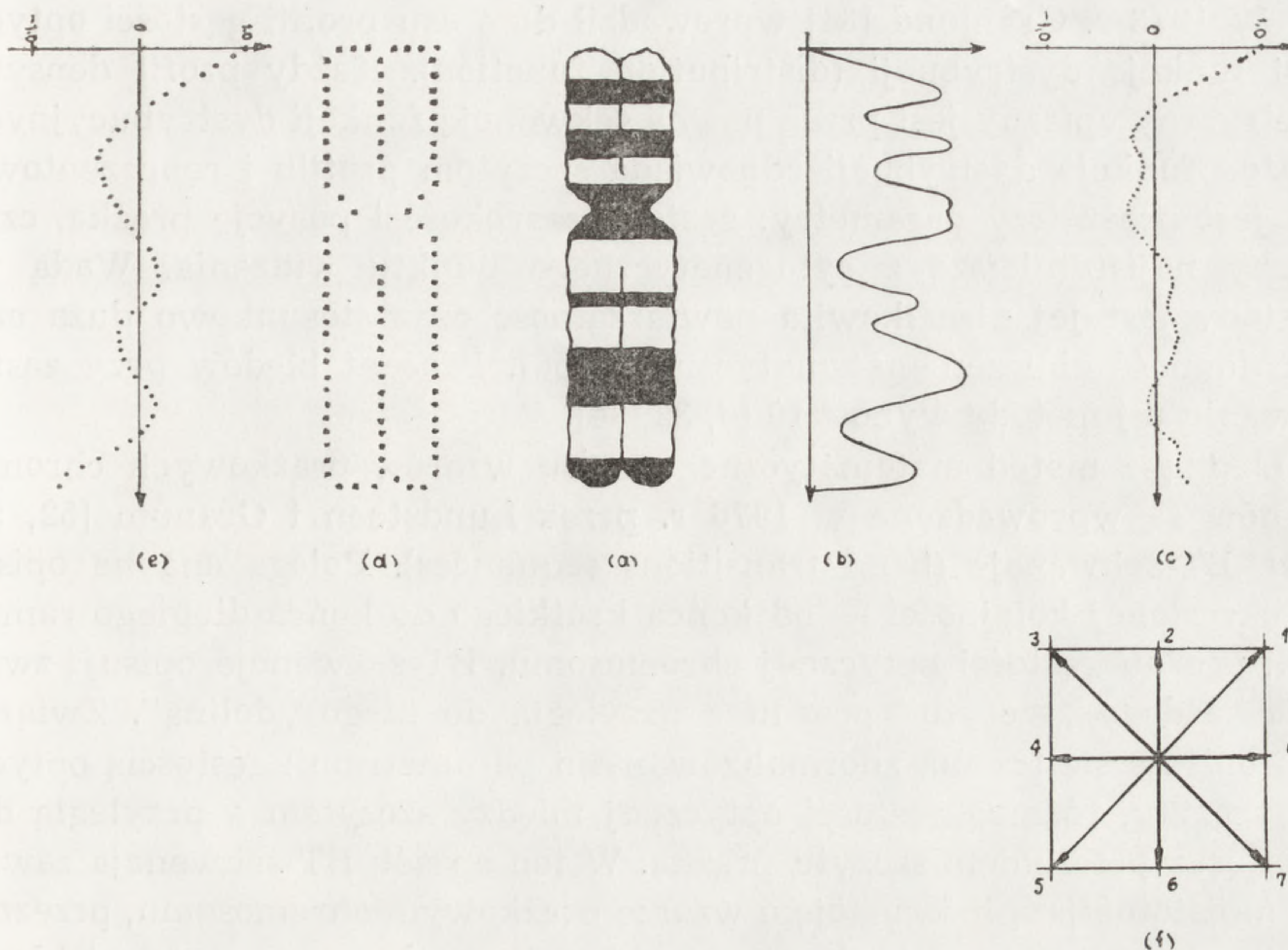
AUTOMATYZACJA ANALIZY I KLASYFIKACJI CHROMOSOMÓW

Zastosowanie metod matematycznych do analizy chromosomów wybarwionych barwnikiem Giemsy zostało zapoczątkowane przez Ledleya w 1964 r. [47]. Do opisu konturu chromosomów autor zastosował analizę składniową, przyjmując pięć wzorcowych krzywych, oznaczonych literami A, B, C, D i E. Krzywe te pozwalały na lokalizację ramion i centromeru chromosomu. Metoda ta była następnie stosowana przez Fu [23], który opisywał chromosomy łańcuchami liter, a następnie klasyfikował je, stosując analizę stochastyczną. Gallus i Neurath w 1970 r. [27] zastosowali analizę konturu chromosomów opartą na pomiarach zmiany kąta w zadanych odstępach konturu chromosomu. Metoda ta pozwalała w łatwy sposób zlokalizować ramiona i centromer [26]. Metody związane z analizą konturu chromosomu wykorzystywały do lokalizacji ramion i centromeru największe załamania krzywizny konturu na końcach ramion i charakterystyczne zachowanie się krzywizny konturu w okolicy centromeru [75]. Założenia matematyczne do analizy konturów obrazów występujących w biologii i medycynie, podali w 1974 r. Young i wsp. [79]. Mori i wsp. [59] wykazali, że analiza krzywizny konturu umożliwia dokładny opis obrazu w przypadku, gdy największa ilość informacji istotnej do rozpoznania związana jest z konturem analizowanego obrazu. Z konturów chromosomów wyprowadzono uproszczone formy szkieletowe dla tworzenia wzorców i klasyfikacji.

Druga grupa metod, stosowanych do analizy chromosomów, polega na określeniu położenia długiej osi chromosomu i badaniu gęstości optycznej jego obrazu. Metody te zostały opisane w pracach Aiello i wsp. [1], Neuratha i wsp. [60], Gallusa, Montanaro i Maccacaro [25], Onoe i wsp. [66], O'Handleya i wsp. [41] oraz w pracy Rutowitza i wsp. [70]. Opis długiej osi chromosomu przeprowadza się na podstawie analizy gęstości optycznej lub wpisywania chromosomu w prostokąt, którego dłuższy bok określa kierunek jego osi. Określenie długiej osi napotyka trudności w tych chromosomach, w których wymiar podłużny jest zbliżony do wymiaru poprzecznego, np. w grupie F i G [25].

Wprowadzenie technik laboratoryjnych uwidaczniających prążki w chromosomach dostarczyło nowej cechy pomiaru wykorzystywanej do analizy i klasyfikacji.

Caspersson i wsp. [9, 12] dokonywali fotometrycznego pomiaru stopnia zaczernienia wzdłuż ramion chromosomów i zastosowali analizę Fouriera profili gęstości. Od tego czasu wielu badaczy stosuje analizę profili densytometrycznych do klasyfikacji lub porównania wzorców prążkowych chromosomów [6, 34, 54].



Ryc. 1. Odwzorowanie chromosomu; *a* — schemat chromosomu z naniesionymi prążkami G, *b* — densytometryczny profil prążków, *c* — funkcja autokorelacji prążków, *d* — kontur chromosomu, *e* — funkcja autokorelacji konturu, *f* — siatka Freemana do kodowania (z badań własnych)

Odwzorowanie chromosomu w postaci konturu, profilu prążków i funkcji autokorelacji konturu i prążków przedstawia ryc. 1.

Zestaw cech stosowanych obecnie do identyfikacji chromosomów wyprążkowanych podają między innymi Bruschi i wsp. [8];

I. Cechy ogólne: długość, pole, indeks centromeru, liczba prążków chromosomu.

II. Cechy lokalne: gęstość optyczna, szerokość i pozycja pojedynczych prążków.

Zastosowana przez Casperssona i wsp. [9, 12] metoda opisu profili densytometrycznych za pomocą współczynników Fouriera jest dobrze zdefiniowana matematycznie, powtarzalna i szybka, natomiast wadą jej jest nadmiernie duża czułość na lokalne zmiany wzorów prążkowych; zmiana pojedynczego szczytu prążka może spowodować zmianę wszystkich współczynników [32]. Poza tym współczynniki Fouriera opisują głównie cechy ogólne (global features). Procent błędów w klasyfikacji chromosomów za pomocą tej metody wynosi 10–25 [14, 32, 56, 58].

W 1973 r. Granlund [34] wprowadził do opisu profili gęstości optycznej funkcję dystrybucji (distribution function). Każdy profil densytometryczny opisany jest przez pewną sekwencję funkcji dystrybucyjnych. Każda funkcja dystrybucji odpowiada szczytom profilu i reprezentowana jest przez trzy parametry: gęstość, szerokość i pozycję prążka, czyli cechy najistotniejsze z cytogenetycznego punktu widzenia. Wadą tej metody jest jej niecałkowita powtarzalność oraz stosunkowo duża czasochłonność obliczeń matematycznych [56]. Procent błędów przy zastosowaniu tej metody wynosi 10 [6, 32, 34].

Jedną z metod matematycznego opisu wzorów prążkowych chromosomów są wprowadzone w 1976 r. przez Lundsteen i Granum [52, 53] tzw. BT-sekwencje (band transitions sequences). Polega ona na opisie, w określonej kolejności — od końca krótkiego do końca długiego ramienia, profilu gęstości optycznej chromosomu. BT-sekwencje opisują związek każdego „szczytu” profilu z przyległą do niego „doliną”. Związek ten opisuje się trzema znormalizowanymi parametrami: gęstością optyczną szczytu, różnicą gęstości optycznej między szczytem a przyległą doliną oraz położeniem szczytu prążka. W ten sposób BT-sekwencja zawiera najistotniejszą informację o wzorze prążkowym chromosomu, przeznaczoną do wprowadzenia do programu systemu do automatycznej klasyfikacji chromosomów.

Procent błędów w klasyfikacji chromosomów za pomocą tej metody wynosi 0,7, podczas gdy przy stosowaniu innych metod co najmniej 10 [51]. Wspomniany tu odsetek błędów, jak i procenty wymienione przy opisie współczynników Fouriera i funkcji dystrybucji dotyczą klasyfikacji chromosomów w obrębie pełnych metafaz określanej w piśmiennictwie mianem „karyotyping” w odróżnieniu od określenia „classification”, stosowanego do chromosomów analizowanych pojedynczo. Wielu autorów podkreśla fakt, że również w klasyfikacji wizualnej przez cytogenetyków o wiele mniejszy (około dziesięciokrotnie) procent błędów otrzymywany jest w kariotypowaniu niż w klasyfikacji izolowanych chromosomów, nawet gdy metafazy są niekompletne [54, 55]. Powodem tego jest możliwość zastosowania w kariotypowaniu znajomości składu chromosomów (22 autosomy i 2 chromosomy płciowe) oraz możliwość porównywania pojedynczych chromosomów z danej metafazy ze sobą [53–55]. Autorzy ci sugerują, że na wymienionych zasadach powinny opierać się również systemy do automatycznej klasyfikacji chromosomów [38, 51]. Inni autorzy podkreślają znaczenie jakości prążkowania klasyfikowanych metafaz [55, 56]. Prążkowanie zmieniające się od metafazy do metafazy jest trudniejsze do automatycznego sklasyfikowania.

W komputerowej analizie i klasyfikacji chromosomów do chwili obecnej stosuje się matematyczny model decyzyjny Bayesa w różnych odmianach, w tym wykorzystujący przedziały ufności cech mierzalnych

z chromosomu oraz model dyskryminacyjny Bayesa [38, 40, 45, 49]. Klasyfikacja chromosomów na podstawie twierdzenia Bayesa wymaga ich porównania z wielkościami wzorcowymi.

Pierwsze, niekompletne matematyczne wzorce chromosomów opisali Penrose w 1964 r. oraz Turpin i Lejeune w 1965 r. [77], następnie Bender i Kastenbaum w 1969 r. [4] oraz Neurath i wsp. w 1972 r. [63, 64]. Wzorce Bendera i Kastenbauma oparte były na pomiarach długości ramion chromosomów znormalizowanych do długości chromosomów autosomalnych odpowiedniej płytki metafazowej. Autorzy ci, porównując wzorce kariotypów męskiego i żeńskiego, stwierdzili występowanie różnic między chromosomem X w tych kariotypach. Znalazło to potwierdzenie w analizie statystycznej wzorców Bendera, przeprowadzonej w naszej pracowni [74].

Wzorce opisane przez Neuratha i wsp. [63, 64] są oparte na pomiarze długości ramion i pola powierzchni, znormalizowanych do długości całkowitej i pola powierzchni haploidalnego żeńskiego garnituru chromosomów. Pomiar długości ramion chromosomów zostały przeprowadzone za pomocą pióra świetlnego, przez nanoszenie położenia centromeru, końców ramion oraz punktów dodatkowych w obrębie ramion, w przypadku ich zagięć. Z wartości pomierzonych autorzy obliczyli całkowitą długość chromosomu, pole powierzchni i indeks centromeru, w stosunku do długości i do pola powierzchni ramion.

Wzorce oparte na pomiarach długości ramion chromosomu i położenia centromeru przedstawiane były przez wielu autorów [25, 41], a w naszej pracowni przez Skawińskiego w 1976 r. [74]. Stosowano również próby wyprowadzenia wzorców do klasyfikacji opartych na odwzorowaniu konturów chromosomów w postaci funkcji [15].

Wzorce do klasyfikacji chromosomów na podstawie pomiaru prążków zostały opisane przez Granlunda i wsp. [32, 34] w postaci rozkładów krzywych Gaussa.

Bruschi i wsp. [8] zastosowali wzorce komputerowe prążków G chromosomów przepisane na postać numeryczną z wizualnych wzorców paryskich.

Analiza statystyczna liczby i położenia prążków w chromosomach wskazuje na duże zmienności między wzorcami paryskimi a wzorcem występującym w preparatyce [73]. Dlatego w naszych badaniach stosowaliśmy wzorce numeryczne uproszczone do postaci 0-1 (zero-jedynkowej) i wyprowadzone z badań rozkładów statystycznych zachowania się prążków G [42].

Spostrzeżenia o zmienności wzorców podaje Lundsteen [51], zwracając uwagę na konieczność budowy dla potrzeb komputerowej klasyfikacji chromosomów wzorców dynamicznych, kontrolowanych współczynnikami kontrakcji chromosomów.

SYSTEMY KOMPUTEROWE DO ANALIZY
I KLASYFIKACJI CHROMOSOMÓW

Po raz pierwszy do komputerowej analizy chromosomów zastosowany został w 1964 r. przez Ledleya konwerter o nazwie FIDAC [47]. Umożliwiał on odwzorowanie chromosomów w siedmiostopniowej skali jasności. FIDAC wykorzystany został do badań cytogenetycznych również przez Rutowitza i wsp. w 1970 r. [70]. Zastosowanie konwersji automatycznej umożliwiło wykonywanie 1000 badań cytogenetycznych w ciągu tygodnia. Onoe i wsp. [66] używali do konwersji obrazu chromosomów urządzenia mechanicznego, umożliwiającego uzyskanie 128 stopni zaczerńnienia. Dane te były następnie analizowane przez minikomputer. Natomiast Mendelsohn i wsp. [57] zastosowali do badań cytogenetycznych urządzenie o nazwie CYDAC. Pozwalało ono już na konwersję obrazu z mikroskopu w 256-stopniowej skali zaczerńnienia. Neurath i wsp. [60] zastosowali kamerę telewizyjną połączoną z konwerterem analogowo-kodowym odwzorowującym obraz w 14-stopniowej skali zaczerńnienia. Gilbert [30] mierzył za pomocą cyrkla długości ramion chromosomów, a uzyskane dane wprowadzał do maszyny cyfrowej i dokonywał klasyfikacji, uzyskując w 75% wyniki zgodne z uporządkowaniem chromosomów przez cytogenetyka. Caspersson i wsp. [12] analizowali stopień zaczerńnienia wzdłuż ramion chromosomów, a wynik pomiarów fotometrycznych nanosili na karty perforowane. Geldermann i wsp. [28] używali półautomatycznego konwertera PF-10 Pencil Follower do pomiaru odległości dziesięciu punktów w obrębie ramion chromosomów. Dane z konwersji na taśmie perforowanej były następnie wykorzystywane do automatycznej klasyfikacji chromosomów. W 1969 r. Neurath i wsp. [61, 62] zastosowali system do analizy i klasyfikacji chromosomów o nazwie PIQUANT, który odwzorowuje obraz w 64-stopniowej skali zaczerńnienia. System ten umożliwia wprowadzenie korekty za pomocą pióra świetlnego, w przypadku nieprawidłowej lokalizacji ramion lub centromeru spowodowanej zagięciem ramion chromosomu. Czas analizy pojedynczej płytki metafazowej wynosi około 15 minut, a dodatkowe korekty za pomocą pióra świetlnego powodują wydłużenie czasu o około 10 minut. Analizator obrazu o nazwie PIQUANT jest połączony z komputerem IBM 360/30 i został zastosowany przez Neuratha do współpracy cytogenetyka z komputerem. Marimuthu i wsp. [56] również analizowali i klasyfikowali chromosomy w systemie komputerowym PIQUANT, biorąc pod uwagę nie tylko długość ramion lub położenie centromeru, ale także wzór prążkowy chromosomu. Obraz chromosomów uzyskiwali z filmu poprzez kamerę telewizyjną. Obraz ten był następnie przesyłany do maszyny cyfrowej IBM 360/30. Obraz lub jego fragmenty wyświetlane były na monitorze.

W systemie ALMS, zastosowanym po raz pierwszy przez O'Handleya w 1973 r. [41], wykorzystuje się obrazy bezpośrednio z mikroskopu optycznego. Dane przetworzonego obrazu zostają przekazane poprzez minikomputer IBM-1130 na magnetyczne nośniki informacji oraz do komputera IBM 360/44 w celu dalszego przetwarzania. Obraz reprezentowany jest w pamięci maszyny w 256-stopniowej skali zaczerwienia. W systemie tym oprogramowanie umożliwia też automatyczną kontrolę położenia stolika mikroskopu, oświetlenia obrazu i przesyłania informacji.

System komputerowy, opracowany na Uniwersytecie w Pittsburgu [70], realizuje zadania w zakresie: wyszukiwania metafaz w preparacie, dokonywania automatycznej konwersji obrazu, analizowania metafaz i opracowania kariotypów, oceny wyników badań cytogenetycznych w aspekcie badań populacyjnych. W systemie tym wykorzystany został automatyczny mikroskop świetlny wyszukujący metafazy za pomocą optycznego układu z laserem i poddający je automatycznej inwersji. Układy mikroskopu sterowane są w zakresie automatycznego wyszukiwania metafaz, regulacji położenia stolika mikroskopu i regulacji ostrości za pomocą minikomputera PDP-7. Minikomputer wykorzystuje się również do wczytywania informacji o pacjencie, przesyłania danych z konwersji do dużego komputera PDP-10 z pamięcią 32 768 słów, wyświetlania wyników analizy na monitorze i do współdziałania z operatorem. System pozwala na analizę 200 metafaz dziennie.

W latach siedemdziesiątych zastosowano zestaw aparaturowy do automatycznej analizy obrazów, w tym także do analizy obrazów chromosomów, pod nazwą QUANTIMET [29]. Najlepiej poznanym aparatem z tej serii, stosowanym do badań cytogenetycznych, jest QUANTIMET 720. Aparat taki znajduje się między innymi w Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie. Dane wejściowe do niego mogą być dostarczone z mikroskopu optycznego i elektronowego, epidiaskopu, taśmy filmowej i przeźroczy. Moduły urządzenia umożliwiają pomiar liczbowy powierzchni, długości obwodu, średniego odcinka liniowego i współczynnika formy i gęstości optycznej chromosomów w polu widzenia. Możliwe jest również wyszukiwanie metafaz i kontrola ostrości obrazu w mikroskopie świetlnym QUANTIMET może współdziałać z kalkulatorem w zakresie oceny statystycznej wyników pomiaru oraz z komputerem PDP-11, do którego mogą być przesyłane wyniki pomiarów gęstości optycznej w 64-stopniowej skali. Dodatkowe wyposażenie umożliwia korektę oświetlenia obrazu i interakcję operatora. W Katedrze Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Leuven [67] opracowano system do automatycznej klasyfikacji chromosomów, w którym wejście stanowi kamera telewizyjna połączona z mikroskopem lub z analizatorem negatywów. Obraz w 128-stopniowej skali zaczerwienia przetwarzany jest przez komputer

o pamięci operacyjnej równej 64 k bitów. Wyniki uzyskuje się w postaci graficznej z możliwością wprowadzenia poprawek. W skład systemu wchodzi układ do automatycznego wyszukiwania metafaz. System pozwala na pomiar następujących parametrów: długości, pola powierzchni, obwodu, położenia centromeru i gęstości optycznej chromosomów. Rozkład sumarycznej gęstości wzdłuż osi symetrii chromosomów aproksymuje się szeregami funkcyjnymi, a następnie przeprowadza się klasyfikację metodą korelacji i minimalizacji prawdopodobieństwa błędu przy współudziale z operatorem. Czas analizy jednej metafazy około 30 minut. Poprawność klasyfikacji waha się zależnie od metody w granicach 33–79,5%.

W latach 1973–1975 na Uniwersytecie w Kopenhadze uruchomiono półautomatyczny system JPL [36]. Oparty jest on na interakcji operatora i komputera, przy czym rola operatora w zależności od wykonywanych procedur może ulegać znacznej redukcji. Za pomocą systemu JPL można wykonywać 660 analiz cytogenetycznych rocznie, czyli około dwa razy więcej niż przy analizie tradycyjnej. W roku 1976 Castleman i wsp. [14] opracowali system do automatycznej analizy i klasyfikacji, obejmujący półautomatyczną część laboratoryjną uzyskiwania płytek metafazowych na szkiełkach podstawowych i automatyczną analizę i klasyfikację chromosomów. Przy użyciu tego systemu można przeprowadzić dziennie 576 analiz cytogenetycznych.

System do analizy chromosomów metodą falową został stworzony w Edynburgu [37]. Pozwala on analizować 5000 chromosomów na sekundę. Istotą tej metody jest szczegółowy rozkład wszystkich ludzkich chromosomów za pomocą falowej cytofotometrii z użyciem lasera.

W 1981 r. Bruschi i wsp. [8] opisali system komputerowy pod nazwą CYGEN-1 oparty na wzorcach numerycznych prążków.

W Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej w Warszawie skonstruowano Cyfrowy Przetwornik Obrazu (CPO-2) umożliwiający konwersję obrazu ze zdjęć w 16-stopniowej skali zacinienia [46]. Obraz po konwersji przechowuje się w pamięci buforowej urządzenia, skąd może być partiami wprowadzany do pamięci operacyjnej. Obraz przed i po konwersji wyświetlany jest na monitorze ekranowym.

W naszym Zakładzie od 1971 r. prowadzone są prace nad gromadzeniem danych genetycznych w pamięci maszyny cyfrowej. Prace nad systemami komputerowymi do automatyzacji badań cytogenetycznych obejmują rozwiązanie techniczne i badania nad optymalnymi algorytmami dla maszyn cyfrowych [3, 43–45, 65, 74, 75]. Do kodowania konturów chromosomów korzystano z Cyfrowego Przetwornika Wykresów i z CPO [46]. Do kodowania prążków zastosowano densytometr produkcji Carl Zeiss Jena połączony z maszyną cyfrową ODRA 1304. Prowadzone są również prace nad kodowaniem prążków na CPO.

BADANIA WŁASNE

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w Pracowni Genetyki Zakładu Patofizjologii AM we Wrocławiu rozpoznawania chromosomów metodami numerycznymi dokonywano na podstawie pomiaru długości ramion, położenia centromeru i analizy konturu obrazów chromosomów. Wprowadzenie do pomiarów liczby i lokalizacji prążków w chromosomach dało nowe przesłanki dla bardziej obiektywnej klasyfikacji. Wykorzystanie nowej cechy pomiarowej, czyli profili densytometrycznych, w komputerowej klasyfikacji chromosomów wymagało przeprowadzenia analizy rozpoznawania prążków.

W trakcie rozpoznawania i klasyfikacji chromosomów w naszej pracowni brane są pod uwagę jako najważniejsze następujące kryteria wykorzystywane również przy automatycznej analizie i klasyfikacji:

1. długość chromosomu w porównaniu z długością innych chromosomów. Gdy klasyfikuje się pojedyncze chromosomy, pod uwagę bierze się również proporcje chromosomów (stosunek długości i szerokości chromosomu),

2. indeks centromeru (niezależnie od innych chromosomów albo w porównaniu z innymi chromosomami),

3. liczba prążków na długim ramieniu,

4. położenie prążków na długim ramieniu względem centromeru,

5. liczba prążków na krótkim ramieniu,

6. połączenie prążków na krótkim ramieniu względem centromeru,

7. szerokość prążków,

8. intensywność zaczernienia prążków.

Cechy te zgodne są z cechami klasyfikacyjnymi podanymi przez Bruschi i wsp. [8].

Pierwszych klasyfikacji dokonywano na podstawie pomiaru długości ramion chromosomów. Do analizy używano dwuwymiarowych wektorów $X_i = (x_1^i, x_2^i)$, z których pierwsza składowa jest średnią arytmetyczną długości ramion krótkich, a druga — średnią arytmetyczną długości ramion długich dla i -tego chromosomu, $i = 1, 2, \dots, 46$. Zbudowano zbiory ufności dla poszczególnych klas chromosomów [44]. Z kolei, przyjmując normalność rozkładów wektorów długości ramion chromosomów, zastosowano je w modelu zwanym obecnie analizą dyskryminacyjną Bayesa [3, 43]. Metoda ta należy do grupy metod klasyfikacyjnych izolowanych chromosomów. Pewne założenia o znajomości parametrów rozkładu prowadzą do metody największej wiarygodności, która wybiera chromosomy homologiczne. Zaliczamy ją do metod klasyfikacji izolowanych chromosomów, ale uwzględniających istnienie par homologicznych.

Opis konturów chromosomów dostarczył nowych informacji. Kodowanie konturu chromosomu polegało na aproksymacji linii brzegowej

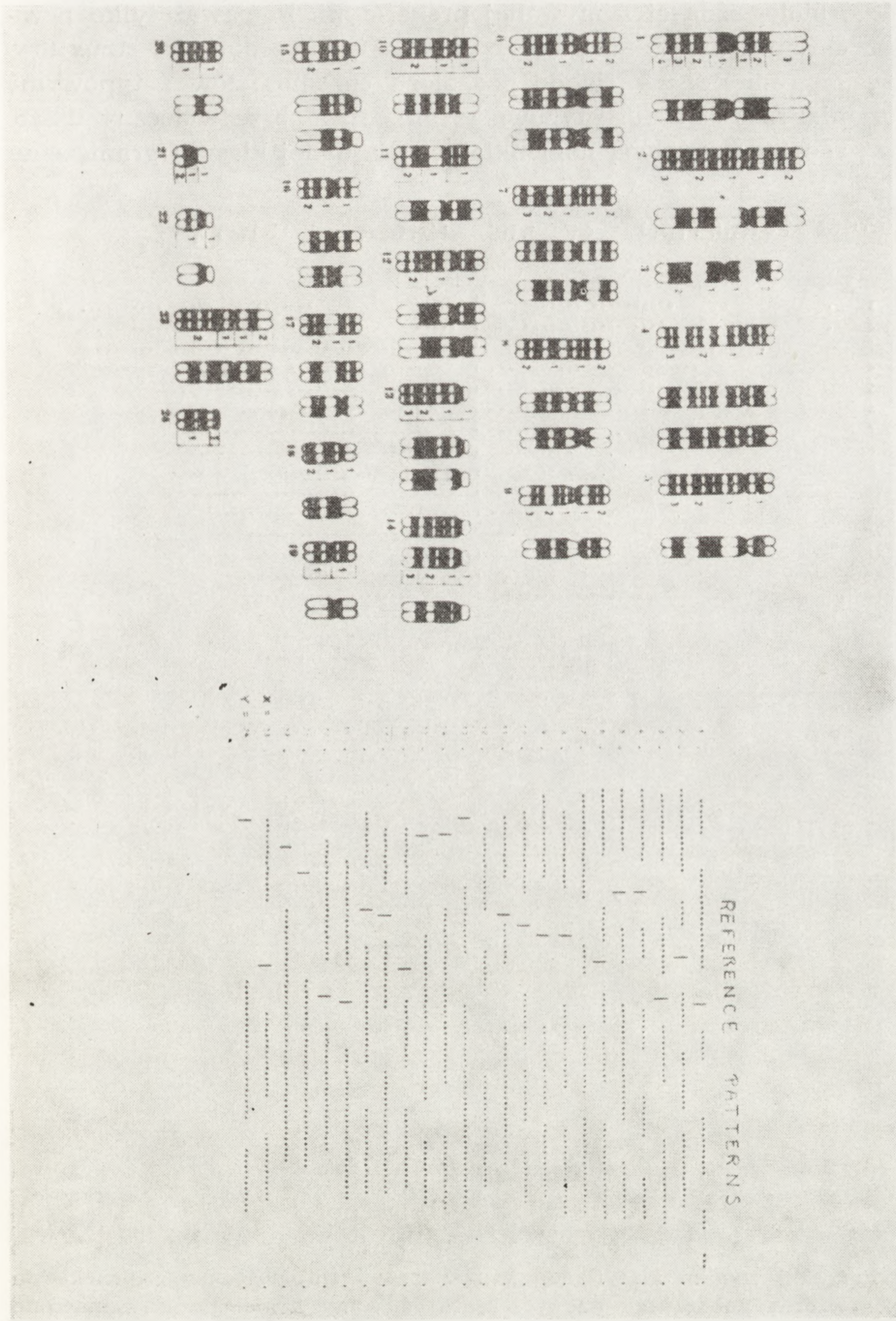
chromosomu przez wektory siatki Freemana [21], na której umieszcza się chromosomy. Następnie kontur opisywano funkcją autokorelacji Freemana. Jest ona niezmiennicza ze względu na punkt początkowy kodowania oraz kierunek kodowania i niezależna od obrotów w stopniu umożliwiającym zastosowanie jej do rozpoznawania obrazów chromosomów [3]. Uzyskiwane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Procentowa zgodność klasyfikacji komputerowej z cytogenetykiem w chromosomach wybarwionych tradycyjnie i techniką prążków G (badania własne)

Pomiar i metody klasyfikacji chromosomów	Liczba chromosomów	Zgodność na ogólną liczbę chromosomów	Zgodność klasyfikacji do 7 grup	Zgodność klasyfikacji do 22 klas
Długość ramion Twierdzenie Bayesa	924	55,6	94,3	36,9
Długość ramion Metoda najmniejszych kwadratów	924	63,6	93,8	43,6
Długość ramion i kontur Funkcja autokorelacji Metoda najmniejszych kwadratów	924	67,5	92,2	53,1

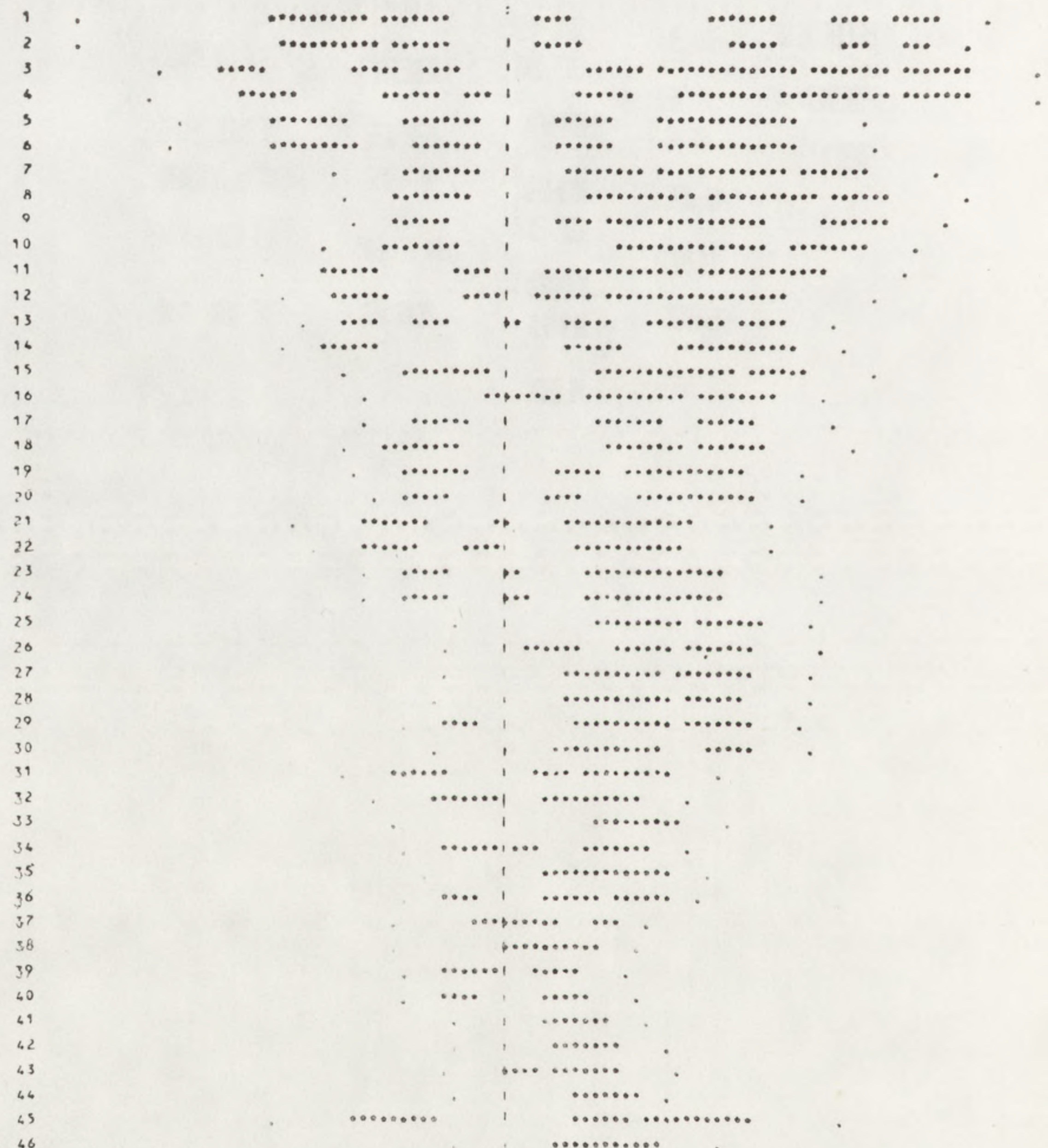
Wprowadzenie struktur prążkowych dostarczyło dodatkowej cechy pomiarowej. Pomiar struktury prążkowej chromosomów wykonywano densytometrem. W wyniku pomiaru otrzymujemy krzywą densytometryczną. Opisuje ona poprzeczną gęstość zaczernienia chromosomu wzdłuż jego osi głównej. Do procesu analizy i klasyfikacji chromosomów użyto funkcji densytometrycznych, tj. opisu krzywej densytometrycznej w matematycznych terminach. Do dobierania w pary chromosomów homologicznych służą miary (wskaźniki) podobieństwa będące odległościami euklidesowymi pomiędzy dwiema krzywymi densytometrycznymi. Wskaźniki te w istotny sposób wykorzystują położenie centromeru na krzywej densytometrycznej. Miejsca te służą za początek odniesienia przy porównywaniu krzywych densytometrycznych. Korzystniej niż w przypadku konturów chromosomów przedstawia się problem klasyfikacji chromosomu na podstawie struktur prążkowych. Ponieważ poszczególne klasy chromosomów różnią się od siebie układem prążków, można dla każdej klasy budować wzorzec będący przeciętną krzywą próbkową dla krzywych densytometrycznych chromosomów tej klasy. Klasyfikacji dokonuje się również na podstawie wskaźników podobieństwa między krzywą densytometryczną badanego chromosomu a wzorcami krzywych



Ryc. 2. Wzorzec numeryczny prążków G stosowany do komputerowej klasyfikacji chromosomów w Pracowni Genetyki Zakładu Patofizjologii AM we Wrocławiu; po stronie lewej — wzorzec wizualny prążków G według Seabright; po stronie prawej — wzorzec zero-jedynkowy prążków G wyprowadzony z analiz statystycznych preparatów chromosomów otrzymanych według techniki podanej przez Seabright. Początek i koniec chromosomu zaznaczony jest kropką, centromer — kreską pionową, prążki G oznaczono ciągiem kropek

densytometrycznych dla poszczególnych klas. Okazało się jednak, że wzorce te nie spełniają praktycznych wymogów ze względu na dużą zmienność biologiczną otrzymywanej preparatyki. Ponieważ tylko pewna część chromosomów danej klasy posiada typowe dla niej struktury prążkowe, ograniczyliśmy się do podzbioru chromosomów z typowymi strukturami. Przez strukturę typową rozumiemy dobrze widoczny układ prążków, zgodny z ustaloną nomenklaturą dla danej klasy. Ograniczenie

O-1 TRANSFORMATION OF THE WHOLE KARYOTYPE



Ryc. 3. Przykład wyniku klasyfikacji komputerowej chromosomów człowieka na podstawie wzorca pokazanego na ryc. 2; chromosomy homologiczne zaznaczone są kolejno liczbą nieparzystą i parzystą, chromosom X oznaczono numerem 45, a Y — 46

się do powyższego podzbioru miało na celu stworzenie wzorców odpowiadających poszczególnym klasom chromosomów, a proces klasyfikacji na podstawie tych wzorców miał naśladować postępowanie cytogenetyka, który w pierwszej kolejności przy kariotypowaniu bierze pod uwagę chromosomy o typowych strukturach. Poza tym dokonaliśmy redukcji zmienności krzywych densytometrycznych związanych z różnorodną oscylacją krzywych densytometrycznych na tych samych przedziałach określoności. W pierwszym etapie dokonywaliśmy transformacji odpowiednio wygładzonych krzywych densytometrycznych. W drugim etapie dokonaliśmy odwzorowań wygładzanych krzywych densytometrycznych w postać 0-1 (zero-jedynkową), gdzie wartość 1 informuje nas o istnieniu prążka w danym punkcie funkcji densytometrycznej, a 0 (zero) o braku prążków w tym punkcie. Otrzymana postać 0-1 (zero-jedynkowa) jest takim samym przedstawieniem chromosomu o strukturze prążkowej, jakie podawane jest w konwencjach układów prążkowych. Już samo zastąpienie krzywych densytometrycznych ich uproszczonymi postaciami 0-1 (zero-jedynkowymi) dało widoczną poprawę w procesie dobierania w pary chromosomów homologicznych, co można tłumaczyć utratą informacji o zmienności wahań krzywych densytometrycznych na tych samych przedziałach określoności. Zmienności te spowodowane są tak zmiennością kontrakcji, jak i efektami obróbki fotograficznej. Do celów klasyfikacji zbudowane zostały uproszczone zero-jedynkowe wzorce, które są w pewnym sensie średnią próbkową z chromosomów o typowej strukturze prążkowej dla danej klasy. Wzorec komputerowy prążków G wyprowadzony z rozkładów statystycznych przedstawia ryc. 2. Przykład kariogramu uszeregowanego według podanego wzorca komputerowego przedstawia ryc. 3. Zastosowanie tych wzorców także po-

TABELA 2

Wyniki komputerowego parowania i klasyfikacji chromosomów człowieka (liczby przedstawiają procentową zgodność z klasyfikacją cytogenetyka); badania własne

Prążki dobrze widoczne			Prążki słabo widoczne		
nr kariogramu	parowanie	klasyfikacja	nr kariogramu	parowanie	klasyfikacja
1401.13	75	85	1592.00	55	75
1401.13	65	85	1658.27	60	65
1401.III	80	75	1519.06	70	60
1722.10	70	90	1519.06	75	50
1658.25	65	85	1364.00	75	70
101.00	75	80	1772.01	60	85
100.00	70	80	1658.06	65	70
1431.15	75	85	1523.12	65	60
\bar{x}	72	83	\bar{x}	66	67

prawiło automatyczną trafność klasyfikacji, szczególnie w przypadku kariotypów o wysokiej liczbie chromosomów z typowymi strukturami prążkowymi.

Do opisu krzywej densytometrycznej została wykorzystana także funkcja autokorelacji Freemana [42] (tab. 2).

Stopień zgodności klasyfikacji komputerowej zależy od widoczności prążków w obrazach chromosomów. Nasze wyniki są dodatkowo obciążone błędem wynikającym z nie najlepszej jakości mikroskopu i densytometru.

OMÓWIENIE I WNIOSKI

Mimo szybkiego udoskonalania metod preparatyki (hodowla, barwienie) końcowe efekty nie są jeszcze zadowalające dla potrzeb tak automatyzacji pomiarów, jak i ich zastosowań w obliczeniach komputerowych, ze względu na znaczną zmienność płytek metafazowych. Jak wykazały badania Lundsteena i innych autorów [40, 51, 54–56], obecne struktury prążkowe chromosomów nie są w pełni dyskryminujące. Wizualna klasyfikacja daje około 2–5% błędów. Czasochłonny wybór dobrych metafaz do badań z setek komórek na szkiełku mikroskopowym decyduje o skróceniu czasu trwania następnych czynności oraz o szybkim sprecyzowaniu diagnozy. O jakości metafazy decyduje: liczba nienałożonych, niezlepionych i niezakrzywionych chromosomów o dobrze widzialnych prążkach i dobrym kontraście między chromosomami i otoczeniem. Obecnie w wielu ośrodkach stosowane są metody półautomatycznego wyszukiwania metafaz [70].

Wybór cech dyskryminacyjnych przesądza o poprawności klasyfikacji tak przez cytogenetyka, jak i komputer. Automatyzacja pomiarów dotyczy takich cech mierzalnych jak: długości ramion chromosomów, zawartość DNA, opis konturu, opis struktury prążkowej.

Długości ramion będące podstawą klasyfikacji ustalonej na konferencji w Denver nie przesądzają o prawidłowości identyfikacji. Na podstawie długości ramion chromosomów można dokonać podziału chromosomów na grupy denverskie oraz sklasyfikować chromosomy grupy A i E. Zawartość DNA niewiele wnosi do poprawy klasyfikacji. Kontury chromosomów mogą być przydatne tylko do dobierania w pary chromosomów homologicznych. Przydatność pomiaru chromosomów zakrzywionych jest wątpliwa w przypadku, gdy jeden z homologów jest prosty, a drugi — zakrzywiony. Wprowadzanie preparatyk uwidaczniających całą gamę prążków pozwoliło na sprecyzowanie zasad klasyfikacji podanej na konferencji w Denver. Do klasyfikacji automatycznych używa się profili densytometrycznych, które są pomiarami chromosomów o strukturze prążkowej. Profil densytometryczny dostarcza dużo infor-

macji, lecz różni badacze podają różne opisy tych profili. Najbardziej znane są zastosowania pierwotnych profili względnie skończonej liczby Fouriera funkcji gęstości Gaussa aproksymujących profile. Nasze postępowanie polega na opisie profilu densytometrycznego funkcją 0–1 (zero–jedynekową).

Obecnie stosowany jest jeden główny model klasyfikacji chromosomów — analiza dyskryminacyjna Bayesa. Rozróżnia się trzy metody klasyfikacji chromosomów. Pierwsza polega na klasyfikacji pojedynczego izolowanego chromosomu na podstawie pewnego wzorca porównawczego, np. funkcji gęstości lub innej funkcji wzorcowej. Opisane metody można stosować zarówno do pełnego, jak i niekompletnego kariogramu oraz do dowolnego zbioru chromosomów z wielu różnych komórek. Zwykle klasyfikację chromosomów z pełnej płytki nazywamy kariotypowaniem. Druga metoda klasyfikacji izolowanych chromosomów pełnego kariogramu zakłada wykorzystanie informacji o istnieniu par homologicznych. Trzecia metoda polega na klasyfikacji chromosomów, mając do dyspozycji nie tylko wiadomości o parametrach danej klasy, ale także o zależności między tymi parametrami. Funkcją porównawczą jest tutaj funkcja gęstości całego prawidłowego kariotypu, tzn. funkcja gęstości 46 wektorów. Numeryczne realizacje tych metod różnią się niekiedy znacznie od opisu teoretycznego i zależą przede wszystkim od użytych zmiennych dyskryminujących, a także sprzętu komputerowego.

Oddzielnym problemem jest automatyczne wykrywanie aberracji chromosomów. Wykrywanie aberracji liczbowych nie przedstawia większego problemu, natomiast zastosowanie komputerów do wykrywania aberracji strukturalnych jest szeroko dyskutowane. Brak jest jakichkolwiek efektywnych metod na wykrywanie tego typu aberracji. Obecne metody polegają albo na wyszukiwaniu chromosomów nie wpadających do wzorców poszczególnych klas, albo na budowaniu wzorców dla każdej z aberracji. W dotychczasowych publikacjach na ten temat autorzy starają się znaleźć jakieś istotne różnice między pomiarami klas prawidłowych i z aberracjami [65].

W problemie analizy wielokomórkowej jednostką doświadczenia jest nie chromosom, lecz cała komórka. Zatem dopóki nie będą opracowane metody klasyfikacji prawidłowej komórki i wykrywania aberracji, można opracowywać tylko modele teoretyczne. Analiza wielokomórkowa służy sprecyzowaniu orzeczenia genetycznego. Im więcej komórek zostanie przebadanych, tym pełniejsze będzie wrażenie o składzie chromosomów danego osobnika.

Przedstawienie analiz chromosomów dotyczy głównie kariotypowania. Obecnie, gdy bada się przydatność metod klasyfikacyjnych, wyniki powinny być przedstawione w porównaniu z ułożeniem zaakceptowa-

nym przez wielu cytogenetyków. Podanie wskaźnika błędu i tabeli porównawczej informuje o stopniu informatywności cech mierzalnych użytych w komputerowej klasyfikacji.

Z przytoczonego piśmiennictwa można wyciągnąć wniosek, że zastosowanie metod matematycznych i specjalistycznych systemów komputerowych do badań cytogenetycznych zwiększa obiektywność i przyspiesza proces analizy i klasyfikacji chromosomów. Zastosowanie automatycznej klasyfikacji pozwala w sposób zadowalający grupować chromosomy do 10 klas. Zastosowanie analizatorów obrazu, połączonych z komputerem, do badań cytogenetycznych i pracujących pod kontrolą wizualną specjalisty cytogenetyka, pozwala na klasyfikację chromosomów zgodną z klasyfikacją denverską w 82–94^oo.

Wśród metod stosowanych do klasyfikacji automatycznej jedynie porządkowanie kariogramu, polegające na dobieraniu chromosomów parami, nie wymaga wstępnego ustalania wzorców. Klasyfikacja tą metodą prowadzi jednak do zacierania różnic między homologicznymi chromosomami badanej płytki metafazowej. Klasyfikacja przez porównanie z wzorcami zwiększa obiektywność oceny, przez ujawnienie różnic w obrębie par chromosomów.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że stopień rozpoznawania liczby prążków G chromosomów metafazowych człowieka jest podobny dla cytogenetyków i maszyny cyfrowej. Analizując liczbę i rozkład prążków G chromosomów pochodzących z własnej preparatyki laboratoryjnej w porównaniu z wzorcem paryskim i wzorcem Seabright, stwierdzono pewne rozbieżności między rozkładami prążków w naszym materiale i we wzorcu paryskim. Wyprowadzony w naszej pracowni statystyczny wzorzec komputerowy prążków odpowiada średniemu wariantowi wzorca Seabright [42]. Posługiwanie się techniką komputerową wymaga ustalenia takiego wzorca. Tę drogę postępowania przyjęto w pracowniach, które zajmują się problematyką komputeryzacji badań cytogenetycznych.

Lubs i wsp. [50] proponują wprowadzenie do automatycznej klasyfikacji wzorów prążkowych R zamiast G, gdyż ciemno wybarwione w tej metodzie regiony telomerowe pozwalają na lepsze zlokalizowanie końców chromosomów, co jest istotne do określenia długości i indeksu centromerowego chromosomu. Profile chromosomów w technice prążków R mogą być łatwo opisane przez współczynniki Fourierowskie, funkcje dystrybucji, jak również BT-sekwencje [51]. Dotychczas jednak nie stosowano tej metody.

Wprowadzanie nowych metod opisu matematycznego chromosomów daje przesłanki do tworzenia coraz bardziej udoskonalonych modeli wzorców prążkowych. Lundsteen na podstawie analizy profili BT chro-

mosomów o różnym stopniu kontrakcji sugeruje, że częstość pojawienia się prążków oraz ich gęstość i kontrast mogą być funkcją stopnia kontrakcji chromosomów. W związku z tym rozważa on możliwość zbudowania dynamicznego modelu wzorów prążkowych [51].

Zasadniczym wnioskiem wynikającym z naszych badań oraz danych z literatury [38] jest stwierdzenie, że wskaźnik błędów przy automatycznej klasyfikacji chromosomów jest jeszcze zbyt wysoki, aby można było tę metodę powszechnie zaakceptować.

Obecnie zastosowanie matematycznych procedur klasyfikacyjnych ogranicza się do następujących rozwiązań cząstkowych:

- do podziału chromosomów na 7 grup denverskich,
- do wstępnej szybkiej klasyfikacji na podstawie długości ramion,
- do klasyfikacji chromosomów, co do których cytogenetyk ma wątpliwości,
- jako miernik najwiarygodniejszego kariotypu, gdy cytogenetyk jest niepewny, która z wersji ułożenia danego kariogramu jest prawidłowa,
- do analizy chromosomów podejrzanych o aberrację przez cytogenetyka,
- do wykrywania większości aberracji liczbowych,
- do tworzenia w pamięciach komputerowych systemów alarmowych dla potrzeb populacyjnych i poradnictwa genetycznego (biblioteki alarmowe i banki genetyczne).

Wprowadzenie w ciągu ostatnich lat w wielu laboratoriach cytogenetycznych w świecie nowych technik laboratoryjnych uwidaczniających chromosomy we wcześniejszym stadium podziału komórki dostarcza kilkakrotnie bogatszych w prążki obrazów chromosomów [80]. W naszej pracowni przeprowadza się obecnie podstawowe badania poznawcze nad ich zachowaniem w celu uzyskania nowych dokładniejszych metod komputerowej analizy i klasyfikacji chromosomów prawidłowych i wykrywania aberracji strukturalnych o niewielkim kalibrze.

Stosowanie wzorców komputerowych do klasyfikacji chromosomów wymaga ich kontroli, a ideałem byłyby wzorce dynamiczne, kontrolowane współczynnikami kontrakcji. Uwidacznianie coraz to nowszych struktur prążkowych wymaga analiz statystycznych.

LITERATURA

- [1] AIELLO M., LAMI C., MONTANARI V., Optimal matching of wheat chromosomes, *Comp. Graph. Image. Proc.*, **3**: 225–229, 1974.
- [2] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81–86, 1971.

- [3] BEDNARSKI T., FILIPOWSKI H., JAGIELSKI J., Identification of human chromosomes, a decision theoretic approach, Institute of Mathematics Polish Academy of Sciences, February 1978, Preprint 130.
- [4] BENDER M. A., KASTENBAUM M. A., Statistical analysis of the normal human karyotype, *Am. J. Hum. Genet.*, **21**: 322-351, 1969.
- [5] BERG van den H. T. C. M., de FRANCE H. F., HABBEMA J. D. F., RAAT-GEVER J. W., Automated selection of metaphase cells by quality cytometry, Copyright by the Society for Analytical Cytology, Vol. 1, No 6, 1981.
- [6] BERG van den H. T. C. M., HABBEMA J. D. F., de FRANCE H. F., BAKKER H. K., de VRIES G. A., On the use of distribution functions to describe and classify chromosome density profiles, *Comput. Biol. Med.*, **9**: 11-20, 1979.
- [7] BOBROW M., MADAN K., PEARSON P. L., Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No 9., *Nature (London), New Biol.*, **238**: 122-124, 1972.
- [8] BRUSCHI C., TEDESCHI F., PUGLISI P. P., MARMIROLI N., Computer-assisted karyotyping system of banded chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **29**: 1-8, 1981.
- [9] CASPERSSON T., CASTLEMAN K. R., LOMAKKA G., MODEST E. J., MØLLER A., NATHAN R., WALL R. J., ZECH L., Automatic karyotyping of quinacrine mustard stained human chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **67**: 233-235, 1971.
- [10] CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH V., ZECH L., Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **49**: 219-222, 1968.
- [11] CASPERSSON T., JOHANSSON C., MODEST E. J., Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents, *Chromosoma*, **30**: 215-227, 1970.
- [12] CASPERSSON T., LOMAKKA G., MØLLER A., Computerized chromosome identification by aid of the quinacrine mustard fluorescence technique, *Hereditas*, **67**: 103-110, 1971.
- [13] CASPERSSON T., LOMAKKA G., ZECH L., The 24 fluorescence patterns of the metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability, *Hereditas*, **67**: 89-102, 1971.
- [14] CASTLEMAN K. R., MELNYK J. H., An automated system for chromosome analysis — final report, JPL Document No 5040-30, Jet Propulsion Laboratory, Pasadena, California, 1976.
- [15] CZOGAŁA A., Analiza i klasyfikacja chromosomów metodą komputerowego porównywania charakteryzujących je funkcji, Praca doktorska, Wrocław 1979.
- [16] DUTRILLAUX B., Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T, *Chromosoma*, **41**: 395-402, 1973.
- [17] DUTRILLAUX B., COUTURIER J., Techniques d'analyses chromosomiques, Biologie clinique. Expansion scientifique française. Paris 1972, 5-12.
- [18] DUTRILLAUX B., de GROUCHY J., FINAZ C., LEJEUNE J., Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier), *C. R. Acad. Sci.*, **273**: 587-588, 1971.
- [19] DUTRILLAUX B., LEJEUNE L., Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain, *C. R. Acad. Sci.*, **272**: 2638-2640, 1971.
- [20] FINAZ C., De GROUCHY J., Le caryotype human après traitement par chymotrypsin, *Ann. Genet.*, **14**: 309-311, 1971.
- [21] FREEMAN H., Computer processing of line-drawing images, *Computing Surveys*, **6**: 57-97, 1974.

- [22] FREEMAN M. V. R., BEISER S. M., ERLANGER B. F., MILLER O. J., Reactions of antinucleoside antibodies with human cells in vitro, *Exp. Cell Res.*, **69**: 345-348, 1971.
- [23] FU K. S., Stochastic languages for picture analysis, *Comp. Graph. Image. Proc.*, **2**: 433-453, 1973.
- [24] GAGNÉ R., LABERGE C., Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosomes in man, *Exp. Cell Res.*, **73**: 239-242, 1972.
- [25] GALLUS G., MONTANARO N., MACCACARO G. A., A problem of pattern recognition in the automatic analysis of chromosomes: Locating the centromere, *Computer and Biomedical Research*, Vol. 2, No 2, October 1968.
- [26] GALLUS G., MORABITO A., REGOLIOSI G., On a complete chromosome recognition scheme, *Bruxelles. Ifac Symposium*, 111-117, 1971.
- [27] GALLUS F., NEURATH P. W., Improved computer chromosome analysis incorporating preprocessing and boundary analysis, *Phys. Med. Biol.*, **15**: 435-445, 1970.
- [28] GELDERMANN H., STRANZINGER G., PAUFLER S., Automatisierung der Chromosomenanalyse mit dem Elektronenrechner, *Humangenetik*, **9**: 325-360, 1970.
- [29] GIBBARD D. W., SMITH D. J., WELLS A., Area sizing and pattern recognition on the Quantimet 720, *The Microscope*, **20**: 37-50, 1972.
- [30] GILBERT C. W., A computer programme for analysis of human chromosomes, *Nature*, **5096**: 1437-1440, 1966.
- [31] GORDON W. D., RICHARD A. R., HYMIE GORDON, A computer based videodensitometric system for studying banded human chromosomes illustrated by the analysis of the normal morphology of chromosome 18, *Am. J. Hum. Genet.*, **29**: 37-51, 1977.
- [32] GRANLUND G. H., Identification of human chromosomes by using integrated density profiles, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **23**: 182-189, 1976.
- [33] GRANLUND G. H., Statistical analysis of chromosome characteristics, *Pattern Recognition*, **6**: 115-126, 1974.
- [34] GRANLUND G. H., The use of distribution functions to describe integrated density profiles of human chromosomes, *J. Theor. Biol.*, **40**: 573-589, 1973.
- [35] GRANLUND G. H., ZACK G. W., YOUNG J. J., EDEN M., A technique for multiple cell chromosome karyotyping, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 160-167, 1976.
- [36] GRANUM E., Report of „The JPL-System” for automated chromosome analysis: possibilities for improvements of software and operational design, *Electronics Labor. Tech. Univ. of Denmark. Report no AACHC-6201 ILE*. 1694, Lyngby, Oct. 1978.
- [37] GREEN D. K., Chromosome analysis and sorting by „follow” methods, *The 78 European Workshop on Automated Human Cytogenetics, Lyngby, Copenhagen 1978, Proceedings*, 8-11.
- [38] HABBEMA J. D. F., A discriminant analysis approach to the identification of human chromosomes, *Biometrics*, **32**: 919-928, 1976.
- [39] HABBEMA J. D. F., A statistical model for the incomplete cell analysis of chromosomes: some preliminary remarks, *Bull. Int. Stat. Inst.*, **46**: 341-345, 1975.
- [40] HABBEMA J. D. F., Statistical methods for classification of human chromosomes, *Biometrics*, **35**: 103-118, 1979.

- [41] O'HANDLEY D. A., BECKENBACH E. S., CASTLEMAN K. R., SELZER R. H., WALL R. J., Picture analysis applied to biomedicine, *Comp. Graph. Image. Proc.*, 2, 417-432, 1973.
- [42] HAUS O., JAGIELSKI J., NOGA L., Analiza i klasyfikacja chromosomów człowieka w stadium metafazy na podstawie pomiaru densytometrycznego prążków G — opracowanie w ramach problemu węzłowego 10.4.3. „Analiza i rozpoznawanie chromosomów”, Wrocław 1980.
- [43] JAGIELSKI J., BEDNARSKI T., CZOGAŁA E., KLONECKI W., MUSIELA M., IHNATOWICZ J., Methods of classification of human chromosomes, Institut of Mathematics, Polish Ac. of Sci., Preprint nr 187, 1979.
- [44] JAGIELSKI J., SKAWIŃSKI W., Analiza i klasyfikacja chromosomów przy użyciu maszyn cyfrowych, *Pol. Tyg. Lek.*, 29: 1243-1245, 1974.
- [45] JAGIELSKI J., SKAWIŃSKI W., The analysis and classification of chromosomes. I. Application of the Bayes theorem, *Mat. Med. Pol.*, 3: 198-203, 1978.
- [46] KULPA Z., DERNAŁOWICZ J., System cyfrowy analizy obrazów CPO-2 i jego zastosowanie biomedyczne — I Kraj. Konf. Nauk. „Biocybernetyka i Inż. Biomedyczna”, Warszawa 1976.
- [47] LEDLEY R. S., High speed automatic analysis of biomedical pictures, *Science*, 146: 216-223, 1964.
- [48] LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., RETHORÉ M., COUTURIER J., CARPENTIER S., RAOUL O., Analysis of 30 cases of translocation by the controlled heat denaturation, [w:] *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man*, red. F. K. Pfeiffer, Symp. Med. Hoechst. 1972, 6, s. 191-200, Schattauer, Stuttgart.
- [49] LOW D. A., SELLES D., Bayes theorem applied to chromosome classification, *Comp. Biomed. Res.*, 4: 561-570, 1971.
- [50] LUBS H. A., VERMA R. S., LEDLEY R. S., Automated analysis of R-banded cells: Early results and future prospects, [w:] *Chromosomes Today*, red. P. L. Pearson and K. L. Lewis, vol. 5, J. Wiley and Sons, N.Y. 1976, s. 429 (cytowane za Lundsteen C. poz. [51]).
- [51] LUNDSTEEN C., Aspects of automated chromosome analysis, *Dan. Med. Bull.*, 27: 1-21, 1980.
- [52] LUNDSTEEN C., GRANUM E., Description of chromosome banding patterns by band transition sequences. A new basis for automated chromosome analysis, *Clin. Genet.*, 15: 418-429, 1979.
- [53] LUNDSTEEN C., GRANUM E., Visual classification of banded human chromosomes. III Classification and karyotyping of density profiles described by band transition sequences, *Clin. Genet.*, 15: 430-439, 1979.
- [54] LUNDSTEEN C., GRANUM E., Visual classification of banded human chromosomes. II Classification and karyotyping of integrated density profiles, *Ann. Hum. Genet.*, 40: 431-442, 1977.
- [55] LUNDSTEEN C., LIND A. M., GRANUM E., Visual classification of banded human chromosomes. Karyotyping compared with classification of isolated chromosomes, [w:] *Automation of cytogenetics*, 110-116. Conf. 751158, U.S. Energy Research and Development Administration, Washington, D.C., 1975.
- [56] MARIMUTHU K. M., SELLES E. D., NEURATH P. W., Computer analysis of Giemsa banding patterns and automatic classification of human chromosomes, *Am. J. Hum. Genet.*, 26: 369-377, 1974.
- [57] MENDELSON M. L., CONWAY T. J., HUNGERFORD D. A., KOLMAN W. A., PERRY B. H., PREWITT J. M. S., Computer oriented analysis of human

- chromosomes. I Photometric estimation of DNA content, *Cytogenetics*, 5: 223-242, 1966.
- [58] MØLLER A., NILSSON H., CASPERSSON T., LOMAKKA G., Identification of human chromosome regions by aid of computerized pattern analysis, *Exp. Cell Res.*, 70: 475-478, 1972.
- [59] MORI S., MONDEN Y., MORI T., Edge representation in gradient space, *Comp. Graph. Image. Proc.*, 2: 321-325, 1973.
- [60] NEURATH P. W., BABLOUZIAN B. L., WARMS T. H., SERBAGI R. C., FALEK A., Human chromosome analysis by computer — an optical pattern recognition problem, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 128: 1013-1028, 1966.
- [61] NEURATH P. W., BRAND D. H., SCHREINER E. D., Man-machine interaction for image processing, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 157: 324-338, 1969.
- [62] NEURATH P. W., GALLUS G., SELLES W. D., Interactive computer aided chromosome analysis, *J. Assoc. Advanc. Med. Instrum.*, 4: 6-14, 1970.
- [63] NEURATH P. W., KESS B., LOW D. A., Individualized human karyotyping through quantitative analysis, *Comp. Biol. Med.*, 2: 181-183, 1972.
- [64] NEURATH P. W., LIN S., LOW D. A., Quantitative karyotyping a model twin study, *Cytogenetics*, 11: 457-474, 1972.
- [65] NOWICKI G. A., Analiza struktury prążkowej chromosomów człowieka dla potrzeb komputerowej klasyfikacji, *Prace Naukowe AM we Wrocławiu*, PWN, 1980 (w druku).
- [66] ONOE M., TAKAGI M., YUKIMATSU K., Chromosome analysis by minicomputer, *Comp. Graph. Image Proc.*, 2: 402-416, 1973.
- [67] OOSTERLINCK A., DAELE J., BOER J. de, DAM F., REYNARTER A., BERGH H., van den, Computer assisted karyotyping with human interaction, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 754-756, 1977.
- [68] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, 168: 1356-1358, 1979.
- [69] Paris Conference (1971), Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects, Orig. Artic. ser 8*, 7: 1-46, 1972.
- [70] RUTOWITZ D., FARROW A. S. J., GREEN D. K., HILDITCH C. J., PATON K. A., STEIN B., A system of automatic chromosome analysis at the University of Birmingham 6-10 I 1969, *Abrams M. E., Ckatto Windus London 1970*, 35, 65.
- [71] SEABRIGHT M., A rapid banding technique for human chromosomes, *Lancet*, 2: 971-972, 1971.
- [72] SEABRIGHT M., COOKE P., WHEELER M., Variation in trypsin banding at different stages of contraction in human chromosomes and the definition, by measurement, of the „average” karyotype, *Humangenetik*, 29: 35-40, 1975.
- [73] SELLES W. D., NEURATH P. W., CONKLIN J., HORTON J. B., Progress and problems in the cytophotometric analysis of G-banded chromosomes, [w:] *Proc. Workshop of Automation of Cytogenetics*, red. M. L. Mendelsohn. Asilomar. California, Lawrence, Livermore Laboratory Technical Report CONF-751158, 1975, 3-16.
- [74] SKAWIŃSKI W., Zastosowanie komputerów do analizy i klasyfikacji chromosomów, *Post. Hig. Med. Dośw.*, 5: 625-651, 1976.
- [75] SKAWIŃSKI W., NOWICKI G. A., Automatyczna klasyfikacja chromosomów, III Krajowe Sympozjum Biocybernetyki, Biomatematyki i Biotechniki PTC, 1976, streszczenia.

- [76] SUMNER A. T., EVANS H. J., BUCKLAND R. A., New technique for distinguishing between human chromosomes, *Nature, New Biol.*, **232**: 31-32, 1971.
- [77] TURPIN R., LEJEUNE J., *Les chromosomes humains*, Gauthier Villars, Paris 1965.
- [78] WANG H. C., FEDOROFF S. B., Banding in human chromosomes treated with trypsin, *Nature, New Biol.*, **235**: 52-58, 1982.
- [79] YOUNG J. T., WALKER J. E., BOWIE J. E., *An analysis technique for biological shape*, Medinfo 74, N. Holland Publ. Co. 1974.
- [80] YUNIS J. J., BALL D. W., SAWYER J. R., G-banding patterns of high-resolution human chromosomes 6-22, X and Y, *Hum. Genet.*, **49**: 291-306, 1979.
- [81] YUNIS J. J., ROLDAN L., YAMINEH W. G., LEE J. C., Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes, *Nature, New Biol.*, **231**: 532-533, 1971.

Otrzymano: 15 października 1981.

Przyjęto: 4 listopada 1981.

Adres autorów: ul Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław.

PRZEMIESZCZAJĄCE SIĘ GENY JAKO CZYNNIKI EWOLUCJI?

Od szeregu lat wiadomo, że tylko nieznaczna część genomu organizmów wyższych koduje białka. U człowieka np. stanowi ona nieco ponad 1% całkowitego DNA (ref. [4]), u jeżowca — około 10% (ref. [5]). Pozostała, główna część genomu zawiera sekwencje unikalne, lecz nie kodujące białek, oraz sekwencje powtarzające się. Wśród tych ostatnich wyróżnia się satelitarny DNA, na który składają się miliony krótkich identycznych sekwencji, oraz umiarkowanie powtarzalny DNA, zawierający bardziej złożone i dłuższe sekwencje (ref. [7]). U roślin wyższych zawartość powtarzalnego DNA zwiększa się w miarę zwiększania zawartości podstawowej (2C) DNA (ref. [6]).

Porównywanie ilości powtarzających się sekwencji DNA u gatunków z tego samego rodzaju, lecz różniących się zawartością 2C DNA sugeruje, że właśnie ta frakcja DNA decyduje o ewolucji kariotypu. Powtarzalny DNA zlokalizowany jest w heterochromatynie, a wniosek ten został w ostatnich latach potwierdzony przez pomiary ilościowe i analizę lokalizacji prążków C u spokrewnionych gatunków ([1], ref. [6]). Zebrane do 1978 r. dane umożliwiły Naglowi [5] sformułowanie hipotezy, w myśl której skokowe zmiany w heterochromatynie, głównie typu amplifikacji i delecji, grają istotną rolę w ewolucji kariotypów.

Rola powtarzających się sekwencji DNA pozostaje w sferze hipotez. Uważa się, że satelitarny DNA, nie wykorzystywany do syntezy RNA *in vivo*, może uczestniczyć w jakiś szczególny sposób w utrzymywaniu struktury chromosomów. Natomiast umiarkowanie powtarzalny DNA uczestniczyłby — zdaniem Davidsona i wsp. [2] — w regulacji aktywności genów.

Głównym tematem omawianym na konferencji „Genome evolution and phenotypic variation” (King’s College, Cambridge, Anglia, 22–24 czerwca 1981), zreferowanej przez Lewina [4], był dynamiczny stan genomu roślin i zwierząt, polegający na stałej amplifikacji i coraz to nowych układach sekwencji nukleotydów. Ostatecznie przyjęto koncepcję „płynnego genomu” (fluid genome), w którym zachodzi stale przemieszczanie sekwencji DNA. W wyniku tych procesów następują trojaki

zmiany ewolucyjne: w strukturze chromosomów, w układzie powtarzalnych sekwencji i w regulacji funkcji genów strukturalnych. Najbardziej pasjonującym zagadnieniem jest stwierdzenie, w jakiej mierze płynność genomu przyczynia się do utworzenia barier biologicznych między gatunkami. Koncepcję „płynnego genomu” można na razie traktować tylko jako interesującą hipotezę roboczą.

Autor w sprawozdaniu z konferencji referuje szereg wypowiedzianych poglądów, streszcza niektóre referaty i głosy w dyskusji. Pogląd o nie kodującym RNA i białek, powtarzalnym DNA jako o niepotrzebnym obciążeniu genomu („śmieć”) został odrzucony, jak również — nieco żartobliwe sugestie — jakoby był on samoistnym wtrętem, istniejącym i powielającym się w obrębie genomu bez pełnienia w nim jakiegokolwiek funkcji („selfish DNA”). Kilka interesujących doniesień i głosów w dyskusji przytaczam za Lewinem [4].

Bennett twierdzi, że długość ramion chromosomów determinuje porządek, w jakim zespół chromosomów łączy się ze sobą i samoorganizuje w obrębie jąder. Konsekwencją określonego układu przestrzennego chromosomów byłoby rozmieszczenie pewnej grupy genów strukturalnych w bliskim — zapewne funkcjonalnym — sąsiedztwie, nawet jeżeli znajdują się one w rozmaitych chromosomach. Konsekwencją takiego układu przestrzennego mogłaby być możliwość przemieszczania się genów między znajdującymi się blisko chromosomami.

Rees uzyskał płodne potomstwo dwóch gatunków żyta różniących się zawartością DNA o około 40%. Liczba i morfologia chromosomów u tych gatunków była taka sama. Tak duża różnica w zawartości DNA wzbudza jednak wątpliwości co do normalnego przebiegu koniugacji chromosomów. W dyskusji zaproponowano więc, że tylko pewne rodzaje sekwencji DNA byłyby niezbędne dla prawidłowego przebiegu tego procesu, a u tych dwóch gatunków sekwencje takie występują.

Britten, Davidson i ich współpracownicy wykazali, że umiarkowanie powtarzalny DNA jest rozmieszczony między genami kodującymi białka; sekwencje umiarkowanie powtarzalnego DNA są transkrybowane. Te właśnie produkty transkrypcji wykazują uderzające różnice między różnymi tkankami i między różnymi stadiami rozwoju. Na tej podstawie Britten i Davidson zaproponowali wspomniany model regulacji ekspresji genów kodujących białka za pośrednictwem umiarkowanie powtarzalnego DNA. Zdaniem Lewina [4], koncepcja ta wymaga potwierdzenia doświadczalnego. Davidson wyraził pogląd, że z ewolucyjnego punktu widzenia można oczekiwać, iż przemieszczane sekwencje w genomie mogą grać doniosłą rolę w przesuwaniu się genów w kierunku pozycji, w jakiej mogą one podlegać regulacji, lub poza ten obszar.

Davidson przedstawił interesujące dane świadczące o wpływie prze-

kształceń genomu — drogą przemieszczania się określonych sekwencji DNA — na funkcjonowanie genów strukturalnych na przykładzie aktyn, stanowiących grupę białek pełniących rozmaite strukturalne funkcje w komórkach mięśniowych i w cytoszkielecie. Organizmy zawierają rodziny genów kodujących różne aktyny, przy czym każda aktyna jest kodowana przez szereg genów aktywnych w rozmaitych okresach rozwoju. Jeżeli geny przemieszczają się w genomie z jednego miejsca w inne, mogą znaleźć się w odmiennym funkcjonalnie obszarze, w którym produkt ich aktywności będzie odmienny. Zdaniem Davidsona, stare geny w nowym układzie doprowadzają do nowych skutków morfologicznych.

Geny kodujące globinę, białko hemoglobiny, są genami strukturalnymi o najlepiej dotąd poznanej ewolucji [3]. U człowieka geny kodujące β -globinę zajmują tylko 8% długiego odcinka DNA, zawierającego około 60 kz. Jaka jest funkcja pozostałego DNA? Jeffreys w wyniku porównania u Naczelnych zarówno pojedynczej kopii, jak i powtarzających się sekwencji DNA w tym regionie wykazał, że są one w obrębie tego rzędu zachowane; sugerowałoby to ich rolę funkcjonalną, a tym samym eliminowałoby hipotezę „śmiecia”. Obecność u roślin motylkowych białka (leghemoglobiny) biorącego udział w wiązaniu azotu atmosferycznego jest uwarunkowana przez gen przypominający pierwotny gen globiny. Zdaniem Jeffreysa mogło tu nastąpić przemieszczenie „poziome” tego genu za pośrednictwem wirusa.

Hipoteza Dovera nawiązuje do koncepcji udziału amplifikacji heterochromatyny i jej delecji w powstawaniu nowych gatunków w wyniku zmian w kariotypie. Hipoteza ta opiera się na dwóch założeniach: 1. członki poszczególnych klas (rodzin) umiarkowanie powtarzalnego DNA wykazują tendencję do znacznego strukturalnego podobieństwa poprzez ten sam kierunek ewolucyjny, 2. pojawienie się w obrębie takiej klasy wariantu (w wyniku mutacji) prowadzi do rozprzestrzenienia się tego wariantu w obrębie populacji aż do zastąpienia formy wyjściowej. Taka sytuacja mogłaby odgrywać istotną rolę w procesie specjacji — jeżeli obecność nowego wariantu w obrębie klasy powtarzalnych sekwencji doprowadzi do reproduktywnej niezgodności między osobnikami obu populacji. Konsekwencją tej hipotezy jest pojmowanie klasy powtarzalnych sekwencji jako układu dynamicznego w wyniku stale zachodzących amplifikacji i delecji. Powstały mutant może być bądź eliminowany, bądź stać się formą dominującą w populacji.

W zakończeniu sprawozdania Lewin [4] cytuje podsumowanie, którego dokonał M. Smith: „Biologowie ewolucyjni powinni zacząć traktować na serio biologię molekularną, szczególnie ze względu na wykazanie takich elementów w genomie, które mogą pomnażać się poza klasycz-

nymi prawami Mendla. Biologowie molekularni muszą jednakże zrozumieć, jak wiele zostało dokonane w biologii ewolucyjnej. Zaprzyjaźnijmy się z nią”.

Należy dodać, że więź między warsztatem badawczym biologów ewolucyjnych i cytogenetyków również przyczyni się do poznania mechanizmów ewolucji na poziomie aparatu genetycznego. Wypada również zachęcić biologów molekularnych do poznania wspomnianych na wstępie niniejszego omówienia podstawowych osiągnięć cytogenetyki w tym zakresie.

LITERATURA

- [1] BENNETT M. D., GUSTAFSON J. P., SMITH J. B., Variation in nuclear DNA in the genus *Secale*, *Chromosoma* (Berl.), **61**: 149–176, 1977.
- [2] DAVIDSON E. H., KLEIN W. H., BRITTEN R. J., Sequence organization in animal DNA and a speculation on hnRNA as a coordinate regulatory transcript, *Devel. Biol.*, **55**: 69–84, 1977.
- [3] HÜBNER H., DZWONKOWSKA A., OSIECKA R., Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota. II. Struktura genów, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 147–173, 1982.
- [4] LEWIN R., Do jumping genes make evolutionary leaps? *Science*, **213**: 634–636, 1981.
- [5] NAGL W., Search for the molecular basis of diversification in phylogenesis and ontogenesis, *Pl. Syst. Evol.*, *Suppl.* **2**: 3–25, 1979.
- [6] OLSZEWSKA M. J., Heterochromatyna w genomie roślin, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 241–256, 1982.
- [7] OLSZEWSKA M. J., SYSA P. S., Struktura genomu, [w:] *Metody badania chromosomów*, red. M. J. Olszewska, PWRiL, Warszawa 1981.

Maria J. Olszewska

Słownik

Poniżej przedstawiony za Science, 209: 1435-1438, 1980, zestaw wybranych terminów i ich definicji z zakresu genetyki molekularnej stanowi kontynuację naszej działalności zmierzającej do ustalenia mianownictwa w języku polskim. Niektóre z wymienionych terminów są stosowane w artykułach zamieszczonych w tym numerze Postępów Biologii Komórki.

W zestawie tym opuszczono terminy powszechnie przyjęte i zamieszczone w Słowniku terminów genetycznych (Rieger R., Michaelis A., Green M. M., tłumaczenie i adaptacja pod red. W. Gajewskiego i A. Makarewicz, PWRiL, Warszawa 1974). Przy ustalaniu propozycji mianownictwa wzięto pod uwagę terminologię stosowaną w wymienionym Słowniku oraz w Biologii molekularnej, Informacji genetycznej (red. Z. Lassota, PWN, Warszawa 1980).

Redakcja

Słownik

PROPOZYCJE POLSKIEGO MIANOWNICTWA NIEKTÓRYCH TERMINÓW Z ZAKRESU GENETYKI MOLEKULARNEJ

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) — cytotoksyczność komórek zależna od przeciwciał

Amplifikacja (amplification) — 1. wzrost stosunku plazmidowego DNA względem bakteryjnego DNA spowodowany przez np. chloramfenikol; 2. replikacja banku genów (gene library) w pufie; 3. termin ten jest również używany dla zjawiska wybiórczej replikacji określonych kodujących lub nie kodujących sekwencji DNA

Analiza sekwencji zasad najbliższego sąsiedztwa (nearest neighbour analysis) — biochemiczna technika określania częstości, z jaką pary zasad znajdują się jedna obok drugiej

Antysensowna nić (antisense strand)

— nić DNA, która ma taką samą sekwencję jak mRNA

AUG — patrz: kodon inicjujący

Bank genów (gene library) — przypadkowy zbiór fragmentów DNA klonowanych w wektorze, który zawiera całkowitą informację genetyczną danego gatunku, np. kurczęcia, człowieka; czasami nazywany jest zbiorem „shotgun”

CAP — białko aktywujące genu katabolicznego (czasami CRP — catabolite repression protein lub CGA), które uczestniczy w inicjacji transkrypcji u prokariotów

C_H — stały fragment ciężkiego łańcucha immunoglobuliny

Chromosome walking — izolacja

Jeśli to nie pasuje to ten bank nie działa

brać podobnego terminu

izolacja

okrywających się klonów molekularnych w celu połączenia dużych przerw chromosomowych

Cięcie (cut) — przerwanie dwuniciowej struktury w duplesie polinukleotydowym w odróżnieniu od przecięcia pojedynczej nici (nick)

Czynnik transpozycyjny (transposable element) — fragment DNA, który może przemieszczać się z jednego miejsca genomu w drugie

Ekson (exon) — fragment DNA, który koduje dojrzały mRNA (lub tRNA, rRNA)

Endonukleaza restrykcyjna (restriction endonuclease) — specyficzna endodezoksyrybonukleaza; tnie obie nici sekwencji specyficznych; enzymy restrykcyjne izolowane były zwykle z bakterii, np. Eco RI, Bam I, Hind III

Fosfodwuesteraza I (phosphodiesterase I) — enzym usuwający hydrolytycznie nukleotydy 5' z oligonukleotydów zakończonych grupą 3' OH; nazywana jest także 5' egzonukleazą

Fragment Klenow (Klenow fragment) — fragment otrzymany z polimerazy I w wyniku cięcia proteolitycznego; pozbawiony jest egzonukleazy 5' → 3'

Gen nieciągły (split gene) — gen, który nie jest ciągły, lecz jest przerywany; gen przerywany (interrupted gene)

Gen regulator (regulatory gene) — gen, którego produkt jest wykorzystywany w regulacji innego genu

Gen strukturalny (structural gene) — gen, który determinuje strukturę pierwszorzędową (sekwencję aminokwasów) polipeptydu

Gen supresorowy (suppressor gene) — gen, który może odwracać efekt mutacji specyficznego typu w innych genach

Geny przemieszczające się (jumping genes) — geny związane z elementami przemieszczającymi się

Gorące miejsce (hot spot) — miejsce preferowane czyli/lub prosta sekwencja (simple sequence) np. dla inicjacji rekombinacji

Heterodupleks (heteroduplex) — cząsteczka DNA, której dwie nici pochodzą z różnych cząsteczek wyjściowych tak, że mogą występować nie odpowiadające sobie zasady lub bloki par zasad

Hybrydyzacja krzyżowa zwykle niezupełna (cross hybridization) — hybrydyzacja próbki z niecałkowicie homologiczną (mniej niż 100% komplementarności) cząsteczką

IF-1 — czynnik inicjujący (może być także IF-2, IF-3) syntezę białka

IFN — interferon; swoiste dla gatunku białko wykazujące aktywność antywirusową, wytwarzane przez komórki zakażone aktywnym lub nieaktywnym wirusem DNA lub RNA

Integracja i wycinanie (integration and excision) — integracja: rekombinacja, w której element genetyczny jest włączany; wycinanie: odwrotność integracji

Intron (intron) — fragment genu, który jest transkrybowany, ale nie występuje w dojrzałym mRNA (lub tRNA, rRNA); nazywany jest także sekwencją interweniującą (intervening sequence)

Inwersja (inversion) — zmiana cząsteczki DNA, która została spowodowana przez usunięcie fragmentu cząsteczki, jego odwrócenie i umieszczenie z powrotem w tym samym miejscu

Kapturek (cap) — struktura znajdująca na końcu 5' wielu eukariotycznych mRNA; składa się z 7'-metyloguanozyny-pppX, gdzie X jest pierwszym kodującym nukleotydem w DNA; struktura ta dodawana jest potranskrypcyjnie blisko charakterystycznej sekwencji TATA (Hogness box); brak jej w cząsteczkach prokariotycznego mRNA

Klasa (class) — patrz: klasa immunoglobuliny

Klasa immunoglobuliny (immunoglobulin class) — klasa immunoglobuliny jest determinowana przez stały region łańcucha ciężkiego i jest związana z ogólnymi właściwościami przeciwciała, komórkową i tkankową lokalizacją, wiązaniem komplementu i innymi cechami; jest niezależna od zmiennego regionu łańcucha ciężkiego i od łańcucha lekkiego; u myszy np. występują immunoglobuliny należące do 8 klas: IgM (łańcuch μ); IgD (łańcuch δ); cztery IgG (łańcuchy γ); IgA (łańcuch α); IgE (łańcuch ϵ)

Klon komórek „crown gall” (cg clone, crown gall clone) — roślinne komórki nowotworowe, których namnażanie zostało zaindukowane przez przeniesienie DNA bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (plazmidu Ti)

Kodon inicjujący (initiation codon) — kodon AUG, czasem GUG; kodon kodujący pierwszy aminokwas w sekwencji białka — formylometioninę (fMet), który często po translacji jest usuwany

Kodon startujący (start codon) — kodon inicjujący

Kodon terminujący (termination codon) — kodon, który oznacza terminację translacji

Kolonizacja genetyczna (genetic colonization) — nowy rodzaj pasożytnictwa *Agrobacterium* u roślin; wprowadzenie do gospodarza informacji genetycznej indukującej syntezę przez gospodarza produktów, które tylko induktor może wykorzystywać

Komplementarny DNA (complementary DNA, cDNA) — DNA, który jest komplementarny do mRNA; używany do klonowania lub jako specyficzna i czuła próbka w badaniach hybrydacyjnych

Końce kohezywne, końce lepkie (cohesive termini, cohesive ends) — komplementarne jednoniciowe końce czą-

steczki DNA, które umożliwiają połączenie ze sobą dwóch końców wprowadzonych fragmentów DNA

Końce tępe (blunt ends, flush ends) — końce cząsteczki DNA, które powstają w wyniku przecięcia dwóch nici DNA w miejscach leżących naprzeciwko siebie

Linker — mały fragment syntetycznego DNA, który posiada miejsce restrykcji wykorzystywane w procesie wiązania ze sobą dwóch cząsteczek DNA (gene splicing)

Łańcuch L (L chain) — lekki łańcuch immunoglobuliny; V_L , J_L i C_L są genami odpowiadającymi fragmentom łańcucha L; w cząsteczce immunoglobuliny występują lekkie łańcuchy typu λ albo κ (nigdy obydwie w jednej cząsteczce)

Łańcuch H (H chain) — ciężki łańcuch cząsteczki immunoglobuliny; patrz: V_H i C_H

Miejsce podstawienia nukleotydu (nucleotide replacement site) — pozycja w kodonie, gdzie wystąpiła mutacja punktowa

Miejsce przełączające (switching site) — punkt pęknięcia, w którym fragmenty genu łączą się w procesach przegrupowania genów; czasami skróty S i S_α mogą oznaczać miejsce przełączające dla genu α

Mutacja amber (amber mutation) — mutacja, która powoduje przedwczesne zakończenie syntezy łańcucha polipeptydowego; jest ona spowodowana zmianą kodonu prowadzącą do powstania kodonu nonsensownego AUG, który sygnalizuje terminację syntezy

Mutacja milcząca (silent mutation) — mutacja w kodonie lub sekwencji, która nie powoduje zmiany aminokwasu

Mutacja nonsensowna (nonsense mutation) — mutacja, która powoduje zakończenie syntezy łańcucha polipep-

tydowego, np. mutacja ochre lub amber

Mutacja ochre (ochre mutation) — mutacja, która powoduje przedwczesną terminację syntezy polipeptydu; mutacja ta powoduje powstanie kodonu UGA sygnalizującego terminację syntezy białka

Mutacja supresorowa (suppressor mutation) — mutacja, która całkowicie lub częściowo odtwarza funkcję utraconą w wyniku mutacji pierwotnej i jest zlokalizowana w miejscu genetycznym różnym od miejsca mutacji pierwotnej

Mutacja wrażliwa na zimno (cold sensitive mutation) — mutacja prowadząca do genu, który jest aktywny w dopuszczalnie wysokiej (permissyjnej) temperaturze, ale jest nieaktywny w niskiej (ograniczającej, niepermissyjnej) temperaturze

Nacięcie (nick) — przecięcie jednej nici DNA (może być spowodowane przez dezoksyrybonukleazę lub bromek etydyny)

Nopalina (nopaline) — opina (por. niżej) syntetyzowana przez plazmid Ti (N- α (1,3-dikarboksypropyl)-L-arginina)

Odwrócone powtórzenie w DNA (inverted repeat in DNA) — patrz: palindrom

Oktopina (octopine) — opina syntetyzowana przez plazmid Ti (N- α (N-1-karboksyetyl)-L-arginina)

Operator (operator) — region DNA, który reaguje z białkiem represorowym i kontroluje ekspresję przyległego genu lub grupy genów

Operon (operon) — jednostka genowa składająca się z jednego lub więcej genów, które określają polipeptyd i operator; operon reguluje transkrypcję genu strukturalnego (regulator i geny kodujące sąsiadują ze sobą w cząsteczce DNA)

Operon lac (lac operon) — operon u

Escherichia coli, który zawiera trzy geny biorące udział w metabolizmie laktozy

Opiny (opines) — pochodne zasadowych aminokwasów produkowane przez komórki nowotworowe „crown gall”

Ori (origin point) — punkt lub region, gdzie zaczyna się replikacja DNA

Orientacja n (n orientation) — gdy określony fragment jest włączany do wektora, możliwe są dwie orientacje:

n — gdy genetyczna mapa zarówno wektora, jak i włączanego fragmentu są zorientowane w tym samym kierunku
u — gdy kierunki są różne

Orientacja u (u orientation) — patrz: orientacja n

Palindrom (palindrome) — sekwencja identyczna z sekwencją w komplementarnej nici (odczytywana w tym samym kierunku 5' \rightarrow 3'); idealne palindromy (np. GAATTC) występują często w miejscach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne; mniej idealne palindromy (np. TACCTCTGGCGTGATA) znajdują się w miejscach wiązania białek takich jak represory; przerwane palindromy (np. odwrócone powtórzenie GGTTXXXAACC) pozwalają na utworzenie w jednoniciowych kwasach nukleinowych struktury pętli na trzonku (loop stem structure) nazywanej także strukturą „szpilki do włosów” (hairpin loop structure)

Pętla r (r loop) — trójniciowa struktura, w której hybryda RNA-DNA wypiera drugą nić DNA uwidaczniającą się jako pętla; struktura ta daje charakterystyczne obrazy w mikroskopie elektronowym

Plazmid Ti (Ti plasmid) — plazmid często odpowiedzialny za indukcję komórek nowotworowych roślin „crown gall”

Poliadenylacja (polyadenylation) — nietranskrypcyjne dodanie poli(A) do końca 3' eukariotycznego RNA

Promotor (promoter) — sekwencja DNA, do której przyłącza się polimeraza RNA i inicjuje transkrypcję

Próba Grünsteina-Hognessa (Grünstein-Hogness assay) — metoda hybrydyzacji kolonii stosowana do identyfikacji klonów plazmidów (kolonie są przenoszone na filtr i hybrydyzowane z próbką RNA komplementarnego do poszukiwanego genu)

Przeciwrównoległe cząsteczki (antiparallel molecules) — cząsteczki równoległe, ale skierowane w przeciwnych kierunkach (obie nici w cząsteczce DNA ułożone są przeciwrównoległe)

Przerwa (gap) — przerwa w dwuniciowym DNA spowodowana utratą fragmentu jednej nici na pewnym odcinku

Przesuwanie eksonów (exon shuffle) — alternatywny wzór dojrzewania RNA (processing), który prowadzi do ekspresji różnych kombinacji eksonów tego samego genu

Pseudogen (pseudogene) — sekwencja, która przypomina gen, ale nie funkcjonuje jak gen; sekwencja ta nie ma żadnego fenotypu i może być śladową pozostałością genu

Punkt obrotu, zawiasa (hinge) — krótka elastyczna sekwencja aminokwasów immunoglobuliny pozwalająca na przesuwanie się jednego fragmentu względem innego; gdy sekwencja ta jest obecna, oddziela miejsce wiązania antygeny od fragmentu F_c cząsteczki

Punkt startujący (start point) — pierwszy nukleotyd transkryptu

Readthrough — transkrypcja regionu znajdującego się za sekwencją terminującą spowodowana przypadkowym błędem polimerazy RNA w rozpoznawaniu sygnału terminującego

Receptor F_c (F_c receptor) — receptor dla fragmentu F_c

Represor (repressor) — białko, które wiąże się z sekwencją regulacyjną (o-

peratorem) sąsiadującą z genem i które, gdy ulegnie połączeniu z nią, blokuje transkrypcję genu

Sekwencja zgodna (consensus sequence) — sekwencja, której każdy nukleotyd jest najczęstszy w danej pozycji w pewnej grupie porównywanych cząsteczek; wykorzystywana do określania miejsc cięcia RNA i innych miejsc

Sekwencja „ladder” (ladder sequence) — sekwencja „drabinkowa”; prążki w żelu odpowiadające sekwencji DNA

Sekwencja regulacyjna (regulatory sequence) — sekwencja DNA biorąca udział w regulowaniu ekspresji genu (np. promotor, regulator)

Sekwencja SD (SD sequence, Shine-Dalgarno sequence) — sekwencja zaczynająca się w odległości 3–11 nukleotydów od kodonu AUG w mRNA; jest komplementarna do końca 3' 16S rRNA

Sekwencja TATA (box TATA, Hogness box) — hipotetyczny eukariotyczny promotor, do którego przyłącza się polimeraza RNA II; sekwencja analogiczna do sekwencji TATAATG (Pribnow box) u prokariotów

Sekwencja TATAATG (box TATAATG, Pribnow box) — zgodna sekwencja znajdująca się obok punktu inicjacji łańcucha RNA prokariotycznych promotorów

Sekwencja terminująca (termination sequence) — sekwencja DNA znajdująca się na końcu transkrypcyjnej jednostki, która sygnalizuje koniec transkrypcji

Shotgunning — patrz: bank genów

Splicing — 1. gene splicing — procedura, w wyniku której następuje połączenie jednej cząsteczki DNA z inną; 2. RNA splicing — usuwanie z mRNA intronów i wiązanie ze sobą eksonów

spm — gen, który powoduje supresję (sp) i mutację (m) niestałych mutabilnych genów

Supresja tRNA (tRNA suppressor) — mutacja w genie tRNA, która zmienia sekwencję antykodonu na sekwencję komplementarną do kodonu terminującego; powoduje to supresję terminacji łańcucha aminokwasów (mutacja non-sensowna)

T-DNA — przeniesiony DNA obecny w transformowanych komórkach

Technika Southerna (Southern blot technique) — metoda przenoszenia fragmentów DNA, które rozdziela się metodą elektroforezy żelowej (agarozowej) i przenosi na filtr nitrocelulozowy; pozycje fragmentów DNA na filtrze są identyczne z pozycjami na żelu; DNA jest zwykle uwidaczniany dzięki hybridacji z ^{32}P DNA lub próbką RNA

Transdukcja (transduction) — przeniesienie materiału genetycznego z jednej komórki do innej przez wektor wirusowy (dla bakterii wektorem jest bakteriofag)

Transfekcja (transfection) — infekcja komórek wyizolowanym z wirusa lub wektora wirusowego DNA lub RNA

Transfekcja ostra (acute transfection) — krótkoterminowa infekcja komórek DNA

Transformacja (transformation) — wprowadzenie egzogenego DNA (czynnika transformującego) do komórki

Transpozaza (transposase) — enzym biorący udział w procesie transpozycji

Transpozon (transposon) — czynnik ulegający transpozycji

Transpozycja (transposition) — przemieszczenie z jednego miejsca w genomie w inną pozycję

Transwersja (transversion) — mutacja spowodowana zastąpieniem pirymidyny przez purynę lub odwrotnie

V_H — zmienna część ciężkiego łańcucha immunoglobuliny

Wektor (vector) — cząsteczka DNA mogąca autonomicznie replikować się w komórce; do tej cząsteczki może być eksperymentalnie włączony inny fragment DNA w celu spowodowania replikacji tego fragmentu

Zmiana klasy (class switch) — zmiana w ekspresji limfocytów B powodująca przełączenie się ekspresji z jednej klasy przeciwciał na drugą

opracowała Alina Dzwonkowska

RECENZJE

P. T. MARSHALL i G. M. HUGHES, *Physiology of mammals and other vertebrates*.

Wydanie drugie, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.

Autorzy książki są stosunkowo dobrze znanymi naukowcami i pełnią odpowiedzialne funkcje na wyższych uczelniach w Anglii. P. T. Marshall jest dyrektorem wydziału biologii Leys School w Cambridge, G. M. Hughes natomiast jest profesorem zoologii w Uniwersytecie Bristolskim. Pierwsze wydanie tej książki ukazało się w 1965 r. i doczekało się aż trzech wydań. W 1967 r. dwa wznowienia poprawione oraz w 1972 r. Obecne wydanie jest znacznie rozszerzone, co jest w pełni zrozumiałe mając na uwadze dość odległy termin pierwszego wydania (15 lat) oraz narosłą w tym okresie wiedzę o biologii zwierząt. Rozwijająca się ona dzięki takim dyscyplinom naukowym jak: biologia komórki, biochemia i biologia molekularna. Czytelnik znajdzie zatem w niniejszym wydaniu bardzo poszerzone rozdziały dotyczące zagadnień homeostazy i koordynacji. W sposób pełniejszy potraktowali autorzy również rozdziały dotyczące reprodukcji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że autorzy dzieła świadomie zrezygnowali z posługiwania się ograniczonymi już przykładami z fizjologii rekina czy żaby i sięgnęli do bogatej teki, która zawiera wiele cennych informacji z dziedziny fizjologii również ryb i ptaków.

Całość książki została podzielona na 12 rozdziałów, których nie sposób omówić szczegółowo na łamach tej recenzji, zwłaszcza że podział ten jest charakterystyczny dla większości podobnych wydań fizjologii ogólnej. Każdy z rozdziałów został podzielony na podrozdziały, a ten z kolei na części. Całość zamyka indeks. Charakterystyczną cechą książki jest obecność dużej ilości rycin anatomicznych części organizmu lub narządów kręgowców. Ponadto schematyczne przedstawienia tkanek i komórek, które są podłożem opisywanych zjawisk fizjologicznych. Ten sposób wzbogacenia rozdziałów książki fizjologicznej, wiadomościami

anatomohistologicznymi narzuca jej piętno podręcznika biologii ogólnej. Nie jest to zresztą jedyny rys charakterystyczny odpowiedzialny za to wrażenie. Autorzy w pierwszych rozdziałach serwują czytelnikowi pokazną porcję podstawowych wiadomości z chemii związków organicznych; cukrów, tłuszczów, białek itd., zakładając tym samym jego całkowitą ignorancję w tej materii. A nawet gdyby tak było, to np. z opisów i rycin odnoszących się do struktury białek czytelnik niewiele się dowie. Autorzy dość dowolnie tłumaczą pochodzenie różnych symboli stosowanych w histologii już w XIX w. Na przykład prążek H, dzielący pasmo A w sarkomerze opisują jako rzekomo pochodzące od niemieckiego „Heller” = jaśniejszy. Jest to całkowicie błędne, gdyż symbol ten jest skrótem nazwiska Hensena, odkrywcy tej struktury, wprowadzony przez Enghlemanna w 1873 r. Podobne wypaczenie wprowadza niepotrzebne zamieszanie w umysłach studentów, którzy w wielu przypadkach bezkrytycznie wierzą w „prawdy” zawarte w ładnie wydanej i drogiej książce. Dużym moim zdaniem mankamentem jest całkowite pominięcie nazwisk odkrywców i badaczy, którym zawdzięczamy, a autorzy tej książki również, znajomość procesów życiowych naszego organizmu. Decyzja tak bezosobowego przedstawienia treści wybitnie zubożyła zawartość książki i tym samym zaszeregowała ją do klasy książek na poziomie szkoły średniej. Nie sposób jest również nie wytknąć braku literatury pomocniczej oraz pominięcia źródła wielu tabel, wykresów i rycin, którymi autorzy bogato i instruktywnie ilustrują tekst poszczególnych rozdziałów. Konkludując, jest to podstawowy podręcznik, który wprowadzić może kandydatów na studia biologiczne, rolnicze względnie medyczne w podstawowe wiadomości z fizjologii kręgowców. Może również stać się pożyteczną pozycją w ręku krytycznego i dobrze już znającego biologię nauczyciela szkoły średniej lub asystenta, może służyć jako źródło prostych schematów i rycin do ilustrowania wykładu lub lekcji.

Wincenty Kilarski

I. McCONNELL, A. MUNRO i H. WALDMANN, *The Immune System. A Course on the Molecular and Cellular Basis of Immunity.*

Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1981.

Książka ta ukazała się po raz pierwszy w 1975 r. W latach 1976 i 1978 była wznawiana w języku angielskim, a w 1979 r. pojawiło się jej tłumaczenie włoskie. W 1981 r. wydano drugą, zmodyfikowaną wersję tego podręcznika, uwzględniającą najnowsze osiągnięcia z dziedziny

immunogenetyki i immunocytoлогии, rzutujące na zrozumienie szeregu procesów immunologicznych.

Książka adresowana jest do czytelników zaznajomionych z podstawami immunologii. Z myślą o osobach mniej zaawansowanych autorzy umieścili na końcu podręcznika niewielki słowniczek, obejmujący 136 terminów często powtarzających się w tekście, a główne działy poprzedzili przystępnym wprowadzeniem. Tym niemniej pozycję tę mogą w pełni wykorzystać i docenić jedynie osoby o przygotowaniu fachowym.

Książka składa się z trzech działów: I. Drobiny i geny (6 rozdziałów), II. Immunologia komórkowa (wprowadzenie i 8 rozdziałów), III. Immunologia kliniczna (wprowadzenie i 5 rozdziałów). W dziale I została omówiona struktura, funkcja i zapis genetyczny trzech głównych zespołów białek uczestniczących w reakcjach obronnych ustroju: przeciwciał, układu dopełniacza i antygenów zgodności tkankowej. Duży nacisk autorzy kładą na ukazanie metod badawczych, których zastosowanie przyczyniło się do osiągnięcia współczesnego stanu wiedzy na temat wymienionych drobin i kodujących je genów. Tę samą zasadę stosują w pozostałych częściach książki. W dziale drugim można prześledzić, jak powstaje wiedza na temat interakcji komórkowych w reakcjach immunologicznych. Dużo miejsca poświęcono tu biologicznej funkcji głównego regionu zgodności tkankowej. Informacje o cząsteczkach i komórkach zaangażowanych w reakcje odpornościowe wykorzystane są w dziale trzecim dla wytłumaczenia (definitywnego czy też hipotetycznego) szeregu procesów znanych od dawna z praktyki klinicznej. Dział III traktuje o mechanizmach odporności, o niedoborach immunologicznych, autoagresji, powiązaniu jednostek chorobowych z systemem HLA, oraz o przeszczepach tkanek i narządów. Układ książki jest zatem niezwykle logiczny, jednak trudny dla początkujących.

Książka zawiera niezwykle starannie opracowany materiał ilustracyjny: liczne doskonałe schematy i przejrzyste wykresy oraz szereg fotografii preparatów z mikroskopu świetlnego i elektronowego.

„The Immune System” to niewątpliwie bardzo cenna pozycja fachowa dla immunologów.

Barbara Płytycz

Preliminary Announcement

THIRD INTERNATIONAL CONGRESS
ON CELL BIOLOGY

Under the Patronage
of the International Federation for Cell Biology

Sponsored by

Japan Society for Cell Biology

Supported by

Science Council of Japan (Tentative)

Japan Society for the Promotion of Science (Tentative)

KEIO PLAZA HOTEL CONFERENCE HALLS, TOKYO, JAPAN, 26-31 AUGUST 1984

The earlier congresses were held in Boston 1976 with 4200 participants and Berlin 1980 with 3200 participants

Executive Officers

Honorable President	Dr. K. Dan
President	Dr. S. Seno
Vice Presidents	Dr. N. Kamiya
„	Dr. Y. Okada
„	Dr. M. Yamada
Secretary General	Dr. T. Okigaki
Chairmen	
Program Committee	Dr. Y. Okada
Local Committee	Dr. H. Terayama
Finance Committee	Dr. O. Midorikawa

Congress Secretariat

Shigei Medical Research Institute

2117 Yamada, Okayama, 701-02

JAPAN

Tel. 0862-82-3113

0862-82-6332

Mailing Address

Japan Convention Services, Inc.,

Nippon Press Center Bldg.

2-1, Uchisaiwai-cho 2-chome,

Chiyoda-ku, Tokyo 100
JAPAN
Tel. 03-508-1211

Official Travel Agents

Japan Travel Bureau
1-13-1, Nihombashi, Chuo-ku, Tokyo 103
JAPAN

Meon Group Travel
Petersfield, Hampshire
ENGLAND GU32 3JN

Official Air Carrier

Japan Air Lines

I N F O R M A T I O N

SCHEDULED DATES

Sunday, 26 August, 1984
Registration, Opening Ceremony and Reception
Monday, August 27, 1984 to Friday, August 31, 1984
Scientific Sessions, Social Activities, Get Together
Party and Closing Ceremony

PRE AND POST CONFERENCE SATELLITE MEETINGS

There will be ample dates for holding satellite or small meetings featuring special topics in depth before and after the conference. Those of you who wish to organize satellites, please contact the Congress Secretariat.

SOCIAL ACTIVITIES

A complete program of social events will be arranged for participants, their families and guests. The Opening Ceremony will be open to all participants followed by a Get Together Party at the Congress site, Keio Plaza Hotel.

REGISTRATION AND HOTEL ACCOMMODATION

Congress registration and hotel accommodation forms will be distributed to you in the middle of 1983 as the second circular to members of IFCB. If you do not belong to your national or federal society and wish to participate the Congress, you should notify the Congress Secretariat.

Accommodation will be reserved in advance at advantageous rates at a number of hotels in various price categories within easy walking distance to the Keio Plaza Hotel. Arrangement to make more economical accommodations especially for young scientists is under preparation. Full information will be circulated later.

SCIENTIFIC PROGRAM (Tentative)

GENERAL

The scientific program will be a mixture of plenary lectures, symposia and workshops with invited speakers, poster demonstrations and oral presentation sessions. While maintaining the customary breadth of subject matter, we hope to give special attention to the growth areas in Cell Biology.

Participants wishing to contribute a paper will be asked to submit an abstract on the official form, copies of which will be distributed in 1983. The official language of the Congress will be English.

PUBLICATION

Each delegate will receive a Book of Abstracts on registering at the Congress. The Proceedings of the Congress will be published in both hard and soft cover form about 5 months after the end of the Congress.

LOCATION

ABOUT TOKYO

The most populated capital city in the world with a mixture of oriental and occidental tastes, Tokyo had been misunderstood as the most expensive town to live or stay in. This is not true anymore. You now find hotel accommodations and food prices are rather less expensive than in many American and European cities. In fact, organizers of recent international congresses held in Tokyo were surprised by the number of participants from abroad that far exceeded their expectation. In this world's largest city, you will still discover small shops, narrow alleys and typical crafts and professions where they maintain the influence of the Shogun period.

ABOUT SHINJUKU DISTRICT

Tokyo as usual of metropolis has several downtowns, each with its own unique flavor. Shinjuku is one of the latest development with skyscrapers, department stores, and a variety of economical spots for shopping and dining. Since the district is new, and attracts the younger generation, Shinjuku is called „A town for youth.”

ABOUT KEIO PLAZA HOTEL

The hotel is located in the new metropolitan center Shinjuku, an area of towering buildings with open green spaces. Occupying an entire block of the center, the 47 story Keio Plaza Hotel has 1,500 deluxe rooms, 30 restaurants and bars. The combination of Main Building and Annex, Conference facilities are available for over 4,000 participants. A Plaza for people to meet, to talk, it is a City within a City.

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 200 zł, półrocznie 100 zł

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada, na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:
BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	131
H. HÜBNER i A. K. KONONOWICZ — Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota. I. Struktura chromatyny	133
H. HÜBNER, A. DZWONKOWSKA i R. OSIECKA — Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota. II. Struktura genów	149
M. SCHMIDT — Replikacja DNA w komórce eukaryotycznej	177
M. KWIATKOWSKA — Zmiany struktury jądra a jego aktywność replikacyjna i transkrypcyjna w przebiegu cyklu komórkowego	199
F. WACHTLER — On the identification of active nucleolus-organizing regions (NOR) in interphase	235
M. J. OLSZEWSKA — Heterochromatyna w genomie roślin	243
A. KLECZKOWSKA — Warianty strukturalne chromosomów człowieka. I. Polimorfizm prążków C	259
P. S. SYSA — Polimorfizm chromosomów zwierząt domowych	271
M. ŚWITOŃSKI — Polimorfizm kariotypów u niektórych gatunków z rodziny <i>Canidae</i>	297
J. JAGIELSKI, O. HAUS i L. NOGA — Komputerowa analiza i klasyfikacja chromosomów człowieka	307
Przemieszczające się geny jako czynniki ewolucji? (M. J. OLSZEWSKA)	331
Propozycje polskiego mianownictwa niektórych terminów z zakresu genetyki molekularnej (A. DZWONKOWSKA)	335
Recenzje	341