

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 12 - NR 1**

**1985 (1-120)**

# **Postępy Biologii Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>



Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

#### Redakcja

redaktor naczelny — Jerzy KAWIAK  
zastępcy — Wincenty KILARSKI, Jan MACHEJDA, Maria OLSZEWSKA  
sekretarz — Maciej KAWALEC

#### Rada Redakcyjna

przewodniczący — Zofia OSUCHOWSKA  
sekretarz — Maciej KAWALEC  
członkowie — Jadwiga ACKERMAN, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,  
Aleksander KOJ, Włodzimiera KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,  
Aleksandra PRZYŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

#### Adres Redakcji

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

---

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 540 + 100 egz. Ark. wyd. 10,25. Ark. druk. 7,5. Papier druk. sat. kl. III, 60 g,  
70 × 100 cm. Oddano do składania 11 XII 1984 r. Podpisano do druku w marcu 1985 r. Druk  
ukończono w marcu 1985 r. Zam. 532/84. Cena zł 100,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## KOORDYNACJA OSCYLACYJNEJ AKTYWNOŚCI SKURCZOWEJ W PLAZMODIUM ŚLIZOWCA *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

### COORDINATION OF THE OSCILLATING CONTRACTILE ACTIVITY IN PLASMODIUM OF *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Joanna KOŁODZIEJCZYK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

*Streszczenie.* Przedstawiono rozwój poglądów na temat przestrzennej i czasowej organizacji i koordynacji procesów skurczowych w plazmodium śluzowca *Physarum polycephalum*. Omówiono próby wyjaśnienia źródła synchronizacji fazowej oscylacyjnej aktywności skurczowej w migrującym plazmodium, a także rolę strefy czołowej i sieci żył w wytwarzaniu siły napędowej oraz w sterowaniu lokomocją.

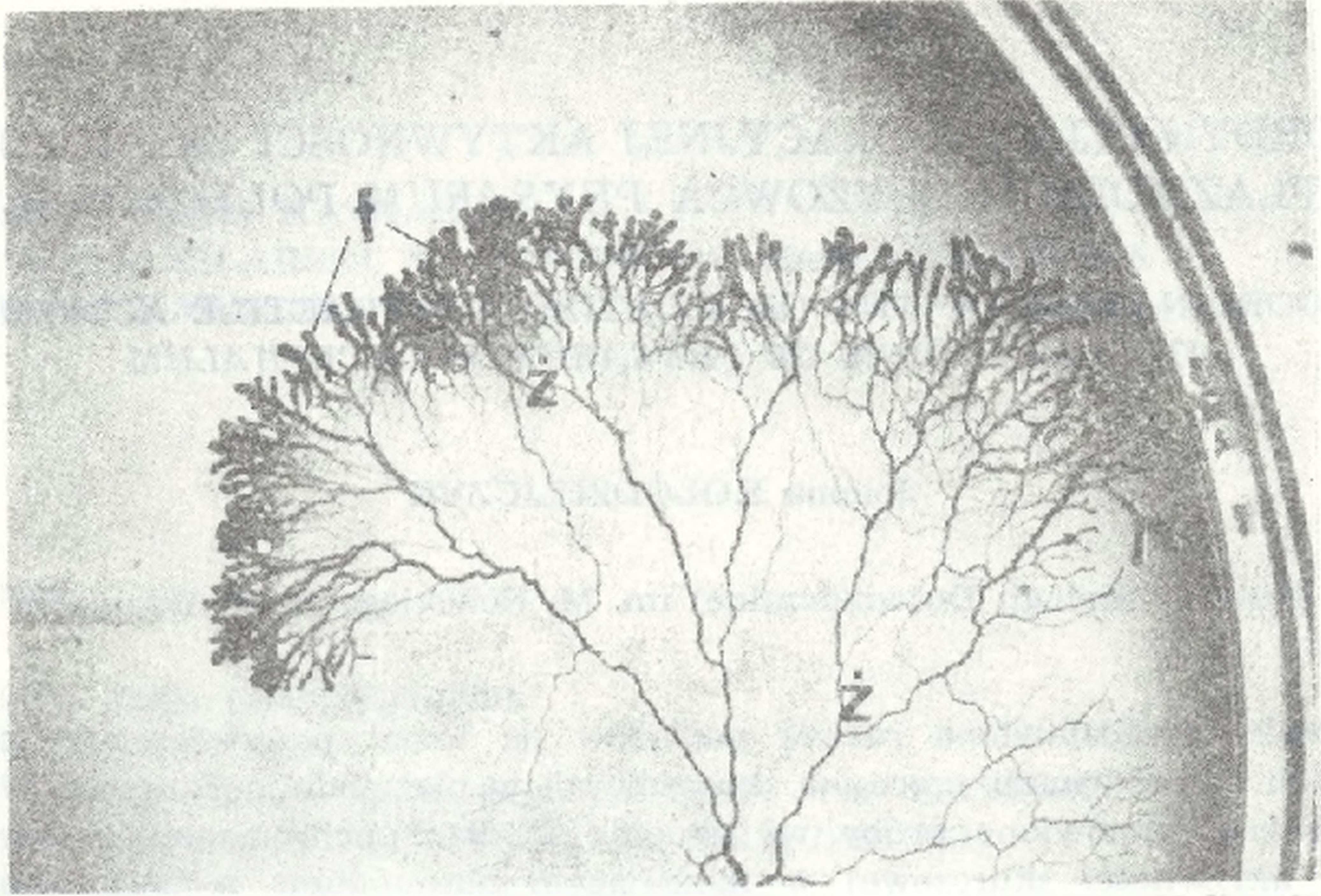
*Summary.* The evolution of views on the spatial and temporal organization and coordination of contractile activity in plasmodia of the slime mould, *Physarum polycephalum* is presented. The first attempts to explain the source of the phase synchronization of contraction oscillations in a migrating plasmodium are reviewed. The role of the frontal zone and the vein's network in generating the motive force and in steering locomotion is discussed.

#### WSTĘP

Wegetatywne stadium śluzowca *Physarum polycephalum* przybiera formę bezkomórkowej, wielojądrowej masy protoplazmy o powierzchni pokrytej błoną plazmatyczną i warstewką śluzu. Plazmodium zróżnicowane jest pod względem morfologicznym i funkcjonalnym. Wyróżnić w nim można dwa główne obszary: front plazmodium, zwany też czołem, stanowiący gruby, przeważnie wachlarzowaty płat ciągłej protoplazmy, oraz znajdującą się za tym obszarem strefę anastomozujących żył plazmodialnych [35, 49, 60]. Podział ten jest jednak dość względny, gdyż obszar zbudowany z ciągłej warstwy protoplazmy za frontalną krawędzią plazmodium nie jest jednolity, lecz poprzecinany siecią drobnych strumyków protoplazmatycznych. Strumyki płyną dość stałymi kanała-



mi, które jednak nie są jeszcze żyłami plazmodialnymi, gdyż ściany ich nie są całkowicie zróżnicowane i wyodrębnione od kanałów sąsiednich. Nie tworzą więc one ażurowej sieci oddzielnych żył, jaka powstaje w starszych częściach migrującego śluzowca, ale przejście między strefą kanałów czołowych i strefą sieci żył jest całkowicie płynne (ryc. 1).



Fot. M. Cieślawska

Rys. 1. Plazmodium *Physarum polycephalum* migrujące po podłożu agarowym

f — front plazmodium, ż — sieć żył

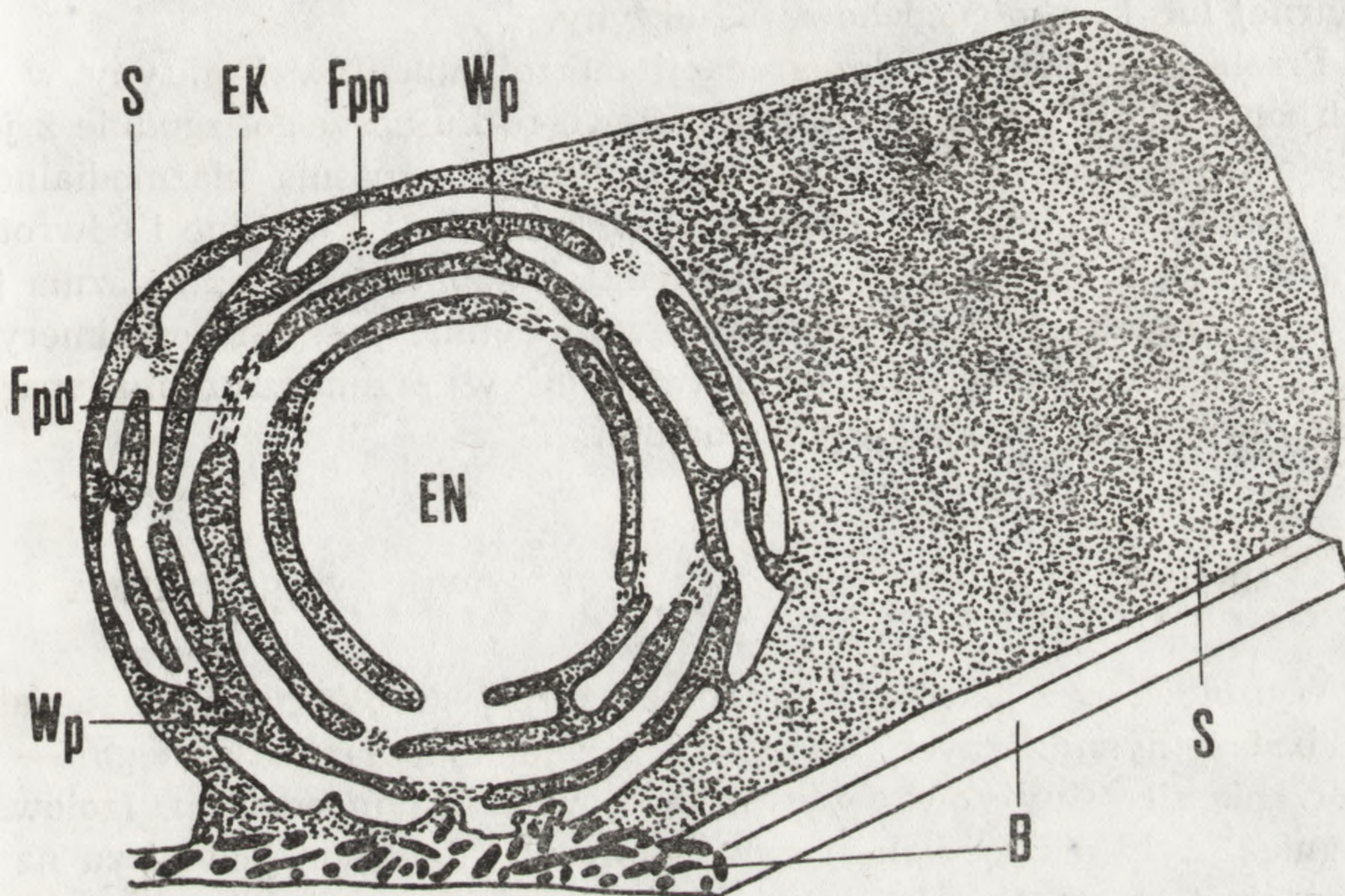
Plazmodium śluzowca ma zdolność ukierunkowanej migracji po podłożu. Bezpośrednią przyczyną lokomocji jest przepływ protoplazmy w plazmodium. Ruch protoplazmy w żyłach i na terenie strefy frontальной jest przykładem przepływu wahadłowego [25, 45, 46]. Polega on na przemieszczaniu się płynnej w stanie solu endoplazmy w kanałach tworzonych przez zżelifikowane ściany żył, a cechą charakterystyczną tego ruchu są okresowe zmiany kierunku i prędkości przepływu (skierowanego z tylnych obszarów plazmodium ku jego frontowi i odwrotnie). Zmiany kierunku przepływu zachodzą regularnie w rytmie minutowym, ze średnią okresowością 1,47 min [18].

Uważa się powszechnie, że endoplazma płynąca w plazmodium sama zachowuje się biernie. Jej przepływ zachodzi wskutek różnic ciśnienia hydrostatycznego między poszczególnymi obszarami plazmodium, a wywołany jest rytmicznymi skurczami ektoplazmatycznych ścian żył [25, 27]. W ścianach żył plazmodialnych znajduje się układ aktomiozynowych elementów kurczliwych, makro- i mikrofilamentów, których ułożenie i wzajemne przesunięcia odpowiedzialne są za skurcze żył i przepływ protoplazmy w plazmodium śluzowca [4, 5, 28, 40, 52].



## ORGANIZACJA APARATU KURCZLIWEGO CYTOPLAZMY ŚLIZOWCA

Do lepszego poznania struktury i dynamiki sieci fibryl w plazmodium oraz do odkrycia molekularnej podstawy skurczu żył przyczyniły się w ogromnej mierze badania na poziomie mikroskopii elektronowej. Pierwszych obserwacji struktur fibrylarnych w ścianach żył plazmodialnych w mikroskopie elektronowym dokonał Wohlfarth-Bottermann [54]. W ścianach plazmodialnych żył wykryto obecność fibryl ułożonych okrężnie, radialnie i wzdłużnie [58] (ryc. 2). Sieć fibryl w plazmodiach



Rys. 2. Schemat struktury pasma plazmodialnego z kultury hodowanej na bibule filtracyjnej

S — warstwa śluzu, EK — ściana ektoplazmatyczna, EN — kanał endoplazmatyczny,  $F_{pp}$  — fibryle w przekroju poprzecznym,  $F_{pd}$  — fibryle w przekroju podłużnym,  $W_p$  — wpuklenia plazmalemy, B — bibuła filtracyjna (podłoże), wg Wohlfarth-Bottermann [74]

składa się z cienkich filamentów F-aktynowych o średnicy 60-80 Å. Mechanizm skurczu w ektoplazmie polega na zwiększonym zachodzeniu na siebie filamentów F-aktyny poprzez ślizganie się ich po oligomerycznych, dwubiegunowych cząsteczkach miozyny. Te właśnie przesunięcia mikrofilamentów powodują powstawanie różnic ciśnienia hydrostatycznego we wnętrzu żył, a co za tym idzie odpowiedzialne są za przepływy protoplazmy manifestujące się jej regularnym ruchem wahadłowym [4, 5, 28, 40, 52]. A więc przepływ protoplazmy jest zjawiskiem, u podstaw którego leżą mechanizmy biochemiczne bardzo podobne do tych, które wywołują skurcze mięśni.

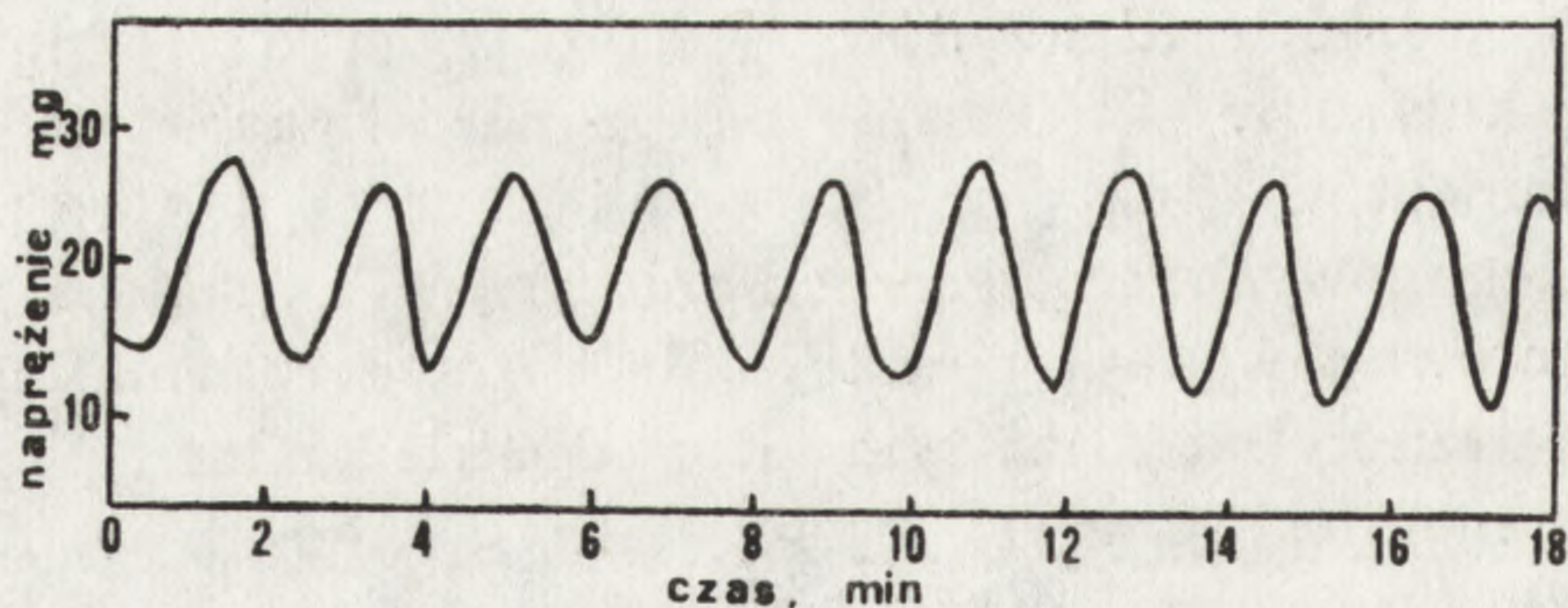


Cechą charakterystyczną plazmodialnego układu fibrylarnego jest jego niestały, labilny charakter, wpływający z efemerycznej struktury białek kurczliwych śluzowca. Zmienność aktyny plazmodialnej polega na jej dynamicznych zdolnościach do ulegania częstym i powtarzalnym przekształceniom:  $G \rightleftharpoons F$ -aktyna. Związane to jest z rolą aktyny w układzie ruchowym śluzowca, która wymaga od tego białka nie tylko przekształcania energii chemicznej w pracę mechaniczną, a więc wytwarzania siły napędowej dla ruchu plazmodium, ale też przemieszczania się w żyłach na duże odległości (do 10 cm), co możliwe jest tylko w formie globularnej lub krótkołańcuchowej G-aktyny.

Przebieg agregacji i dezagregacji mikrofilamentów F-aktyny w żyłach zmienia się podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego, zgodnie z jego kolejnymi fazami, i jest związany z dynamiką pasma plazmodialnego. Przekształcenia globularnej G-aktyny w fibrylarną F-aktynę i odwrotnie związane są z cyklicznymi przemianami endoplazma — ektoplazma [12, 19, 63], zachodzącymi w żyłach śluzowca. Polimeryzacja i depolimeryzacja aktyny są podstawowymi zjawiskami w przemieszczaniu aparatu skurczowego i w lokomocji plazmodium.

#### METODY BADAŃ AKTYWNOŚCI SKURCZOWEJ ŻYŁ ŚLUZOWCA

Wyizolowany z plazmodium odcinek żyły jest doskonałym materiałem do badań dynamicznych właściwości żelu cytoplazmatycznego — do mierzenia siły skurczowej wytwarzanej w badanym odcinku. Izolowany fragment żyły plazmodialnej, zawieszony w wilgotnym powietrzu na ramionach tensjometru, kurczy się i rozkurcza rytmicznie. Pozwala to na dokonanie dynamicznej charakterystyki pasma poprzez mierzenie skurczu izometrycznego i skurczu izotonicznego [26]. Pomiar w reżimie izometrycznym polega na określaniu spontanicznych zmian naprężenia ścian żyły przy jej stałej długości (ryc. 3). Natomiast pomiary izoto-



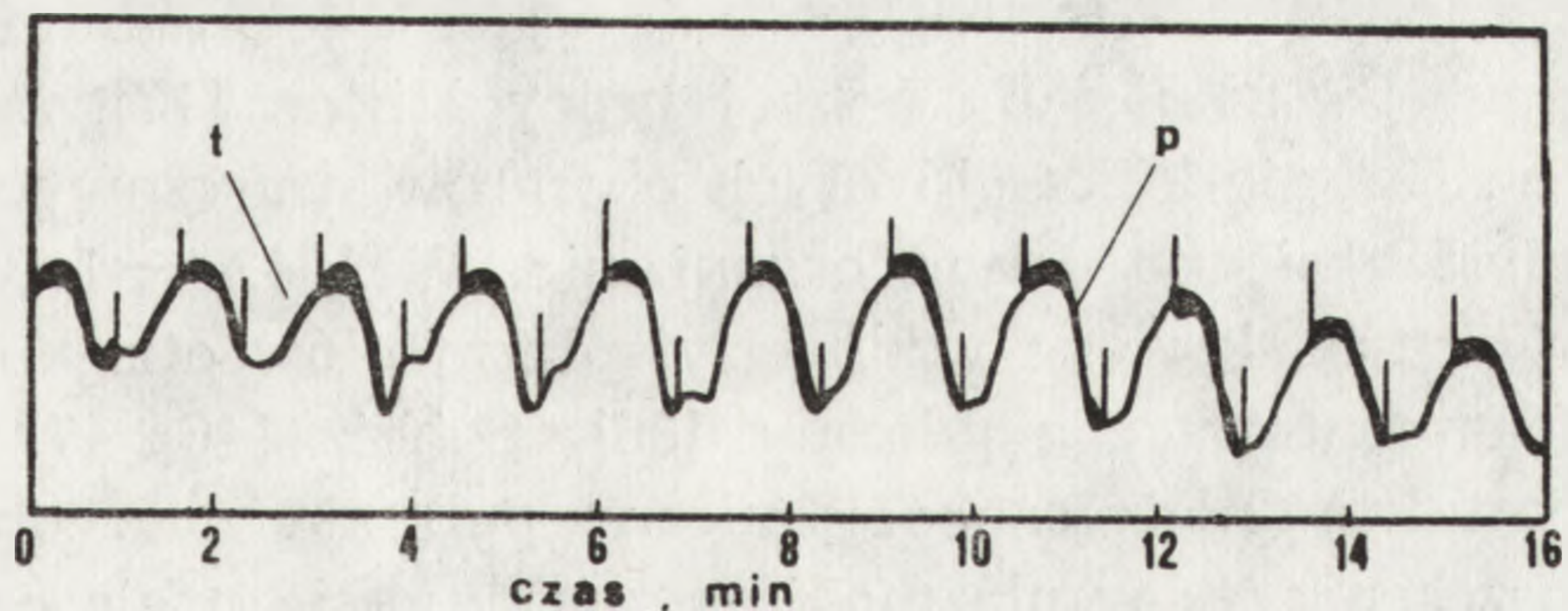
Rys. 3. Naprężenie izometryczne pasma śluzowca izolowanego z plazmodium i zawieszony na tensjometrze (wg Takeuchi, Yoneda, 1977)



niczne opierają się na badaniu spontanicznych zmian długości pasma przy stałym naprężeniu badanego odcinka. Tak więc badania izolowanych fragmentów żył plazmodialnych wykazały okresowy charakter zmian naprężenia tych żył oraz ich długości, a także umożliwiły pomiar siły skurczu, którego maksymalną wartość oceniono na  $50 \text{ g/cm}^2$  [26]. Stwierdzono też ścisły związek między okresowymi, cyklicznymi zmianami stanu cytoplazmatycznej F-aktyny a fazą skurczu bądź rozkurczu izometrycznego [62].

Metodę tensjometryczną dostosowano także do badań *in situ*, bez izolowania żyły z macierzystego plazmodium. Wykazano w ten sposób, że w żyłę przylegającej do podłoża wzdłuż głównej osi jej kanału zachodzą okresowe zmiany naprężenia, oraz że skurcz izometryczny pasma ma charakter radialny, tzn. wyraża się w okresowych zmianach średnicy żyły, czyli w jej pulsacji. Współistnienie wzdłużnej i radialnej składowej skurczu zgodne jest z topografią układu fibrylarnego żyły plazmodialnej [57] (por. ryc. 2).

Oprócz badań tensjometrycznych, określających siłę skurczu pasm plazmodialnych, wyraźny obraz przebiegu kolejnych cykli skurczowo-rozkurczowych żył daje też metoda fotometryczna. Opiera się ona na tym, że zmiany średnicy pulsującej żyły związane są z oscylacjami jasności jej wnętrza. Na odpowiednie sygnały świetlne reaguje fotokomórka połączona z rejestratorem. Fotokomórkę można przystosować bezpośrednio do mikroskopu, lecz częściej rejestruje się za jej pomocą zmiany jasności wybranych pól na ekranie telewizyjnym [31] lub na ekranie projekcyjnym, po uprzednim sfilmowaniu badanego materiału [14]. Otrzymane w ten sposób krzywe pulsacji żyły obrazują wiernie kolejne cykle pulsacji, a przy zastosowaniu dodatkowej aparatury można jednocześnie na krzywych pulsacji rejestrować zmiany kierunku przepływu endoplazmy w żyłę (ryc. 4) [31]. W przeciwieństwie do techniki



Rys. 4. Krzywa pulsacji żyły plazmodialnej w nienaruszonym plazmodium, otrzymana metodą fotometryczną

p — przedni kierunek przepływu endoplazmy w żyłę, t — tylny kierunek przepływu endoplazmy (wg Kołodziejczyk, Grębeckiego 1982)



tensjometrycznej, metodą fotometryczną nie rejestrujemy samego skurczu, lecz jego wtórne następstwa — zmiany jasności obrazu wynikające ze zmian wymiarów geometrycznych żyły. Choć cykliczny przebieg otrzymanych krzywych odzwierciedla dokładnie rytmikę aktywności skurczowej, to ich amplitudy nie mogą być miarą siły skurczu. Trzeba też pamiętać, że rejestrowane zmiany grubości żyły mogą zależeć nie tylko od miejscowej aktywności skurczowej badanego odcinka, ale w pewnym stopniu także od ruchów endoplazmy, powodowanych skurczami innych okolic plazmodium. Metoda fotometryczna ma też pewne zalety w porównaniu z tensjometryczną. 1. Nie wymaga oddzielenia badanego fragmentu od reszty plazmodium i od podłoża. 2. Sam proces rejestracji nie może w niczym wpłynąć na przebieg rejestrowanego zjawiska. 3. Gdy stosuje się ją do materiału uprzednio sfilmowanego, można powtarzać rejestracje w różnych punktach obrazu przy kolejnych projekcjach i uzyskiwać synchroniczne zapisy skurczów zachodzących równocześnie w rozmaitych okolicach plazmodium [14].

Do analizy cyklicznej aktywności skurczowej śluzowca metodą fotometryczną używano także spektrofotometru [41] oraz densytometru [6]. Na podobnej zasadzie oparta jest także metoda zapisu radialnej aktywności skurczowej żył *in situ* przy użyciu miniaturowych emiterów i czujników podczerwieni [42].

#### PLAZMODIUM ŚLUZOWCA JAKO UKŁAD POLIRYTMICZNY

Przestrzenny przebieg procesów skurczowych w plazmodium śluzowca od dawna był tematem wielu badań. We wczesnych koncepcjach przyjmowano model wielorytmiczności śluzowca. Model ten obowiązywał przez blisko siedemdziesiąt lat, a poszczególne hipotezy oparte na jego założeniach w różny sposób interpretowały to zjawisko.

Pierwsze dane charakteryzujące migrujące plazmodium jako organizm polirytmiczny zamieścił w swej pracy Hilton [17]. Według niego w plazmodium istnieje kilka głównych obszarów skurczowych, z których skurcze rozchodzą się po całym organizmie. W 1942 r. Lewis opisywał spontaniczne centra aktywne wzdłuż żył plazmodiów otrzymanych z izolowanych fragmentów protoplazmy [36]. Seifriz [46, 47] obserwował w plazmodium trzy niezależne rytmiczne pulsacje i na obserwacji tej oparł przypuszczenie, że w plazmodium znajduje się wiele centrów skurczowych, niezależnie od siebie wytwarzających rytmy pulsacji.

Kolejnym zwolennikiem hipotezy wielorytmiczności plazmodium śluzowca był Kamiya [23, 24]. Na podstawie analizy dynamoplazmogramów, tzn. krzywych okresowego przebiegu zmian siły napędowej w czasie,



twierdził, że ich pozornie dowolny i odbiegający od sinusoidy przebieg można wyjaśnić nakładaniem się dwóch lub więcej oscylacji prostych. Świadczyć to miało według Kamiyi o istnieniu w plazmodium licznych miejsc skurczowych. Opierając się na tych obserwacjach Kamiya wysunął hipotezę, według której plazmodium śluzowca jest układem polirytmicznym, w którym istnieje wiele koegzystujących ze sobą ognisk pobudzenia skurczowego, będących źródłami rytmów o różnych okresach [25].

Koncepcja wielorytmiczności plazmodium *Physarum polycephalum* sformułowana przez Kamiyę była w swych ogólnych zarysach powszechnie przyjmowana przez wiele lat. Różni jej zwolennicy powielali ją, wprowadzając nieznaczne tylko zmiany. Na przykład Jahn i jego współpracownicy [20-22] przypisywali ogólną aktywność skurczową plazmodium wielokrotnej interakcji licznych oddzielnych centrów skurczowych. Te hipotetyczne aktywne regiony o zmiennym położeniu geometrycznym, będące źródłem lokalnych skurczów, nazywali „origins”. Powstawanie tych centrów aktywnych wiąźali z powstawaniem i hydrolizą ATP w plazmodium.

Powstała równolegle koncepcja Stewarta [48] opierała się na podobnych założeniach, tylko w miejsce stosowanego przez poprzednich autorów pojęcia „origins” wprowadzała inne — „sources”.

Również w ostatnich latach hipoteza polirytmiczności przyjmowana była przez niektórych badaczy. Między innymi Durham i Ridgway [11] oraz Winfree [53] traktowali plazmodium jako populację luźno ze sobą powiązanych oscylatorów.

#### KONCEPCJA FALOWEGO CHARAKTERU AKTYWNOŚCI SKURCZOWEJ

Pewną liczbę zwolenników zdobyła sobie hipoteza o falowym charakterze aktywności skurczowo-rozkurczowej w plazmodium. Seifriz [44, 47], Kishimoto [30], Stewart [48] i Rhea [40] twierdzili, że kolejne skurcze i rozkurcze rozprzestrzeniają się w plazmodium w formie fal perystaltycznych. Rhea [40] uważał, że falowe rozchodzenie się skurczów i rozkurczów w plazmodium odbywa się w kierunku przeciwnym do migracji śluzowca, tzn. od strefy frontalnej ku tyłowi plazmodium. Zwolennikiem falowego rozprzestrzeniania się aktywności skurczowo-rozkurczowej był także Baranowski [7], aczkolwiek wyniki jego eksperymentów wskazywały na niezgodny z hipotezą Rhea kierunek rozchodzenia się fali skurczowo-rozkurczowej. Według Baranowskiego, kierunek rozprzestrzeniania się tej fali w plazmodium jest najczęściej zgodny z kierunkiem lokomocji organizmu. Nie jest to jednak reguła bezwzględna,



ponieważ obserwacje prowadzone na migrującym plazmodium wykazały, że fronty falowych zmian grubości ciągłej warstwy protoplazmy mogą wykazywać różną orientację w stosunku do kierunku migracji, a przebieg falowania bywa zmienny [6, 8]. Zjawisko rozchodzenia się falowych zmian grubości w strefie frontalnej plazmodium obserwowali też Cieślawska i Grębecki [9]. Do tej pory nie zanotowano podobnych zmian falowych w sieci żył plazmodialnych.

Można obecnie przypuszczać, że perystaltyka pojawia się w strefach granicznych między takimi obszarami plazmodium, które w sposób istotny różnią się między sobą częstotliwością oscylacji skurczowo-rozkurczowych. Durham i Ridgway [11] sugerowali, że różnice takie mogą powstawać pod wpływem miejscowego działania bodźców zewnętrznych. Gradienty bodźców (chemicznych lub cieplnych) oddziałujące na plazmodium mogą powodować powstawanie fal skurczowo-rozkurczowych. Fale takie miały powstawać w najkorzystniej położonych w stosunku do strefy działania bodźca obszarach plazmodium, które zarazem charakteryzowały się wyższą lokalną częstotliwością skurczowo-rozkurczową. Z tych obszarów fale miały rozprzestrzeniać się po całym organizmie.

Wyniki zgodne z koncepcją Durhama i Ridgwaya otrzymali też Hejnowicz i Wohlfarth-Bottermann [16]. Kierunek rozchodzenia się obserwowanych przez nich fal w plazmodium był przeciwny do kierunku oddziaływania czynnika przyciągającego, np. ciepła. Perystaltykę obserwowali między dwoma obszarami śluzowca, poddanymi działaniu różnych temperatur. Obszary te cechowały się dwoma różnymi, lecz jednorodnymi rytmami skurczowo-rozkurczowymi. Autorzy ci nie potwierdzili, jakoby na terenie plazmodium istniały odrębne centra aktywności skurczowej.

#### PLAZMODIUM ŚLUZOWCA JAKO UKŁAD MONORYTMICZNY

W latach sześćdziesiątych pojawiły się pierwsze głosy krytykujące traktowanie plazmodium śluzowca jako organizmu wielorytmicznego. Rozwój tensjometrycznych metod eksperymentalnych w zastosowaniu do śluzowca umożliwił przeciwstawienie się modelowi polirytmiczności plazmodium. Wohlfarth-Bottermann [55] i Teplov [51] udowodnili, że skurcz (a zarazem i oscylacje ciśnienia hydrostatycznego) zachodzi w każdym punkcie żyły, nie tylko w określonych centrach skurczowych. Również Korohoda i wsp. [33] twierdzili, że oscylatory rozmieszczone są w plazmodium wzdłuż całej sieci żył, a nie w określonych rejonach organizmu. Na poparcie swej tezy przytaczali fakt, że wielkość siły napędowej przepływu jest niezależna od długości żył plazmodialnych, a rytmy



okresowych zmian kierunku przepływu są oddzielne dla poszczególnych żył, nawet gdy są one ściśle ze sobą połączone [25].

Pod koniec lat siedemdziesiątych, w miarę dalszego rozwoju badań eksperymentalnych, zajmujących się plazmodium jako złożonym przestrzennym układem skurczowo-rozkurczowym, zaczęło przybywać danych przeciwko traktowaniu śluzowca jako organizmu polirytmicznego. Obserwacje Nagai i wsp. [39] po raz pierwszy dowiodły, że w izolowanej z plazmodium żyłe fazy cyklu skurczowo-rozkurczowego są wzdłuż niej zsynchronizowane. Wyniki wskazujące na istnienie synchronizacji rytmów skurczowo-rozkurczowych w prostym izolowanym pasmie plazmodialnym otrzymali następnie niezależnie: Yoshimoto i Kamiya [66], Krüger i Wohlfarth-Bottermann [35], Wohlfarth-Bottermann [60, 61] oraz Achenbach i Wohlfarth-Bottermann [2]. Uzupełnieniem ich badań było uzyskanie przez Takeuchi i Yoneda [50] synchronizacji rytmów w dwóch pasmach połączonych poprzez wzajemną fuzję. Również eksperymenty Moczoń i Grębeckiego [37, 38], przeprowadzone na izolowanych żyłach, wykazały, że dynamika profilów żył wskazuje na istnienie tego samego ogólnego rytmu skurczowo-rozkurczowego, a różne składowe skurczu żył (skurcze podłużne i okrężne) są zsynchronizowane w tym samym miejscu żyły.

Do ostatecznego odrzucenia hipotezy o polirytmiczności plazmodium śluzowca przyczyniły się wreszcie eksperymenty Grębeckiego i Cieślawskiej [14], przeprowadzone na całych, nie naruszonych migrujących plazmodiach. Wyniki tych badań potwierdziły uzyskane przez innych autorów obserwacje na izolowanych żyłach i pozwoliły na sformułowanie hipotezy, traktującej migrujące plazmodium w zupełnie inny sposób niż obowiązujące dotychczas koncepcje polirytmiczne. Według hipotezy Grębeckiego i Cieślawskiej [14], migrujące plazmodium jest „niedoskonale zsynchronizowanym monorytmicznym układem skurczowym”. Znaczy to, że na terenie całego plazmodium, oprócz wąskiej strefy frontalnej, przeważają oscylacje skurczowo-rozkurczowe o tej samej częstotliwości i fazie. A więc cały układ głównych żył plazmodialnych kurczy się jednocześnie, podczas gdy krawędź frontalna posuwa się naprzód [9, 10, 13, 14]. Ten punkt widzenia został następnie przyjęty i potwierdzony przez innych autorów [16, 29].

Przeważa zatem pogląd, że układ żył swobodnie migrującego śluzowca nie może zawierać żadnych uprzywilejowanych miejsc odgrywających rolę aktywnych lokalnych centrów skurczowo-rozkurczowych. Koordynacja przepływu między głównymi żyłami ma więc przypuszczalnie charakter monorytmiczny, a nie — jak sądzono dotychczas — polirytmiczny lub perystaltyczny.



PRÓBY WYJAŚNIENIA ŹRÓDŁA SYNCHRONIZACJI FAZOWEJ  
OSCYLACYJNEJ AKTYWNOŚCI SKURCZOWEJ

Przyjęcie modelu monorytmiczności plazmodium otworzyło nowy, nie rozwiązany dotychczas ostatecznie problem. Chodzi mianowicie o to, w jaki sposób osiągnana jest w plazmodium synchronizacja fazowa oscylacyjnej aktywności skurczowej i jaka jest natura nieznanego czynnika regulacyjnego.

Pierwsze eksperymenty, których celem było wyjaśnienie tego problemu, wskazywały, że nieprzerwany wahałowy przepływ endoplazmy jest niezbędnym i koniecznym warunkiem dla przenoszenia czynnika lub czynników powodujących synchronizację fazową aktywności skurczowej [2, 3, 35, 50, 67, 68]. Natomiast badania na temat charakteru i sposobu działania czynnika synchronizacyjnego początkowo dopuszczały różne możliwe sposoby regulacji fazowej. Wohlfarth-Bottermann [59] sugerował, że fizjologiczny zegar oscylatora uzależniony jest od temperatury. Regulacja fazowa w jego eksperymentach podtrzymywana była przez wzrost temperatury w granicach fizjologicznych, tolerowanych przez śluzowca (16-24°C). Achenbach i Wohlfarth-Bottermann [3] nie wykluczają istnienia w plazmodium układu regulacyjnego o podstawach biochemicznych, wypowiadając się jednocześnie przeciwko możliwości regulacji synchronizacji skurczów przez bioelektryczną aktywność błony [2]. Autorzy ci dowiedli, że synchronizację wywołuje przepływ endoplazmy. Zapewne nie chodzi tu jednak o przenoszenie chemicznego mediatora, ale o zmiany ciśnienia hydrostatycznego wewnątrz żył. Prowadzi to do hipotezy o mechanicznej regulacji synchronizacji skurczów, sformułowanej w sposób najpełniejszy przez Kesslera [29], według którego zmiany naprężenia ścian wywołane przepływem endoplazmy wpływałyby na wędrówkę jonów wapniowych przez błony w plazmodium. Różnice w miejscowym stężeniu wolnego wapnia powodowałyby zaś odpowiednią reakcję aktomiozyny ektoplazmatycznej.

Wiele prac opublikowanych ostatnio przez zespół Wohlfartha-Bottermanna [34, 64] oraz przez badaczy japońskich [43] przemawia za kompleksowym charakterem regulacji aktywności skurczowej w plazmodium śluzowca. Do utrzymania skurczów oscylacyjnych w plazmodium konieczne jest ATP, które powstaje w procesie glikolizy lub oddychania, lub też jednocześnie w obu tych procesach. Szybkość wytwarzania ATP zależy od tempa hydrolizowania tego związku przez kompleks białek kurczliwych oraz od dostępności substratów dla metabolizmu energetycznego. Jednocześnie aktywność ATP-azy regulowana jest przez dynamicznie zmieniającą się organizację strukturalną białek, na którą z kolei oddziałuje poziom wolnego wapnia w plazmodium. Wapń wpływa na



stan i funkcje białek kurczliwych bądź bezpośrednio, bądź też poprzez cykliczne nukleotydy, kalmodulinę oraz białka kontrolujące fibrylogenezę białek kurczliwych. Postuluje się więc, że aktywność ruchowa plazmodium ma charakter oscylacyjny wskutek działania sprzężeń zwrotnych między aparatem skurczowym, wapniowym układem regulacyjnym oraz metabolizmem energetycznym.

#### ROLA FRONTU PLAZMODIUM W BEHAWIORZE RUCHOWYM ŚLIZOWCA

Istotnym zagadnieniem dla pełnego wyjaśnienia działania plazmodium jako oscylacyjnego układu skurczowego jest rola strefy frontalnej w czasowo-przestrzennej organizacji zjawisk skurczowych u śluzowca. Front plazmodium jako obszar współdziałający z siecią żył, a zarazem najbardziej eksponowany na działanie bodźców zewnętrznych, wpływających na zjawiska ruchowe w całym plazmodium, odgrywa niewątpliwie bardzo istotną rolę w powstawaniu i rozprzestrzenianiu się aktywności skurczowo-relaksacyjnej śluzowca. Brak jest jednak pełnego obrazu roli strefy frontalnej w tych zjawiskach.

Yoshimoto i Kamiya [66, 68] przypisali frontowi plazmodium funkcję aktywnej generacji zjawisk skurczowych oraz odpowiedzialność za wahadłowy przepływ strumienia endoplazmy. W związku z tym twierdzą, że pulsacje żył w sieci plazmodialnej są bierne, tzn. oscylacje średnicy żył nie są przyczyną, ale następstwem przyływów i odpływów endoplazmy wywoływanych przez strefę czołową. Należałoby więc wyciągnąć stąd wniosek, że siła napędowa, odpowiedzialna za migrację całego plazmodium, wytwarzana jest wyłącznie w jego froncie.

Takie stanowisko nie znalazło jednak potwierdzenia w późniejszych badaniach na izolowanych żyłach, w których pomimo przerwania kontaktu ze strefą czołową utrzymują się synchroniczne rytmy skurczowo-rozkurczowe i niezmienny przepływ endoplazmy [1, 2, 35, 60, 61]. Także eksperymenty Kołodziejczyk i Grębeckiego [31], w których operacyjnie oddzielano żyłę główną plazmodium od jego frontu, całkowicie izolując obie te strefy, lecz pozostawiając je in situ (tzn. na pierwotnym podłożu), udowodniły, że zachowanie łączności żyły z czołem w plazmodium nie jest niezbędne do utrzymania oscylacyjnej aktywności skurczowej żył. A więc pulsowanie żył plazmodialnych nie może być biernym efektem aktywności strefy frontalnej, jak sądzili Yoshimoto i Kamiya, ale jest ono przejawem aktywności skurczowej samych żył.

Przeciwko traktowaniu frontu jako głównego źródła siły napędowej w plazmodium przemawiają także eksperymenty Grębeckiego i Cieślawskiej [15], które wykazały, że szybsze tempo ruchu progresywnego wy-



kazują krawędzie frontalne, które połączone są z większą liczbą żył plazmodialnych. Amputacja części połączeń czoła ze strefą żył zwalnia ruch przedniej krawędzi. Autorzy ci wykazali też, że segmenty frontalne, oddzielone od sieci żył, kontynuują migrację dopiero po częściowym odbudowaniu systemu żył. Wskazuje to, że siła napędowa lokomocji śluzowca powstaje w każdym miejscu, gdzie protoplazma jest zróżnicowana na warstwy ektoplazmatyczną i endoplazmatyczną, tzn. zarówno w sieci żył, jak też w kanalikach wyodrębnionych na terenie strefy frontальной — poza przednią krawędzią czoła [15].

Odrzucając hipotezę przyznającą strefie czołowej plazmodium monopol na wytwarzanie siły napędowej, nie można jednak odrzucać bardziej umiarkowanego poglądu, że front jest strefą koordynującą rytmikę zjawisk skurczowo-rozkurczowych, zachodzących na całym obszarze migrującego plazmodium. Wykazano, że choć np. oddzielenie żył od frontu nie wygasza ich pulsacji, to jednak powoduje zakłócenia w regularności ich cykli skurczowych oraz w regularności wahadłowych zmian przepływu endoplazmy [31]. Wiąże się to zapewne z tym, że front musi pełnić rolę strefy sterującej migracją całego plazmodium. Istotnie, eksperymenty, w których oddziaływano na front migrującego plazmodium dodatkimi i ujemnymi bodźcami świetlnymi pozwoliły stwierdzić, że strefa frontalna silniej niż sieć żył reaguje na działanie bodźców, a reakcja ta jest bardziej wybiórcza. Jednocześnie reakcja na bodźce nie ogranicza się jedynie do strefy bezpośrednio poddanej ich działaniu, a więc do czoła plazmodium, ale przenoszona jest na cały obszar śluzowca [32].

Tak więc strefa frontalna w migrującym plazmodium odgrywa niewątpliwie rolę sterującą w zjawiskach ruchowych, ale na obecnym etapie badań nie potrafimy jeszcze jej w pełni opisać i ocenić, w jakim stopniu i w jaki sposób front kontroluje i modeluje oscylacyjną kurczliwość żył w nienaruszonym plazmodium. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

#### LITERATURA

- [1] ACHENBACH U., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Mechanical and thermal methods of phase shifting for studying the nature of the synchronizing factor and its transmission, *J. Exp. Biol.* **85**: 21-31, 1980.
- [2] ACHENBACH U., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Synchronization and signal transmission in protoplasmic strands of *Physarum*. Effects of externally applied substances and mechanical influences, *Planta*, **151**, 574-583, 1981a.
- [3] ACHENBACH U., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Synchronization and signal transmission in protoplasmic strands of *Physarum*, *Planta*, **151**: 584-594, 1981b.



- [4] ALLERA A., BECK R., WOHLFARTH-BITTERMANN K. E., Weitreichende fibrillare protoplasmadifferenzierungen und ihre bedeutung fur die protoplasmastromung. VIII. Identifizierung der plasmafilamente von *Physarum polycephalum* als F-actin durch anlagerung von heavy meromiosin in situ, *Cytologie*, **4**: 437-449, 1971.
- [5] ALLERA A., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Weitreichende fibrillaire protoplasmadifferenzierungen und ihre bedeutung fur die protoplasmastromung. IX. Aggregationszustande des myosins und bedingungen zur entstehung von myosin filamenten in den plasmodien von *Physarum polycephalum*, *Cytobiologie*, **6**: 261-286, 1972.
- [6] BARANOWSKI Z., Svyaz volnovykh yavleniy s simgraciey plazmodia miksomitseta, [w] *Nemyshtchnyie Formy Podviznosti*, red. G. M. Frank, Akademia Nauk SSSR, Pushtchino 1976, 47-50.
- [7] BARANOWSKI Z., The contraction-relaxation waves in *Physarum plasmodium*, *Acta Protozool.*, **17**: 377-397, 1978a.
- [8] BARANOWSKI Z., Thickness changes and flow of endoplasm in frontal zones of *Physarum polycephalum* plasmodia, *Acta Protozool.*, **18**: 113-114, 1978b.
- [9] CIEŚLAWSKA M., GRĘBECKI A., Synchrony of contraction in freely migrating plasmodia of *Physarum polycephalum*, *Acta Protozool.*, **18**: 125-126, 1979a.
- [10] CIEŚLAWSKA M., GRĘBECKI A., Synchronal pulsation in plasmodia of *Physarum polycephalum*, [w] *Current Research on Physarum*, red. W. Sachsenmayer, Univ. of Innsbruck, Austria 1979b, 167-170.
- [11] DURHAM A. C. H., RIDGWAY E. B., Control of chemotaxis in *Physarum polycephalum*, *J. Cell Biol.*, **69**: 218-223, 1976.
- [12] FLEISCHER M., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Correlation between tension force generation, fibrillogenesis and ultrastructure of cytoplasmic actomyosin during isometric and isotonic contractions of protoplasmic strands, *Cytobiologie*, **10**: 339-365, 1975.
- [13] GRĘBECKI A., Organization of motory functions in amoebae and in slime moulds plasmodia, *Acta Protozool.*, **18**: 43-58, 1979.
- [14] GRĘBECKI A., CIEŚLAWSKA M., Plasmodium of *Physarum polycephalum* as a synchronous contractile system, *Cytobiologie*, **17**: 335-342, 1978.
- [15] GRĘBECKI A., CIEŚLAWSKA M., Motive force generation site in plasmodium of *Physarum polycephalum*: a dissection study, *Acta Protozool.*, w druku, 1984.
- [16] HEJNOWICZ Z., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Propagated waves induced by gradients of physiological factors within plasmodia of *Physarum polycephalum*, *Planta*, **150**: 144-152, 1980.
- [17] HILTON A. E., 1908, cytowane wg JAHN T. L., RINALDI R. A., BROWN M., *J. Queckett Microscop. Club*, **10**: 263, 1964.
- [18] HÜLSMANN N., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Spatio-temporal relationships between protoplasmic streaming and contraction activities in plasmodial veins of *Physarum polycephalum*, *Cytobiologie*, **17**: 316-334, 1978.
- [19] ISENBERG G., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Transformation of cytoplasmic acting: Importance for the organization of the contractile gel reticulum and the contraction-relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin, *Cell. Tiss. Res.*, **173**: 495-528, 1976.
- [20] JAHN T. L., Protoplasmic flow in mycetozoan, *Physarum* — II. The mechanism of flow: a re-valuation of the contraction-hydraulic theory and of the diffusion drag hypothesis, *Biorheology*, **2**: 133-152, 1964.



- [21] JAHN T. L., BOVEE E. G., Protoplasmic movements within cells, *Physiol. Rev.*, **49**: 793-862, 1969.
- [22] JAHN T. L., RINALDI R. A., BROWN M., Protoplasmic flow in mycetozoon, *Physarum* — I. Geometry of the plasmodium and the observable facts of flow, *Biorheology*, **2**: 123-131, 1964.
- [23] KAMIYA N., Physical aspects of protoplasmic streaming, [w] *The Structure of Protoplasm*, red. W. Seifriz, Iowa State College Press, Ames, Iowa 1942, 199-244.
- [24] KAMIYA N., The motive force responsible for protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium, *Ann. Rep. Scient. Works., Fac. Sci. Osaka Univ.*, **1**: 53-83, 1953.
- [25] KAMIYA N., Protoplasmic streaming, [w] *Protoplasmatologia VIII 3a*, Springer Verlag, Wien 1959, 1-199.
- [26] KAMIYA N., ALLEN R. D., ZEH R., Contractile properties of the slime mold strand, *Acta Protozool.*, **11**: 113-124, 1972.
- [27] KAMIYA N., NAKAJIMA H., ABE S., Physiology of the motive force of protoplasmic streaming, *Protoplasma*, **48**: 94-112, 1957.
- [28] KESSLER D., On the location of myosin in the myxomycete *Physarum polycephalum* and its possible function in cytoplasmic streaming, *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **1**: 125-137, 1972.
- [29] KESSLER D., Plasmodial structure and motility, *Cell Biol. of Physarum and Didymium*, **1**: 145-208, 1982.
- [30] KISHIMOTO U., Rhythmicity in the protoplasmic streaming of a slime mold, *Physarum polycephalum*. II. Theoretical treatment of the electric potential rhythm, *J. Gen. Physiol.*, **41**: 1223-1244, 1958.
- [31] KOŁODZIEJCZYK J., GRĘBECKI A., Further studies on the relation between contraction and streaming oscillations in the plasmodial veins of *Physarum polycephalum*, *Acta Protozool.*, **21**: 37-53, 1982.
- [32] KOŁODZIEJCZYK J., GRĘBECKI A., Effects of white-red illumination changes on the coordination of some motor functions in plasmodia of *Physarum polycephalum*, *Acta Protozool.*, **22**: 19-31, 1983.
- [33] KOROHODA W., RAKOCZY L., WALCZAK T., On the control mechanism of protoplasmic streaming in the plasmodia of Myxomycetes, *Acta Protozool.*, **7**: 363-373, 1970.
- [34] KOROHODA W., SHRAIDEH Z., BARANOWSKI Z., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Energy metabolic regulation of oscillatory contraction activity in *Physarum*, *Cell Tiss. Res.*, **231**: 675-691, 1983.
- [35] KRÜGER J., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Stretch-induced phase shifts and their synchronization, *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **9**: 61-71, 1978.
- [36] LEWIS W. H., The relation of the viscosity changes of protoplasm to amoeboid locomotion and cell division, [w] *The structure of protoplasm*, red. W. Seifriz, Iowa College Press, Ames, Iowa 1942, 163-197.
- [37] MOCZOŃ M., GRĘBECKI A., Dynamics of the profiles of plasmodial veins of *Physarum polycephalum* during the pulsation cycle, *Protoplasma*, **97**: 173-183, 1978.
- [38] MOCZOŃ M., GRĘBECKI A., Time relationships between the longitudinal and radial contraction in plasmodial veins of *Physarum polycephalum*, *Acta Protozool.*, **17**: 543-550, 1978.



- [39] NAGAI R., YOSHIMOTO Y., KAMIYA N., Changes in fibrillar structure in the plasmodial strand in relation to the phase of contraction-relaxation cycle, Proc. Japan Acad., 51: 38-43, 1975.
- [40] RHEA R. P., Microcinematographic, electron microscopic and electrophysiological studies on shuttle streaming in the slime mold *Physarum polycephalum*, [w] Dynamics of Fluids and Plasmas, red S. I. Pai i in, Acad Press, New York 1966, 35-58.
- [41] SACHSENMAYER W., BLESSING J., BRAUSER B., HANSEN K., Protoplasmic streaming in *Physarum polycephalum*. Observation of spontaneous and induced changes of the oscillatory pattern by photometric and fluorometric techniques, Protoplasma, 77: 381-396, 1973.
- [42] SAMANS K., E., GÖTZ von OLENHUSEN K., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Infrared reflexion as a non invasive registration technique, Cell. Biol. Internat. Rep., 2: 271-278, 1978.
- [43] SATOH H., UEDA T., KOBATAKE Y., Primary oscillator of contractional rhythm in the plasmodium of *Physarum polycephalum*: role of mitochondria, Cell Str. Funct., 7: 275-283, 1982.
- [44] SEIFRIZ W., A theory of protoplasmic streaming, Science, 86: 397-398, 1937.
- [45] SEIFRIZ W., Protoplasmic streaming, Bot. Rev., 9: 49-123, 1943.
- [46] SEIFRIZ W., The rheological properties of protoplasm, [w] Deformation and flow in biological systems, red A. Frey-Wyssling, Amsterdam, New York 1952, 3-156.
- [47] SEIFRIZ W., Mechanism of protoplasmic movement, Science, 86: 1136-1138, 1953.
- [48] STEWART P. A., The organisation of movement in slime mold plasmodia, [w] Primitive motile systems in cell biology, red. R. D. Allen i N. Kamiya, New York, London 1964, 69-79.
- [49] STEWART P. A., STEWART B. T., Protoplasmic movement in slime mold plasmodia: The diffusiondrug force hipothesis, Exp. Cell Res., 17: 44-58, 1959.
- [50] TAKEUCHI Y., YONEDA M., Synchrony in the rhythm of the contraction-relaxation cycle in two plasmodial strands of *Physarum polycephalum*, J. Cell Sci., 26: 151-160, 1977.
- [51] TEPLOV V. A., Mechanika protoplazmaticheskih tiazhey plazmodia miksomitseta (Mechanics of the protoplasmic strands of slime mold plasmodium), [w] Nemyshtchnye Formy Podviznosti, red G. M. Frank, Akademia Nauk SSSR, Pushtchino 1976, 37-46.
- [52] USUI N., Fibrillar differentiation in a macroplasmodium of the slime mold *Physarum polycephalum*, Dev. Growth Differ., 13. 241-255, 1971.
- [53] WINFREE A. T., Some principles and paradoxes about the phase control of biological oscillations, J. Interdiscipl. Cycle Res., 8: 1-14, 1977.
- [54] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Weitreichende, fibrillare Protoplasma-differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplastromung. I. Elektronmikroskopischer Nachweis und Feinstruktur, Protoplasma, 54: 514-539, 1962.
- [55] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Differentiation of the ground cytoplasm and their significance for generation of the motive force of ameboid movement, [w] Primitive Motile Systems, red R. D. Allen i N. Kamiya, Acad Press. New York 1964, 79-109.
- [56] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Plasmalemma invaginations as charac-



- teristic constituents of plasmodia of *Physarum polycephalum*, J. Cell Sci., **16**: 23-37, 1974.
- [57] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Tensiometric demonstration of endogenous, oscillating contractions in plasmodia of *Physarum polycephalum*, Z. Pflanzenphysiol., **76**: 14-27, 1975a.
- [58] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Weitreichende fibrillare protoplasma-differenzierungen und ihre bedeutung für die protoplasmaströmung X. Die anordnung der actomyosin-fibrillen in experimentall unbeeinflussten protoplasmaadern von *Physarum* in situ, Protistologica, **11**: 19-30, 1975b.
- [59] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Simultaneous tensiometry of longitudinal and radial rhythms, periodicity analysis and temperature dependence, J. Exp. Biol., **67**: 49-59, 1977.
- [60] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Oscillatory contraction activity in *Physarum*, J. Exp. Biol., **81**: 15-32, 1979a.
- [61] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Contraction phenomena in *Physarum*: new results, Acta Protozool., **18**: 59-75, 1979b.
- [62] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., FLEISCHER M., Cycling aggregation patterns of cytoplasmic F-actin coordinated with oscillating tension force generation, Cell Tiss. Res., **165**: 327-344, 1976.
- [63] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., ISENBERG G., Dynamics and molecular basis of the contractile system of *Physarum*, [w] Contractile Systems in non-muscle tissues (red S. V. Perry i in., Elsevier) North-Holland Biomedical Press 1976, 297-308.
- [64] WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., SHRAIDEH Z., BARANOWSKI Z., Contractile and structural reactions to impediments of  $Ca^{++}$ -homeostasis in *Physarum polycephalum*, Cell Str. Funct., w druku.
- [65] YOSHIMOTO Y., KAMIYA N., Studies on contraction rhythm of the plasmodial strand. I. Synchronization of local rhythms, Protoplasma, **95**: 89-97, 1978a.
- [66] YOSHIMOTO Y., KAMIYA N., Studies on contraction rhythm of the plasmodial strand. II. Effect of externally applied forces, Protoplasma, **95**: 101-109, 1978b.
- [67] YOSHIMOTO Y., KAMIYA N., Studies on contraction rhythm of the plasmodial strand. III. Role of endoplasmic streaming in synchronization of local rhythms, Protoplasma, **95**: 111-121, 1978c.
- [68] YOSHIMOTO Y., KAMIYA N., Studies on contraction rhythm of the plasmodial strand. IV. Site of active oscillation in an advancing plasmodium, Protoplasma, **95**: 123-133, 1978d.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-097 Warszawa.

Otrzymano: wrzesień 1984.

Przyjęto: styczeń 1984.



## ENZYMY JĄDROWE KTÓRYCH AKTYWNOŚĆ WPŁYWA NA WBUDOWYWANIE PREKURSORÓW RNA IN VITRO

THE ACTIVITY OF NUCLEAR ENZYMES INFLUENCING THE INCORPORATION  
OF RNA PRECURSORS IN VITRO

Jacek WOJCIEROWSKI, Halina ANTOSZ

Samodzielna Pracownia Genetyki Człowieka  
Instytutu Patologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie

*Streszczenie.* Izolowane jądra komórkowe stanowią dobry model do badania reakcji transkrypcji. Dezoksyrybonukleoproteidy jądrowe, stanowiące matrycę i polimerazy RNA katalizujące reakcję, są endogenne. Prekursory RNA mogą być jednak wbudowywane także do innych niż RNA kwasonierozpuszczalnych produktów. W przeciwieństwie do „czystych” rekonstruowanych układów transkrypcyjnych, w izolowanych jądrach komórkowych znajduje się wiele układów enzymatycznych, wpływających zarówno na własności matrycowe chromatyny, jak też na aktywność polimeraz RNA. Na podstawie danych z piśmiennictwa przedstawiono krótką charakterystykę enzymów jądrowych, które mogą mieć wpływ na wbudowywanie radioaktywnych nukleozydotrójfosforanów do RNA i innych produktów in vitro.

*Summary.* The preparations of isolated cell nuclei appeared to be an useful model for investigation of the transcription. Nuclear deoxyribonucleoproteins serve as templates, RNA polymerases catalysing this reaction are also endogenous. On the other hand labelled ribonucleosideriphosphates could be incorporated not only into ribonucleic acid but additionally into some different acid insoluble products in nuclear system. Unlike “pure” reconstituted systems of transcription in isolated cell nuclei numerous enzymes modifying RNA polymerase activity as well as chromatin templates are present. Short characteristics of nuclear enzymes influencing the incorporation of radioactive nucleosidetriphosphates into RNA and other products are presented on the basis of literature data.

### Stosowane skróty

DTT — dwutiotreitol

ddTTP — 2'3' dwudezoksytymidynotrójfosforan

dsDNA — dwułańcuchowy DNA,

ssDNA — jednołańcuchowy DNA,

EDTA — kwas etylenodwuaminoczteroowy



NAD — dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy

NEM — N-etylomaleimid

NMN — nukleotyd nikotynamidowy

pCMP — parachlorortęciobenzoesan

PMSF — fenylometylosulfonylofluorek

SADM — S-adenozylometionina

SDS — siarczan dodecylanu sodu.

Badania aktywności enzymów jądrowych przeprowadza się najczęściej w preparatach izolowanych jąder komórkowych. Badania histochemiczne na utrwalonych komórkach nie dają nigdy pewności prawidłowej lokalizacji wykazywanej aktywności enzymatycznej. Badania aktywności enzymów mogą być również wskaźnikiem czystości i natywności uzyskanych preparatów. Na obecność domieszek cytozolowych wskazuje m. in. aktywność oksydazy cytochromowej (EC.1.9.3.1.), oksydoreduktazy cytochromowej (EC.1.6.2.1.), dehydrogenazy glukozy-6 fosforanu (EC.1.1.1.49.) [113, 138, 292]. Pewne wątpliwości budzi obecność śladowych aktywności heksokinazy, izomerazy glukozy-6 fosforanu i syntetazy NAD [61, 196]. Dehydrogenazy mleczanowa i bursztynianowa są uważane za wskaźnik zanieczyszczeń mitochondriami, a reduktaza cytochromu 2 wskazuje na zanieczyszczenie rybosomami [113]. ATP-azy, monoaminooksydaza, glukozy-6 fosfataza, cytochromy a, a<sub>3</sub>, b i c są charakterystyczne dla otoczki jądrowej, metylotransferaza SADM-RNA, syntetaza NAD (EC.6.3.5.1.) raczej dla jąder [150]. Nukleozydotrójfosfatazy są dość trwale związane ze strukturami jąder komórkowych [71]. Liczne enzymy jądrowe są zaangażowane w procesy regulacji stanu konformacji matrycy i utrzymania ich integralności, w regulacji poziomu stężeń prekursorów RNA, w depolimeryzacji pierwotnych produktów transkrypcji i we wbudowywaniu prekursorów RNA do innych niż RNA produktów oraz w procesach „dojrzwania” i transportu nowosyntetyzowanego RNA. Dlatego przy planowaniu doświadczeń w układzie izolowanych jąder komórkowych należy wziąć pod uwagę obecność tych enzymów, ich aktywność w warunkach środowiska inkubacyjnego i możliwość zewnętrznego wpływu na tę aktywność.

#### 1. POLIMERAZY RNA I (A), II (B) i III (C)

Liczne prace przeglądowe poświęcono głównym enzymom transkrypcji — polimerazom RNA [44, 169, 177, 213]. Masa cząsteczkowa polimeraz RNA wynosi około 600 kD. Polimeraza jąderkowa (I) składa się z sześciu podjednostek polipeptydowych, nukleoplazmatyczna (II) — z ośmiu, a III — z dziesięciu. Funkcje podjednostek nie są wystarczająco



poznane. Liczba podjednostek (oprócz największych) jest zmienna i jest to prawdopodobnie przyczyną istnienia podtypów enzymu (w obrębie polimeraz RNA I, II i III) [66, 145, 285]. Różne polimerazy RNA zawierają w swoim składzie podjednostki identyczne i wykazujące pokrewieństwo immunologiczne (zwłaszcza polimerazy RNA I i II) [36].

Własności polimeraz RNA izolowanych z komórek zależą od metody oczyszczania enzymu i wydaje się, że w kompleksach funkcjonalnych polimeraz *in vivo* znajdują się dodatkowe czynniki regulacyjne [58, 116, 141]. Wydaje się, że regulacja aktywności jądrowych polimeraz RNA *in vivo* w dużym stopniu polega na modyfikacjach enzymu, głównie na jego fosforylacji, a nie na syntezie *de novo* [16, 143]. *In vitro* różne kinazy białkowe mogą fosforylować różne podjednostki enzymu. W polimerazie RNA I fosforylowane są zwłaszcza podjednostki o masach cząsteczkowych 194, 51 i 29 kD, a w polimerazie RNA II — podjednostki 214, 50 i 21 kD [59]. Inne modyfikacje enzymu, jak np. metylacje, zmiany liczbowe podjednostek, przyłączanie dodatkowych czynników regulujących, mogą również odgrywać ważną rolę. Natomiast niespecyficzna metylacja polimerazy RNA *in vivo* dwumetylonitrozaminą i *in vitro* metylometanosiarczanem hamują silnie jej aktywność [106].

W izolowanych jądrach komórkowych (wątroba szczurza) liczba cząsteczek polimerazy RNA I oceniana jest na około  $2 \cdot 10^4$ , a polimerazy RNA II — od  $0,5 \cdot 10^3$  do  $1,5 \cdot 10^3$ . Polimeraza RNA III dość szybko opuszcza jądro komórkowe w czasie izolowania i inkubacji [166]. Większość wewnątrzjądrowych cząsteczek polimeraz RNA pozostaje silnie związana z matrycami (enzym „związany”), reszta stanowi enzym „wolny” [25, 97, 259]. Część cząsteczek związanej polimerazy RNA aktywnie transkrybuje matryce, jednak pewna liczba cząsteczek pozostaje nieaktywna transkrypcyjnie („silent” enzym) [229].

Aktywność polimerazy RNA I może być zahamowana niskimi stężeniami aktynomycyn, pochodnymi akrydyny (proflawina lub akryflawina), dwumetylo-10,12-benzakrydyną (DMBAcr) lub toyoamycyną [88, 173, 253]. Aktynomycyna D w stężeniu około  $1 \mu\text{M}$  hamuje głównie elongację nici RNA, powyżej  $10 \mu\text{M}$  również inicjację. Także sole metali jednowartościowych w wyższych stężeniach, np.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w stężeniach ponad  $160 \text{ mM}$  [157], obecność jonów  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$  [192] i brak SADM w środowisku [97] hamują aktywność polimerazy RNA I. Do czynników hamujących aktywność polimerazy RNA II należy  $\alpha$ -amanityna [118], aflatoksyny [105], trójfosforan 3'dezoksyadenozyny [64] oraz jony  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  [192].

Polimeraza RNA III może być zahamowana wysokimi stężeniami  $\alpha$ -amanityny (ponad  $10^{-5}\text{M}$ ).

Oprócz wymienionych tu polimeraz RNA w jądrach komórkowych



znajdować się może polimeraza RNA „starterowa” zaangażowana w replikacji, a być może również w transkrypcji DNA. W syntezie DNA wirusów Eukaryota [7, 76] i komórek wyższych Eukaryota [92, 280] wykazano obecność „starterów” RNA. Opisano polimerazę RNA „starterową” limfocytów ludzkich [263]. W komórkach Eukaryota za syntezę iRNA może być odpowiedzialna również polimeraza RNA I [100]. Polimerazy RNA zależne od RNA są charakterystyczne raczej dla frakcji mikrosomów [114], nie można jednak wykluczyć ich obecności w preparatach jąder komórkowych [180].

## 2. POLIMERAZY DNA

Aktywność polimeraz DNA w preparatach izolowanych jąder komórkowych może wpływać na wydajność obserwowanej reakcji transkrypcji, zwłaszcza synteza replikacyjna lub reperacyjna DNA mogą mieć wpływ hamujący na przebiegającą reakcję transkrypcji [33]. Również obecność aktywnych reduktaz rybonukleotydów może powodować wbudowywanie prekursorów RNA do DNA [75, 267]. Dodatkowo w procesie replikacji może być syntetyzowany „starterowy” RNA, a efektywna reparacja uszkodzeń może być niezbędna do przebiegu transkrypcji.

Polimerazom DNA Eukaryota poświęcono obszernie artykuły przeglądowe [288, 289]. Polimeraza DNA  $\alpha$  (enzym Bolluma) o masie cząsteczkowej 100-300 kD i o stałej sedymentacji 6,8-10,5 uważana jest często za enzym cytoplazmatyczny [219], in vivo jest jednak stale obecna w jądrach komórkowych [20]. Polimeraza DNA  $\alpha$  jest słabo związana z chromatyną i wymywa się 0,14 M NaCl [84, 171]. Jedynie w fazie S cyklu życiowego duża liczba cząsteczek polimerazy  $\alpha$  pozostaje silnie związana [48]. Zwłaszcza końcowy etap replikacji (łączenie pośredników o rozmiarach replikonów) jest prawdopodobnie bezwzględnie zależny od polimerazy DNA  $\alpha$  [300]. Istnieją dyskretne formy polimerazy  $\alpha$  różniące się nieco masą cząsteczkową i własnościami [174, 303]. Enzym ten przeprowadza reakcję polimeryzacji DNA in vitro z szybkością 30 nukleotydów, a in vivo — 60 nukleotydów na sekundę, opisano też liczne komórkowe czynniki regulujące tę szybkość [123, 241].

Polimeraza DNA  $\alpha$  nie może kopiować poli r(A)-oligo d(T), chociaż pewne podtypy enzymu nie stosują się do tej reguły (np. enzym z grasicy cielęcia i z komórek KB [837, 303]). Najprawdopodobniej pewne dodatkowe czynniki regulacyjne, obecne w kompleksie replikacyjnym, hamują tę niespecyficzną reakcję [50].

Miejscem inicjacji dla polimerazy DNA  $\alpha$  są zazwyczaj szersze luki (gaps) na jednej nici DNA, a nie nacięcia [82]. Enzym nie ma aktywności egzonukleolitycznej, chociaż znane są wyjątki [46].



Do czynników hamujących aktywność polimerazy DNA  $\alpha$  można zaliczyć NaCl i KCl powyżej stężenia 25 mM (a zwłaszcza powyżej 100 mM) i etanol [72], heparynę, czynniki blokujące grupy —SH, pH środowiska bliskie 7 [80], afidikolinę, NEM i bromek etydyny [148]. 1- $\beta$ -D arabinofuranozylocytozyna blokuje inicjację, 2-dezoksyadenozyna elongację nici DNA. 9- $\beta$ -D arabinozyloadenina hamuje prawdopodobnie inicjację syntezy DNA w nowych replikonach [17]. ATP w wysokich stężeniach również hamuje replikację, 5 mM ATP hamuje syntezę DNA o 60% [260]. Wydaje się, że poli(A) i poli(U) w stężeniach 100  $\mu$ g/ml hamują reakcję replikacji [238]. Polimeraza DNA  $\alpha$  jest mało wrażliwa na ddTTP (zwłaszcza w systemie izolowanych jąder komórkowych [148, 281], na obecność fosforanów, a spermidyna nawet aktywuje jej aktywność [171].

Polimeraza DNA  $\beta$  (enzym Weissbacha) [287] o masie cząsteczkowej 30-50 kD jest specyficznym enzymem jądrowym. Większość autorów uważa, że enzym ten funkcjonuje jako polimeraza reperacyjna [182], chociaż jest możliwe, że odgrywa również rolę w replikacji [277]. Za wyłącznie reperacyjną funkcją polimerazy DNA  $\beta$  przemawia fakt, że ilość enzymu nie zmienia się w cyklu życiowym komórki. Aktywność polimerazy DNA  $\beta$  jest hamowana silnie przez ddTTP i jony fosforanowe [148, 195, 297]. Enzym jest wrażliwy na obojętny odczyn środowiska i jest bardzo termolabilny [72]. Afidikolina [195], NEM, bromek etydyny, NaCl w stężeniu 0,2 M, etanol, czynniki blokujące grupy —SH nie wpływają na aktywność enzymu, natomiast sole o stężeniu ponad 0,25 M, a dla pewnych komórek pCMB obniżają ją [186, 297].

Polimeraza DNA  $\beta$  może wykorzystywać bardzo krótkie matryce DNA (5 nukleotydów w obecności jonów  $Mg^{2+}$ ) [279]. Szybkość polimeryzacji dla tego enzymu jest bardzo mała, około 2,5 nukleotydów na sekundę. Znane są też białka regulujące aktywność tego enzymu [187].

Polimeraza DNA  $\delta$  ma również aktywność 3'-5' egzonukleazy. Jest to aktywność hamowana wybiórczo 6-merkaptopuryną i 5'AMP [39].

Polimerazy RDNA mogą kopiować poli r(A)d(T)<sub>6-10</sub>, ale w odróżnieniu od odwrotnych transkryptaz nie mogą używać matryc RNA. Wydaje się, że są to enzymy raczej cytoplazmatyczne, chociaż mogą być obecne w błonie jądrowej, a nawet w jąderkach komórkowych [302]. Ponadto zanieczyszczenia cytoplazmatyczne w preparatach jąder komórkowych mogą być powodem aktywności polimeraz RDNA w tych preparatach. Polimerazy RDNA są stymulowane obecnością kationów jednowartościowych i jonów fosforanowych, wymagają obecności DTT, ale nie są hamowane przez 0,5% Triton X100. Pewne enzymy tego typu są bardziej zbliżone do odwrotnej transkryptazy wirusów onkogennych, np. polimeraza N3 z komórek czerniaka [89]. Najlepiej poznanym enzymem



z grupy polimeraz RDNA jest polimeraza  $\gamma$ , specyficzny enzym mitochondrialny (enzym Fridlendera) [86].

Pewną odmianą polimerazy RDNA jest polimeraza DNA III [159]. Enzym ten nie jest wrażliwy na etanol (10%) i bardziej od innych polimeraz RDNA jest hamowany jonami metali jednowartościowych.

Odwrotna transkryptaza (rewertaza) jest enzymem, który katalizuje reakcję syntezy DNA na matrycy RNA; jest specyficzna dla wirusów onkogennych. Tym niemniej komórki (zwłaszcza ich frakcja mikrosomalna) mogą wykazywać aktywność odwrotnej transkryptazy zależnej od obecności endogennych wirusów. Wirusy te mogą pełnić ważną fizjologicznie rolę w różnicowaniu i embriogenezie, i dlatego w pewnych przynajmniej typach komórek można spodziewać się aktywności odwrotnej transkryptazy. Publikowane były liczne prace przeglądowe na temat własności tego enzymu [12, 254, 272]. Ogólnie biorąc, odwrotna transkryptaza wirusów grupy leukemia-sarkoma ptaków składa się z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  o masach cząsteczkowych odpowiednio 65-70 kD i 95-100 kD. Enzym wirusów onkogennych ssaków jest zbliżony do podjednostki  $\alpha$ . W komórkach zakażonych wirusem enzym istnieje głównie w formie wysokomolekularnej, natomiast w czystych preparatach wirusów i w komórkach po traktowaniu 0,5 M KCl lub Tritonem X100 w formie niskomolekularnej. Enzym może używać jako matrycy DNA, RNA lub homorybopolinukleotydów, ma aktywność rybonukleazy H i endonukleazy, może również przeprowadzać reakcję „rozwijania” (unwinding) i pirofosforolizy [176], nie wykazuje żadnej aktywności egzonukleolitycznej. Aktywność odwrotnej transkryptazy może być zahamowana kofeiną [239], a aktywność RN-azy H tego enzymu — NaF w stężeniu 10 mM [284]. Zastanawiające jest, że polimerazy DNA  $\alpha$  i  $\beta$  wykazują podobieństwo chromatograficzne i immunologiczne do odwrotnej transkryptazy, zwłaszcza endogennych wirusów [183]. Ponieważ rewertazy funkcjonalnie zbliżone są do polimeraz RDNA, można więc założyć pewne pokrewieństwo wszystkich polimeraz DNA komórki. Różnice mogłyby polegać na aktywacji przez proteolizę [212], fosforylację [214], przez zmianę proporcji polipeptydów wchodzących w skład kompleksu [110] lub przez obecność dodatkowych polipeptydów stymulujących [156].

### 3. NUKLEOZYDOTRANSFERAZY NIE UŻYWAJĄCE MATRYC

Enzymy te nie mogą odtwarzać ani syntetyzować określonych sekwencji nukleotydów i przenoszą pojedyncze reszty dezoksyrybonukleotydowe i rybonukleotydowe na różne substraty. Niekiedy enzymy są zdolne do przyłączania kolejnych reszt nukleotydowych tworząc homopolimery. Substratami, na które przenoszone są reszty nukleotydowe



i które pełnią rolę startera są zazwyczaj —3'OH grupy RNA i DNA. Enzymy tego typu znajdują się w jądrach komórkowych i skutkiem ich działania może być wbudowanie znakowanych nukleozydofosforanów w nierozpuszczalne w kwasach produkty. Produkty te niekiedy bez wystarczających dowodów są określane jako homopolimery.

Najważniejszymi enzymami syntetyzującymi homopolimery są poli(A) polimerazy, które po ukończonej syntezie łańcucha RNA używają go jako startera do poliadenylacji. Reakcja ta ma znaczenie w dojrzewaniu większości klas mRNA. Jądrowa polimeraza poli(A) istnieje w formie enzymu związanego z chromatyną i w formie wolnego „enzymu”. Enzym związany syntetyzuje homopolimer o długości około 200 reszt nukleotydowych, enzym „wolny” dobudowuje jedynie 10 do 20 reszt [215, 221]. Jedynie forma „związana” enzymu jest hamowana przez trójfosforan kordycepiny [217]. Polimeraza poli(A) jest zasadniczo enzymem wewnątrzjądrowym [119], ale w cytoplazmie, zwłaszcza we frakcji mikrosomalnej, znaleziono enzymy podobne do „wolnych” polimeraz poli(A) jądrowych [181]. Enzym wymaga ATP jako substratu, ale obecność innych trójfosforanów nukleozydów hamuje jego aktywność [2]. Enzym jest aktywowany jonami  $Mg^{2+}$  lub  $Mn^{2+}$ , jak również przez dwubutyrylo-cAMP, natomiast EDTA, AcD bromek etydyny i DNA-aza niewiele wpływają na jego aktywność. Inhibitorami poli(A) polimerazy są trójfosforan kordycepiny w stężeniach 2  $\mu g/ml$ , pirofosforany, kwas jodoctowy (5 mM) i  $(NH_4)_2SO_4$  [216]. Małe stężenia cAMP (1,5 mg/100 g wagi ciała) niewiele hamują syntezę oligo(A) (40-60 nukleotydów) [151].

Liczne prace dotyczące polimeraz poli(A) i poliadenylacji są zebrane w wielu publikacjach [2, 35, 119, 215]. Opisano również enzym syntetyzujący polimer  $ppp5'(A_2p)_nA$  [43, 225].

Wydaje się, że istnieją również polimerazy poli(U), poli(G) i poli(C) [32, 112]. Enzymy te są mniej specyficzne dla jąder komórkowych. Nie można wykluczyć, że polimerazy RNA Eukaryota, podobnie jak polimerazy RNA bakteryjne, mogą syntetyzować homopolimery w warunkach zahamowanej elongacji RNA [70].

Nukleozydotransferazy przenoszące pojedyncze reszty nukleotydowe na startery RNA stanowią ważną klasę enzymów dojrzewania i modyfikacji posttranskrypcyjnych. GTP-RNA guanylylotransferaza bierze udział w tworzeniu „kapturków” mRNA i hnRNA [129, 226, 231, 271], adenylylo- i cytydylylotransferazy biorą udział w tworzeniu i odtwarzaniu 3'CCA trypletu tRNA, znane są też transferazy przenoszące reszty rybonukleotydowe na startery DNA [142].

Najważniejszym enzymem przenoszącym reszty tymidynofosforanowe na —3'OH krańcową pozycję startera DNA jest transferaza krańcowa (CE.2.7.7.31) z jąder komórkowych grasicy cielej i komórek limfoidal-



nych typu T [62, 96]. Enzym ten może przenosić także reszty innych dezoksyrybonukleotydów, a nawet w pewnych warunkach rybonukleotydów [218]. Modyfikacje enzymu, jak np. fosforylacja, mogą być odpowiedzialne za jego heterogenność [45]. Starterem enzymu jest głównie ssDNA, ale także dsDNA lub dezoksynukleoproteid chromatyny [218]. Sztucznymi starterami są  $d(A)_{12-18}d(T)_6$  i  $poli(A)d(T)_{12-18}$ . Inhibitorami transferazy krańcowej są sterptolidyna ( $10^{-3}M$ ), siarczan proflawiny, nadmiar ATP i NEM [67]. Aktynomycyna,  $\alpha$ -amanityna i EDTA nie mają wpływu na jej aktywność [67, 184]. Znane są nukleozydotransferazy przenoszące reszty nukleotydowe na substraty inne niż kwasy nukleinowe, np. na dwuglicerydy [301] lub amid kwasu nikotynowego [40].

#### 4. LIGAZY POLINUKLEOTYDOWE (LIGAZY DNA I RNA) (EC.6.5.1.1.)

Ligazy DNA są zaangażowane głównie w replikacji DNA (ligaza I) [237], w procesach reperacji związanych z nacinaniem nici DNA (ligaza II) i prawdopodobnie również w regulacji stanu nadspiralności DNA, głównie jako czynnik relaksujący. W obecności AMP ligaza może wytwarzać nacięcia, czyli może działać jak enzym nacinający [236, 237].

Ligazy łączą wiązaniem estrowym grupy  $-3'OH$  z grupami  $5'P-$ łańcucha polinukleotydowego. Aktywność ligazy DNA w izolowanych jądrach komórkowych może mieć znaczenie dla efektywności reinicjacji syntezy RNA ze względu na jej wpływ na konformację matrycy, a także dla specyficzności inicjacji przez usuwanie powstających „nacięć”. Aktywność ligaz RNA jest warunkiem prawidłowego „dojrzewania” produktów transkrypcji, a być może również ich transportu do środowiska.

Ligazy DNA są specyficzne dla jądra komórkowego i występują jako wielkocząsteczkowe białka (ligaza DNA I — 170-200 kD, stała sedymentacji — 5,5-8,5 S) lub mniejsze białka (ligaza DNA II — 85-90 kD, stała sedymentacji — 4-6 S) [255]. Wysuwane są jednak przypuszczenia, że istnieje tylko jedna ligaza DNA [256].

Ligazy DNA są bardzo wrażliwe na zmiany pH, na obecność EDTA, jonów  $Ca^{2+}$  oraz na denaturację termiczną. W temperaturze poniżej  $25^{\circ}C$  aktywność ligaz ulega odwracalnemu obniżeniu [264]. Ligazy są wrażliwe na NEM i na pCMB, ligaza DNA II jest częściowo hamowana przez PMSF [255], nie są natomiast hamowane przez bromek etydyny i aktynomycynę D. Enzym wymaga obecności jonów  $Mg^{2+}$  (10-20 mM) i jest stymulowany jonami metali jednowartościowych (150 mM). ATP jest kofaktorem. Obszerną literaturę dotyczącą ligaz DNA można znaleźć w licznych pracach przeglądowych i doświadczalnych [235, 264, 306]. Ligazy RNA są zaangażowane w „dojrzewaniu” prekursorów mRNA,



głównie w usuwaniu sekwencji intronowych (splicing) [165]. Ligaza tRNA stanowi wyjątek wśród enzymów Eukaryota, gdyż łączy wiązaniem estrowym grupy —3'p i 5'OH— [137].

#### 5. ENZYMY USUWAJĄCE LOKALNE USZKODZENIA HELISY DNA BEZ NACINANIA ŁAŃCUCHA

Enzymy te rozpoznają uszkodzenia (dimery pirymidynowe, metylowane zasady) i usuwają je. W usuwaniu dimerów pirymidynowych zaangażowane są fotolizy specyficzne głównie dla dsDNA, ale rozpoznające również uszkodzenia w ssDNA. Masa cząsteczkowa tych enzymów wynosi około 40 kD, optymalne pH — 7,2. Aktywność fotoliaz jest hamowana przez fosforany [246].

Metylowane zasady lub uracyl są rozpoznawane i usuwane przez N-glikozydazy (EC.3.2.1.20 i EC.3.2.1.21.) [200]. Wśród tych enzymów szczególnie aktywne są N-glikozydazy urydylowe [41, 250]. Skutkiem ich działania jest powstawanie miejsc apurynowych lub apirymidynowych, które są usuwane w procesach naprawczych typu wycinania i zastępowania (cut and patch) połączonych z nacięciem łańcucha DNA. Jednak sposób działania N-glikozydaz wskazuje na ich niezależność od mechanizmu wycinania, co więcej, istnieje inna jeszcze możliwość reperacji miejsc apurynowych nie uwarunkowana nacinaniem nici DNA, mianowicie przez akcję „insertaz” [65].

Opisane tu enzymy są istotne dla przebiegu procesu transkrypcji, ponieważ utrzymują stan natywności matryc, zwłaszcza usuwając powstające spontanicznie miejsca apurynowe.

#### 6. ENZYMY MODYFIKUJĄCE DNA

Najważniejszą modyfikacją DNA jest metylacja. Podnoszone jest znaczenie metylacji w procesach regulacji ekspresji genów, w różnicowaniu, embriogenezie, karcinogenezie, a także w regulacji transkrypcji. Przegląd literatury dotyczącej metylaz DNA i metylacji znajduje się w licznych publikacjach [1, 55, 266]. Zachowanie aktywności enzymów modyfikujących DNA w układach transkrypcyjnych *in vitro* może mieć znaczenie dla ich prawidłowego funkcjonowania. Metylazy DNA są enzymami jądrowymi i metylacja zachodzi w jądrach komórkowych *in vitro* [266]. W przeciwieństwie do nieswoistych czynników metylujących reakcja enzymatyczna jest zależna od obecności SADM i hamowana jest analogiem — S-adenozylhomocysteiną [55] i jest wysoce specyficzna. U Eukaryota metylacja DNA ogranicza się wyłącznie do cytozyny w obrębie dwunukleotydu 5'—C<sub>p</sub><sup>m</sup>G<sub>p</sub>—3' [34]. Podobnie jest metylowana nić komple-



mentarna. Powoduje to konieczność uzupełniania grup metylowych w nowo syntetyzowanej nici DNA bezpośrednio po zakończeniu fazy S cyklu życiowego. Metylazy wymagają istnienia struktur superspiralnych w DNA, są hamowane poliaminami, wyższymi stężeniami mocznika, detergentami (0,2% Triton X100 hamuje je częściowo, 0,1% dezoksyholan kompletnie), 5-azacytydyną [56, 57, 227]. NaCl w stężeniu niższym niż 50 mM powoduje agregację enzymu, w wyższym niż 200 mM — jego dysocjację z chromatyny. Jądra komórkowe nie zawierają restryktaz, jednak metylacja DNA ma wyraźny wpływ na jego wrażliwość na nukleolizę [132]. Opisano również demetylację DNA w komórkach mysich [94].

Inną modyfikacją jest fosforylacja 5'OH— grupy DNA. Reakcję tę przeprowadzają kinazy polinukleotydowe (ATP zależne DNA kinazy) niekiedy wysoce specyficzne [251]. Siarczany, np. dekstranu, hamują tę reakcję [202].

## 7. ENZYMY MODYFIKUJĄCE RNA

Modyfikacje łańcucha polirybonukleotydowego odbywają się już w czasie jego elongacji. Obecność i aktywność enzymów modyfikujących może mieć znaczenie dla inicjacji syntezy RNA (metylacje pierwszych nukleotydów), jak również dla elongacji, terminacji, dojrzewania i transportu. Podobnie jak dla DNA, modyfikacje RNA polegają głównie na przenoszeniu reszt fosforanowych i na metylacjach. Modyfikacje RNA są głównie związane z procesami „dojrzewania” mRNA, ale także tRNA. Kinazy polinukleotydowe (EC.2.7.1.78) przenoszą reszty fosforanowe na 5'OH— grupy RNA i oligonukleotydów [266], są ATP zależne, ale niekiedy mogą przenosić reszty fosforanowe z GTP, CTP i UTP [296]. Opisano również fosforylasy polinukleotydowe i RNA trójfosfatazy [234, 271]. Pewne enzymy z tej grupy wykazują wysoką specyficzność i są zaangażowane w dojrzewaniu hnRNA i prekursorów mRNA [222].

Metylazy RNA zależne od SADM wykazują dużą specyficzność wobec substratów. Znane są metylazy tRNA [131], rRNA [194, 168] i mRNA. Dla mRNA specyficzne enzymy metylują guaninę „kapturka” (cap) prawdopodobnie przed rozpoczęciem elongacji nici polinukleotydowej [128]. Inne metylazy są odpowiedzialne za metylację pierwszego nukleotydu mRNA w pozycji 2'C rybozy. Oba enzymy są hamowane sinefunginą [206]. Metylacja drugiego nukleotydu odbywa się już prawdopodobnie na terenie cytoplazmy [47]. Metylacje „wewnętrzne” w regionie —3'OH mRNA i hnRNA (do 15 grup metylowych, głównie N<sup>6</sup>mA i 5mC [14]) są katalizowane przez odrębny enzym hamowany cykloleucyną lub S-tubericynylohomocysteiną [69].



## 8. BIAŁKA DESTABILIZUJĄCE HELISĘ DNA

Wszystkie enzymy „nacinające” jedną nić podwójnie łańcuchowego DNA, w tym zwłaszcza endonukleazy jądrowe, powodują relaksację superspiralnej helisy. Wydaje się jednak, że *in vivo* regulacja „pulsacji” (breathing) i rotacja wzajemna łańcuchów helisy DNA (swivell) odgrywają ważną rolę w inicjacji i elongacji zarówno replikacji, jak i transkrypcji, i odbywają się w specyficznych regionach DNA [103]. Do specyficznych enzymów relaksujących można zaliczyć topoizomerazy typu I [11, 274], topoizomerazy typu II (NC enzymy — „nicking-closing” enzymy), ATP zależne DN-azy [87], a być może również DNA ligazy działające jako AMP zależne endonukleazy [236]. Topoizomerazy I (Eukaryota) mogą relaksować całkowicie zarówno dodatnio, jak i ujemnie nadspiralizowany DNA [11], [207]. Topoizomerazy typu II, oprócz tworzenia nacięć, mogą również zamykać te nacięcia, pozostając przy tym kowalencyjnie związane z DNA (przez tyrozyne topoizomerazy do —3'OH grupy w nacięciu). Białko enzymu nie ulega oderwaniu w 100 mM KOH, 100 mM HCl i w 4 M chlorowodoru guanidyny [90, 262].

Wśród bardzo wielu białek wiążących się z DNA (DNA binding proteins) jedynie pewne typy silnie wiążące się z jednołańcuchowym DNA (tworzące kompleksy w obecności fenolu i SDS-u) mogą odpowiadać NC-enzymom [74]. Pewne typy białek *in vivo* silnie związane z DNA również mogą być odnoszone do topoizomeraz [144]. Nacięcia zablokowane NC-enzymami są rozmieszczone nieprzypadkowo i mogą być miejscami inicjacji zarówno replikacji, jak transkrypcji [286, 290]. Dotychczas nie zostało wystarczająco wyjaśnione, jaki jest mechanizm powstawania struktur nadspiralnych w Eukaryota. Nie stwierdzono tu enzymów typu bakteryjnych „gyraz”, chociaż kwas nalidiksinowy wpływa hamująco na replikację DNA Eukaryota [18]. Być może rolę gyrazy odgrywają pewne czynniki przejściowo występujące w kompleksach topoizomerazy II; rolę taką pełnić mogą ATP-azy zależne od DNA (m. in. antygen T wirusa SV40) [91].

Oprócz enzymów bezpośrednio zmieniających konformację helisy DNA istnieją prawdopodobnie liczne białka (z grupy białek wiążących się z DNA) utrwalające uzyskany stan nadspiralności i ułatwiające przesuwanie się polimeraz RNA i DNA [73]. Białka te są niekiedy bardziej specyficzne jedynie dla określonego stanu chromatyny, np. białka HMG (high mobility group) są prawdopodobnie niespecyficznymi stabilizatorami aktywnej euchromatyny [175]. Inni autorzy uważają, że rolę tę pełnią inne białka chromatyny, jak PS<sub>1</sub> lub A24 [122, 283]. Trudno jest obecnie określić, jaką rolę odgrywają tzw. białka ściśle związane z chromatyną (tightly bound). Stanowią one niejednorodną grupę białek i w



pracach różnych autorów mogą oznaczać zarówno NC-enzymy, jak też białka wykazujące powinowactwo do DNA. Wydaje się jednak, że nie są one charakterystyczne dla transkrybowanej chromatyny [185]. Topoizomerazy wprowadzają zmiany konformacji konieczne do tworzenia nukleosomów [90]. Również białka nukleosomu — histony H2A, H2B, H3 i H4 [140], a także międzynukleosomowe — histon H1 [160] i białko A24 [95] utrwalają strukturę helisy i wyższe struktury nadspiralne. W warunkach izolowania i inkubacji *in vitro* jąder komórkowych może dochodzić do utraty histonów, zwłaszcza histonu H1 [107], i słabo związanych białek utrwalających aktywny stan matrycy. Nie dotyczy to ściśle związanych białek i topoizomeraz chromatyny, jednak stosowane detergenty, wysokie stężenia soli, polisacharydów lub heparyny mogą powodować uszkodzenie ich funkcji.

#### 9. DN-azy JĄDROWE

DN-azy jądrowe *in vivo* są zaangażowane w procesy reperacji i w regulację konformacji DNA. *In vitro*, nawet w niskich temperaturach skutkiem ich działania jest depolimeryzacja matrycy i utrata jądrowego DNA, zwłaszcza w izolowanych jądrach komórkowych *in vitro* [29]. Na autolityczne działanie DN-az najbardziej narażony jest aktywnie transkrybowany „metaboliczny” DNA jąder komórkowych. Depolimeryzacja tego DNA powodować może spadek specyficzności inicjacji transkrypcji, obniżenie syntezy polirybonukleotydów i podwyższenie syntezy oligorybonukleotydów [68, 198].

Relaksacja nadspiralnego DNA przez endodezoksyrybonukleazy „nacinające” może być odpowiedzialna za zaburzenie inicjacji transkrypcji w preparatach izolowanych jąder komórkowych, ale zahamowanie aktywności dezoksyrybonukleaz jądrowych, zwłaszcza zaangażowanych w reperacji DNA, może prowadzić do nagromadzenia się uszkodzeń DNA (np. miejsc apurynowych).

Główna endodezoksyrybonukleaza jądrowa (endonukleaza I) jest podobna ze względu na swoje własności do DN-azy trzustkowej [139, 154]. Enzymy tego typu izolowane z różnych tkanek różnią się nieco własnościami, ogólnie jednak są specyficzne raczej dla dsDNA, a skutkiem ich działania jest depolimeryzacja DNA do oligodezoksynukleotydów zakończonych —3'OH i 5'P— [178]. Endonukleazy I mogą być zależne od obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  endonukleaza) [198], od jonów  $\text{Mg}^{2+}$  lub  $\text{Mn}^{2+}$  [124, 178]. Pewne dezoksyendonukleazy tej grupy mogą depolimeryzować również rybohomopolimery, zwłaszcza poli(A), poli(U) i poli(C), inne nie mają tej własności [53]. Endodezoksyrybonukleaza ją-



der komórkowych wątroby szczurzej jest hamowana przez NaF w stężeniu 3 mM wyższymi stężeniami soli metali jednowartościowych (50% inhibicji w obecności KCl w stężeniu 55 mM), pirofosforanami (w stężeniu 8 mM), heparyną (22 ng/ml) i siarczanem polidekstranu (1,3 ng/ml), jonami fosforanowymi (40 mM), EDTA, tRNA i polirybonukleotydami [53, 149, 23]. Enzym z jąder komórkowych *Physarium polycephalum* jest hamowany NaCl i KCl w stężeniach od 100 mM, pCMB (10 mM), ale jest niewrażliwy na azydek sodu [282].

Endonukleazy specyficzne dla dsDNA są aktywne w depolimeryzacji DNA w autolizie w różnicowaniu końcowym. Enzymy depolimeryzujące homopolimery mogą odgrywać rolę w „dojrzewaniu” RNA.

Jądrowe endodezoksyrybonukleazy specyficzne głównie dla ssDNA obejmują enzymy zaangażowane w reperacji, a także enzymy „nacinające”, które rozpoznają i wprowadzają nacięcia w destabilizowaną strukturę nadspiralnego DNA [111, 205] i mogą być zaangażowane w inicjacji transkrypcji [276], a także w elongacji replikacji DNA (tworzenie odcinków zdolnych do rotacji „swivell”) [282]. W wyniku depolimeryzacji DNA powstają zazwyczaj 5'P— oligonukleotydy. EDTA i 2-merkaptoetanol hamują ich aktywność (endonukleaza  $\alpha$ ) [111]. Specyficzność ssDNA endonukleaz jest względna i zależy od stężenia soli, zwłaszcza wysokie stężenia soli metali jednowartościowych blokują aktywność ssDNA endonukleaz wobec dsDNA [247], ssDNA specyficzne endonukleazy nie są wrażliwe na wysokie stężenia soli [278]. Ze względu na regulację aktywności dezoksyendonukleaz w chromatynie in vitro jest ważne stwierdzenie faktu istnienia specyficznych inhibitorów tych enzymów [120, 248].

Możliwość rozpoznawania małych zaburzeń struktury helisy DNA, połączona ze zdolnością tworzenia „nacięć”, jest charakterystyczna dla endonukleaz reperacyjnych (korrendonukleaz). Znane są enzymy Eukaryota korygujące błędy replikacji polimeraz DNA [208]. Korrendonukleazy typu I (endonukleaza II wprowadzająca nacięcia w pobliżu miejsc apurynowych, apirymidynowych i alkilowanych zasad [134]) oraz korrendonukleazy typu II (UV-endonukleazy), wprowadzające nacięcia w pobliżu dimerów pirymidynowych, wiązań poprzecznych DNA, uszkodzeń po napromieniowaniu  $\gamma$  i po działaniu makromycyny [15]. Korrendonukleazy II tworzą nacięcia zakończone grupami —3'OH i 5'P— w pobliżu dimeru [31]. Korrendonukleaza APu/APi wprowadza nacięcia w ten sposób, że miejsce apurynowe pozostaje przy —3'OH końcu [167]. Enzym ma masę cząsteczkową 24-40 kD, jest stymulowany jonami  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ , wymaga pH 7,5-9, hamowany jest jonami  $Ca^{2+}$ , NaCl, EDTA, tRNA, adeniną, hypoksantyną, adenozyną, AMP oraz NAD [149], nie jest wrażliwy na kofeinę, NADH, ADP, ATP, uracyl, cytozynę [125, 167, 258]. APu/APi endonukleazy błony jądrowej są stymulowane Tritonem X100,



nukleoplazmy raczej inhibowane [257]. Kwaśne DN-azy jądrowe są specyficzne dla ssDNA, dają w wyniku depolimeryzacji DNA —3'P oligonukleotydy. Enzymy te, aktywne przy pH 4,9-5,1, są hamowane w obecności jonów  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CH_2JCOO^-$ . Opisano tkankowe inhibitory kwaśnych DN-az jądrowych [158].

Egzodezoksynukleazy jądrowe są specyficzne dla dsDNA lub ssDNA. Część tych enzymów jest zaangażowana w procesach reperacji uszkodzeń DNA (korregzonukleazy). Egzodezoksynukleaza III depolimeryzuje ssDNA i dsDNA w kierunku 3'-5' dając w wyniku 5'P dezoksynukleotydy [134]. Egzodezoksynukleaza IV jest dsDNA specyficzną korregzonukleazą zaangażowaną w wycinaniu dimerów pirymidynowych w kierunku 5'-3', dając w wyniku 5'P dezoksynukleotydy [162]. Podobny enzym został opisany w komórkach drożdży (egzonukleaza I drożdży) [273]. Korregzonukleaza ssDNA specyficzna depolimeryzuje DNA w kierunku 3-5'. Znanym jest też enzym typu egzodezoksynukleazy (DN-aza V Eukaryota), depolimeryzujący dsDNA w obu kierunkach (3'-5' i 5'-3' od nacięcia) [188]. Pewne polimerazy DNA mogą wykazywać aktywność ssDNA egzonukleaz [17].

#### 10. RN-azy JĄDROWE

Endorybonukleazy jądrowe pełnią prawdopodobnie rolę przy dojrzewaniu prekursorowych drobin mRNA, tRNA i rRNA [85]. Zahamowanie aktywności RN-az jądrowych zabezpiecza nowo syntetyzowane produkty przed depolimeryzacją hamuje jednak jego „dojrzewanie”, a być może nawet elongację transkrypcji.

Jąderka komórkowe zawierają specyficzne endorybonukleazy zaangażowane w dojrzewaniu prekursorów rRNA [63]. Enzymy te przy braku białek preribosomów (a sytuacja taka może mieć miejsce w izolowanych jądrach komórkowych) niszczą kompletnie prekursor rRNA [295]. Endonukleaza jąderkowa A rozkłada RNA do 5'P oligorybonukleotydów, endonukleaza B — do 5' rybonukleozydofosforanów [152]. W dojrzewaniu prekursorów tRNA są zaangażowane liczne endorybonukleazy. U Eukaryota stwierdzono m. in. enzymy analogiczne do RN-az  $P_1$  i  $P_2$  Prokaryota (usuwających 3' i 5' końcowe nukleotydy prekursora tRNA) [6]. Opisano też enzymy odpowiedzialne prawdopodobnie za wycinanie sekwencji intronowych w prekursorowych tRNA [199].

Główne endonukleazy nukleoplazmy są zaangażowane w dojrzewaniu prekursorów mRNA w rozpadzie pierwotnego transkryptu [153]. Rybonukleazy D (RN-azy ds) analogiczne do ds RN-azy III z *Escherichia coli* biorą prawdopodobnie udział w dojrzewaniu prekursorów mRNA, usu-



wając połowę struktur palindromowych [211]. Istnienie RN-az D w jądrach komórkowych budzi pewne wątpliwości, są to enzymy spotykane raczej we frakcji rybosomów [26]. Wydaje się jednak, że występują również w jądrach komórkowych w zestawie białek hnRNP [210] lub w nukleoplaźmie. RN-azy D są inaktywowane bromkiem etydyny w stężeniu  $10^{-5}M$ .

Endonukleazy aktywowane  $ppp(A2'p)_nA$  są częściowo specyficzne dla sekwencji UpAp i UpN i mogą być zaangażowane w regulacji proliferacji komórek [299]. Pewna grupa endorybonukleaz jądrowych depolimeryzuje specyficznie rybohomopolimery. Z tych enzymów poli(A) endorybonukleaza (endorybonukleaza IV) może brać udział w dojrzewaniu mRNA [224]. Enzym ten (EC.3.1.4.9) jest najbardziej aktywny w pH 7,5-8,0 w sile jonowej 20-300 mM, aktywują go jony  $Mg^{2+}$ , może również depolimeryzować inne homopolimery i RNA [191]. Pewne enzymy z tej grupy preferują raczej poli(U) lub poli(C) [295].

Egzorybonukleazy jądrowe również biorą udział w dojrzewaniu prekursorowych RNA. Najbardziej charakterystycznym enzymem tej grupy jest egzonukleaza 3'-5', depolimeryzująca poli(A) i poliadenylowany mRNA [155, 223]; jest ona silnie inhibowana już w 200 mM NaCl. Również obecność 2'-O metylowanych nukleotydów hamuje aktywność egzorybonukleaz [243].

Rybonukleazy hybrydowe (RN-azy H) usuwają polirybonukleotydy z hybrydów RNA-DNA (EC.3.1.4.34). Znane są dwie główne RN-azy H: wysokocząsteczkowa (80 kD) RN-aza H1, zaangażowana w syntezie DNA, usuwa prawdopodobnie starterowe oligorybonukleotydy z fragmentów Okazaki [37, 38], oraz RN-aza H2 o masie cząsteczkowej 30 kD ma być zaangażowana w terminacji syntezy RNA [130]. RN-azy H są hamowane SADM, nie są natomiast wrażliwe na  $\alpha$ -amanitynę, AcD, fosforany i pirofosforany oraz pCMB. Specyfika ich działania zależy w dużym stopniu od rodzaju jonów dwuwartościowych [220, 240].

Oprócz rybonukleaz w preparatach jąder komórkowych znajdują się mogą inhibitory tych enzymów pochodzące z cytozolu [24, 230], jak również specyficzne dla jąder komórkowych [233].

## 11. KINAZY BIAŁKOWE

Fosforylacja białek niehistonowych chromatyny może zmieniać konformację nukleosomów i wpływać na aktywność matrycową [98, 161]. Zwłaszcza fosforylacja białek HMG-14 i HMG-17 może mieć znaczenie w regulacji transkrypcji [8, 275]. Podobne znaczenie może mieć fosforylacja podjednostek polimeraz RNA [30, 59, 242]. Natomiast fosforyla-



cja białek matriks jądrowej może odgrywać rolę w inicjacji syntezy DNA [5].

Enzymy fosforylujące białka jądrowe są zazwyczaj dzielone na kinazy zależne i niezależne od cyklicznego AMP. cAMP zależne kinazy są słabo związane z chromatyną i mogą być ekstrahowane 0,3 M NaCl [164]. Wątpliwe jest czy są to enzymy jądrowe [79, 232], chociaż wydaje się pewne, że są obecne w jądrach komórek grasicy [179]. cAMP zależne kinazy są specyficzne dla histonów, ale mogą również fosforylować pewne białka niehistonowe, podjednostki polimeraz RNA i białka hnRNP [109, 294]. Kinazy histonów fosforylują histony H1 i H5 (np. histon H1B w N-końcowej treoninie), wpływając bardzo silnie na dekondensację chromatyny [4, 28]. Natomiast defosforylacja histonów zwiększa kondensację chromatyny, zwłaszcza defosforylacja histonu H5 w erytrocytach przekształca go w superrepresor [245]. Kinazy histonów, zwłaszcza specyficzne dla histonu H4, są niekiedy zależne od cGMP [163].

Fosforylacja histonów H1 i H3 wydaje się ściśle uzależniona od cyklu życiowego komórki, natomiast fosforylacja histonów H2A i H5 nie [28]. Są jednak doniesienia, że fosforylacja histonów jest słabo skorelowana z cyklem życiowym komórek [203].

Fosforylacja jest stymulowana 5  $\mu$ M cAMP i merkaptoetanolem [52]. Wydaje się, że istnieje cały złożony system regulujący fosforylację i defosforylację histonów. W skład tego systemu obok cAMP wchodziłyby glukagon i insulina [249], a także wewnątrzjądrowe białko kalmodulina (CDR) i jądrowe inhibitory kinaz zależnych i niezależnych od cAMP [79, 232, 298] oraz poliaminy [190]. Interesująca jest ścisła zależność między blokowaniem defosforylacji histonów przez  $\text{ClHgPhSO}_3$  lub 50 mM siarczyn sodowy, a ich silnym wpływem hamującym na proteolizę histonów [99]. Natomiast jednooctan lub NEM hamują znacznie silniej proteolizę niż defosforylację histonów.

Kinazy białkowe niezależne od cAMP stanowią heterogenną grupę enzymów o różnej specyficzności substratowej [78, 135], przenoszą grupy fosforanowe z ATP, dATP lub GTP na białka kwaśne (NHP lub kazeinę) [13]. Opisywane są najczęściej dwie kinazy niezależne od cAMP: I i II ( $A_1$  i  $A_2$  lub NI i NII) [51]. Enzymy te są silnie związane z chromatyną jądrową, fosforylują białka w grupach —OH seryny i treoniny [79]. Stałe sedymentacji są odpowiednio 3,6 i 10,8s, optymalne pH 6,0-6,5 i 7,0-7,5, są termolabilne, zależne od obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  lub  $\text{Ca}^{2+}$ , stymulowane obecnością polianionów [10, 190]. Kinazy niezależne od cAMP nie są wrażliwe na jodooctan, ale są hamowane przez jony metali jednowartościowych, NEM, pCMB, ADP, adeninę, kordycepinę, 6-merkaptopurynę i tubericydynę [3, 98].



## 12. POLIMERAZY POLI(ADP-RYBOZY)

Zahamowanie poliryboadenylacji białek jądrowych w układzie *in vitro* (brak NAD) może prowadzić do wzrostu aktywności endodezoksyrybonukleaz, zwłaszcza zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  [305]. Nadmierna poli(ADP) rybozylacja histonów może jednak prowadzić do kondensacji chromatyny i do obniżenia własności matrycowych [209].

Polimerazy poli(ADP rybozy) są białkami silnie związanymi z chromatyną (nie dysocjują w 1 M NaCl), rozmieszczonymi głównie w regionach międzynukleosomowych [193]. Katalizują tworzenie wiązań glikozydowych między 1'C rybozy i 2'OH rybozy z NAD. Wydaje się, że osobne enzymy przeprowadzają ADP-rybozylację i elongację nici polimeru (ADPR) [269], chociaż — być może — obie reakcje katalizuje jedno białko [252]. Zazwyczaj do białek przyłączane są krótkie (1-3 reszty) łańcuchy poli(ADPR) [19]. Masa cząsteczkowa enzymu izolowanego z komórek raka wysiękowego Ehrlicha wynosi 130 kD, pI — 9,4 [146].

Opisana jest reakcja poliadenylacji zależna od DNA i histonu oraz poliadenylacja zależna od obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$ . W tym ostatnim przypadku tworzone są dłuższe (do 12 reszt) łańcuchy poli(ADPR) [252]. Stymulujący DNA powinien zawierać jednołańcuchowe „napięcia”. DNA pełni rolę stabilizatora konformacji enzymu i nie jest substratem podlegającym poliryboadenylacji [19]. Reakcja przebiega w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  (do 20 mM) i DTT (0,5 mM). Poliaminy stymulują jej przebieg. Optymalne pH 7,8, temperatura około 27°C [127, 291]. EDTA niewiele hamuje aktywność poli(ADPR) polimerazy, natomiast nikotynamid, tymidyna i sama ADP-ryboza są inhibitorami [146]. Substratami jądrowymi poli(ADP) rybozylacji są głównie histony H1, H2B, H2A, ale nie H3 i H4, a także białka HMG-1 i HMG-14 [93, 291]. Jeszcze bardziej selektywnie są (ADP)rybozylowane białka niehistonowe [121]. Również białka enzymatyczne jąder komórkowych, m. in. endodezoksynukleaza  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  zależna ulegają poli(ADP) rybozylacji [305]. Rola ADP-rybozylacji białek jądrowych w procesach reperacji DNA była postulowana najwcześniej. Przegląd literatury dotyczący tego problemu zawarty jest w wielu publikacjach [201, 304]. Rozważana jest również możliwość zaangażowania tej modyfikacji białek w replikacji DNA [21] i w różnicowaniu komórek [201, 204]. Enzymami rozkładającymi poli(ADP) rybozę są fosfodwuesterazy i glikohydrolazy, opisano też komórkowe inhibitory poli(ADPR) polimeraz.

## 13. ACETYLOTRANSFERAZY BIAŁEK JĄDROWYCH

Acetylacja histonów H3 i H4 zmienia konformację nukleosomów w kierunku takiej dekondensacji chromatyny, która zwiększa jej aktyw-



ność matrycową [102, 293]. Histony heterochromatyny nie są acetylowane [102]. Acetylacja histonów H1 jest prawdopodobnie związana ze zmianami konformacji chromatyny w cyklu życiowym komórki [228]. W jądrach komórkowych istnieje układ deacetylujący histony [115]. 15 mM maślan sodowy i inne alifatyczne kwasy karboksylowe hamują deacetylację histonów (literatura do tego zagadnienia jest zebrana m. in. w pracy Hallecka i Gurleya [102]). Po zastosowaniu inhibitorów obserwowana jest hyperacetylacja histonów połączona z utrzymaniem wysokiej aktywności matrycowej i z zahamowaniem syntezy DNA. Istnieją również specyficzne acetylotransferazy białek niehistonowych [126].

Wszystkie te spostrzeżenia wskazują, że utrzymanie stanu acetylacji białek niehistonowych i histonów w czasie izolowania i inkubacji *in vitro* preparatów izolowanych jąder komórkowych może mieć bardzo duże znaczenie w badaniach reakcji transkrypcji. Acetylotransferazy białek jądrowych stanowią grupę enzymów o różnej specyficzności. Acetylazy histonów (EC.2.3.1.48) są heterogenne: acetylaza A (80 kD) ma dość niską specyficzność, acetyluje głównie histon H3, acetylaza B (90 kD) jest specyficzna dla histonów H1 i H4, acetylaza DB jest specyficzna dla histonów H3 i H4 a także H2A i H2B [27, 197]. Ogólnie enzymy przenoszą reszty acetylowe z acetylokoenzymu A na  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> grupy lizyny i seryny histonów argininowych H3 i H4 [293]. Reakcja jest hamowana cysteiną i jonami Me<sup>2+</sup>, stymulowana poliaminami [22, 60].

#### 14. METYLOTRANSFERAZY BIAŁEK JĄDROWYCH

Metylacja histonów wydaje się reakcją podobną do acetylacji. Podlegają jej głównie histony argininowe H3 i H4, przy czym reszty metylowe pochodzące z SAM są wprowadzane głównie w pozycję  $\epsilon$ -N lizyny [81, 244, 294]. Poliamidy hamują tę reakcję [54].

Metylazy histonów stanowią heterogenną grupę enzymów (metylazy I, II i III) [133]. Metylacja histonów odgrywa prawdopodobnie ważniejszą rolę w replikacji DNA niż w regulacji transkrypcji [81].

#### 15. PROTEAZY

Proteoliza w układzie izolowanych jąder komórkowych jest prawdopodobnie główną przyczyną rozpadu i niestabilności zawiesiny jąder komórkowych i uszkodzenia matryc. Dlatego proteazy jądrowe powinny być jak najskuteczniej hamowane w układach *in vitro*. Przeglądy literatury dotyczące tych enzymów były publikowane w polskim piśmiennictwie [170].



Proteaza serynowa (proteaza A) jest enzymem działającym w wysokich stężeniach soli (2M NaCl i 5 M mocznik) i w niskich temperaturach, chociaż optymalne stężenie soli wynosi 0,5 M. Optymalne pH wynosi 8,0-9,0 [42]. W jądrze komórkowym istnieją prawdopodobnie różne proteazy serynowe — enzym o masie cząsteczkowej 24 kD (optymalne pH 8,5) i enzym o masie cząsteczkowej 16 kD (optymalne pH 7,8). Proteazy te są silnie związane z chromatyną i nie są wrażliwe na czynniki blokujące grupy —SH ani na EDTA. Inhibitorami proteaz serynowych są 1 mM PMSF i 1 mM dwuizopropylofluorofosforan i czynniki alkilujące. Karbo-benzoksy-fenyloalanino-chlorometyloketon i paranitrofenyloaceton w stężeniu 10 mM hamują ją odwracalnie. Fizjologiczna rola tej proteazy nie jest znana, wydaje się, że jej aktywność jest niska w chromatynie nieaktywnej transkrypcyjnie (erytrocyty ptasie) [42].

Proteaza tiolowa (proteaza B) jest dość specyficzna dla zasadowych białek histonów i rybosomów jądrowych. Jej masa cząsteczkowa wynosi około 40 kD, zakres pH 4,4-7,8 przy optymalnym pH 5,5. Do optymalnej aktywności wymaga: 1 mM EDTA i 2 mM DTT [265]. Inhibitorami proteazy tiolowej są E64 (mieszanina izomerów optycznych N/N-(DS-trans-karboksyoksirankarbonyl/L-leucylo/agmatyny)), NEM, jodoacetamid (1 mM), pCMB, inhibitor sojowy trypsyny, Triton X100 (0,5% obniża aktywność proteazy tiolowej o 70%) [104, 265].

Opisano również inne proteazy chromatyny, np. wysokomolekularna proteaza Bonnera o masie cząsteczkowej 200 kD [49].

## 16. FOSFOTRANSFERAZY I FOSFATAZY JĄDROWE

W publikacjach przed 1970 r. przypisywano jądrum komórkowym, zwłaszcza izolowanym z komórek grasicy, zdolność syntezy ATP, a nawet zdolność do oksydatywnej fosforylacji [136]. Obecnie wydaje się to mniej pewne. Również obecność kinazy kreatynowej (EC.2.7.3.2) wydaje się ograniczona do pewnych tylko typów komórek [77, 189]. Fosfatazy nukleozydotrójfosforanów, zwłaszcza ATP-azy są powszechnie obecne w jądrach komórkowych. ATP-azy są zależne od jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , być może są to dwa odrębne enzymy [270]. Jony  $HCO_3^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Na^+$  i  $K^+$  aktywują ATP-azy, jony  $Ba^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  — 2,4-dwunitrofenol (dla  $Mg^{2+}$  zależnej ATP-azy),  $F^-$ ,  $CNS^-$ ,  $J^-$ ,  $ClO_4^-$  i pCMB hamują aktywność ATP-az [117, 270]. Stosowanie antybiotyków nystatyny i amfoterycyny B w preparatach izolowanych jąder komórkowych podwyższa aktywność ATP-az [9]. Jądra komórkowe zawierają ATP-azy zależne od DNA [101], częściowo omawiane łącznie z białkami destabilizującymi helisę DNA. Opisano również dwufosfatę nukleozydotrójfosforanów z chromatyny jądrowej [108] i dUTP-azę w komórkach HeLa [172].



Obecność aktywnych fosfataz nukleotydów w preparatach jąder komórkowych może wywierać duży wpływ na stabilność substratów reakcji transkrypcji i być jedną z głównych przyczyn nieliniowego wbudowywania prekursorów RNA w tym układzie.

#### 17. INNE ENZYMY

Jądra komórkowe mogą zawierać wiele innych układów enzymatycznych, m. in. enzymy glikolizy obecne zwłaszcza w jądrach komórkowych izolowanych w środowisku niewodnym [147], enzymy zaangażowane w translacji, reduktazy rybonukleotydowe odwracalnie hamowane EDTA hydroksymocznikiem lub 2-azydocytydyną [75], reduktazę GDP [267] i enzymy przeprowadzające dezoksynukleozydofosforany w rybonukleozydofosforany (dCTP) [261]. Aktywność tych enzymów może mieć znaczenie wobec stosowania znakowanych nukleozydotrójfosforanów jako prekursorów syntezy RNA i DNA.

W izolowanych jądrach komórkowych stwierdzono również obecność NADPH zależnej reduktazy cytochromu P-450, fosforylasy NAD, NAD-azy hydrolizującej wiązanie nikotynamid — ryboza w NAD i NADP. Wynikiem reakcji jest utworzenie swobodnej ADP-rybozy [268].

Obecność aktywnych fosfataz w preparatach jąder komórkowych może wywierać duży wpływ na stabilność substratów reakcji i być jedną z głównych przyczyn nieliniowego wbudowywania prekursorów RNA w tym układzie.

#### LITERATURA

- [1] ADAMS R. L. P., McKAY E. L., CRAIG L. M., BURDON R. H., Methylation of mosquito DNA, *Biochim. Biophys. Acta.*, **563**: 72-81, 1979.
- [2] ADOLF G. R., SWETLY P., Poly (A) polymerase activity during cell cycle and erythropoietic differentiation in erythroleukemic mouse spleen cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 334-344: 1978.
- [3] AHMED K., Studies on nuclear phosphoproteins of rat ventral prostate. Incorporation of  $^{32}\text{P}$  from ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP, *Biochim. Biophys. Acta*, **243**: 38-48, 1971.
- [4] AJIRO K., BORUN T. W., COHEN L. H., Phosphorylation sites of different histone 1 subtypes and their relationship to chromatin function during the HeLa S3 cell cycle, *Biochemistry*, **20**: 1445-1454, 1981.
- [5] ALLEN G. L., BEREZNEY R., COFFEY D. S., Phosphorylation of nuclear matrix proteins in isolated regenerating rat liver nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**: 111-116, 1977.
- [6] ALTMAN S., Transfer RNA biosynthesis [w]: *International Review of Biochemistry* (red. B. F. C., Clark), **17**: 19-44, 1978, Baltimore Univ. Park Press.
- [7] ANDERSON S., KAUFMAN G., De PAMPHILIS M., RNA primers in SV40



- DNA replication: identification of transient RNA-DNA covalent linkages in replicating DNA, *Biochemistry*, **16**: 4990-4998, 1977.
- [8] ARFMANN H. A., HAASE E., SCHROTER H., High mobility group proteins from CHO cells and their modifications during cell cycle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**: 137-143, 1981.
- [9] ASINOVSKAYA N. K., SOKOLOV V. N., KRAVCHENKO L. S., TERE-SHIN L. M., Changes of ATPase activity in dog kidney nuclear membranes under the effect of polyenic antibiotics, *Biokhimija*, **43**: 1019-1023, 1978.
- [10] ATMAR V. J., DANIELS G. R., KUEHL G. D., Polyamine stimulation of phosphorylation of nonhistone proteins in nuclei and nucleoli from *Physarum polycephalum*, *Eur. J. Biochem.*, **90**: 29-37, 1978.
- [11] BAASE W. A., WANG J. C., An  $\omega$  protein from *Drosophila melanogaster*, *Biochemistry*, **13**: 4299-4303, 1974.
- [12] BARTNIKOWA W., Polimerazy DNA komórek eukariotycznych i rewertazy onkowirusów, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 1-20, 1981.
- [13] BAYDOON H., HOPPE J., FRIEST W., WAGNER K. G., The ATP substrate site of a cyclic-nucleotide independent protein kinase from porcine liver nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **115**: 385-389, 1981.
- [14] BEEMON K. L., KEITH J., Localization of N<sup>6</sup>-methyladenosine in the Rous sarcoma virus genome, *J. Biol. Chem.*, **113**: 165-179, 1977.
- [15] BEERMAN T. A., Strand scission superhelical and linear duplex DNAs by the antitumour protein macromycin, Relationship of in vivo DNA damage to cell growth inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **564**: 361-371, 1979.
- [16] BELL G. I., VALENZUELA P., RUTTER W. J., Phosphorylation of yeast DNA-dependent RNA polymerase in vitro and in vivo. Isolation of enzymes and identification of phosphorylated subunits, *J. Biol. Chem.*, **252**: 3082-3092, 1977.
- [17] BELL D. E., FRIDLAND A., Mode of action of 9- $\beta$ -D arabinosyladenine and 1- $\beta$ -D arabinosylcitidine on DNA synthesis in human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta* **606**: 57-66, 1980.
- [18] BENBOW R. M., FORD C. C., Cytoplasmic control of nuclear DNA synthesis during early development of *Xenopus laevis*. Cell free assay, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**: 2437-2441, 1975.
- [19] BENJAMIN R. C., GILL D. M., ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly (ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA, *J. Biol. Chem.* **255**: 10493-10501, 1980.
- [20] BENSCH K. G., TANAKA S., HU S-Z., SHU-WANG T., KORN D., Intracellular localization of human DNA polymerase  $\alpha$  with monoclonal antibodies, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8391-8396, 1982.
- [21] BERGER N. A., KAICHI A. S., STEWARD P. G., KLEVECZ R. R., FORREST G. L., GROSS S. D., Synthesis of poly (adenosine diphosphate ribose) in synchronized Chinese hamster cells, *Exptl. Cell Res.*, **117**: 127-135, 1978.
- [22] BERKOVIC G. F., MAURITZEN C. M., Acetylation of histones in isolated erythroid nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**: 160-167, 1977.
- [23] BERNARDI G., APPELA E., ZITO R., Studies on acid deoxyribonuclease. III. Physical and chemical properties of hog spleen acid deoxyribonuclease, *Biochemistry*, **4**: 1725-1729, 1965.
- [24] BLACKBURN P., JAILKHANI B. L., Ribonuclease inhibitor from human placenta interaction with derivatives of ribonuclease A., *J. Biol. Chem.*, **254**: 12488-12493, 1979.



- [25] BOLOUKHERE M., THOMAS C., HEILPORN-POHL V., HANOCQ F., BRACHET J., Nuclear localization of "template bound" RNA polymerase I in nuclei of *Xenopus laevis* blastulae, *Exptl. Cell Res.*, **130**: 291-296, 1980.
- [26] BOTHWELL A. L. M., ALTMAN S., Partial purification and properties of an endoribonuclease isolated from human KB cells, **250**: 1451-1459, 1975.
- [27] BÖHM J., SCHLAEGER E. J., KNIPPERS R., Acetylation of nucleosomal histones in vitro, *Eur. J. Biochem.*, **112**: 353-362, 1980.
- [28] BRADBURY E. M., INGLIS R. J., MATTHEWS H. R., Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation, *Nature (London)*, **247**: 257-261, 1974.
- [29] BRAUNGRABER E. G., EARLY A., Autolytic release of DNA from nuclei prepared from rat brain, *Biochem. J.*, **102**: 17p, 1967.
- [30] BRÉANT B., BUHLER J. M., SENTENAC A., On the phosphorylation of yeast RNA polymerase A and B, *Eur. J. Biochem.*, **130**: 247-251, 1983.
- [31] BRENT T. P., Repair enzyme suggested by mammalian endonuclease activity specific for ultraviolet-irradiated DNA, *Nature New Biol.*, **239**: 172-173, 1972.
- [32] BRISCHAMMAR S., JUNTTI N., A poly (U) polymerase in tobacco leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, **383**: 351-358, 1975.
- [33] BRONSTEIN A. D., LELEIKO N. S., MUNRO H. N., RNA synthesis by villus and crypt cell nuclei of rat intestinal mucosa, *Biochim. Biophys. Acta*, **739**: 334-343, 1983.
- [34] BROWNE M. J., TURNBULL J. F., McKAY E. L., ADAMS R. L. P., BURDON R. H., The sequence specificity of a mammalian DNA methylase, *Nucl. Acids Res.*, **4**: 1039-1045, 1977.
- [35] BRYSCH B., Sekwencje poli (A) w kwasach rybonukleinowych, *Post. Biochem.*, **19**: 377-391, 1973.
- [36] BUHLER J. M., HUET J., DAVIES K. E., SENTENAC A., FROMAGEOT P., Immunological studies of yeast nuclear RNA polymerase at the subunit levels, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9949-9954, 1980.
- [37] BUSEN W., Purification, subunit structure and serological analysis of calf thymus ribonuclease H1, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9434-9443.
- [38] BUSEN W., The subunit structure of calf thymus ribonuclease H1 as revealed by immunological analysis, *J. Biol. Chem.*, **257**: 7106-7108, 1982.
- [39] BYRNES J. J., DOWNEY K. M., BLACK V. L., ESSERMAN L., SO A. G., Selective inhibition of the 3' to 5' exonuclease activity associated with mammalian DNA polymerase  $\delta$ , *Miami Winter Symp.*, **12**: 245-266, 1976.
- [40] CANTAROW W., STOLLAR B. O., Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase a nonhistone chromatin protein. Purification and properties of the chicken erythrocyte enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**: 26-34, 1977.
- [41] CARADONNA S. J., CHENG Y-C., Uracil DNA-glycosylase. Purification and properties of the enzyme isolated from blast cell of acute myelocytic leukemia patients, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2293-2300, 1980.
- [42] CARTER D. B., CHAE C-B., Chromatin bound protease: Degradation of chromosomal proteins under chromatin dissociation conditions, *Biochemistry*, **15**: 180-186, 1976.
- [43] CAYLEY P. J., KERR J. M., Synthesis and biological significance of (2-5) oligoadenylate derivatives of NAD, ADP-ribose and adenosine (5') tetraphospho (5') adenosine., *Eur. J. Biochem.*, **1982**: 122, 601-608.
- [44] CHAMBON P., Eukaryotic nuclear RNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**: 613-638, 1975.



- [45] CHANG J. M. C., BOLLUM F. J., Cyclic AMP-dependent phosphorylation of terminal deoxynucleotidyl transferase, *J. Biol. Chem.*, **257**: 9588-9592, 1982.
- [46] CHEN Y-C., BOHN E. W., PLANK S. R., WILSON S. H., Mouse DNA polymerase  $\alpha$ . Subunit structure and identification of a species with associated exonuclease *J. Biol. Chem.*, **254**: 11678-11687, 1979.
- [47] CHENG T. C., KAZAZIAN H. H., Sequential methylation of globin mRNA in nucleated erythroid cells and reticulocytes of mice, *J. Biol. Chem.*, **253**: 246-251, 1978.
- [48] CHIU J. F., CRADDOCK C., HNILICA L. S., Bound forms of nuclear DNA polymerase in regenerating and neoplastic rat livers, *FEBS Lett.*, **36**: 235-238, 1973.
- [49] CHONG M. T., GARRARD W., BONNER J., Purification and properties of a neutral proteases from rat liver chromatin, *Biochemistry*, **13**: 5128-5134, 1974.
- [50] CHOU M. Y., MATSUMOTO H., FUKATA H., FUKUSAWA H., Template specific inhibitor for DNA polymerase isolated from Cauliflower inflorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**: 48-54, 1981.
- [51] CHRISTMANN J. L., DAHMUS M. E., Phosphorylation of rat ascites tumor non-histone chromatin proteins. Differential phosphorylation by two cyclic nucleotide independent protein kinases and comparison to in vivo phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3326-3331, 1981.
- [52] CHUANG D. M., HOLLENBECK R. A., COSTA E., Protein phosphorylation in nuclei of adrenal medulla incubated with cyclic adenosine 3'5' monophosphate dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **252**: 8365-8373, 1977.
- [53] CORDIS G. A., GOLDBLATT P. J., DEUTSCHNER N. P., Purification and characterization of a major endonuclease from rat liver nuclei, *Biochemistry*, **14**: 2596-2602, 1975.
- [54] CORY M., HENRY D. W., TAYLOR D. L., KOSKELA K. J., Inhibitors of histone methylation, *Chem. Biol. Interactions*, **9**: 253-259, 1974.
- [55] COX R., PRESCOTT C., IRVING C. C., The effect of S-adenosylhomocysteine on DNA methylation in isolated rat liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **474**: 493-500, 1977.
- [56] COX R., Polyamines inhibit DNA methylation in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**: 594-598, 1979.
- [57] CREUSOT F., ACS G., CHRISTMAN J. K., Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza 2' deoxycytidine, *J. Biol. Chem.*, **257**: 2041-2048, 1982.
- [58] DAHMUS M. E., Multiple forms of a eukaryotic RNA polymerase II stimulation factor, *FEBS, Lett.*, **61**: 227-230, 1976.
- [59] DAHMUS M. E., Phosphorylation of Eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. Identification of calf thymus RNA polymerase subunits phosphorylated by two purified protein kinases, correlation with in vitro sites of phosphorylation in HeLa cell RNA polymerase II, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3332-3339, 1981.
- [60] DAS R., KANUNGO M. S., Effects of polyamines on in vitro phosphorylation and acetylation of histones of the cerebral cortex of rats of various age, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 708-714, 1979.
- [61] DEAKIN H., ORD M. G., STOCKEN L. A., Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and thiol content of thymus nuclei from control and X-irradiated rats. *Biochem. J.*, **89**: 296-304, 1963.



- [62] DEIBEL M. R. Jr., COLEMAN M. S., Purification of a high molecular weight human terminal deoxynucleotidyl-transferase, *J. Biol. Chem.*, **254**: 8634-8640, 1979.
- [63] DENOYA C., COSTA-GIOMI P., SCODELLER E. A., VASQUEZ C., LaTORRE J. L., Processing of naked 45-S ribosomal RNA precursor in vitro by an RNA associated endoribonuclease, *Eur. J. Biochem.*, **115**: 375-383, 1981.
- [64] DESROSIERS R. C., ROTTMAN F. M., BOEZI J. A., TOWLE H. C., The sensitivity of RNA polymerase I and II from Novicoff hepatoma N1G1 cells to 3' deoxyadenosine 5' triphosphate, *Nucl. Acids Res.*, **3**: 325-332, 1976.
- [65] DEUTSCH U. A., LINN S., DNA binding activity from cultured human fibroblasts that is specific for partially depurinated DNA and that inserts purines into apurinic sites, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 141-144, 1979.
- [66] DEZELEÉ G., WYERS F., SENTENAC A., FROMAGEOT P., Two forms of RNA polymerase B in yeast. Proteolytic conversion in vitro enzyme BI into BII., *Eur. J. Biochem.*, **65**: 543-552, 1976.
- [67] Di CIOCCIO R. A., SRIVASTAVA B. I. S., Selective inhibition of terminal deoxynucleotidyl-transferase from leukemic cells by streptoligidin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**: 1343-1350, 1976.
- [68] DIMITRIADIS G. J., TATA J. R., Subnuclear fractionation by mild micrococcal nuclease treatment of nuclei of different transcriptional activities causes a partition of expressed and nonexpressed genes, *Biochem. J.*, **187**: 467-477, 1980.
- [69] DIMOCK K., STOLTZFUS M., Cycloleucine blocks 5' terminal and internal methylations of Avian Sarcoma Virus genome RNA, *Biochemistry*, **17**: 3627-3632, 1978.
- [70] DOOLEY M. M., HALLING S. M., DOI R. H., Template independent poly (A). poly (U) synthesizing activity of different forms of *Bacillus subtilis* RNA polymerase, *Biochim. Biophys. Acta*, **610**: 158-166, 1980.
- [71] DOUGLAS M., FRAMBROUGH M. Jr., Nuclear proteins [w] Handbook of molecular cytology (red. Lima de Faria A.), North Holland Publ. Co., 437-464, 1973.
- [72] DUBE D. K., KUNKEL T. A., SEAL G., LOEB L. A., Distinctive properties of mammalian DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Acta*, **561**: 369-382, 1979.
- [73] DUGUET M., SOUSSI T., ROSSINBOL J. M., MECHALI M., DeRECONDO A. M., Stimulation of rat liver  $\alpha$ - and  $\beta$ -type polymerases by an homologous DNA unwinding protein, *FEBS Lett.*, **77**: 160-164, 1977.
- [74] DYMSHITZ G. M., FET V. V., A protein factor from regenerating rat liver destabilizing the secondary DNA structure, *Mol. Biol. (Moscow)*, **11**: 531-536, 1977.
- [75] ENGSTROM Y., ERICSSON S., THELANDER L., AKERMAN M., Ribonucleotide reductase from calf thymus. Purification and properties, *Biochemistry*, **18**: 2941-2948, 1979.
- [76] ELIASSON R., REICHARD P., Replication of polyoma DNA in isolated nuclei. VII. Initiator RNA synthesis during nucleotide depletion, *J. Mol. Biol.*, **129**: 393-419, 1979.
- [77] ERASHOVA N. S., SAKS V. A., SHAROV V. G., LYZLOVA S. N., Creatine kinase from muscle cell nuclei, *Biokhimiya*, **44**: 372-378, 1979.
- [78] FAMULSKI K. S., Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne substraty jądrowych kinaz białkowych, *Post Biochemii*, **23**: 379-397, 1975.



- [79] FARRON-FURSTENTHAL F., Two naturally occurring inhibitors of nuclear protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4589-4595, 1980.
- [80] FICHOT O., PASCAL M., MECHALI M., de RECONDO A. M., DNA polymerase  $\alpha$  from regenerating rat liver. Catalytic properties of the highly purified enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **561**: 29-41, 1979.
- [81] FIDWELL T., ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., Methylation of histones during regeneration of the liver, *J. Biol. Chem.*, **243**: 707-709, 1968.
- [82] FISHER P. A., KORN D., Enzymological characterization of KB cell DNA polymerase  $\alpha$ . II. Specificity of the protein-nucleic acid interaction, *J. Biol. Chem.*, **254**: 11033-11039, 1979.
- [83] FISHER P. A., WANG T. S., KORN D., Enzymological characterization of DNA polymerase  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **254**: 6128-6137, 1979.
- [84] FRAMBROUGH D. M. Jr., Nuclear protein factors, [w] Handbook of molecular cytology (red. Lima de Faria A.), North Holland Publ. Co., 437-477, 1973.
- [85] FRANKE W. W., SCHEER U., SPRING K., TRENDELENBURG M. F., KROHNE S., Morphology of transcriptional units of rRNA. Evidence for transcription in apparent spacer intercepts and cleavage in the elongating nascent RNA, *Exptl. Cell Res.*, **100**: 233-244, 1976.
- [86] FRIDLENDER B., FRY M., BOLDEN A., WEISSBACH A., New synthesis RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 452-455, 1972.
- [87] GAFUROV Y. M., TEREENTIEV L. J., RASSKAZOV V. A., Isolation and some properties of ATP independent DN-ase from sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) embryos, *Biokhimiya*, **44**: 996-1004, 1979.
- [88] GAMULIN V., La REGINA-RODRIGUEZ M. A., BRDAR B., Dimethyl-10,12-benz (A) acridine: evidence for differential effects on the synthesis of RNA of mammalian or avian fibroblasts and some RNA viruses, *Biochim. Biophys. Acta*, **562**: 139-148, 1979.
- [89] GERARD G. S., LOEWENSTEIN P. M., GREEN M., Characterization of a DNA polymerase activity in cultured human melanoma cells that copies poly (2'-O-methyl cytidilate), *J. Biol. Chem.*, **255**: 1015-1022, 1980.
- [90] GERMOND J. E., ROUVIERE-YANIV J., YANIV M., BRUTLAG D., Nicking-closing enzyme assembles nucleosome-like structures in vitro, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3779-3783, 1979.
- [91] GIACHERIO D., HAGER L. P., A specific DNA unwinding activity associated with SV40 large T antigen, *J. Biol. Chem.*, **255**: 8963-8966, 1980.
- [92] GILLUM A. M., CLAYTON D. A., Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L cells. RNA priming during the initiation of heavy-strand synthesis, *J. Mol. Biol.*, **135**: 353-368, 1979.
- [93] GIRI C. P., WEST M. H. P., SMULSON M., Nuclear protein modification and chromatin substructure. I. Differential poly (adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal proteins in nuclei versus isolated nucleosomes, *Biochemistry*, **17**: 3495-3500, 1978.
- [94] GJERSET R. A., MARTIN D. W. Jr., Presence of a DNA demethylating activity in the nucleus of murine erythroleukemic cells, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8581-8583, 1982.
- [95] GOLDKNOPF J. L., FRENCH M. E., MUSSO R., BUSCH H., Presence of protein A24 in rat nucleosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 5492-5495, 1977.



- [96] GREGOIRE K. E., GOLDSCHNEIDER J., BARTON R. W., BOLLUM F. J., Ontogeny of terminal deoxyribonucleotidyl-transferase positive cells in lymphopoietic cells in lymphopoietic tissues of rat and mouse, *J. Immunol.*, **123**: 1347-1352, 1979.
- [97] GROSSMAN K., FRIEDRICH H., SEITZ U., Purification and characterization of chromatin bound DNA-dependent RNA polymerase I from parsley (*Petroselinum crispum*). Influence of nucleoside triphosphates, *Biochem. J.*, **191**: 165-171, 1980.
- [98] GRUMMT J., Phosphorylation of nucleolar proteins. Identification of a nucleolus-associated protein kinase activity, *FEBS Lett.*, **39**: 125-128, 1974.
- [99] GURLEY L. R., WALTERS R. A., TOBEY R. A., Sequential phosphorylation of histones in the chinese hamster cell cycle, *J. Biol. Chem.*, **250**: 3936-3944, 1975.
- [100] GUY A. L., TAYLOR J. H., Actinomycin D inhibits initiation of DNA replication in mammalian cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 6088-6092, 1978.
- [101] HACHMANN H., LEZIUS A. G., An ATPase depending on the presence of single stranded DNA from mouse myeloma, *Eur. J. Biochem.*, **61**: 325-330, 1976.
- [102] HALLECK M. G., GURLEY L. R., Histone methylation and heterochromatin content of cultured *Peromyscus* cells, *Exptl. Cell Res.*, **132**: 201-214, 1981.
- [103] HALLIGAN B. D., DAVIS J. L., EDWARDS K., LIU L. F., Intra and intermolecular strand transfer by HeLa DNA topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, **257**: 3995-4000, 1982.
- [104] HANADA K., TAMAI M., YAMAGISHI M., OHMURA S., SAWADA J., TANAKA I., Studies on thiol protease inhibitors. I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 523-528, 1978.
- [105] HARLEY E. H., REES K. R., COHEN A., A comparative study of the effect of aflatoxin B1 and actinomycin D on HeLa cells, *Biochem. J.*, **114**: 289-298, 1969.
- [106] HERZOG J., FARBER J. L., Inhibition of rat liver RNA polymerases by action of the methylating agents dimethylnitrosamine in vivo and methylmethanesulphonate in vitro, *Cancer Res.*, **36**: 1761-1770, 1976.
- [107] HILDEBRAND C. E., GURLEY L. R., TOBEY R. A., WALTERS R. A., Action of heparin on mammalian nuclei. I. Differential extraction of histone H1 and cooperative removal of histones from chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **477**: 295-311, 1977.
- [108] HIRASAWA E., MATSUMOTO H., TAKAHASHI E., nucleoside triphosphates diphosphatase from germinated pea cotyledon chromatin, *Plant Cell Physiol.*, **20**: 1041-1046, 1979.
- [109] HIRSH J., MARTELO O. J., Phosphorylation of rat liver ribonucleic acid polymerase I by nuclear protein kinases, *J. Biol. Chem.*, **251**: 5408-5413, 1976.
- [110] HIZI A., LEIS J. P., JOKLIK W. K., RNA-dependent DNA polymerase of Avian Sarcoma virus B77, *J. Biol. Chem.*, **252**: 2290-2295, 1977.
- [111] HOLLOMAN W. K., ROWE T. C., RUSCHE J. R., Studies on nuclease  $\alpha$  from *Ustilago maydis*, *J. Biol. Chem.*, **256**: 5087-5094, 1981.
- [112] HOZUMI N., HARUNA Y., WATANABE I., MIKOSHIBA K., TSUKADA Y., Poly (U) polymerase in rat brain, *Nature (London)*, **256**: 337-339, 1975.
- [113] HUDACK E. D., BRUMMOND D. O., Studies on Ehrlich ascites cell nuclei.



- III. Enzymatic analysis of cytoplasmic contamination of nuclei isolated from the Ehrlich ascites tumor, *Exptl. Cell Res.*, **22**: 345-355, 1961.
- [114] IKEGAMI M., FRAENKEL-CONRAT H., Characterization of the RNA dependent RNA polymerase of Tobacco leaves, *J. Biol. Chem.*, **254**: 149-154, 1979.
- [115] INOUE A., FUJIMOTO D., Histone deacetylase from calf thymus, *Biochim. Biophys. Acta*, **220**: 307-317, 1970.
- [116] ISHIKAWA A., SAITO H. T., Subunits of RNA polymerase in function and structure. IX. Regulation of RNA polymerase activity by stringent starvation protein (SSP), *J. Mol. Biol.*, **129**: 517-530, 1979.
- [117] IVASHENKO A. T., Investigation of adenosinetriphosphatase activity of rat liver and thymus cell nuclei, *Biokhimija*, **43**: 2064-2069, 1978.
- [118] JACOB S. T., SAJDEL E. M., MUNRO H. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 765, 1970, cyt. za: *The Ribonucleic Acids* (Wyd. P. P. Stewart i D. S. Letham 1973, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York).
- [119] JELINEK W. R., Polyadenylic acid synthesis in vitro in isolated HeLa cell nuclei and whole cell homogenates, *Cell*, **2**: 197-204, 1974.
- [120] JENNS S. M., BRYANT J. A., Deoxyribonucleic acid polymerase and deoxyribonuclease activities in pea seedlings, *Planta*, **138**: 99-103, 1978.
- [121] JUMP D. B., BUTT T. R., SMULSON M., Nuclear protein modification and chromatin structure. 3. Relationship between poly (adenosine diphosphate) ribosylation and different functional forms of chromatin, *Biochemistry*, **18**: 983-990, 1979.
- [122] KARAVANOV A. A., CHESTKOV V. V., AFANASJEV B. N., Properties of protein released from mouse spleen nuclei under conditions of limited hydrolysis with DNase I and micrococcal nuclease, *Mol. Biol. (Moscow)*, **15**: 220-233, 1981.
- [123] KALF S. F., METRIONE R. M., KOSZALKA T. R., A protein stimulatory factor for DNA polymerase  $\alpha$  in rat giant trophoblast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 566-575, 1981.
- [124] KALINSKI A., TAKAMATSU H., LASKOWSKI M. Sr., An endonuclease activity of chicken erythroblast nuclei and mononucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10542-10545, 1980.
- [125] KANE C. M., LINN S., Purification and characterization of an apurinic/apirimidinic endonuclease from HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3405-3414, 1981.
- [126] KANUNGO M. S., THAKUR M. K., Phosphorylation and acetylation of non-histone chromosomal proteins of the brain of rats of various ages and their modulation by calcium and estradiol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**: 14-9, 1979.
- [127] KAWAMURA M., TANIGAWA Y., KITAMURA A., MIYAKE Y., SHIMOYAMA M., Effect of polyamines on purified poly (ADP-ribose) synthetase from rat liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**: 121-128, 1981.
- [128] KEITH J. M., ENSINGER M. J., MOSS B., HeLa cell RNA (2'-O methyladenosine-N<sup>6</sup>) methyltransferase specific for the capped 5' end of messenger RNA, *J. Biol. Chem.*, **253**: 5033-5041, 1978.
- [129] KEITH J. M., VENKATESAN S., GERSHOWITZ A., MOSS B., Purification and characterization of the messenger ribonucleic acid capping enzyme: GTP-RNA guanylyltransferase from wheat germ, *Biochemistry*, **21**: 327-333, 1982.



- [130] KELLER W., CROUCH R., Relation of viral to cellular ribonuclease H, [w] Possible episomes of eukaryotes (red. Silvestrini L. G), Cold Spring Harbor Lab., Proc. Lepetit Colloq. 4-th, 123-129, 1972.
- [131] KERR S. J., BOREK E., Regulation of tRNA methyltransferase in normal and neoplastic tissues, Adv. in Enzyme Regul., **11**: 63-70, 1973.
- [132] KHODAREV N. N., VOTRIN J. J., SOKOLOV N. N., BASNAKYAN A. G., Methylation and degradation of chromatin DNA in isolated rat liver cell nuclei, Biokhimiya, **44**: 1058-1067, 1979.
- [133] KIM S., PAIK W. K., Purification and properties of protein methylase II, J. Biol. Chem., **245**: 1806-1813, 1970.
- [134] KIRTIKAR D. M., CARTHEART G. R., GOLDFWAIT, D. A., Endonuclease II, apurinic acid endonuclease and exonuclease III, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 4324-4328, 1976.
- [135] KISH V. M., KLEINSMITH L. J., Nuclear protein kinases. Evidence for their heterogeneity, tissue specificity, substrate specificities and differential responses to cyclic adenosine 3'5' monophosphate, J. Biol. Chem., **249**: 750-760, 1974.
- [136] KLOUWEAU H. M., BETEL J., APPELMAN A. W. M., ARTS C., Synthesis of adenosine 5' triphosphate by isolated rat liver nuclei, Biochim. Biophys. Acta, **97**: 152-154, 1965.
- [137] KNAPP G., OGDEN R. C., PEEBLES C. L., ABELSON J. N., Splicing of yeast tRNA precursors: structure of the reaction intermediates, Cell, **18**: 37-45, 1979.
- [138] KOEN Y. M., PEREVOSHCHIKOVA V. I., ZBARSKY J. B., Some enzymes of isolated rat liver and hepatoma-27 nuclear envelopes and nuclei, Biokhimiya, **41**: 982-989, 1976.
- [139] KOIDE S. S., BURZIO L., TANIGAWA Y., Properties of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  dependent endonuclease from sea urchin eggs of *Arbacia punctulata*, Experientia, **31**: 646-648, 1975.
- [140] KORNBERG R. D., Chromatin structure. Repeating units of histones and DNA. Science, **184**: 868-871, 1974.
- [141] KOSTRABA N. C., NEWMAN R. S., WANG T. Y., Selective inhibition of transcription by a nonhistone protein isolated from Ehrlich ascites tumor chromatin, Arch. Biochem. Biophys., **179**: 100-105, 1977.
- [142] KRAKOW J. S., KAMMEN H. O., CANELLAKIS E. S., The incorporation of ribonucleotides into terminal positions of DNA, Biochim. Biophys. Acta, **53**: 52-55, 1961.
- [143] KRANIAS E. G., YUNGSMANN R. A., Phosphorylation of calf thymus RNA polymerase II by nuclear cyclic 3'5' AMP independent protein kinase, Biochim. Biophys. Acta, **517**: 439-446, 1978.
- [144] KRAUTH W., WERNER D., Analysis of the most tightly bound proteins in eukariotic DNA, Biochim. Biophys. Acta, **564**: 390-401, 1979.
- [145] KREBS G., CHAMBON P., Animal DNA-dependent RN polymerases. Purification and molecular structure of hen-oviduct and liver class-B RNA polymerases, Eur. J. Biochem., **61**: 15-24, 1976.
- [146] KRISTENSEN T., HOTLUND J., Poly (ADP-ribose) polymerase from Ehrlich ascites tumor cells. Properties of the purified polymerase, Eur. J. Biochem., **88**: 495-501, 1978.
- [147] KROHNE G., FRANKE W. W., A major soluble acidic protein located in nuclei of diverse vertebrate species, Exptl. Cell Res., **129**: 167-190, 1980.



- [148] KROKAN H., SCHAFFER P., De PAMPHILIS M. L., Involvement of eukaryotic deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, **18**: 4431-4443, 1979.
- [149] KUEBLER J. P., GOLDTHWAIT D. A., An Endonuclease from calf liver specific for apurinic sites in DNA, *Biochemistry*, **16**: 1370-1377, 1977.
- [150] KUEHL L., SUMSION E. N., Site of synthesis of several soluble enzymes of the cell nucleus, *J. Cell Biol.*, **50**: 1-9, 1971.
- [151] KUZNETSOV D. A., MUSAEV N. J., KHASIGOV P. Z., NIKOLAEV A. Y., The effect of poly (A) segment size on the inhibition of hnRNA biosynthesis by cordycepin in rat brain cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **740**: 220-222, 1983.
- [152] KWAN C. N., GOTOH S., SCHLESSINGER D., Nucleases in HeLa cell nucleoplasm and nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **349**: 428-441, 1974.
- [153] KWAN C. N., Purification and characterization of an endoribonuclease from nucleoplasm and nucleoli of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **251**: 7132-7136, 1976.
- [154] LACKS G. A., Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin, *J. Biol. Chem.*, **256**: 2644-2648, 1981.
- [155] LAZARUS H. M., SPORN M. B., Purification and properties of a nuclear exonuclease from Ehrlich ascites tumor cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**: 1386-1393, 1967.
- [156] LEE S. G., HUNG P. P., Extensive reverse transcription of RSV genome by nucleic acid-binding protein, *Nature (London)*, **270**: 366-369, 1977.
- [157] LEONARD T. B., JACOB S. T., Alternations in DNA-dependent RNA polymerase I and II from rat liver by thioacetamide: preferential increase in the level of chromatin associated nucleolar RNA polymerase I B, *Biochemistry*, **16**: 1538-1544, 1977.
- [158] LESCA P., Protein inhibitor of acid deoxyribonucleases, Improved purification procedure and properties, *J. Biol. Chem.*, **251**: 116-123, 1976.
- [159] LEWIS B. J., ABRELL J. W., SMITH G. R., GALLO R. C., Human DNA polymerase III (R-DNA polymerase). Distinction from DNA polymerase I and reverse transcriptase, *Science*, **183**: 867-869, 1974.
- [160] LI H. J., Model for chromatin structure, *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1275-1289, 1975.
- [161] LIMAS C. J., Phosphorylation of myocardial nuclei enhances their susceptibility to deoxyribonuclease I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 1347-1352, 1981.
- [162] LINDAHL T., Action pattern of mammalian deoxyribonuclease IV, *Eur. J. Biochem.*, **18**: 415-421, 1971.
- [163] LINNALA-KANKKUNEN A., MAENPAA P. H., A cyclic GMP-dependent histone kinase bound to liver nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **587**: 324-332, 1979.
- [164] LINNALA-KANKKUNEN A., MAENPAA P. H., Phosphorylation of high mobility group protein HMG 14 by a cyclic GMP dependent protein kinase from avian liver nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 287-291, 1981.
- [165] LINNE T., OBERG B., PHILIPSON L., RNA ligase activity in phage-infected bacteria and animal cells, *Eur. J. Biochem.*, **42**: 157-165, 1974.
- [166] LIU Y. C., ROSE K. M., JACOB S. T., Evidence for the nuclear origin of RNA polymerase identified in the cytosol: release of enzymes from the nuclei isolated in isotonic sucrose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**: 114-121, 1976.
- [167] LJUNGQUIST S., LINDAHL T., A mammalian endonuclease specific for



- apurinic sites in double stranded deoxyribonucleic acid. I. Purification and general properties, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1530-1535, 1974.
- [168] LONG T. W., TERAOKA H., TSUKADA K., Partial purification of a ribosomal ribonucleic acid methylase from rat liver nuclei and methylation of undermethylated nuclear ribonucleic acid from regenerating liver of ethionine-treated rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **740**: 29-37, 1983.
- [169] LOSICK R., CHAMBERLIN M., RNA polymerases, Cold Spring Harbor Lab., New York 1976.
- [170] LUBOŃ H., TYRAWSKA-SPYCHAŁOWA D., Proteazy białek chromatyny, *Post. Biol. Kom.*, **6**: 31-49, 1979.
- [171] LYNCH W. E., SURREY S., LIEBERMANN I., Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver, *J. Biol. Chem.*, **250**: 8179-8183, 1975.
- [172] MAHAGAOKAR S., ORENGO A., RAO P. N., The turnover of deoxyuridine triphosphate during the HeLa cell cycle, *Exptl. Cell Res.*, **125**: 87-94, 1980.
- [173] MAITRA U., NAKATA Y., HURWITZ J., *J. Biol. Chem.*, **242**: 4908, 1967, *Cyt. za The Ribonucleic Acids* (wyd. P. R. Stewart and D. S. Letham 1973, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York).
- [174] MASAKI S., KOIWAI O., YOSHIDA S., 10 S DNA polymerase  $\alpha$  of calf thymus shows a microheterogeneity in its large polypeptide component, *J. Biol. Chem.*, **257**: 7172-7177, 1982.
- [175] MATHEW C. G. P., GOODWIN G. H., JOHNS E. W., Studies on the association of the high mobility group non-histone chromatin proteins with isolated nucleosomes *Nucl. Acids Res.*, **6**: 167-179, 1979.
- [176] MATSON G. W., BAMBARA R. A., Duplex DNA binding activity of the avian myeloblastosis virus DNA polymerase, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**: 29-38, 1981.
- [177] MAZUŚ B., Polimerazy RNA eukariontów ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz roślin wyższych, *Post. Biochem.*, **23**: 347-377, 1977.
- [178] McKENNA W. G., MAIO J. J., BROWN F. L., Purification and properties of a mammalian endonuclease showing site-specific cleavage of DNA, *J. Biol. Chem.*, **256**: 6435-6443, 1981.
- [179] MEDNIEKS M. J., JUNGMAN R. A., SCHWEPPE J. S., Ontogeny and multiplicity of cyclic AMP-dependent protein kinase in thymic lymphoid cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **197**: 185-192, 1979.
- [180] MIKOSHIBA K., TSUKADA Y., HARUNA I., WATANABE J., RNA-dependent RNA synthesis in rat brain, *Nature (London)*, **249**: 445-448, 1974.
- [181] MILCHEV G. I., HADIJOLOV A. A., Association of poly (A) and poly (U) polymerases with cytoplasmic ribosomes, *Eur. J. Biochem.*, **84**: 113-121, 1978.
- [182] MILLER M. R., CHINAULT D. N., Evidence that DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$  participate differentially in DNA repair synthesis induced by different agents, *J. Biol. Chem.*, **257**: 46-49, 1982.
- [183] MIZUTANI S., TEMIN H. M., Specific serological relationship among partially purified DNA polymerases of avian leucosissarcoma viruses and reticuloendotheliosis viruses avian cells, *J. Virol.*, **13**: 1020-1029, 1974.
- [184] MODAK M. J., Biochemistry of terminal deoxynucleotidyltransferase: Mechanism of inhibition by adenosine 5' triphosphate, *Biochemistry*, **17**: 3116-3120, 1978.
- [185] MONTAGNA R. A., RODRIQUEZ I. V., BECKER F. F., A comparative study of the nonhistone proteins of rat liver euchromatin and heterochromatin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**: 617-624, 1977.



- [186] MOSBAUGH D. W., KUNKEL T. A., STALKER D. M., Teheng J. E., Meyer R. R., Novicoff hepatoma DNA polymerase, sensitivity of the  $\beta$ -polymerase to sulfhydryl blocking agents, *Nucl. Acids Res.*, **3**: 2341-2348, 1976.
- [187] MOSBAUGH D. W., STALKER D. M., PROBST G. S., MEYER R. R., Novicoff hepatoma deoxyribonucleic acid polymerase. Identification of a stimulatory protein bound to the  $\beta$ -polymerase, *Biochemistry*, **16**: 1512-1518, 1977.
- [188] MOSBAUGH D. W., MEYER R. R., Interaction of mammalian deoxyribonuclease V, a double-strand 3'-5' and 5'-3' exonuclease with deoxyribonucleic acid polymerase  $\beta$  from the Novicoff hepatoma, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10239-10247, 1980.
- [189] MURONE I., OGATA K., Studies on creatine kinase of skeletal muscle and brain with special reference to subcellular distribution and isozymes, *J. Biochem.*, **74**: 41-48, 1973.
- [190] MURRAY A. W., FROSCIO M., ROGERS A., Effect of polyamines on cyclic AMP-dependent and independent protein kinases from mouse epidermis, *Biochem. Biol.*
- [191] MULLER W. E. G., SEIBERT G., STEFFEN R., ZAHN R. K., Endoribonuclease IV. Further investigation on the specificity, *Eur. J. Biochem.*, **70**: 249-258, 1976.
- [192] NOVELLO F., STIRPE F., The effects of cooper and other ions on the ribonucleic acid polymerase activity of isolated rat liver nuclei, *Biochem. J.*, **111**: 115-119, 1969.
- [193] NOLAN M. L., BUTT T. R., WONG M., LAMBRIANIDOU A., SMULSON M. E., Characterization of poly ADP ribose-histone H1 complex formation in purified polynucleosomes and chromatin, *Eur. J. Biochem.*, **113**: 15-25, 1980.
- [194] OBARA M., HIRANO H., HIGASHI K., Purification and characterization of nuclear ribonucleic acid methylase from Ehrlich Ascites tumor cells of mice, *Biochemistry*, **21**: 1374-1380, 1982.
- [195] OGURO M., SHIODA M., NAGANO H., MANO Y., The mode of action of aphidicolin on DNA synthesis in isolated nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 13-19, 1980.
- [196] ORD M. G., STOCKEN L. A., Phosphate-transfer reactions by nuclei from rat thymus gland, *Biochem. J.*, **84**: 593-600, 1962.
- [197] OTTO B., BOHM J., KNIPPERS R., A histone specific acetyltransferase is associated with Simian-Virus 40 chromatin, *Eur. J. Biochem.*, **112**: 363-366, 1980.
- [198] PAUL J. J., DUERKSEN J. D., Release of euchromatic segments by magnesium/calcium dependent autodigestion of chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 97-105, 1976.
- [199] PEEBLES C. L., OGDEN R. C., KNAPP G., ABELSON J., Splicing of yeast tRNA precursors: a two stage reaction, *Cell*, **18**: 27-36, 1979.
- [200] PEGG A. E., Enzymic removal of O<sup>6</sup>-methyl-guanine from DNA by mammalian cell extracts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 166-173, 1978.
- [201] PEKALA P. H., LANE M. D., WATKINS P. A., MOSS J., On the mechanism of preadipocyte differentiation. Masking of poly (ADP-ribose) activity during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Biol. Chem.*, **256**: 4871-4876, 1981.
- [202] PHEIFFER B. H., ZIMMERMAN S. B., Deoxyribonucleic acid kinase from nuclei of rat liver, mechanism and reversal inhibition of the reaction, *Biochemistry*, **18**: 2960-2963, 1979.



- [203] PHILLIPS I. R., SHEPHARD E. A., STEIN J. L., KLEINSMITH L. J., STEIN G. S., Nuclear protein kinase activities during the cell cycle of HeLa S<sub>3</sub> cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **565**: 326-346, 1979.
- [204] PORTEOUS J. W., FURNEAUX H. M., PEARSON C. K., LAKE C. M., MORRISON A., Poly (adenosine diphosphate ribose) synthetase activity in nuclei of dividing and non-dividing but differentiating intestinal epithelial cells, *Biochem. J.*, **180**: 455-465, 1979.
- [205] PRZYKORSKA A., SZARKOWSKI J. W., Single-stranded-specific nuclease from the nucleoplasm of rye germ nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **108**: 285-293, 1980.
- [206] PUGH C. S., BORCHARDT R. T., STONE H. O., Sinefungin a potent inhibitor of virion mRNA (guanine-7-)-methyltransferase, mRNA (nucleoside-2'-)-methyltransferase and viral multiplication, *J. Biol. Chem.*, **253**: 4075-4077, 1978.
- [207] PULLEYBLANK D. E., ELLISON M. J., Purification and properties of type I topoisomerase from chicken erythrocytes. Mechanism of eukaryotic topoisomerase action, *Biochemistry*, **21**: 1155-1161, 1982.
- [208] RADDING C. M., Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**: 847-880, 1978.
- [209] RASTL E., SWETLY P., Expression of poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase activity in erythroleukemic mouse cells during cell cycle and erythropoietic differentiation, *J. Biol. Chem.*, **253**: 4333-4340, 1978.
- [210] RECH J., BRUNEL C., JEANTEUR P., HnRNP from HeLa cells contain a ribonuclease active on double stranded RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**: 422-427, 1979.
- [211] RECH J., CATHALA G., JEANTEUR P., Isolation and characterization of a ribonuclease activity specific for double-stranded RNA (RN-ase D) from Krebs ascites cells, *J. Biol. Chem.*, **255**: 6700-6705, 1980.
- [212] RHO H. M., GRANDGENETT D. P., GREEN M., Sequence relatedness between the subunits of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5278-5280, 1975.
- [213] ROEDER G. R., GOLOMB M. W., JACHNING J. A., NG S. Y., PARKER C. S., SCHWARTZ L. B., SKLAR V. E. F., WEINMANN R., Animal nuclear RNA polymerases, *Recept. Horm. Action*, **1**: 195-236, 1977.
- [214] ROKUTANDA M., MAEDA J. Y., Purification of protein kinase of mouse sarcoma virus and its effect on reverse transcriptase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**: 1322-1328, 1979.
- [215] ROSE K. M., ROE F. J., JACOB S. T., Two functional states of polyadenylated acid polymerase in isolated nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **478**: 180-191, 1977.
- [216] ROSE K. M., BELL L. E., JACOB S. T., Selective inhibition of initial polyadenylation in isolated nuclei by low levels of cordycepin 5' triphosphate, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**: 548-552, 1977.
- [217] ROSE K. M., BELL L. E., JACOB S., Specific inhibition of chromatin-associated poly (A) synthesis in vitro by cordycepin 5'-triphosphate, *Nature (London)*, **267**: 178-180, 1977.
- [218] ROYCHOUDHURY R., JAY E., WU R., Terminal labelling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase, *Nucl. Acids Res.*, **3**: 101-116, 1976.



- [219] SALZMAN L. A., KERLIE Mc. L., Nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase from rat nephroma cells, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5589-5595, 1975.
- [220] SAWAI Y., SUGANO N., TSUKADA K., Ribonuclease H activity in cultured plant cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **518**: 181-185, 1978.
- [221] SAWICKI S. G., JELINEK W., DARNELL J., 3'-terminal addition to HeLa cell nuclear and cytoplasmic poly (A), *J. Mol. Biol.*, **113**: 219-235, 1977.
- [222] SCHIBLER W., PERRY R. P., Characterization of the 5' termini of hnRNA in mouse L cells: implications for processing and cap formation, *Cell*, **9**: 121-130, 1976.
- [223] SCHRODER H. C., ZAHN R. K., DOSE K., MULLER W. E., Purification and characterization of poly (A) specific exoribonucleases from calf thymus, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4535-4538, 1980.
- [224] SCHRODER H. C., ZAHN R. K., MULLER W. E. G., Role of actin and tubulin in the regulation of poly(A) polymerase — endoribonuclease IV complex from calf thymus, *J. Biol. Chem.*, **257**: 2305-2309, 1982.
- [225] SEMEKENS-ETIENNE M., GOLDSTEIN L., OOMS H. A., DUMONT J. E., Variation of (2'-5') oligo/adenylate synthetase activity during rat liver regeneration, *Eur. J. Biochem.*, **130**: 269-273, 1983.
- [226] SHATKIN A., Capping of eukaryotic mRNAs, *Cell*, **9**: 645-653, 1976.
- [227] SHEID B., SRINIVASAN P. R., BOREK E., DNA methylase of mammalian tissues, *Biochemistry*, **7**: 280-285, 1968.
- [228] SHEPHERD G. R., NOLAND B. J., HARDIN J. M., Histone acetylation in synchronized mammalian cell culture, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 544-549, 1971.
- [229] SHIELDS D., TATA J. R., Variable stabilities and recoveries of rat liver RNA polymerase A and B according to growth status of the tissue, *Eur. J. Biochem.*, **64**: 471-480, 1976.
- [230] SHORTMAN K., Studies on cellular inhibitors of ribonuclease. I. The assay of the ribonuclease inhibitor system and the purification of the inhibitor system from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 37-49, 1961.
- [231] SHUMAN S., RNA capping by HeLa cell RNA guanylyltransferase. Characterization of a covalent protein-guanylate intermediate, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7237-7245, 1982.
- [232] SIKORSKA M., McMANUS J. P., WALKER P. R., WHITFIELD J. F., The protein kinases from rat liver nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**: 1196-1203, 1980.
- [233] SKRIDONIENKO A. D., Isolation and purification of a ribonuclease inhibitor from the nuclear sap of rat liver, *Dokl. Acad. Nauk ZSRR.*, **210**: 1233-1237, 1973.
- [234] SMITH J. C., STRATFORD I. J., HUTCHINSON D. W., BRETNALL H. J., Insoluble derivatives of polynucleotide phosphorylase, *FEBS Lett.*, **30**: 240-248, 1973.
- [235] SODERHALL S., LINDAHL T., Mammalian deoxyribonucleic acid ligase. Isolation of an active enzyme-adenylate complex, *J. Biol. Chem.*, **248**: 672-675, 1973.
- [236] SODERHALL S., Properties of DNA-adenylate complex formed in the reaction between mammalian DNA ligase I and DNA containing single-stranded breaks, *Eur. J. Biochem.*, **51**: 129-136, 1975.



- [237] SODERHALL S., LINDAHL T., DNA ligase of eukaryotes, *FEBS Lett.*, **67**: 1-8, 1976.
- [238] SRIVASTAVA B. I. S., Modified nucleotide polymers as inhibitors of DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Acta*, **414**: 126-132, 1975.
- [239] SRINIVASAN A., REDDY E. P., SARMA P. S., SCHULTZ R. A., Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase activity of oncornaviruse by caffeine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**: 239-246, 1979.
- [240] STAVRIANOPOULOS J. G., GAMBINO-GIUFFRIDA A., CHARGRAFF E., Ribonuclease H of calf thymus: substrate specificity, activation, inhibition, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 1087-1091, 1976.
- [241] STEINBERG J. A., OTTEN M., GRINDEY G. B., Isolation of a DNA polymerase  $\alpha$  associated regulatory protein from calf thymus, *Cancer Res.*, **39**: 4330-4335, 1979.
- [242] STETLER D. A., ROSE K. M., Phosphorylation of deoxyribonucleic acid dependent RNA polymerase II by nuclear protein kinase NII. Mechanism of enhanced ribonucleic acid synthesis, *Biochemistry*, **21**: 3721-3728, 1982.
- [243] STUART G. E., ROTTMAN F. M., Synthetic polynucleotides as model substrates for ribosomal RNA processing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**: 1001-1008, 1973.
- [244] SUNG M. T., HARFORD J., BUNDMAN M., VIDALAKAS G., Metabolism of histones in avian erythroid cells, *Biochemistry*, **16**: 279-285, 1977.
- [245] SUNG M. T., Phosphorylation and dephosphorylation of histone V (H5) controlled condensation of avian erythrocyte chromatin, *Biochemistry*, **16**: 286-290, 1977.
- [246] SUTHERLAND B. M., Photoreactivating enzyme from human leukocytes, *Nature*, (London), **248**: 109-112, 1974.
- [247] SUTTON W. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **240**: 522-531, 1971, cyt. za: PRZYKORSKA A., SZARKOWSKI J. W., Single-strand-specific nuclease from the nucleoplasm of Rye germ nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **108**: 285-293, 1980.
- [248] SZOPA J., WAGNER K. G., Purification and properties of a DNase inhibitor from *Nicotiana tabacum* cell cultures, *Europ. J. Biochem.*, **111**: 211-215, 1980.
- [249] SZUMIEL I., ZAJDEL M. E., Udział adenozy-3',5'-monofosforanu w regulacji czynności genów u zwierząt, *Post. Biochemii*, **18**: 175-198, 1972.
- [250] TALPAERT-BORLE M., CAMPAGNARI F., CREISSEN D. M., Properties of purified uracil-DNA glycosylase from calf thymus. An in vitro study using synthetic DNA-like substrates, *J. Biol. Chem.*, **257**: 1208-1214, 1982.
- [251] TAMURA S., TERAOKA H., TSUKADA K., Characterization of DNA kinase from calf thymus, *Eur. J. Biochem.*, **115**: 449-453, 1981.
- [252] TANAKA Y., HASHIDA T., YOSHIHARA H., YOSHIHARA K., Bovine thymus poly (ADP-ribose) polymerase histone-dependent and magnesium ion-dependent reaction, *J. Biol. Chem.*, **254**: 12433-12438, 1979.
- [253] TAVITIAN A., URETZKY S. C., ACS G., Selective inhibition of RNA synthesis in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **157**: 33-42, 1968.
- [254] TEMIN H. M., The DNA provirus hypothesis. The establishment and implications of RNA directed DNA synthesis. *Prix Nobel*, Univ. Wisconsin, U.S.A., 185-203, 1976.
- [255] TERAOKA H., TAMUKA S., TSUKADA K., Evidence for a single species of DNA ligase localized in nuclei of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **563**: 535-539, 1979.



- [256] TERAOKA H., TSUKADA K., Eukaryotic DNA ligase. Purification and properties of the enzyme from bovine thymus and immunochemical studies of the enzyme from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4758-4763, 1982.
- [257] THIBODEAU L., VERLY W. G., Cellular location of the apurinic/apirimidinic endodeoxyribonucleases in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **107**: 553-563, 1980.
- [258] THIBODEAU L., BRICTEUX S., VERLY W. G., Purification and properties of the major apurinic/apirimidinic endodeoxyribonuclease of rat liver chromatin, *Eur. J. Biochem.*, **110**: 379-385, 1980.
- [259] THOMAS C., HEILPORN-POHL U., HANOCQ F., PAYS E., BOLOUKHERE M., Changes in "template bound" and "free" RNA polymerase activities in isolated nuclei from *Xenopus laevis* embryos, *Exptl. Cell Res.*, **127**: 63-74, 1980.
- [260] THOMPSON L. R., MUELLER G. C., Dissociation of the DNA replicase system of bovine lymphocyte nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **414**: 231-241, 1975.
- [261] TOBIN R. S., Conversion of dCTP to CTP by isolated nuclei of Ehrlich ascites tumor cells, *Life Sci.*, **14**: 957-965, 1974.
- [262] TSE Y. C., KIRKEGAARD K., WANG J. C., Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA, *J. Biol. Chem.*, **255**: 5560-5565, 1980.
- [263] TSENG B. Y., AHLEM C. N., DNA primase activity from human lymphocytes. Synthesis of oligoribonucleotides that prime DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, **257**: 7280-7283, 1982.
- [264] TSUKUO T., ARENS M., PADMANBHAN R., GREEN M., Purification and properties of a DNA ligase from a soluble DNA replication complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **606**: 202-213, 1980.
- [265] TSURUGI K., OGATA K., Presence of thiol protease in regenerating rat liver nuclei. Partial purification and some properties, *Eur. J. Biochem.*, **109**: 9-15, 1980.
- [266] TURNBULL J. F., ADAMS R. L. P., DNA methylase: purification from ascites cells and the effect of various DNA substrates on its activity, *Nucl. Acids Res.*, **3**: 677-695, 1976.
- [267] TYRSTED G., GAMULIN V., Ribonucleotide reductase activity and deoxyribonucleoside triphosphate pools in PHA stimulated lymphocytes, *J. Cell Biol.*, **70**: 318a, 1976.
- [268] UEDA K., FUKUSHIMA M., OKAYAMA H., HAYASHI O., Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase from rat liver nuclei (NADase), *J. Biol. Chem.*, **250**: 7541-7551, 1975.
- [269] UEDA K., KAWAICHI M., OKAYAMA H., HAYAISHI O., Poly (ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins, Enzymatic elongation of chemically synthesized ADP-ribosehistone adducts, *J. Biol. Chem.*, **254**: 679-687, 1979.
- [270] VASILEVA N. A., BELKINA G. G., STEPANENKO S. Y., ATALYKOVA F. J., OPARIN A. J., Properties and localization of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ATPase activities in wheat embryo cell nuclei, *Biokhimiya*, **43**: 851-856, 1978.
- [271] VENKATESAN S., GERSHOVITZ A., MOSS B., Purification and characterization of mRNA-guanylyltransferase from HeLa cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2829-2834, 1980.
- [272] VERMA J. M., The reverse transcriptase, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**: 1-38, 1977.



- [273] VILLADSEN J. S., BJØRN S. E., VRANG A., Exonuclease II from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme which liberates 5'-deoxymononucleotides from single stranded DNA by a 5'-3' mode of hydrolysis, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8177-8182, 1982.
- [274] VOSBERG H. P., GROSSMAN L. J., VINOGRAD J., Isolation and partial characterization of the relaxation protein from nuclei of cultured mouse and human cells, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 79-93, 1975.
- [275] WALTON G. M., SPIESS J., GILL G. N., Phosphorylation of high mobility group 14 protein by cyclic nucleotide-dependent protein kinases, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4661-4668, 1982.
- [276] WANG J. C., Interactions between twisted DNAs and enzymes. Effects of superhelical turns, *J. Mol. Biol.*, **87**: 797-816, 1974.
- [277] WANG H. F., POPENOE E. A., Variation of deoxyribonucleic acid polymerase activities during avian erythropoiesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **474**: 98-108, 1977.
- [278] WANG E. C., ROSE J. A., Deoxyribonucleic acid single-stranded specific endonucleases in mammalian cells. Partial purification of a salt-resistant endonuclease with an acidic isoelectric point, *Biochemistry*, **20**: 755-757, 1981.
- [279] WANG T. S. F., KORN D., Specificity of the catalytic interaction of human DNA polymerase  $\beta$  with nucleic acid substrates, *Biochemistry*, **21**: 1597-1597, 1982.
- [280] WAQUAR M. A., HUBERMAN J. A., Covalent linkage between RNA and nascent DNA in the slime mould *Physarium polycephalum*, *Cell*, **6**: 551-557, 1975.
- [281] WAQUAR M. A., EVANS M. J., HUBERMAN J. A., Effect of 2'3'-dideoxythymidine-5'triphosphate on HeLa cell in vitro DNA synthesis: evidence that DNA polymerase  $\alpha$  is the only polymerase required for cellular DNA replication, *Nucl. Acids Res.*, **5**: 1933-1946, 1978.
- [282] WATERBORG J. H., KUYPER C. M. A., Endonuclease activity in nuclei of *Physarium polycephalum*. Partial purification and characterization, *Biochim. Biophys. Acta*, **478**: 224-233, 1977.
- [283] WATSON D. C., LEVY-MILSON B., DIXON G. H., Free ubiquitin is a non-histone protein of trout testis chromatin, *Nature (London)*, **276**: 196-198, 1978.
- [284] WATSON K. F., SCHENDEL P. L., ROSOK M. J., RAMSEY L. R., Model RNA-directed DNA synthesis by avian myeloblastosis virus DNA polymerase and its associated RNase H, *Biochemistry*, **18**: 3210-3219, 1979.
- [285] WEIL P. A., BLATTI S. P., HeLa cell deoxyribonucleic acid dependent RNA polymerases: function and properties of the class III enzymes, *Biochemistry*, **15**: 1500-1510, 1976.
- [286] WEINTRAUB H., GROUDINE M., Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation, *Science*, **193**: 848-856, 1976.
- [287] WEISSBACH A., SCHLABACH A., Fridlender B., Bolden A., DNA polymerases from human cells, *Nature New Biol.*, **231**: 167-170, 1971.
- [288] WEISSBACH A., Vertebrate DNA polymerases, *Cell*, **5**: 101-108, 1975.
- [289] WEISSBACH A., Invited paper: the functional roles of mammalian DNA polymerase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**: 386-396, 1979.
- [290] WERNER D., KRAUTH W., HERSHEY H. V., Intermediate protein linkers in Ehrlich ascites cell DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **608**: 243-259, 1980.
- [291] WHITBY A. J., STONE P. R., WHISH W. J. D., Effect of polyamines and



- Mg<sup>2+</sup> on poly (ADP-ribose) synthesis and ADP-ribosylation of histones in wheat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 1295-1304, 1979.
- [292] WIDNELL C. C., TATA J. R., A procedure for isolation of enzymatically active rat liver nuclei, *Biochem. J.*, **92**: 313-317, 1964.
- [293] WIKTOROWICZ J. E., CAMPOS K. L., BONNER J., Substrate and product inhibition initial rate kinetics of histone acetyltransferase, *Biochemistry*, **20**: 1464-1467, 1981.
- [294] WILKS A. W., KNOWLER J. T., The phosphorylation of the proteins of rat liver heterogenous ribonucleoprotein particles by an endogenous kinase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**: 228-233, 1981.
- [295] WINICOV J., PERRY R. P., Characterization of a nucleolar endonuclease possibly involved in ribosomal ribonucleic acid maturation, *Biochemistry*, **13**: 2908-2914, 1974.
- [296] WINICOV J., RNA phosphorylation: a polynucleotide kinase function in mouse L cells, *Biochemistry*, **16**: 4233-4237, 1977.
- [297] WIST E., The role of DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  in nuclear DNA synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **562**: 62-69, 1979.
- [298] WOLF D. J., ROSS J. M., THOMPSON P. N., BROSTROM M. A., BROSTROM C. O., Interaction of calmodulin with histones. Alteration of histone dephosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **256**: 1846-1860, 1981.
- [299] WRESCHNER D. H., SILVERMAN R. H., JAMES T. C., GILBERT C. S., KERR J. M., Affinity labelling and characterization of the ppp(A2'p)nA-dependent endoribonuclease from different mammalian sources, *Eur. J. Biochem.*, **124**: 261-268, 1982.
- [300] YAGURA T., KOZU T., SENO T., Arrest of chain growth of replicon-sized intermediates by aphidicolin during rat fibroblast cell chromosome replication, *Eur. J. Biochem.*, **123**: 15-21, 1982.
- [301] YAMADA M., AUCHER J., WEISSBACH A., Formation of deoxycytidine diphosphate diglyceride by nuclei isolated from HeLa cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**: 461-467, 1976.
- [302] YOSHIDA S., CAVALIERI L. F., Characterization of a DNA polymerase associated with an endogenous DNA synthesis complex isolated from human lymphoid cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**: 42-53, 1977.
- [303] YOSHIDA S., MASAKI S., KOIWAI O., Further characterization of poly (A), oligo (dT) dependent activity of multiple DNA polymerase  $\alpha$  from calf thymus, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 194-200, 1981.
- [304] YOSHIHARA K., HASHIDA T., TANAKA Y., MATSUNAMI N., YAMAGUCHI A., KAMIYA T., Mode of enzyme bound poly (ADP-ribose) synthesis and histone modification by reconstituted poly (ADP-ribose) polymerase — DNA-cellulose complex, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3471-3478, 1981.
- [305] YOSHIKARA K., TANIGAWA Y., BURZIO L., KOIDE S. S., Evidence for adenosine diphosphate ribosylation of (calcium-magnesium ion)-dependent endonuclease, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**: 289-293, 1975.
- [306] ZIMMERMAN S. B., LEVIN C. J., A deoxyribonucleic acid ligase from nuclei of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **250**: 149-155, 1975.

Otrzymano: 17 listopada 1983.

Przyjęto: 20 stycznia 1984.

Adres autorów: ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin.







# AKTYWNA TRANSKRYPCYJNIE CHROMATYNA \*. I. BIAŁKA NIEHISTONOWE AKTYWNEJ TRANSKRYPCYJNIE CHROMATYNY

## TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN \*. I. NON-HISTONE PROTEINS OF TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN

Zofia KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Struktur Komórkowych,  
Instytut Biochemii i Biofizyki, UŁ, Łódź

*Streszczenie.* Artykuł obejmuje przegląd piśmiennictwa na temat wykorzystania nukleaz we frakcjonowaniu chromatyny oraz roli białek niehistonowych w utrzymaniu struktury aktywnej transkrypcyjnie chromatyny.

*Summary.* This paper presents the review of the data concerning chromatin fractionation by nucleases and role of non-histone proteins in the maintenance of transcriptionally active chromatin structure.

### WSTĘP

Większość chromatynowego DNA (około 90%) wraz z zasadowymi białkami chromatyny jest zorganizowana w regularne podjednostki — nukleosomy. Powtarzające się podjednostki chromatyny zawierają rdzeń nukleosomalny, tj. oktamer podwójnych cząsteczek histonów H2A, H2B, H3 i H4 z nawiniętym nań DNA o długości około 140 par zasad oraz międzynukleosomalny odcinek DNA o zmiennej długości (od 15 do 100 par zasad) zasocjowany z histonem H1 [9, 45, 78, 83].

Wiadomo jest, że strukturę nukleosomalną wykazuje zarówno aktywna, jak i nieaktywna transkrypcyjnie chromatyna [62, 63, 75, 88].

Nie wyklucza się, że nukleosomy są strukturami dynamicznymi i podlegają odwracalnym konformacyjnym zmianom [99] dla potrzeb transkrypcji czy replikacji DNA komórek. Lokalne rozwijanie nukleosomów

---

\* Praca wykonana w ramach problemu rządowego PR-6 nr 2103.



bądź ich okresowe znikanie mogą zabezpieczać właściwy przebieg transkrypcji [51, 75, 99].

Wyższy poziom organizacji DNA, prowadzący do cytologicznego rozróżnienia obrazu, tzw. luźnej, „rzadkiej optycznie” euchromatyny i zwartej, „gęstej optycznie” heterochromatyny nie znajduje pełnego odbicia w aktywnej i nieaktywnej matrycowo chromatynie, bowiem większość euchromatyny okazuje się transkrypcyjnie nieaktywna, podobnie jak heterochromatyna [86]. Transkrypcyjnie aktywna chromatyna stanowi średnio 10-20% całości chromatyny [111]. W regionach aktywnej chromatyny DNA jest szczególnie wrażliwy na działanie takich nukleaz, jak DNA-aza I, DNA-aza II i mikrokokalna nukleaza.

#### 1. NUKLEAZY W BADANIACH AKTYWNEJ TRANSKRYPCYJNIE CHROMATYNY

Wyodrębnienie i charakterystyka aktywnej matrycowo części chromatyny wydaje się niezwykle istotne dla poznania pełnego obrazu funkcji aparatu genetycznego. Różne rozwiązania metodyczne były i są stosowane do wyizolowania aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Początkowo wykorzystywano mechaniczną degradację chromatyny (homogenizacja, ultradźwięki) z następczym jej rozdziałem w toku różnicowego wirowania bądź chromatografii kolumnowej. Arnold i Young [5] sonikowaną chromatynę wątroby szczura (96 W, 0°C, 8 s. 0,5 mg DNA/ml, 2 mM 2-merkaptoetanol — 10 mM TrisCl, pH 8,0) rozdzielali na transkrypcyjnie aktywną i nieaktywną na podstawie rozpuszczalności w 1,5 mM roztworze  $Mg^{2+}$ . Magnezorozpuszczalna frakcja chromatyny tej tkanki, stanowiąca 20-25% chromatyny, była wzbogacona w białka (głównie niehistonowe) i RNA (6-krotnie) oraz wykazywała 2-krotnie wyższą aktywność matrycową w syntezie RNA in vitro w zestawieniu z magnezonierozpuszczalną chromatyną. Metody otrzymywania aktywnej chromatyny, opierające się na dezintegracji chromatyny ultradźwiękami, są krytykowane [82] z uwagi na możliwość zniszczenia natywnej struktury chromatyny. Bhorjee i Adler [11] w bogato udokumentowanej pracy, opartej na trawieniu jąder komórkowych komórek HeLa za pomocą mikrokokalnej nukleazy oraz analizie w mikroskopie elektronowym, stwierdzają, że łagodna sonikacja (40 W, 0°C, 45 s) nie narusza podjednostkowej struktury chromatyny.

W początkach lat siedemdziesiątych rozpoczęto stosowanie enzymów nukleolitycznych jako „łagodnych narzędzi” do frakcjonowania aktywnej transkrypcyjnie chromatyny [45, 83, 84, 85]. Enzymy nukleolityczne (DNA-aza I, DNA-aza II i mikrokokalna nukleaza) odegrały istotną rolę w opracowaniu modelu podjednostkowej struktury chromatyny [25, 45,



60, 85] oraz są niezwykle pomocne w badaniach wyższego poziomu organizacji chromatyny [26, 47, 96] i struktur subnukleosomalnych [6, 7, 16]. Mechanizm ataku tych nukleaz jest różny, niemniej wspólną ich cechą jest selektywne nadtrawianie DNA aktywnej transkrypcyjnie chromatyny.

DNA-aza I (dezoksyrybonukleaza trzustkowa, 5'-oligonukleotydohydrolaza dezoksyrybonukleinianu, EC 3.1.4.5) czyni wiele napięć na całej dostępnej długości cząsteczki DNA, wycinając fragmenty 10-nukleotydowe w obydwu niciach, nie w miejscach naprzeciwległych, lecz przesuniętych w stosunku do siebie o dwa nukleotydy. Atak DNA-azy I na DNA nukleosomów powoduje charakterystyczne pasmowanie produktów trawienia w żelu poliakryloamidowym w postaci „drabinki” [25]. Pionierskie prace Berkowitza i Doty'ego [10], grupy Weintrauba [106], Garela i Axela [30] dostarczyły dowodów tkankowospecyficznego trawienia aktywnych fragmentów chromatyny przez DNA-azę I. Trawienie jąder komórkowych erytrocytów kurzczenia za pomocą DNAazy I (1-2 mg DNA w 1 ml 10 mM NaCl — 3 mM MgCl<sub>2</sub> — 10 mM TrisCl, pH 7,4; 1-10 µg białka enzymatycznego, 37°C, 5 min), uwalniające 10-15% jądrowego DNA, pozwala otrzymać zmienione konformacyjnie nukleosomy wzbogacone w geny kodujące globinę [106, 108]. Gen globiny w tych warunkach jest usuwany wybiórczo w erytrocycie, ale nie w jajowodzie kurzczenia, natomiast DNA-aza I preferencyjnie uwalnia gen białka jaja kurzego z jąder komórkowych jajowodu, ale nie z erytrocytu [106].

Ograniczone trawienie DNA-azą I degraduje te sekwencje DNA, które są przewidziane do transkrypcji w danym typie komórek [27]. Na podstawie wieloletnich prac z pracowni Weintrauba [43, 106-110] i Andersona [13, 14], można sądzić, że DNA-aza I uwalnia selektywnie zarówno segmenty chromatyny, zawierające geny aktualnie transkrybowane z wysoką szybkością, jak i geny transkrybowane od czasu do czasu, geny czynne w określonym stadium życia komórki oraz geny potencjalnie aktywne [31]. Czuła metoda immunofluorescencyjna potwierdziła te spostrzeżenia [15, 23, 77]. Przeciwciała przeciwko frakcji tzw. HMG-podobnych (HMG-like) białek niehistonowych chromatyny *Drosophila melanogaster* wytrawionej DNA-azą I, znakowane immunofluorescencyjnie, selektywnie barwią te obszary chromosomów *Drosophila*, które mają bądź straciły aktywność pufową, a tym samym są bądź były aktywne transkrypcyjnie [77].

Wrażliwość chromatyny na atak DNA-azy I wydaje się rozciągać poza kodujące odcinki genu, co podtrzymuje pogląd, że są one również istotne dla zachowania aktywności matrycowej [51]. Zwraca się wiele uwagi na obecność w chromatynie nadwrażliwych miejsc na DNA-azę I (DN-ase I hypersensitive sites) zlokalizowanych w 5' (czasami 3')-regio-



nach różnych aktywnych genów [24]. Miejsca te są tkankowospecyficzne i pojawiają się na określonych etapach różnicowania komórkowego [107]. Lokalizację obszarów wzmożonego ataku DNA-azy I opisano po raz pierwszy dzięki zastosowaniu techniki Southerna [97] do analizy produktów łagodnego trawienia tym enzymem jąder komórkowych *Drosophila*, wykorzystując specyficzne klony  $\lambda$  DNA [112]. Pracochłonna technika identyfikacji nadwrażliwych miejsc działania DNA-azy I pozwoliła na ich usytuowanie m. in. w obrębie 5'końców genów kodujących wysoko- [113] i niskocząsteczkowe [55] białka szoku cieplnego oraz histony [90] u *Drosophila*, genów globiny erytrocytów kurczęcia [43, 79]. Nie ulega wątpliwości, ze względu na brak wzmożonej wrażliwości na DNA-azę I preparatów nagiego DNA, że struktura chromatyny sama w sobie warunkuje zwiększoną aktywność tej nukleazy w określonych jej regionach.

DNA-aza II (3'-nukleotydylohydrolaza dezoksyrybonukleinianu, EC 3.1.4.6) atakuje cząsteczkę DNA w chromatynie w miejscach odległych od siebie o 100 par zasad (lub ich wielokrotności). Miejsce działania tego enzymu znajduje się wewnątrz rdzenia nukleosomu. Uwalnianie przez DNA-azę II odcinków o długości 100 par zasad jest charakterystyczne dla natywnej chromatyny; w przypadku trawienia mononukleosomów nie uzyskuje się tej regularności.

Najczęściej stosowana metoda, wykorzystująca DNA-azę II do wyodrębniania aktywnej chromatyny, pochodzi z laboratorium Bonnera [40, 41]. Technika ta oparta jest na selektywnym trawieniu chromatyny za pomocą DNA-azy II (0,5 mg DNA/ml w 25 mM roztworze octanu sodu, pH 6,6, 100 jednostek enzymu/ml, 24°C, 5 min) i oddzieleniu frakcji nieaktywnej przez wytrącenie roztworem zawierającym 2 mM  $Mg^{2+}$ . DNA aktywnej chromatyny jest wzbogacony w sekwencje kodujące mRNA [41]. Frakcja aktywnej chromatyny „S2” wątroby szczura (około 11% jądrowego DNA) wykazuje 7-krotnie wyższą aktywność matrycową w porównaniu z nieaktywną frakcją P1. Magnezorozpuszczalna chromatyna wątroby zawiera blisko 3-krotnie więcej białek niehistonowych, około 2 razy mniej histonów (brak histonu H1 oraz zmniejszenie ilości histonu H4). Nukleosomy aktywnej frakcji chromatyny sedymentują podczas wirowania w gradiencie sacharozy przy 14S, podczas gdy nukleosomy magnezonierozpuszczalnej frakcji P1 przy 11S. Potraktowanie frakcji nukleosomów sedymentujących przy 14S za pomocą RNA-azy znosi różnice w charakterystyce sedymentacyjnej tej frakcji sugerując, że za wyższą wartość współczynnika S odpowiadają łańcuchy nowo tworzonego RNA. Według Gottesfelda i Butlera [42] magnezorozpuszczalna frakcja chromatyny, uwolniona przez atak DNA-azy II, jest bardziej wrażliwa na DNA-azę I niż niefrakcjonowana chromatyna. Jednakże technika wyodrębniania aktywnej chromatyny z użyciem DNA-azy II/ $Mg^{2+}$ , wciąż



stosowana w różnych modyfikacjach, nie daje pełnego oddzielenia aktywnych sekwencji DNA. Rozbieżności w jej odtworzeniu tłumaczy się tym, że DNA-aza II, podobnie jak mikrokokalna nukleaza, trawi tylko aktywnie transkrybowane geny [14]. Pracownia Tsaneva [33] proponuje, aby podczas frakcjonowania chromatyny techniką DNAaza II/Mg<sup>2+</sup> zastąpić 25 mM roztworem EDTA, pH 6,6, 25 mM roztwór octanu sodu, który ma właściwości precypitowania chromatyny, z wyjątkiem jej roztworów intensywnie rozdrobionych, wpływając przez to na aktywność działania nukleazy oraz wyniki frakcjonowania.

Mikrokokalna nukleaza (EC 3.1.4.7) atakuje łącznikowy DNA chromatyny, doprowadzając w czasie łagodnego trawienia do powstania fragmentów zawierających około 200 par zasad (lub ich wielokrotności). W określonych warunkach trawienia enzym ten uwalnia monomer nukleosomalny, tzw. „chromatosom”, jednostkę zawierającą 160-170 par zasad oraz pięć frakcji histonowych [95, 96]. Wydłużone działanie mikrokokalnej nukleazy doprowadza do wytworzenia segmentów DNA o długości około 140 par zasad, odpowiadających rozmiarem łańcuchowi DNA rdzenia nukleosomalnego. Nukleaza ta preferencyjnie działa na regiony międzynukleosomalne tych fragmentów chromatyny, które zawierają aktualnie transkrybowane sekwencje DNA [75, 111].

W często cytowanej technice Taty i Bakera [98] jądra komórkowe poddaje się wyjątkowo łagodnemu trawieniu mikrokokalną nukleazą (np. 3-5 mg DNA w 1 ml 100 mM NaCl — 0,25 mM CaCl<sub>2</sub> — 8% glicerol — 1 mM ditiotretitol — 10 mM TrisCl, pH 8,0; wątroba kurczęcia czy żaby — 0,2 jedn., 90 s; jajowód kurczęcia — 0,1 jedn., 90 s; erytrocyt kurczęcia — 0,35 jedn., 180 s), prowadzącemu do uwolnienia 6-15% DNA aktywnej chromatyny (frakcja P<sub>2</sub>). Nukleozowrażliwą część chromatyny charakteryzuje obecność bogatej ilościowo frakcji nowo utworzonego, szybkoznakującego się RNA oraz większość aktywności polimerazy RNA (około 85%). Frakcja P<sub>2</sub> jest 10-15 razy bardziej podatna na atak DNAazy I w porównaniu z P<sub>1</sub> i S, uznanymi za frakcje transkrypcyjnie nieaktywne.

Frakcjonowanie jąder komórkowych z udziałem mikrokokalnej nukleazy, w licznych modyfikacjach dotyczących ilości enzymu, stężenia jonów, pH środowiska itd., znalazło zastosowanie do wyodrębnienia aktywnej chromatyny różnych tkanek [13, 21, 22, 67, 98].

## 2. BIAŁKA NIEHISTONOWE ZASOCJOWANE Z AKTYWNA TRANSKRYPCYJNIE CHROMATYNA

Pierwsze badania chemiczne eu- i heterochromatyny (limfocyty, wątroba szczura) wskazywały na około 2-krotne wzbogacenie euchromatyny w białka niehistonowe w porównaniu z heterochromatyną, przy prawie



takiej samej ilości histonów [28, 103]. Preparaty aktywnej transkrypcyjnie chromatyny, otrzymywane przez enzymatyczne frakcjonowanie chromatyny, budzące największe zaufanie, cechuje również znacznie wyższa zawartość białek niehistonowych (a także RNA) w zestawieniu z matrycowo nieaktywną frakcją [22, 29]. Wśród tych wyników zaskoczeniem wydają się dane analizy chemicznej eu- i heterochromatyny wątroby szczura (wyizolowanej z zastosowaniem sonikacji), uzyskane przez Montagnę i wsp. [80]. Autorzy ci w euchromatynie tej tkanki, wykazującej 7-9 razy wyższą aktywność matrycową w stosunku do heterochromatyny, obserwowali niemal identyczną ilość białek niehistonowych, a różnice w odmiennej puli całości białek chromatyny dotyczyły 1,5-krotnie większej ilości histonów w heterochromatynie.

### 2.1. BIAŁKA HMG

Skąpe dotąd piśmiennictwo o białkach niehistonowych aktywnej transkrypcyjnie chromatyny obejmuje w głównej mierze dane na temat białek o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (high mobility group; tzw. białka HMG). Reprezentują one grupę niskocząsteczkowych białek (m.cz. 8 000-29 000), powszechnie występujących w jądrach komórkowych organizmów 4 królestw Eukaryota (zwierzęta, rośliny, grzyby i pierwotniaki). Sygnalne informacje o białkach podobnych do HMG wśród Prokaryota dotyczą przede wszystkim *E. coli* [76]. Białka HMG cechuje nietypowy skład aminokwasowy (około 30% aminokwasów kwaśnych i 25% aminokwasów zasadowych, znaczny odsetek proliny, tj. 5-14%). Białka te można łatwo wymyć z jąder komórkowych za pomocą 0,35M roztworu NaCl lub 0,75M roztworu kwasu nadchlorowego. Stosunek białek HMG do DNA w jądrze komórkowym wynosi średnio 0,03 : 1,0 [36, 102]. Wytrącalność białek HMG za pomocą kwasu trójchlorooctowego (TCA) oraz szybkość ich uwalniania z chromatyny stała się podstawą do ich podziału na dwie grupy: niskocząsteczkowe — HMG-14 i HMG-17 (small) i wysokocząsteczkowe — HMG-1 i HMG-2 (large). Odmienna rozpuszczalność w roztworach TCA służy do ich prostego rozdziału. Białka HMG-1 i HMG-2 rozpuszczają się w 2%, a nie ulegają solubilizacji w 10% roztworze TCA. Z kolei białka HMG-14 i HMG-17 rozpuszczają się w 10%, a nie są rozpuszczalne w 20% roztworze TCA [111]. Wśród dobrze scharakteryzowanych białek HMG gruczołów jądrowych pstrąga, białko HMG-T jest odpowiednikiem HMG-1 i HMG-2, białko zaś H6 — HMG-14 i HMG-17 grasicy cielęcia [102, 105]. Do białek HMG zalicza się również ubikwitynę, niskocząsteczkowy polipeptyd (m.cz. 8 400) odpowiadający białku HMG-20 grasicy cielęcia [34] bądź białku S gruczołów jądrowych pstrąga [104], a występujący powszech-



nie w przyrodzie [por. 59]. Przegląd piśmiennictwa na temat tej ciekawej grupy białek znajdzie czytelnik w ostatnich nielicznych krajowych opracowaniach [44, 49, 59].

Rozmieszczenie białek HMG w chromatynie nie wydaje się przypadkowe. Preferencyjne wiązanie się białek HMG z aktywnymi fragmentami chromatyny stwierdzono wykorzystując do frakcjonowania jąder komórkowych trzy omawiane już tu nukleazy. W 1977 r. Goodwin i wsp. [37] wykazali obecność wszystkich 4 grup HMG w nukleosomach grasicy cielęcia i królika po trawieniu jąder tej tkanki mikrokokalną nukleazą i późniejszej filtracji na Bio-Gel A-5m.

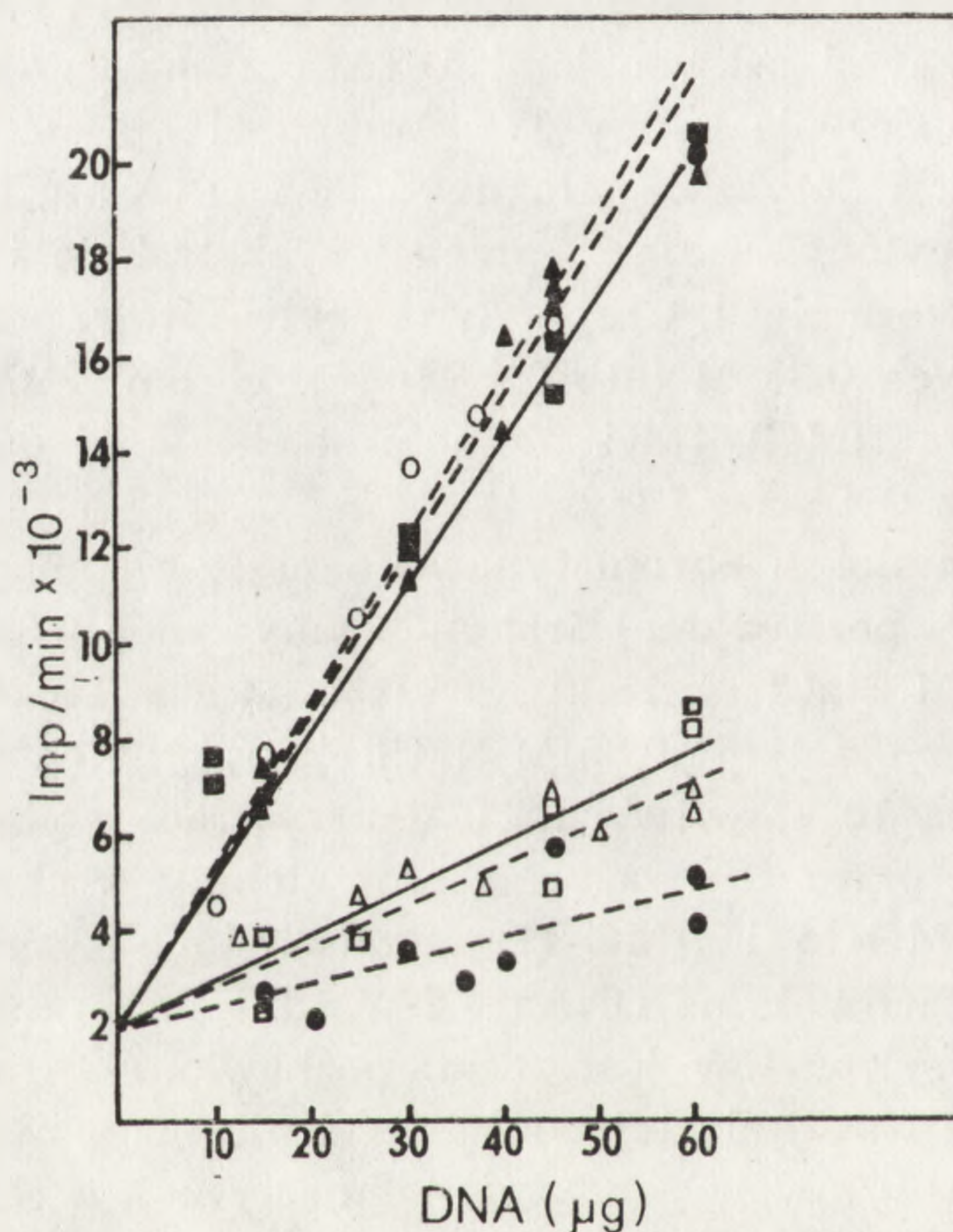
Koronnego dowodu na zasocjowanie białek HMG-14 i HMG-17 z transkrypcyjnie aktywnymi sekwencjami DNA chromatyny dostarczyły porównawcze doświadczenia grupy Weintrauba [108], potwierdzone przez Gazita i wsp. [32], a dotyczące wrażliwości na DNA-azę I genów globiny w jądrach erytrocytów kurczęcia przed ich ekstrakcją i po niej za pomocą 0,35 M roztworu NaCl. Chromatyna erytrocytów, pozbawiona składników wymywanych 0,35 M (lub 0,4 M) roztworem NaCl (czyli stężenie NaCl, które usuwa HMG), traci zdolność selektywnej degradacji genów globinowych przez DNA-azę I (rys. 1).

Odbudowa kompleksu chromatynowego przez rekonstytucję chromatyny erytrocytów, pozbawionej frakcji wymywanej 0,35 M roztworem NaCl (tzw. 0,35 M NaCl ekstrakt), z „0,35 M NaCl ekstraktem” tejże chromatyny bądź z eluatem „0,35 M NaCl ekstraktu” chromatyny, otrzymanym za pomocą 10% roztworu TCA, przywraca podatność preferencyjnego trawienia przez DNA-azę I genów globiny w odtworzonym produkcie. Białka HMG-14 i HMG-17, wyodrębnione z mózgu kurczęcia, mogą nadawać wrażliwość na DNA-azę I w odniesieniu do genów globiny w chromatynie erytrocytów kurczęcia, pozbawionej frakcji usuwanej 0,35 M roztworem NaCl, ale tej właściwości nie mają niskocząsteczkowe białka HMG erytrocytów w produkcie rekonstytucji z chromatyną mózgu pozbawioną „0,35 M NaCl ekstraktu” (rys. 2).

Wyniki te dowodzą, że same białka HMG-14 i HMG-17 nie stanowią czynników wystarczających do podtrzymania aktywności matrycowej chromatyny oraz jej podatności na DNA-azę I. Nie ulega wątpliwości, że dla zachowania takiej aktywności jest istotna interakcja HMG-14 i HMG-17 z innymi składnikami chromatyny, które nadają specyficzność bądź regulują strukturę aktywnego nukleosomu. Takie elementy specyficzności utrzymują się w wyizolowanych nukleosomach. Białka HMG-14 i HMG-17 erytrocytów „rozpoznają” nukleosomy wzbogacone w aktywnie transkrybowane sekwencje genu globiny, nawet w obecności 10-20-krotnego nadmiaru nieaktywnych nukleosomów [91, 109]. Według Albanese i wsp. (2) pewne strukturalne uwarunkowania aktywnego nukleoso-



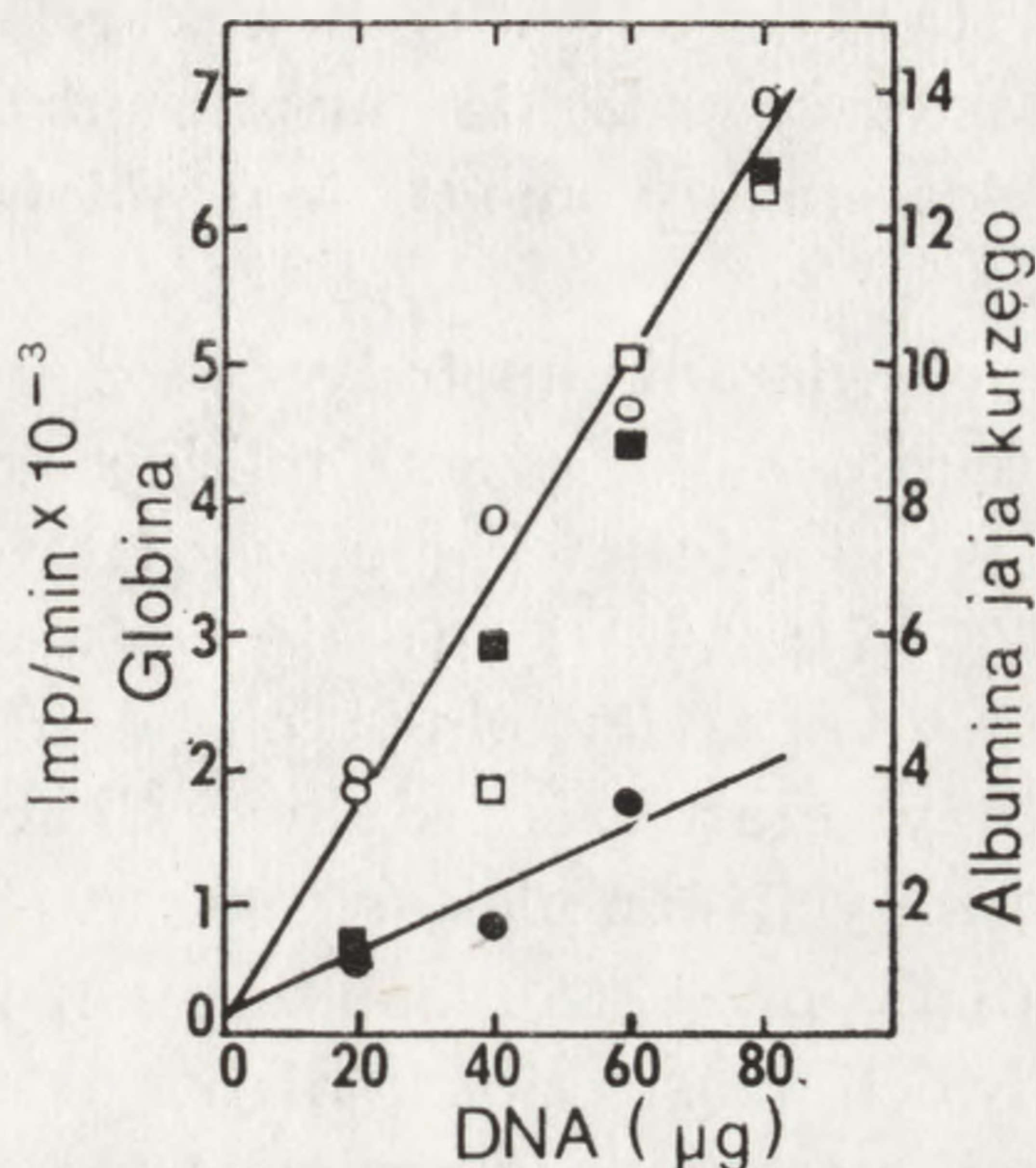
mu, odgrywające rolę w jego interakcji z białkami HMG-14 i HMG-17, pozostają nawet po usunięciu związanych z nim białek HMG. Grupa Weintrauba [108] wysunęła hipotezę, według której komórki ptaków zawierają tzw. receptor aktywnych genów (receptor factor) nie usuwany za pomocą 0,35 M roztworu NaCl, potrzebny dla właściwego związania białek HMG podczas rekonstrukcji. Ten receptor ma prawdopodobnie cechy unikalne aktywnych nukleosomów, niezbędne dla wiązania białek HMG. W warunkach *in vitro* pełna wrażliwość na DNA-azę I jest osiągnięta przy związaniu 1 mola HMG-14 i HMG-17 przez około 20 cząste-



Rys. 1. Rekonstytucja wrażliwości na DNA-azę I genu globiny erytrocytów kurczęcia w obecności niskocząsteczkowych białek HMG [108]. Chromatynę ekstrahowano 0,35 M roztworem NaCl i podzielono na kilka porcji. Jedną porcję rekonstruowano bezpośrednio z „0,35 M NaCl ekstraktem” chromatyny ( $\Delta$ ); drugą porcję rekonstruowano z eluatem „0,35 M NaCl ekstraktu” chromatyny otrzymanym za pomocą 10% roztworu TCA ( $\square$ ); trzecią porcję rekonstruowano z „0,35 M NaCl ekstraktem” chromatyny trawionym uprzednio trypsyną ( $\circ$ ); czwartą porcję trawiono bezpośrednio DNA-azą I ( $\blacktriangle$ ). Każda porcja była trawiona DNA-azą I do uwolnienia 10-15% DNA. DNA oczyszczano i hybrydyzowano z globinowym cDNA. Próby kontrolne:  $\blacksquare$  — jądra komórkowe erytrocytów trawione stafylokokową nukleazą do 35% uwolnionego DNA (brak preferencyjnego trawienia) i  $\bullet$  — jądra komórkowe erytrocytów trawione DNA-azą I do 10% uwolnionego DNA (znaczną utratą sekwencji DNA kodujących globinę)



czek rdzeniowych, co odpowiada warunkom występującym w jądrze komórkowym [109]. Białka HMG-1 i HMG-2 nie okazują wpływu na uwalnianie aktywnych genów przez DNA-azę I.



Rys. 2. Rekonstytucja wrażliwości na DNA-azę I jąder komórkowych erytrocytów kurczęcia w obecności „0,35 M NaCl ekstraktu” jąder komórkowych mózgu kurczęcia [108]. „0,35 M NaCl ekstrakt” chromatyny mózgu rekonstruowano z chromatyną erytrocytów pozbawioną „0,35 M NaCl ekstraktu” (●, ■) oraz „0,35 M NaCl ekstrakt” chromatyny erytrocytów rekonstruowano z chromatyną mózgu pozbawioną „0,35 M NaCl ekstraktu” (○, □). Kółka przedstawiają stopień hybrydyzacji z cDNA globiny; kwadraty — z cDNA albuminy jaja kurzego

W 1983 r. Reeves i Chang [89] przedstawili wyniki świadczące o braku korelacji między obecnością białek HMG-14 i HMG-17 a wrażliwością na DNA-azę I jąder komórkowych grasicy cielęcia oraz komórek erytroleukemicznych Frienda. W produkcie zrekonstruowanej chromatyny obydwu tkanek, pozbawionej frakcji wymywanej 0,35 M roztworem NaCl z wyizolowanymi białkami HMG bądź z eluatem „0,35 M NaCl ekstraktu” chromatyny, otrzymanym za pomocą 10% roztworu TCA, niskocząsteczkowe białka HMG nie uczuły utworzonego kompleksu na DNA-azę I. Z kolei pełen ekstrakt chromatyny, uzyskany za pomocą 0,35 M roztworu NaCl, po rekonstytucji z chromatyną pozbawioną „0,35 M NaCl ekstraktu” dawał pozytywne wyniki w doświadczeniach z DNA-azą I. Rozbieżność rezultatów tych badań oraz grupy Weintrauba [108] może być związana z pewnymi różnicami białek HMG ptaków i ssaków. Reeves i Chang [89] zwracają uwagę na preferencyjne właściwości wiązania białek HMG-14 i HMG-17 z jednołańcuchowymi kwasami nukleinowymi (DNA i RNA). Chromatynę komórek myszy i grasicy cielęcia cechuje wysoka zawartość jądrowego RNA, być może więc oddziaływania typu HMG-RNA zmieniają tak dalece właściwości tych białek, że czynią je nieaktywnymi w próbach rekonstytucyjnych. Może być



również, że w komórkach ssaków, obok białek HMG-14 i HMG-17, jest potrzebny inny czynnik do odtworzenia podatności na DNA-azę I aktywnych genów.

Lokalizacja białek HMG w aktywnych nukleosomach stanowi wciąż otwarty problem. Częsteczki rdzenia nukleosomalnego, chromatosomalnego bądź DNA międzynukleosomalny mogą być miejscami wiążącymi te białka.

Wyjątkowo proste rozwiązanie metodyczne z pracowni Olinsa [71], a polegające na miareczkowaniu rdzeni nukleosomalnych erytrocytów kurczenia białkiem HMG-14 (stosunek molowy HMG-14 do rdzeni odpowiednio: 0,0; 0,44; 0,87; 1,74; 2,62) i analizie wytworzonych kompleksów w żelu poliakryloamidowym, udowodniło obecność dwóch miejsc wiążących białka HMG-14 w cząsteczce rdzenia. Charakterystyka elektroforetyczna nowo utworzonych kompleksów sugeruje różne sposoby wiązania: jeden funkcjonujący przy stechiometrycznej ilości HMG-14, drugi zaś przy więcej niż dwóch cząsteczkach białka HMG-14 na jedną cząsteczkę rdzenia. Analogiczne wyniki otrzymano przy tworzeniu kompleksów rdzeni z mieszaniną białek HMG-14 i HMG-17 w stosunku 1:1. Wydaje się, z uwagi na znaczną homologię struktury I-rzędowej białek HMG-14 i HMG-17 [102], że obydwie białka mogą wiązać się w tych samych miejscach w nukleosomie, bądź mogą się wzajemnie zastępować. Nie udało się jeszcze zlokalizować [71] miejsc wiążących w rdzeniach nukleosomalnych dla białek HMG-1, HMG-2 oraz HMG-2a (tzn. HMG-E).

W tym samym czasie Albright i wsp. [3] opisali zarówno wśród niejednorodnej populacji mononukleosomów (MI — MV, DNA długości od 140 do 220 par zasad) uwolnionych podczas trawienia nukleolitycznego jąder komórkowych grasicy cielęcia, jak i w produktach rekonstrukcji nukleosomów pozbawionych histonu H1 oraz białek HMG-14 i HMG-17 z wyizolowanym białkiem HMG i histonem H1, grupę tzw. nukleosomów MV, mających niezależne miejsca wiązania dla dwóch cząsteczek HMG-14 (lub HMG-17) i jedno dla cząsteczki histonu H1. Miejsce wiązania histonu H1 (czy H5) znajduje się w obrębie chromatosomalnego (od 140 do 166 pary zasad), w którym DNA nawijając się na rdzeń wykonuje dwa pełne obroty.

Mardian i wsp. [71] analizując produkty trawienia przez DNA-azę I oktameru histonowego, występującego w kompleksie utworzonym przez łańcuch polinukleotydowy poli/dA-dT i białko HMG-14, stwierdzili, że miejsce wiązania HMG znajduje się na końcach nici polinukleotydowej, nawiniętej na pojedynczy oktamer. Nieprzypadkowa, odwracalna asocjacja białek HMG-14 i HMG-17 z nukleosomami zawierającymi sekwencje genów aktywnych została udowodniona przez Sandeena i wsp. [91]. W zrekonstruowanych rdzeniach nukleosomalnych, zawierających DNA



o długości 140 par zasad, obserwowano 2-10-krotnie wyższe powinowactwo HMG-14 i HMG-17 do nukleosomów niż do nagiego DNA, co niezbicie dowodzi znaczenia konformacji kompleksu chromatynowego dla zachowania jego funkcji. W przeprowadzonych eksperymentach (elektroforeza bądź ultrawierowanie w gradiencie sacharozy produktów rekonstytucji kompleksów HMG znakowanych  $^{125}\text{J}$  z DNA i cząsteczkami rdzeniowymi) występowało zjawisko współzawodnictwa rdzeni nukleosomalnych o białka HMG-14 i HMG-17. Zmiana kolejności dodawania składników podczas rekonstytucji nukleosomów ani obniżenie stężenia soli (od 0,075 do 0,025 M NaCl, bufor fosforanowy, pH 7,0) w mieszaninie reakcyjnej nie wpływały na przyłączenie białek HMG do cząsteczek rdzeniowych. Wiązanie HMG-14/HMG-17 z rdzeniem nukleosomalnym erytrocytów odbywa się (przynajmniej częściowo) przez 10-20 par zasad końców DNA, co zostało poparte analizą krzywych topnienia kontrolnych rdzeni nukleosomalnych oraz zasocjowanych z białkami HMG-14/HMG-17. Wyniki te zostały uzupełnione przez trawienie otrzymanych kompleksów za pomocą DNA-azy I. Miejsca ataku enzymu przy obydwu końcach DNA rdzenia związanego z białkami HMG (10, 20, 130 para zasad) są częściowo chronione przed nukleolizą przez białka HMG, czego nie obserwowano w przypadku DNA kontrolnych rdzeni nukleosomalnych (bez HMG).

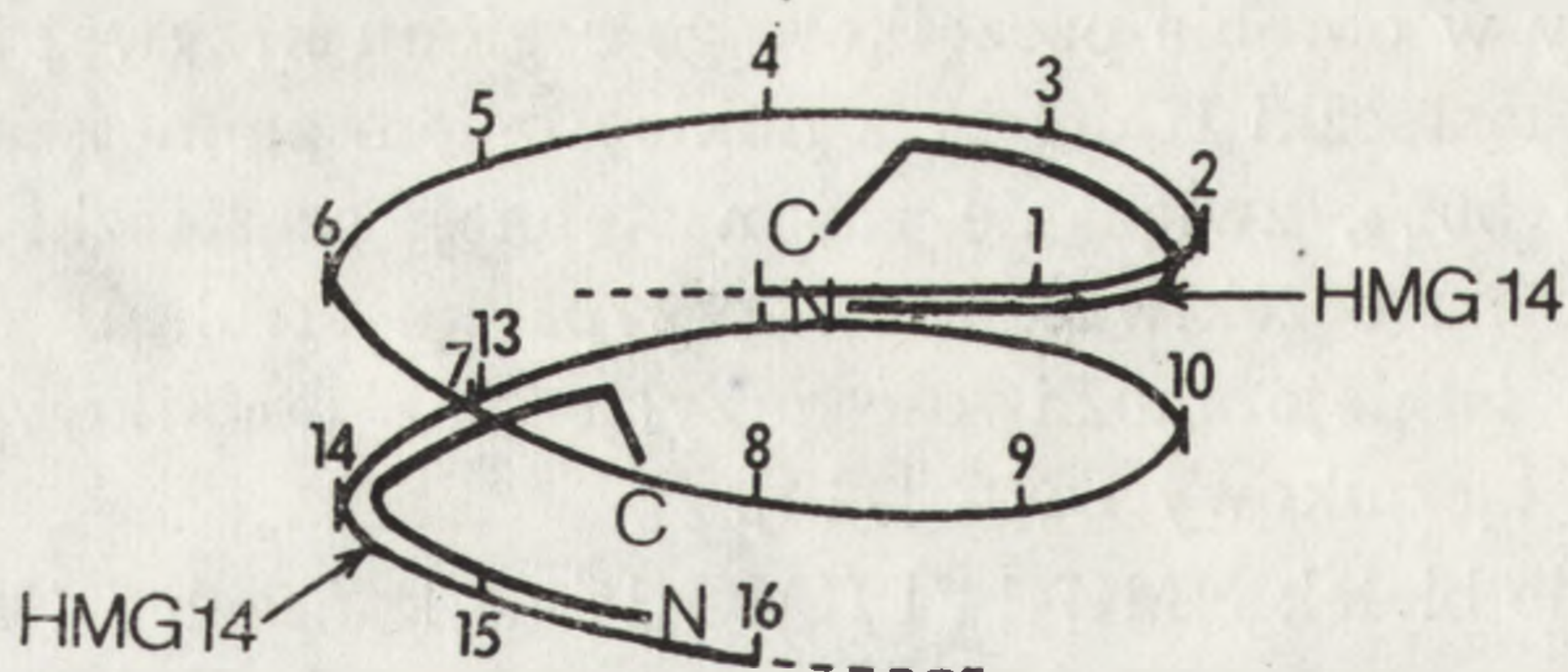
W pracowni Bradbury'ego [114] zaprezentowano, w wyniku badań elektroforetycznych i analizy krzywych topnienia nukleosomów komórek HeLa związanych z białkiem HMG-17, dalsze dowody popierające zasocjowanie białka HMG-17/HMG-14 z DNA rdzenia nukleosomalnego (końcowe 20-25 par zasad). Cząsteczki rdzenia nukleosomalnego charakteryzuje dwufazowy profil krzywych topnienia. Pierwsza faza, tzw. przedtopnieniowa (pre-melt, temperatura  $60^{\circ}\text{C}$ ) jest wynikiem topnienia 40 par zasad obydwu końców DNA rdzeniowego. Druga, główna faza, występująca przy  $74^{\circ}\text{C}$ , jest związana z topnieniem centralnej części DNA rdzeniowego (około 100 par zasad), połączonej z oktamerem histonów. Przyłączenie HMG-17 do mononukleosomów powoduje w pierwszej kolejności zmiany w obrębie początkowego regionu krzywej topnienia. Asocjacja jednej cząsteczki HMG-17 z nukleosomem zmniejsza region przedtopnieniowy o 50%, związanie zaś następnej cząsteczki eliminuje go całkowicie. Można oczekiwać, że w przypadku struktur dwu- i trójnukleosomalnych istnieje możliwość przyłączenia dodatkowych cząsteczek HMG-17 przez łącznikowy DNA [114].

Usytuowanie białek HMG-14 i HMG-17 na końcach DNA rdzeniowego, zabezpieczające go przed atakiem DNA-azy I, może być przyczyną różnic konformacyjnych między końcowymi i centralnymi fragmentami nici DNA związanej z rdzeniem. Region C-końcowy cząsteczki HMG-14/



/HMG-17, oddziałujący kwasowo, pozostaje zasocjowany z histonami, częściowo neutralizując ich dodatni ładunek, co w konsekwencji może prowadzić do ujawnienia miejsc nukleolitycznych w sąsiadującym segmencie DNA. Sekwencje oddziałujące z DNA znajdują się w zasadowym fragmencie cząsteczki HMG-17, między 15 i 40 resztą aminokwasową [1], a ugrupowanie 5 aminokwasów, tj. Arg-Arg-Ser-Ala-Arg wydaje się spełniać w nim istotną rolę [102].

Równolegle opublikowano prace dokumentujące obecność białek HMG-14 i HMG-17 we fragmentach chromatyny o długości odpowiadającej DNA około 160 par zasad, czyli jednostce określanej jako chromatosomal [38, 92]. Zmiany konformacyjne, którym podlegają nukleosomy aktywnej chromatyny, wiążą się z podwyższonym poziomem acetylacji białek chromatyny oraz brakiem lub znacznym spadkiem zawartości histonu H1 [16, 19, 38, 52, 61]. Nieobecność histonu H1 w nukleosomach zawierających białka HMG oraz DNA dłuższa niż 146 par zasad sugeruje, że *in vivo* niskocząsteczkowe białka HMG mogą wymieniać histon H1 [71]. Goodwin i wsp. [38] postulują, że w aktywnej chromatynie zachodzi związanie N-końcowego, zasadowego fragmentu białka HMG-14/HMG-17 (zamiana histonu H1) z 10-20 parami zasad DNA, C-końcowy zaś region tego białka oddziałuje z samym rdzeniem, osłabiając interakcje DNA-histony w tej części nukleosomu. Wymiana histonu H1 w chromatosomal przez białka HMG-14 i HMG-17 wydaje się możliwa, z uwagi na dużą homologię struktury I-rzędowej wymienionych białek. Zastąpienie histonu H1 w aktywnych nukleosomach przez białka HMG-14 i HMG-17 może zapobiegać interakcji między cząsteczkami histonu H1 sąsiadujących nukleosomów, prowadząc do relaksacji solenoidowej struktury chromatyny [26, 101], a co za tym idzie do zwiększonej jej dostępności dla RNA polimerazy czy enzymów nukleolitycznych. Zaproponowany przez Goodwina i Mathewa [39] model interakcji białka HMG-14 (HMG-17) z nukleosomem łączy dotychczasowe koncepcje na ten temat (rys. 3). Zgodnie z nim, białka HMG-14 i HMG-17 wiążą się z nukleosomem w 2



Rys. 3. Model interakcji białek HMG-14 (i HMG-17) z chromatosomal [39]; numery 1-16 odpowiadają pozycjom ataku DNA-azy I



miejscach, przy każdym końcu DNA rdzenia, i przykrywają bądź wcho-  
dzą w interakcję z łącznikowym DNA.

Sasi i wsp. [92] — na podstawie analizy krzywych topnienia oraz wykresów dichroizmu kołowego natywnej i pozbawionej histonu H1-H5 chromatyny erytrocytów kurczenia, skompleksowanej z białkiem HMG-17 — zlokalizowali miejsca wiązania tego białka HMG w międzynukleosomalnym odcinku DNA, bezpośrednio przyległym do rdzenia. Niskocząsteczkowe białka HMG, w opinii tych badaczy, wpływają na stabilizację i kondensację struktury chromatyny.

Ostatnie prace z laboratorium Varshavskyego [8, 64] wnoszą nowe dane na temat lokalizacji niskocząsteczkowych białek HMG w chromatynie. Metoda elektroforetycznego rozdziału cząsteczek subnukleosomalnych i nukleosomalnych z jąder komórkowych komórek HeLa, połączona z identyfikacją sekwencji DNA techniką Southerna [97], udokumentowała, że znaczna część białek HMG-14 i HMG-17 jest związana z nieaktywnymi regionami chromatyny tej tkanki [64], potwierdzając doniesienie Mathewa i wsp. [117] o obecności niskocząsteczkowych białek HMG w segmentach chromatyny, wzbogaconych w satelitarny DNA. Również praca z cytowanego tu laboratorium wskazuje na brak preferencyjnego wiązania białek HMG-14 i HMG-17 z fragmentami chromatyny zawierającymi geny reduktazy dihydrofolianu komórek L5178Y-R (8). Trudności w stwierdzeniu takiego wiązania wynikają prawdopodobnie z nielicznych kopii tego genu (około 350) w komórce. Badacze rozważają możliwość, że takie wiązanie białek HMG-14 i HMG-17 istnieje *in vivo*, a niszczy je proces izolowania, trawienia oraz frakcjonowania chromatyny.

Limitowane trawienie jąder komórkowych gruczołów jądrowych pstrąga za pomocą mikrokokalnej nukleazy (10 mM NaCl — 3 mM MgCl<sub>2</sub> — 1 mM CaCl<sub>2</sub> — 10 mM TrisCl, pH 7,4) uwalnia w supernatancie znaczne ilości białka HMG-T i ubikwityny [61]. Liza osadu w hipotonicznym 1 mM roztworze EDTA, połączona z wprowadzeniem 0,1 M roztworu NaCl do dalszego frakcjonowania chromatyny, pozwala otrzymać dwie populacje nukleosomów wzbogaconych w transkrybowane sekwencje DNA, tj. MN1 i MN2 — odpowiednio rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w 0,1 M roztworze NaCl. Mononukleosomy MN1 i MN2 [69] były heterogenne zarówno pod względem obecnego w nich DNA, jak i składników białkowych. Mononukleosomy MN1 zawierały histony rdzeniowe, niewiele histonu H1 (lub brak), białko H6 (I cząsteczka/nukleosom) i DNA o długości około 150 par zasad, natomiast mononukleosomy MN2 wykazywały obecność histonów rdzeniowych i histonu H1, niewielkiej ilości białka H6 oraz niejednorodnego DNA od 140 do 190 par zasad (średnio 177). Kontynuacja tych badań [48] doprowadziła do dokładniejszego poznania składu mononukleosomów MN1 i MN2. Okazało się, że



w obrębie MN1 i MN2 znajdują się 4 główne składniki, odpowiednio A, B, C, D i A', B', C', D' o zmiennej długości DNA (w MN1 od 100 do 155, w MN2 od 125 do 220 par zasad) oraz różnym molowym stosunku histonów rdzeniowych, histonu H1 i białka H6. Składnik C nukleosomów MN1 wydaje się ciekawy ze względu na wysoką zawartość białka H6, porównywalną z ilością histonów rdzeniowych. W nukleosomach MN1, zawierających komponent C, dwie lub trzy cząsteczki białka H6 są zasocjowane z rdzeniem nukleosomalnym i DNA długości około 145 par zasad. Nukleosomy zawierające białko H6 charakteryzują się obecnością bogato acetylowanych form histonu H4.

Trawienie DN-azą II jąder komórkowych gruczołów jądrowych pstrąga (około 5-16% uwolnionego DNA) z następczym frakcjonowaniem chromatyny za pomocą 2 mM roztworu  $MgCl_2$  prowadzi do pojawienia się w magnezorozpuszczalnej frakcji chromatyny nukleosomów MN3. Te jednostki zawierają DNA długości 180 par zasad, histony rdzeniowe oraz białka typu HMG — H6, HMG-T i ubikwitynę [68]. Próby zlokalizowania białek HMG pstrąga w nukleosomie potwierdziły preferencyjne związanie białka H6 z rdzeniem nukleosomalnym, białka zaś HMG-T ubikwityny z DNA odcinków łącznikowych przylegających do rdzenia [65, 68].

Dogodna technika frakcjonowania chromatyny na domeny o odmiennej wrażliwości na mikrokokalną nukleazę i rozpuszczalności w roztworach NaCl (50, 100, 200 i 400 mM) pozwala wyodrębnić fragmenty chromatyny wmywane niskimi stężeniami NaCl (50 i 100 mM), wzbogacone w aktywne geny [19]. Rozdział białka HMG-17/HMG-14 wśród opisywanych frakcji grasicy cielęcia wykazał, że z aktywnymi domenami chromatyny wiąże się około 48% niskocząsteczkowych białek HMG. Analogiczny sposób frakcjonowania jąder komórkowych gruczołów jądrowych pstrąga [61] dostarcza aktywnej chromatyny bogatej w białka HMG-T, ubikwitynę oraz acetylowane formy histonu H4. W aktywnej chromatynie tej tkanki brak jest histonu H1, a białko H6 występuje w niewielkiej ilości. Natomiast w nieaktywnej transkrypcyjnie chromatynie tkanki gruczołowej występuje około 50 i 25% odpowiednio białka HMG-T i H6.

Trawienie mikrokokalną nukleazą, DNA-azą I bądź DNA-azą II chromatyny guza Ehrlicha i komórek L myszy (5-10% uwolnionego DNA) prowadzi do otrzymania struktur subnukleosomalnych, tzw. SN2 i SN3, w których cząsteczki białek HMG-E i HMG-G (odpowiedniki HMG-14 i HMG-17) są zasocjowane z niskocząsteczkowymi odcinkami DNA (25-30 par zasad), wolnymi od histonów [6, 7]. Technika hybrydyzacji (z pre-mRNA) udowodniono, że DNA pochodzący z tych fragmentów chromatyny jest 3-krotnie wzbogacony w aktywne transkrybowane sekwencje. Kompleksy białek HMG-E i HMG-G z krótkimi odcinkami DNA nie są



artefektami i występują w natywnej chromatynie [7]. Utrwalenie chromatyny formaldehydem przed trawieniem nukleazą i późniejsza analiza elektroforetyczna produktów trawienia takiej oraz kontrolnej chromatyny pozwoliła zaobserwować subnukleosomy SN2 i SN3 w obydwu porównywanych preparatach. Ponadto wolny DNA (znakowany  $^{32}\text{P}$ ), dodany do chromatyny przed enzymatycznym frakcjonowaniem, nie zostaje włączony w tworzenie subnukleosomów, na co wskazuje brak piętna izotopowego w elektroferogramach produktów trawienia chromatyny w miejscach odpowiadających cząstkom SN2 i SN3.

Przedstawione rezultaty sugerują, że subnukleosomy znajdują się w domenach chromatyny szczególnie wrażliwych na działanie mikrokokalnej nukleazy. Uważa się, że subnukleosomy SN2 i SN3 mogą być związane z pewną grupą nukleosomów przejściowo rozwiniętych, a tym samym dostępnych dla polimerazy RNA czy DNA.

Zagadnieniem nadal otwartym jest obecność białek HM-1 i HMG-2 w aktywnej transkrypcyjnie chromatynie. Zasocjowanie wysokocząsteczkowych białek HMG z aktywną chromatyną erytrocytów kaczki, uwolnioną przez DNA-azę I, opisał po raz pierwszy Vidali i wsp. [100] w 1977 r. Nieco później z laboratorium Johnsa [73] i Rilla [52] doniesiono o występowaniu białek HMG-1 i HMG-2 w aktywnej frakcji chromatyny płodowej grasicy myszy selektywnie trawionej przez DNA-azę I [66] oraz we frakcji chromatyny grasicy cielęcia i szpiczaka myszy wytrawionych przez mikrokokalną nukleazę. Podstawową trudność w ustaleniu lokalizacji HMG-1 i HMG-2 w domenach aktywnej chromatyny stanowi łatwość wymywania się tych białek z jąder komórkowych nawet na etapie ich oczyszczania [3]. Panuje pogląd, że związanie HMG-1 i HMG-2 z nukleosomami jest słabe i przejściowe. Mathew i wsp. [73] we frakcji chromatyny uwalnianej przez mikrokokalną nukleazę obserwowali występowanie dwóch populacji białek HMG-1 i HMG-2. Jedna z nich wiąże się luźno z chromatyną i jest bardzo wrażliwa na nukleazy, a druga — mocniej zasocjowana z nukleosomami. Odmiennosc w obrębie białek HMG-1 i HMG-2 uzasadnia ich mikroniejednorodność w toku ogniskowania izoelektrycznego [81]. Nukleosomy zawierające tę grupę białek HMG najczęściej są pozbawione histonu H1. Jackson i wsp. [52] sugerują, że *in vivo* zachodzić może podstawienie histonu H1 białkami HMG-1 i HMG-2, które dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym utrzymują chromatynę w stanie rozproszonym. Wysokocząsteczkowe białka HMG różnych tkanek oraz HMG-T gruczołów jądrowych pstrąga są uwalniane z chromatyny w początkowym etapie trawienia mikrokokalną nukleazą, co sugeruje ich usytuowanie w jej międzynukleosomalnych odcinkach. Możliwość zamiany histonu H1 w łącznikowych regionach przez HMG-T i ubikwitynę (czy białka HMG-1 i HMG-2) może prowadzić do utrzy-



mania tych regionów w rozciągniętej formie, ponieważ brak histonu H1 utrudnia utworzenie solenoidowej struktury chromatyny. Lokalizacja białka HMG-T w odcinkach międzynukleosomalnych chromatyny została potwierdzona immunofluorescencyjnie [87]. Na podstawie elektroforetycznych i sedymentacyjnych badań kompleksów cząsteczek nukleosomalnych erytrocytów kurczęcia (długości DNA 140 i 180 par zasad) z białkami HMG wykazano, że dwie cząsteczki białek HMG-14/HMG-17 wiążą się z rdzeniem nukleosomalnym, a jedna cząsteczka HMG-1 lub HMG-2 asocjuje z 40 parami zasad łącznikowego DNA [93].

Ciekawe spostrzeżenia opisali Marekov i Beltchev [72], którzy obserwowali, że kompleks chromatyny grasicy cielęcia po usunięciu histonu H1 ulega łatwiej trawieniu mikrokokalną nukleazą aniżeli chromatyna tej tkanki, pozbawiona histonu H1 oraz białek HMG-1 i HMG-2. Produkt rekonstytucji chromatyny, bez histonu H1, z wysokocząsteczkowymi białkami HMG osiągał wrażliwość nukleazową analogiczną do tej, którą cechowała się chromatyna po usunięciu histonu H1. Białka HMG-1 i HMG-2 okazywały ponadto wpływ na wzrost nukleolizy nagiego DNA. Wyniki te sugerują, że białka HMG-1 i HMG-2 mogą powodować konformacyjne zmiany chromatynowego DNA poprzez destabilizację jego struktury, czyniąc go bardziej podatnym na nukleolizę. Destabilizacja podwójnej helisy DNA przez wysokocząsteczkowe białka HMG w 25 mM roztworze NaCl została wcześniej opisana przez Javaheriana i wsp. [53]. Obecność białka HMG-1 hamuje hydrolizę jednoniciowego DNA przez nukleazę  $S_1$  [94]. Jego wysokie powinowactwo do jednoniciowego DNA [12, 50] oraz ochrona jednoniciowego DNA przed nukleazami może mieć znaczenie biologiczne.

Na odmienną konformację aktywnej chromatyny wpływa również ubikwityna — białko analogiczne do HMG-20. Ubikwityna tworzy z histonem H2A rozgałęzioną cząsteczkę w kształcie litery Y, nazywaną białkiem A24 lub semihistonem H2A (uH2A) [8, 34, 35 por. 59]. Frakcjonowanie chromatyny techniką DNA-aza II/ $Mg^{2+}$  [40] i późniejsza analiza elektroforetyczna frakcji ubogich (P1 i P2) oraz wzbogaconych (S2) w aktywnie transkrybowane sekwencje DNA pomogło zlokalizować wolne białko HMG-20 we frakcji S2, natomiast białko A24 wraz z histonami rdzeniowymi w nieaktywnych matrycowo frakcjach P1 i P2. Łatwość uwalniania białka HMG-20 z cząsteczek A24 może mieć istotne znaczenie dla zmian konformacyjnych chromatyny. Interakcja HMG-20 z histonem H2A może wpływać na obniżenie aktywności transkrypcyjnej chromatyny, rozszczepienie zaś białka A24 z odłączeniem HMG-20 — na jej relaksację oraz zwiększoną dostępność polimerazy RNA w procesie jej transkrypcji [35]. Rozwój techniki mapowania wariantów nukleosomów w chromatynie, oparty na dwukierunkowej elektroforezie (niskojo-



nowa elektroforeza kompleksu dezoksyrybonukleinowego w pierwszym kierunku, połączona z elektroforezą DNA i białek w drugim kierunku oraz precyzyjną identyfikacją DNA po elektroforetycznym transferze na bibułę DBM — diazobenzylksymetyl — metodą hybrydyzacji), przyczynił się do zlokalizowania białka A24 w odmiennych subfrakcjach chromatyny [8, 64] różnych komórek. W komórkach HeLa oraz komórkach szczura 14B białko A24 jest zasocjowane z mononukleosomami nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny [64], w przypadku zaś *Drosophila* — z mononukleosomami aktywnej transkrypcyjnie chromatyny [cyt. wg 8]. Z kolei mononukleosomy komórek L5178Y myszy są praktycznie pozbawione białka A24. Barsoum i wsp. [8] nie wykluczają, że *in vivo* białko A24 jest obecne w tych komórkach, a proces izolowania chromatyny niszczy je.

## 2.2. INNE BIAŁKA NIEHISTONOWE

Dotychczasowe piśmiennictwo na temat białek niehistonowych aktywnej transkrypcyjnie chromatyny dotyczy głównie białek z grupy HMG. Z kolei ilość białek HMG, tj.  $10^6$  cząsteczek w jądrze komórkowym [36], nie wydaje się pokrywać całości białek niehistonowych, wykrywanych w tej części chromatyny [29]. Jackson i wsp. [52] podali, że we frakcji aktywnej chromatyny S szpiczaka myszy zostaje uwalniane za pomocą mikrokokalnej nukleazy (przy 17% wytrawionego DNA) około 30 białek niehistonowych. Jak dotąd, autorzy zajęli się charakterystyką dwóch polipeptydów odpowiadających białkom HMG-1 i HMG-2.

Analiza elektroforetyczna magnezorozpuszczalnej (S2) i magnezonierozpuszczalnej (P1) frakcji chromatyny wątroby szczura wykazała wiele ilościowych i jakościowych różnic w obrazie ich białek niehistonowych. Gottesfeld i wsp. [40, 41] zwracają uwagę na bogato reprezentowane we frakcji S2 dwa polipeptydy o m.cz. około 38 000.

Frakcja o m.cz. około 40 000 jest głównym składnikiem białek niehistonowych czterech tkanek embrionalnych kurczęcia (erytrocyty, mózg, skóra i mięśnie) magnezorozpuszczalnej części chromatyny [4]. Ilościowo różna zawartość komponentu o m.cz. 40 000 w tkankach o odmiennej aktywności transkrypcyjnej i różnym stopniu zróżnicowania (umiarkowana w erytrocytach, wysoka w mózgu) sugeruje, że może on być składnikiem strukturalnym aktywnej chromatyny.

Uwolnioną przez mikrokokalną nukleazę aktywną, tzw. SP frakcję chromatyny komórek erytroleukemicznych Frienda, cechuje również ilościowo bogaty składnik o m.cz. około 40 000 [22]. Skład chemiczny frakcji SP (wartości stosunku białka niehistonowe/histony około 3; RNA/DNA = 1,15) oraz obecność polipeptydów o m.cz. 40 000 przemawia za bardzo dużym wzbogaceniem jej w jądrowe rybonukleoproteiny. Jednak-



że rybonukleoproteinowy komponent nie wydaje się być uwalniany z innych fragmentów chromatyny w czasie enzymatycznego frakcjonowania, gdyż wirowanie frakcji SP przez 60% roztwór sacharozy (90 min., 140000xg) nie zmienia jej profilu elektroforetycznego, ani właściwości metabolicznych.

Karavanov i wsp. [54] porównując produkty trawienia jąder komórkowych śledziona myszy przez mikrokokalną nukleazę i DNA-azę I poddali wnikliwej analizie główny polipeptyd uwalniany przez obie nukleazy. Okazało się nim białko niehistonowe PS<sub>1</sub> o m.c.z. 25 500 z arginina jako N-końcowym aminokwasem. W składzie aminokwasowym białka PS<sub>1</sub> zwraca uwagę wysoki odsetek glicyny (16,5 mol%); wartość stosunku aminokwasów kwaśnych do zasadowych wynosi około 1,7.

Z obszernych badań z laboratorium Kruha [20, 58] wynika, że bardzo łagodne trawienie mikrokokalną nukleazą jąder komórek HTC (2-4% uwalnianego DNA) usuwa niewielkie fragmenty chromatyny, znacznie wzbogacone w sekwencje DNA, kodujące poli/A<sup>2+</sup>/RNA. Atak nukleazy nie wydaje się przypadkowy. Działanie nukleazy jest zlokalizowane głównie w monomerach i dimerach nukleosomalnych. W tych niewielkich fragmentach chromatyny stwierdzono obecność białek niehistonowych, tzw. fosfoprotein oraz aktywność kinazy proteinowej.

Frakcja białek niehistonowych o m.c.z. 57 000-59 000 oraz 80 000, bliżej niescharakteryzowane, towarzyszyły białkom HMG-1 i HMG-2 w aktywnej transkrypcyjnie chromatynie erytrocytów kaczki [100], otrzymanej techniką DNA-aza II/Mg<sup>2+</sup>.

Pierwsze dane o białkach niehistonowych aktywnej transkrypcyjnie chromatyny prymitywnych organizmów eukariotycznych, *Physarum polycephalum*, pochodzą z pracowni Toczki [17, 18]. Trawienie jąder komórkowych tego śluzowca za pomocą DNA-azy I uwalnia preferencyjnie trzy białka niehistonowe o m.c.z. 49 000, 46 000 i 18 700. Białka te występują również w nukleosomach izolowanych z aktywnej transkrypcyjnie chromatyny tego organizmu. Polipeptydy o m.c.z. 49 000 i 46 000, podobnie jak histony rdzenia nukleosomalnego, cechuje wysoki stopień acetylacji [18].

Białka niehistonowe magnezorozpuszczalnej chromatyny gruczołów mlecznych szczura, wybitnie wzbogacone w RNA, charakteryzowała obecność siedmiu polipeptydów o m.c.z. powyżej 40 000. W elektroferogramach magnezonierozpuszczalnej frakcji chromatyny tej tkanki obserwowano tylko jeden komponent w analogicznym regionie żelu [46].

Przedstawione tu prace dotyczą charakterystyki elektroforetycznej białek niehistonowych (obok histonów) w warunkach selektywnego trawienia aktywnych genów jąder komórkowych różnych tkanek przez enzymy nukleolityczne. W pracowni Kłyszajko-Stefanowicz [57] podjęto



próby rozdziału na hydroksypatycie tzw. frakcji SP, uwolnionej przez mikrokokalną nukleazę, a pochodzącej z tkanek o różnej aktywności genetycznej (wątroba, erytrocyt kurczęcia) po usunięciu DNA (poprzez stosowanie mieszaniny glikol polietylenowy — dekstran T500). Analiza porównawcza trzech grup białek niehistonowych, tj. NHCP1, NHCP2 i NHCP3, wyodrębnionych z frakcji SP obydwu tkanek, wskazuje na ilościowe i jakościowe różnice w ich rozdziale. Komórki wątroby o aktywnym genomie znacznie łatwiej uwalniają większą ilość białek niehistonowych podczas nukleolizy niż erytrocyty reprezentujące tzw. genom milczący (silent). W aktywnej transkrypcyjnie chromatynie wątroby kurczęcia stwierdzono specyficzne polipeptydy o m.cz. 13 000, 23 000, 29 000 i 33 000 (NHCP1), 23 000, 33 000, 45 000 i 110 000 (NHCP2) oraz 38 000 i 41 000 (NHCP3); natomiast w analogicznej frakcji erytrocytów — polipeptydy 59 000 (NHCP1), 92 000 (NHCP2) oraz 63 000 i 75 000 (NHCP3).

Porównanie trzech grup białek niehistonowych aktywnej chromatyny nowotworu Kirkmana-Robbins i odnośnikowej tkanki prawidłowej — wątroby chomika syryjskiego [56, 70] — zwraca uwagę na duże ilościowe różnice w białku NHCP2 (przewaga polipeptydów o m.cz. 53 000 i 62 000 w tkance nowotworowej, a o m.cz. 41 000 — w wątrobie). Polipeptydy o m.cz. 81 000 (NHCP1) i 39 000 (NHCP2) wydają się preferencyjnie związane z frakcją SP wątrobiaka Kirkmana-Robbins, natomiast 21 000, 35 000 i 37 000 (NHCP1), 70 000, 112 000, 141 000 i 157 000 (NHCP2) oraz 30 000-33 000 (NHCP3) — z odpowiadającą frakcją chromatyny tkanki prawidłowej.

Zdolność wiązania białek niehistonowych przez ograniczoną populację nukleosomów wydaje się istotnym czynnikiem warunkującym powstawanie funkcjonalnie i strukturalnie odmiennych regionów chromatyny. Inne czynniki, takie jak modyfikacje białek chromatyny czy metylacja DNA, również przyczyniają się do utrzymania aktywnych domen chromatyny. Zagadnienie to jest przedmiotem kolejnego przeglądowego opracowania.

Pragnę gorąco podziękować prof. dr hab. L. Kłyszajko-Stefanowicz za cenne uwagi w czasie opracowywania tego artykułu.

#### LITERATURA

- [1] ABERCOMBIE B. D., KNEALE G. G., CRANE-ROBINSON C., BRADBURY E. M., GOODWIN G. H., WALKER J. M., JOHNS E. W., Studies on the conformational properties of the high-mobility-group chromosomal protein HMG-17 and its interaction with DNA, *Eur. J. Biochem.*, **84**: 173-177, 1978.
- [2] ALBANESE J., WEINTRAUB H., Electrophoretic separation of a class of



- nucleosomes enriched in HMG-14 and 17 and actively transcribed globin genes, *Nucl. Acids Res.*, **8**: 2787-2805, 1980.
- [3] ALBRIGHT S. C., WISEMAN J. M., LANGE R. A., GARRARD W. T., Subunit structures of different electrophoretic forms of nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **255**: 3673-3684, 1980.
- [4] ALBRECHT J., HEMMINKI K., Protein composition of chromatin subfractions prepared from chick embryos, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**: 152-159, 1977.
- [5] ARNOLD E. A., YOUNG K. E., Heterogeneity of chromatin: Fractionation of sonicated rat liver chromatin by partial precipitation with  $Mg^{2+}$ , *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**: 73-89, 1974.
- [6] BAKAYEV V. V., BAKAYEVA T. G., SCHMATCHENKO V. V., GEORGIEV G. P., Non-histone proteins in mononucleosomes and subnucleosomes, *Eur. J. Biochem.*, **91**: 291-301, 1978.
- [7] BAKAYEV V. V., SCHMATCHENKO V. V., GEORGIEV G. P., Subnucleosome particles containing high mobility group proteins HMG-E and HMG-G originate from transcriptionally active chromatin, *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1525-1539, 1979.
- [8] BARSOUM J., LEVINGER L., VARSHAVSKY A., On the chromatin structure of the amplified, transcriptionally active gene for dihydrofolate reductase in mouse cells, *J. Biol. Chem.*, **257**: 5274-5282, 1982.
- [9] BELLARD H., GANNON F., CHAMBON P., Nucleosome structure, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**: 779-791, 1978.
- [10] BERKOWITZ E. M., DOTY P., Chemical and physical properties of fractionated chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 3328-3332, 1975.
- [11] BHORJEE J. S., ADLER L., Nuclear shearing and chromatin structure, *Cell Biol. Int. Rep.*, **6**: 1065-1076, 1982.
- [12] BIDNEY D. L., REECK G. R., Purification from cultured hepatoma cells of two nonhistone chromatin proteins with preferential affinity for single-stranded DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 1211-1218, 1978.
- [13] BLOOM K. S., ANDERSON J. N., Fractionation of hen oviduct chromatin into transcriptionally active and inactive regions after selective micrococcal nuclease digestion, *Cell*, **15**: 141-150, 1978.
- [14] BLOOM K. S., ANDERSON J. N., Conformation of ovalbumin and globin genes in chromatin during differential gene expression, *J. Biol. Chem.*, **254**: 10532-10539, 1979.
- [15] CARTWRIGHT I. L., ABMAYR S. M., FLEISCHMANN G., LOWENHAUPT K., ELGIN S. C. R., KEENE M. A., HOWARD G. C., Chromatin structure and gene activity: the role of nonhistone chromosomal proteins, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **13**: 1-86, 1983.
- [16] CHAN P. K., LIEW C. C., Identification of nonhistone chromatin proteins in chromatin subunits (or mononucleosomes) devoid of histone H1, *Can. J. Biochem.*, **57**: 666-672, 1979.
- [17] CZUPRYN M., TOCZKO K., Isolation and susceptibility to nucleases of transcriptionally active and inactive chromatin fractions from *Physarum polycephalum*, *Acta Biochim. Polon.*, **27**: 143-152, 1980.
- [18] CZUPRYN M., TOCZKO K., Non-histone proteins preferentially associated with transcriptionally active chromatin of *Physarum polycephalum*, *Acta Biochim. Polon.*, **29**: 17-25, 1982.
- [19] DAVIE J. R., SAUNDERS C. A., Chemical composition of nucleosomes among



- domains of calf thymus chromatin differing in micrococcal nuclease accessibility and solubility properties, *J. Biol. Chem.*, **256**: 12574-12580, 1981.
- [20] DEFER N., KITZIS A., LEVY F., TICHONICKY L., SABATIER M-M., KRUIH J., Presence of non-histone proteins in nucleosomes, *Eur. J. Biochem.*, **88**: 583-591, 1978.
- [21] DIMITRIADIS G. J., TATA J. R., Subnuclear fractionation by mild micrococcal-nuclease treatment of nuclei of different transcriptional activities caused a partition of expressed and non-expressed genes, *Biochem. J.*, **187**: 467-477, 1980.
- [22] DJONDJUROV L. P., IVANOVA E. C., TSANEV R., Two chromatin fractions with different metabolic properties of non-histone proteins of newly synthesized RNA, *Eur. J. Biochem.*, **97**: 133-139, 1979.
- [23] ELGIN S. C. R., SERUNIAN L. A., SILVER L. M., Distribution patterns of *Drosophila* non-histone chromosomal proteins, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. XLII, 839-850, 1978.
- [24] ELGIN S. C. R., DNAase I — hypersensitive sites of chromatin, *Cell*, **27**: 413-415, 1981.
- [25] FELSENFELD G., Chromatin, *Nature*, **211**: 115-122, 1978.
- [26] FINCH J. T., KLUG A., Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1897-1901, 1976.
- [27] FLINT S. J., WEINTRAUB H., An altered subunit configuration associated with the actively transcribed DNA of integrated adenovirus genes, *Cell*, **12**: 783-792, 1977.
- [28] FRENSTER J. H., Nuclear polyanions as derepressors of synthesis of ribonucleic acids, *Nature*, **206**: 680-683, 1965.
- [29] GABRIELLI F., HANCOCK R., FABER A. J., Characterization of a chromatin fraction bearing pulse-labelled RNA, *Eur. J. Biochem.*, **120**: 363-369, 1981.
- [30] GAREL A., AXEL R., Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 3966-3970, 1976.
- [31] GAREL A., ZOLAN M., AXEL R., Genes transcribed at diverse rates have a similar conformation in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4867-4871, 1977.
- [32] 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.
- [33] GEORGIEVA E. I., PASHEV I. G., TSANEV R. G., Distribution of high mobility group and other acid-soluble proteins in fractionated chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**: 240-244, 1981.
- [34] GOLDKNOPF I. L., BUSCH H., Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 864-868, 1977.
- [35] GOLDKNOPF I. L., FRENCH M. F., DASKAL Y., BUSCH H., A reciprocal relationship between contents of free ubiquitin and protein A24, its conjugate with histone 2A in chromatin fractions obtained by the DNase II,  $Mg^{++}$  procedure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 786-793, 1978.
- [36] GOODWIN G. H., SANDERS C., JOHNS E. W., A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids, *Eur. J. Biochem.*, **38**: 14-19, 1973.



- [37] GOODWIN G. H., WOODHEAD L., JOHNS E. W., The presence of high mobility group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes, *FEBS Lett.*, **73**: 85-88, 1977.
- [38] GOODWIN H. G., MATHEW C. G. P., WRIGHT C. A., VENKOV C., JOHNS E. W., Analysis of the high mobility group proteins associated with salt-soluble nucleosome, *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1815-1835, 1979.
- [39] GOODWIN G. H., MATHEW C. P. G., Role in gene structure and function [w] The HMG chromosomal proteins, red E. W. Johns, Academic Press, London—Toronto 1982, 193-221.
- [40] GOTTFELD J. M., GARRARD W. T., BAGI G., WILSON R. F., BONNER J., Partial purification of the template-active fraction of chromatin: A preliminary reports, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2193-2197, 1974.
- [41] GOTTFELD J. M., MURPHY R. F., BONNER J., Structure of transcriptionally active chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 4404-4408, 1975.
- [42] GOTTFELD J. M., BUTTLER D. J. G., Structure of transcriptionally-active chromatin subunits, *Nucl. Acids Res.*, **9**: 3155-3173, 1977.
- [43] GROUDINE W., WEINTRAUB H., Activation of globin genes during chicken development, *Cell*, **24**: 393-401, 1981.
- [44] GRÖBNER S., Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej, *Post. Biochem.*, **28**: 487-501, 1982.
- [45] HEWISH D. R., BURGOYNE L. A., Chromatin substructure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 504-510, 1973.
- [46] HIROSE M., ANABUKI K., MAKI M., HASEGAWA K., CHIBA H., Characterization of chromatin subfractions enriched in RNA from lactating mammary gland of the rat, *Agric. Biol. Chem.*, **44**: 2391-2397, 1980.
- [47] HOZIER J., RENZ M., NEHLS P., The chromosome fiber: evidence for an ordered superstructure of nucleosomes, *Chromosoma*, **62**: 301-317, 1977.
- [48] HUTCHEON T., DIXON G. H., LEVY-WILSON B., Transcriptionally active mononucleosomes from trout testis are heterogenous in composition, *J. Biol. Chem.*, **255**: 681-685, 1980.
- [49] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota I. Struktura chromatyny, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 133-148, 1982.
- [50] 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.
- [51] IGO-KEMENES T., HORZ W., ZACHAU H. G., Chromatin, *Ann Rev. Biochem.*, **51**: 89-121, 1982.
- [52] JACKSON J. B., POLLOCK J. M., RILL R. L., Chromatin fractionation procedure that yields nucleosomes containing near-stoichiometric amounts of high mobility group nonhistone chromosomal proteins, *Biochemistry*, **18**: 3739-3748, 1979.
- [53] JAVAHERIAN K., SADEGHI M., LIU L. F., Nonhistone proteins HMG-1 and HMG-2 unwind DNA double helix, *Nucl. Acids Res.*, **6**: 3569-3580, 1979.
- [54] KARAVANOV A. A., CZESTKOV W. W., AFANASJEV B. N., Charakteristika białka wyswobodzającego iz chromatyna jader selezienki myszy w usłowach ograniczonego gidroliza DNKazoj I i mikrokokowej nukleazoj, *Mol. bioł.*, (Moskwa), **15**: 220-233, 1981.
- [55] KEENE M. A., CORCES V., LOWENHAUPT K., ELGIN S. C. R., DNAase I



- hypersensitive sites of the chromatin for *Drosophila melanogaster* chromatin occur at the 5'ends of regions of transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 143-146, 1981.
- [56] KILIAŃSKA Z., LIPIŃSKA A., KRAJEWSKA W. M., KŁYSZEJKO-STEFA-NOWICZ L., Distribution of chromatin proteins between fractions of hamster liver chromatin differing in their susceptibility to micrococcal nuclease, *Molec. Biol. Rep.*, **8**: 203-211, 1982.
- [57] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., Distribution of non-histone proteins between micrococcal nuclease sensitive and nuclease resistant chromatin from chicken cells with active and inactive genomes, *Cell Biochem. Funct.*, **4**: 78-84, 1984.
- [58] KITZIS A., LEIBOVITCH S-A., LEIBOVITCH M-P., TICHONICKY L., HAR-REL J., KRUIH J., The small chromatin fragments released by micrococcal nuclease from hepatoma tissue cultured cell nuclei are strongly enriched in coding DNA sequences and are related to an actively transcribed single-stranded DNA fraction, *Biochim. Biophys. Acta*, **697**: 60-70, 1982.
- [59] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., Niejednorodność i specyficzność białek niehistonowych, *Post. Biochem.*, **25**: 287-350, 1979.
- [60] KORNBERG R. D., Chromatin structure: A repeating unit of histone and DNA, *Science*, **184**: 868-871, 1974.
- [61] KUEHL L., LYNES T., DIXON G. H., LEVY-WILSON B., Distribution of high mobility group proteins among domains of trout testis chromatin differing in their susceptibility to micrococcal nuclease, *J. Biol. Chem.*, **255**: 1090-1095, 1980.
- [62] KUO M. T., SAHASRABUDDHE C. G., SAUDERS G. F., Presence of messenger specifying sequences in the DNA of chromatin subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1572-1575, 1976.
- [63] LACY E., AXEL R., Analysis of DNA of isolated chromatin subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 3978-3982, 1975.
- [64] LEVINGER L., BARSOUM J., VARSHAVSKY A., Two-dimensional hybridization mapping of nucleosomes: comparison of DNA and protein patterns, *J. Mol. Biol.*, **146**: 287-304, 1981.
- [65] LEVY-WILSON B., WONG N. C. W., DIXON G. H., Selective association of trout-specific H6 protein with chromatin regions susceptible to DNase I and DNAase II: possible location of HMG-T in the spacer region between core nucleosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2810-2814, 1977.
- [66] LEVY-WILSON B., DIXON G., A study of the localization of high mobility group proteins in chromatin, *Can. J. Biochem.*, **56**: 480-491, 1978.
- [67] LEVY-WILSON B., DIXON G. H., Partial purification of transcriptionally active nucleosomes from trout testis cells, *Nucl. Acids Res.*, **5**: 4155-4163, 1978.
- [68] LEVY-WILSON B., CONNOR W., DIXON G., A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequence contains high mobility group as major structural components, *J. Biol. Chem.*, **254**: 609-620, 1979.
- [69] LEVY-WILSON B., DIXON G. H., Limited action of micrococcal nuclease to trout testis nuclei generates two mononucleosome subsets enriched in transcribed DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1682-1686, 1979.
- [70] LIPIŃSKA A., KILIAŃSKA Z., KRAJEWSKA W. M., KŁYSZEJKO-STEFA-NOWICZ L., Chromatin proteins associated with micrococcal nuclease-sen-



- sitive and nuclease-resistant chromatin of Kirkman-Robbins hepatoma and hamster liver, *Mol. Biol. Rep.*, **10**: 31-39, 1984.
- [71] MARDIAN J. K. W., PATON A. E., BUNNICK G. J., OLINS D. E., Nucleosome cores have two specific binding sites for non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17, *Science*, **209**: 1534-1536, 1980.
- [72] MAREKOV L. N., BELTCHEV B. G., Influence of high-mobility-group non-histone chromosomal protein 1 and 2 on the digestion of chromatin with micrococcal nuclease, *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**: 261-267, 1982.
- [73] MATHEW C. G. P., GOODWIN G. H., JOHNS E. W., Studies on the association of the high mobility group non-histone chromatin proteins with isolated nucleosomes, *Nucl. Acids Res.*, **6**: 167-179, 1979.
- [74] MATHEW C. G. P., GOODWIN G. H., IGO-KEMENES T., JOHNS E. W., The protein composition of rat satellite chromatin, *FEBS Lett.*, **125**: 25-29, 1981.
- [75] MATHIS D., OUDET P., CHAMBON P., Structure of transcribing chromatin, *Progr. Nucl. Acids Res. & Mol. Biol.*, **24**: 1-54, 1980.
- [76] MAYES E. L. V., Species and tissue specificity, [w] *The HMG chromosomal proteins*, red. E. W. Johns, Academic Press London—Toronto 1982, 9-40.
- [77] MAYFIELD J. E., SERUNIAN L. A., SILVER L. M., ELGIN S. C. R., A protein released by DNase I digestion of *Drosophila* nuclei is preferentially associated with puffs, *Cell*, **14**: 539-544, 1978.
- [78] MCGHEE J. D., FELSENFELD G., Nucleosome structure, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 1115-1156, 1980.
- [79] MCGHEE J. D., WOOD W. I., DOLAN M., ENGEL J. D., FELSENFELD G., A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult  $\beta$ -globin gene is accessible to nuclease digestion, *Cell*, **27**: 45-55, 1981.
- [80] MONTAGNA R. A., RODRIGUEZ L. V., BECKER F. F., A comparative study of the non-histone proteins of rat liver euchromatin and heterochromatin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**: 617-624, 1977.
- [81] NICOLAS R. H., GOODWIN G. H., Isolation and analysis, [w] *The HMG chromosomal proteins*, red. E. W. Johns, Acad. Press London—Toronto 1982, 41-68.
- [82] NOLL M., THOMAS J. O., KORNBERG R. D., Preparation of native chromatin and damage caused by shearing, *Science*, **187**: 1203-1206, 1975.
- [83] NOLL M., Nuclease digestion as a key to chromatin structure, *Life Sci. Res. Rep.*, **4**: 239-252, 1976.
- [84] OLINS A. L., OLINS D. E., Spheroid chromatin units (v bodies), *Science*, **183**: 330-332, 1974.
- [85] OLINS A. L., CARLSON R. D., WRIGHT E. B., OLINS D. E., Chromatin v bodies: isolation, subfraction and physical characterisation, *Nucl. Acids Res.*, **3**: 3271-3291, 1976.
- [86] PEDERSON P., Chromatin structure and gene transcription: Nucleosomes permit a new synthesis, *Intern. Rev. Cytol.*, **55**: 1-22, 1978.
- [87] 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**: 3358-3363, 1979.
- [88] RAMAKRISHAN N., PATIL M. S., PRADHAN D. S., Characterization of subunits of transcriptionally active & inactive chromatin of Yoshida ascites tumor cells: comparison & transcription functions, *Indian J. Biochem Biophys.*, **20**: 1-7, 1983.



- [89] REEVES R., CHANG D., Investigation of the possible functions for glycosylation in the high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **258**: 679-687, 1983.
- [90] SAMAL B., WORCEL A., LOUIS C., SCHEDL P., Chromatin structure of the histone genes of *D. melanogaster*, *Cell*, **23**: 401-409, 1981.
- [91] SANDEEN G., WOOD W. J., FELSENFELD G., Interaction of high mobility proteins HMG 14 and HMG 17 with nucleosomes, *Nucleic Acids Res.*, **8**: 3757-3777, 1980.
- [92] SASI R., HÜVÖS P. E., FASMAN G. D., A conformational study of the binding of a high mobility group protein with chromatin, *J. Biol. Chem.*, **257**: 1448-1454, 1982.
- [93] SCHRÖTER H., BODE J., The binding sites for large and small high-mobility-group (HMG) proteins, *Eur. J. Biochem.*, **127**: 429-436, 1982.
- [94] SHASTRI K., ISACKSON P. J., FISHBACK J. L., LAND M. D., REECK G. R., Influence of nonhistone chromatin protein HMG-1 on the enzymatic digestion of purified DNA, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 5059-5072, 1982.
- [95] SIMPSON R. T., Structure of chromatin containing extensively acetylated H3 and H4, *Cell*, **13**: 691-699, 1978.
- [96] SIMPSON R. T., Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones, *Biochemistry*, **17**: 5524-5531, 1978.
- [97] SOUTHERN E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517, 1975.
- [98] TATA J. R., BAKER B., Enzymatic fractionation of nuclei: polynucleosomes and RNA polymerase II as endogenous transcriptional complexes, *J. Mol. Biol.*, **118**: 249-272, 1978.
- [99] TSANEV R., Transcriptionally active chromatin, *Molec. Biol. Rep.*, **9**: 9-17, 1983.
- [100] VIDALI G., BOFFA L. C., ALLFREY V. G., Selective release of chromosomal proteins during limited DNAase 1 digestion of avian erythrocyte chromatin, *Cell*, **12**: 409-415, 1977.
- [101] VILLEPONTEAUX B., LASKY L., HARRY I., Lysine-rich histones and the selective digestion of the globine gene of avian red blood cells, *Biochemistry*, **17**: 5532-5535, 1978.
- [102] WALKER J. M., Primary structure, [w] The HMG chromosomal proteins, red E. W. Johns, Academic Press, London—Toronto 1982, 69-87.
- [103] WARNECKE P., KRUSE K., HARBERS E., Isolation and characterization of nonhistone proteins from euchromatic and heterochromatic deoxyribonucleoprotein of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **331**: 295-304, 1973.
- [104] WATSON D. C., LEVY-WILSON B., DIXON G. H., Free ubiquitin is a non-histone protein of trout testis chromatin, *Nature*, **276**: 196-198, 1978.
- [105] WATSON D. C., WONG N. C. W., DIXON G. H., The complete aminoacid sequence of a trout-testis non-histone protein, H6, localized in a subset of nucleosomes and its similarity to calf-thymus non-histone proteins HMG-14 and HMG-17, *Eur. J. Biochem.*, **95**: 193-202, 1979.
- [106] WEINTRAUB H., GROUDINE M., Transcriptionally active and inactive conformations of chromosomal subunits, *Science*, **193**: 848-853, 1976.
- [107] WEINTRAUB H., LARSEN A., GROUDINE M.,  $\alpha$ -globin-gene switching during the development of chicken embryos: Expression and chromosome structure, *Cell*, **24**: 333-344, 1981.



- [108] WEISBROD S., WEINTRAUB H., Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNAase I-sensitive structure on globin chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 630-634, 1979.
- [109] WEISBROD S., GROUDINE M., WEINTRAUB H., Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes, *Cell*, **19**: 289-301, 1980.
- [110] WEISBROD S., WEINTRAUB H., Isolation of actively transcribed nucleosomes using immobilized HMG 14 and HMG 17 and an analysis of  $\alpha$ -globin chromatin, *Cell*, **23**: 391-400, 1981.
- [111] WEISBROD S., Active chromatin, *Nature*, **297**: 289-295, 1982.
- [112] WU C., BINGHAM P. M., LIVAK K. J., HILMGREN R., ELGIN S. C. R., The chromatin structure of specific genes: I Evidence for higher order domains of defined DNA sequence, *Cell*, **16**: 797-806, 1979.
- [113] WU C., The 5'ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNAase I, *Nature*, **286**: 854-860, 1980.
- [114] YAU P., IMAI B. S., THORNE A. W., GOODWIN G. H., BRADBURY E. M., Effect of HMG protein 17 on the thermal stability of control and acetylated HeLa oligonucleosomes, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 2651-2664, 1983.

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

*Otrzymano: 10 lipca 1984.*

*Przyjęto: 24 lipca 1984.*



## AKTYWNA TRANSKRYPCYJNIE CHROMATYNA \*.

II. MODYFIKACJE SKŁADNIKÓW AKTYWNEJ TRANSKRYPCYJNIE  
CHROMATYNYTRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN \*. II. MODIFICATIONS  
OF TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN COMPONENTS

Zofia KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Struktur Komórkowych,  
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ, Łódź

*Streszczenie.* Artykuł przedstawia przegląd piśmiennictwa dotyczącego roli modyfikacji białek chromatyny i metylacji DNA w utrzymaniu struktury aktywnej transkrypcyjnie chromatyny.

*Summary.* The paper presents the review of the data concerning role of chromatin protein modifications and DNA methylation in the maintenance of transcriptionally active chromatin structure.

## MODYFIKACJE BIAŁEK CHROMATYNY I DNA

Uorganizowanie nukleosomów względem DNA (phasing) pozostaje skorelowane z aktywnością transkrypcyjną komórek. Powtarzające się krótsze podjednostki chromatyny cechuje wyższa aktywność w syntezie RNA (46). Długość DNA nukleosomów transkrypcyjnie aktywniejszych jąder komórkowych wątroby kurczęcia wynosi 200 par zasad, natomiast w nukleosomach nieaktywnych erytrocytów — 212 par zasad (50).

Berkowitz i Riggs (14) sugerują możliwość występowania w jądrze komórkowym kilku populacji nukleosomów różniących się długością DNA i aktywnością matrycową. W aktywnej transkrypcyjnie chromatynie wątroby szczura, uwolnionej przez mikrokokalną nukleazę i wydzielonej w toku gradientowego wirowania w sacharozie (tzw. frakcja „A”, wzbo-

\* Praca wykonana w ramach problemu rządowego RP-6 nr 2103.



gacona 10-15-krotnie w aktywne geny i zawierająca wysoki odsetek sekwencji AT), są obecne nukleosomy z DNA o długości 183 par zasad. Natomiast frakcję chromatyny z nietranskrybowanymi sekwencjami charakteryzują nukleosomy z DNA odpowiadającym 219 parom zasad (14).

Jakkolwiek z dotychczasowych badań wynika, że nie ma istotnych różnic w rozmiarach nukleosomów chromatyny o odmiennej aktywności genowej, to ich przyczyna wydaje się być zakodowana w jakichś subtelnych aspektach architektury aparatu genetycznego. Postsyntetyczne modyfikacje białek chromatyny, obecność wariantów histonów, różnice w zawartości histonu H1, wiązanie się nukleosomów z białkami HMG, zmienna gatunkowo długość łącznikowego DNA oraz metylacja DNA skupiają najwięcej uwagi badaczy poszukujących przyczyn utrzymania części chromatyny w stanie wzmożonej aktywności transkrypcyjnej. Rola wariantów histonów w strukturze i funkcji chromatyny jest niejasna. Jednakże pojawienie się w ściśle określonym etapie różnicowania specyficznych zmian w podfrakcjach histonów sugeruje, że są one istotne dla tego procesu (23). Transkrypcyjnie aktywne makrojądro *Tetrahymena* ma odmienne warianty histonów w porównaniu z nieaktywnym mikrojądrem tego organizmu (6). Na strukturalną i funkcjonalną niejednorodność nukleosomów mają wpływ, obok wariantów histonów (zapewniających istnienie teoretycznie 378 form oktamerów), również białka zasocjowane z DNA (ich modyfikacje), a także sam DNA [1].

Modyfikacje (głównie acetylacja i fosforylacja) nie tylko histonów rdzeniowych, ale również histonu H1 oraz białek niehistonowych mogą czynić fragmenty genomu komórek bardziej dostępnymi procesowi transkrypcji.

### 1. ACETYLACJA

Już w 1964 r. Allfrey [2] doniósł, że histony aktywnej transkrypcyjnie chromatyny włączają ( $^3\text{H}$ )-octan 4-6 razy intensywniej niż histony heterochromatyny. Zmiana struktury rdzenia nukleosomalnego po hiperacetylacji histonów wywołuje 2-10-krotny wzrost degradacji DNA przez DNA-azę I (53, 75, 76, 85). W chromatynie drożdży, którą cechuje niezwykle wysoka aktywność matrycowa (przynajmniej 40% chromatyny występuje w postaci aktywnej transkrypcyjnie), jest obecne około 63% zacetylowanych form (di-, tri-, tetra-) histonu H4 [29].

W przypadku dojrzałej spermy *Arbacia lixula* [87] czy mikrojądra *Tetrahymena pyriformis* [35], gdzie nie zachodzi biosynteza RNA, histony występują tylko w formie nieacetylowanej. Podczas dojrzewania erytrocytów ptaków, postępującej kondensacji kompleksu chromatynowego towarzyszy spadek szybkości i stopnia acetylacji histonów H2B, H3 i H4 [72].



Dotychczas przedstawiono wiele dowodów na to, że aktywna transkrypcyjnie chromatyna, podatna na atak nukleaz tkanek prawidłowych i nowotworowych, zawiera histony o znacznie wyższym stopniu acetylacji w porównaniu z częścią transkrypcyjnie nieaktywną [26, 27, 42, 54, 85].

Histony są modyfikowane poprzez acetylację dwoma sposobami. Jeden z nich jest związany ze stałą acetylacją grupy aminowej N-końcowej seryny w histonach H1, H2A i H4 (z nieznacznym obrotem grupy acetylowej). Drugi obejmuje enzymatyczne przeniesienie reszt acetylowych (wysoki obrót grupy acetylowej) z acetylo-CoA na  $\epsilon$ -aminową grupę lizyny wszystkich histonów rdzeniowych [3]. Acetylacja zubożnia dodatni ładunek cząsteczek lizyny w łańcuchach histonów i może prowadzić do zmniejszenia elektrostatycznych oddziaływań z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA [4]. Zlokalizowanie miejsc acetylacji w obrębie zasadowej części łańcuchów histonowych, a także odwracalność procesu acetylacji *in vivo* sugeruje, że ta modyfikacja może odgrywać istotną rolę w modulacji interakcji DNA-histony. Pełen potencjał acetylacji histonów nie jest wykorzystywany, tzn. tylko część reszt lizynowych jest modyfikowana w zależności od lokalnego „wyrównowazenia” aktywności acetylazy i deacetylazy. Taka sytuacja sprzyja wewnętrznej niejednorodności histonów, np. w histonach H3 i H4 może występować 1, 2 bądź 3 i 4 (hiperacetylacja) reszty acetylolizyny, bądź w ogóle histony te nie ulegają acetylacji. Różny stopień zubożenia ładunków dodatnich przez acetylację reszt lizyny w obrębie cząsteczek histonów powoduje ich odmienne zachowanie się podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym lub w toku chromatografii jonowymiennej [26, 87, 92].

Fracjonowanie jąder komórkowych różnych tkanek za pomocą nukleaz dostarczyło rezultatów świadczących o tym, że aktywna transkrypcyjnie chromatyna cechuje się obecnością multiacetylowanych form histonu H4 [26], histonów H3 i H4 [76, 85]. Wyższy stopień acetylacji, a właściwie hiperacetylacji histonów udaje się łatwo obserwować w autoradioelektroferogramach tych białek, jeśli ich izolowanie przebiegało w obecności maślanu sodu [17, 19, 54, 70, 86] — inhibitora deacetylazy. Histony wyodrębnione z nukleazowrażliwej chromatyny „1SF” komórek wątrobiaka HTC, znakowanych *in vivo* ( $^3\text{H}$ )-octanem, wykazują wyższą specyficzną aktywność (1,2-1,6 razy) niż analogiczne białka frakcji nieaktywnej, tzw. „2SF”. Stopień włączania radioaktywnego octanu w obecności maślanu (0-1 godz.) rośnie w histonie H4 około 40%. Nelson i wsp. [54] opublikowali wyniki świadczące, że ilość nukleosomalnej frakcji „1SF” uwalnianej przez mikrokokalną nukleazę z komórek traktowanych maślanem sodu (6 mM) pozostaje w ścisłej korelacji z czasem ekspozycji hodowli na ten inhibitor. Jądra komórkowe komórek HTC, po ich uprzed-



niej inkubacji z maślanem w czasie 0,4 i 14 godz., poddane trawieniu nukleazą (0,5 jedn./50  $\mu$ g DNA, 10 min) uwalniają odpowiednio 6, 12 i 17% frakcji nukleosomalnej. Wydłużona ekspozycja komórek HTC na działanie maślanu powoduje, że większa część histonów ulega hiperacetylacji. Szybki obrót grup acetylowych przez enzymatyczną acetylację i deacetylację jest chyba istotnym czynnikiem warunkującym lokalne zmiany konformacyjne fragmentów chromatyny.

Transkrypcyjnie nieaktywna chromatyna komórek guza Ehrlicha myszy, zawierająca satelitarny DNA (wyodrębniona po trawieniu restrykcyjną nukleazą Bsp i rozfrakcjonowana na Bio-Gel A 50 m), wykazuje znikomą ilość hiperacetylowanych histonów [60].

Sygnalne informacje o roli hiperacetylowanych histonów w procesie dojrzewania gruczołów jądrowych pstrąga w późniejszej zamianie histonów na protaminy w spermatydach wymagają dalszych wyjaśnień [22].

Wiele kontrowersji wobec dotychczas przedstawionych prac na temat korelacji podwyższonej acetylacji histonów i wzmożonej aktywności genowej chromatyny wniosły ostatnie wyniki Yukioka i wsp. [94]. Badacze japońscy nie znaleźli istotnych różnic w stopniu acetylacji histonów uwolnionej przez mikrokokalną nukleazę chromatyny wątroby szczura wzbogaconej w RNA polimerazę II (tzw. chromatin-RNA polymerase II complex) oraz niefrakcjonowanej chromatyny. Ich zdaniem acetylacja histonów nie odgrywa prawdopodobnie bezpośredniej roli w ułatwieniu transkrypcji chromatyny. W tym miejscu należy zacytować wypowiedź Tsaneva [84], że acetylacja histonów nie wydaje się czynnikiem dostatecznym w utrzymaniu aktywnej konformacji chromatyny.

Również McGhee i wsp. [47] pomimo obserwacji, że acetylowana chromatyna komórek HeLa wykazuje nieco mniej skondensowaną strukturę niż jej odpowiednik nieacetylowany, wnioskują, że hiperacetylacja histonów nie jest czynnikiem zapobiegającym tworzeniu się struktury solenoidowej chromatyny.

Zgodnie z wynikami przedstawionymi przez Hallecka i Gurley'a [36], stopień acetylacji zależy od metody ich ekstrakcji.

Acetylacja histonów może prowadzić do destabilizacji struktury aktywnej chromatyny, a wraz z brakiem histonu H1 może ujawniać w niej miejsca wiązania dla białek HMG-14 i HMG-17 oraz polimerazy RNA. In vitro zarówno acetylowane, jak i kontrolne nukleosomy komórek HeLa mają dwa miejsca wiązania dla białek HMG-14/HMG-17 [93]. Ponieważ udział białek HMG-14 i HMG-17 wydaje się dostatecznie udowodniony w utrzymywaniu aktywnej struktury chromatyny rozpoznawanej przez DNA-azę I, jest więc uzasadnione poszukiwanie związku między obecnością tych białek a stopniem acetylacji histonów w aktywnych nukleosomach. Pierwsze doświadczenia wykazały, że trawienie DNA-



-azą I jąder komórek erytroleukemicznych Frienda uwalnia do supernatantu czynniki będące inhibitorami deacetylazy histonowej [66]. Próby ich identyfikacji na podstawie rozpuszczalności w 10-procentowym roztworze TCA, analizy w żelu poliakryloamidowym oraz składu aminokwasowego pozwoliły stwierdzić w supernatancie obecność białek HMG-14 i HMG-17. Reeves i Candido [67] zaobserwowali, że obydwie te białka razem bądź oddzielnie mogą *in vitro* częściowo hamować aktywność deacetylazy histonowej. Białka HMG-1, HMG-2, histon H1, białko H6 czy polilizyna nie okazywały inhibitorowego wpływu na aktywność deacetylazy. Trawienie za pomocą trypsyny mieszaniny białek HMG-14 i HMG-17 przed wprowadzeniem do układu analizującego aktywność deacetylazy znosi praktycznie zupełnie ich inhibitorowe działanie. Gotowanie mieszaniny białek HMG-14 i HMG-17 nie wpływa na ich inhibitorowe właściwości w stosunku do deacetylazy. Hamowanie (do 46%) deacetylazy histonowej przez egzogenne niskocząsteczkowe białka HMG miało również miejsce w przypadku jąder komórkowych, pochodzących z komórek leukemicznych, znakowanych *in vivo* ( $^3\text{H}$ )-octanem (w celu wykluczenia niespecyficznego interakcji znakowanych ( $^3\text{H}$ )-octanem histonów z chromatyną). Deacetylazy są bardzo aktywne w transkrypcyjnie nieaktywnej chromatynie, w której znajdują się głównie histony nieacetylowane [37]. Ciekawa wydaje się hipoteza, że asocjacja białek HMG-14 i HMG-17 z deacetylazą zmniejsza jej aktywność w aktywnej chromatynie, obecne zaś w niej histony osiągają wysoki stopień acetylacji [67]. Hamowanie deacetylacji wydaje się uzależnione od typu białka HMG, jego stężenia oraz źródła enzymu [3]. Uwalnianie ( $^3\text{H}$ )-octanu z histonu H4 grasicy cielęcia w obecności homologicznego białka HMG-14 jest hamowane w około 60%, podczas gdy białko HMG-17 tej tkanki nie wpływa na stopień deacetylacji. Podobne wyniki otrzymano z HMG-14 i HMG-17 erytrocytów kaczki. Z kolei aktywność deacetylazy histonowej erytrocytów kaczki jest represowana przez białko HMG-17 homologiczne i grasicy cielęcia w około 35-40%, przez homologiczne zaś białko HMG-14 w 60% [3].

Poszukiwanie inhibitora deacetylazy histonowej w gruczole jądrowym koguta zakończyło się niepowodzeniem [48]. Ekstrakcja 0,35 M roztworem NaCl frakcji uwolnionej przez DNA-azę I z jąder komórkowych tej tkanki i następcza filtracja otrzymanego ekstraktu w żelu Sepharose 6B pozwoliły natomiast wykryć niskocząsteczkowy komponent stymulujący aktywność deacetylazy *in vitro*. Składnik ten o m.c. około 9000 okazał się termostabilny, odporny na działanie proteaz, a jego skład aminokwasowy przypominał ubikwitynę. Wolna ubikwityna, wyodrębniona z gruczolu jądrowego koguta, stymuluje również aktywność deacetylazy *in vitro*. Wiadomo, że ubikwityna występuje w chromatynie



w dwóch formach: związana kowalencyjnie z histonem H2A (lub H2B) i w stanie wolnym. Wolna ubikwityna jest zlokalizowana we fragmentach aktywnej genetycznie chromatyny [10, 34]. Mezquita i wsp. [48] rozważają możliwość, że ubikwityna *in vivo* może stymulować deacetylację histonów, podobnie jak w eksperymentach *in vitro*, i być odpowiedzialna za wysoki obrót grup acetylowych histonów rdzeniowych niewielkiej (10-15%) części nukleosomów. Większość acetylowanych histonów (40% histonów H3 i H4) podlega deacetylacji z szybkością mniejszą około 10 razy [24].

Białka HMG, podobnie jak histony, ulegają acetylacji. Miejsca acetylacji w białkach HMG znajdują się w zasadowym N-końcowym odcinku łańcuchów, gdzie jednocześnie są najbardziej prawdopodobne miejsca wiązania z DNA [78-80]. Białka HMG-1 i HMG-2 grasicy cielęcia i erytrocytów kaczki zawierają 2-3% acetylowanej lizyny [78]. W białku HMG-1 lizyna w pozycji 2 i 11 ulega acetylacji.

Analiza włączania (<sup>3</sup>H)-octanu bez maślanu sodu w białka HMG-14 i HMG-17 erytrocytów kaczki wskazała na jedno miejsce acetylacji w obydwu białkach, tj. lizynę w pozycji 2 N-końcowej części łańcucha. Natomiast obecność inhibitora deacetylazy, tzn. maślanu o stężeniu 10 mM, ujawniła dodatkowe miejsca acetylacji, tj. lizynę w pozycji 4 w białku HMG-14 oraz w pozycjach 4 i 10 w białku HMG-17 [80]. Odmienność wzorów acetylacji białek HMG-14 i HMG-17, istotnych dla podtrzymania wrażliwości chromatyny na DNA-azę I, w obecności i bez inhibitora deacetylazy zwraca uwagę na łatwość ich enzymatycznej deacetylacji. Sterner i wsp. [79] uważają, że deacetylacja białek HMG i histonów (np. histonu H4) zachodzi przy udziale tego samego enzymu. Usytuowanie miejsc acetylacji w białkach HMG, podobnie jak w histonach rdzeniowych, w N-końcowej części ich cząsteczki sugeruje, że acetylacja i deacetylacja tych białek odgrywają rolę w interakcjach HMG-DNA. W związku z tym, że acetylacja białek niehistonowych jest bardzo mało poznana, nie można wykluczyć możliwości, że ta modyfikacja wpływa na wewnętrzną strukturę cząsteczek HMG przez osłabienie oddziaływań między zasadowymi i kwasowymi regionami samej cząsteczki bądź pary cząsteczek HMG [5].

## 2. FOSFORYLACJA

Fosforylacja histonów i białek niehistonowych jest typem modyfikacji, która może również zmieniać ich oddziaływanie z DNA w kompleksie chromatynowym [5, 7, 84, 89]. Według Tsaneva [84] na regulację aktywności genów wpływa w znacznym stopniu fosforylacja histonów H1 (seryna w pozycji 37) oraz H2A. Fosforylacja histonu H1 zmniejsza jego powinowactwo do DNA [31].



Fosforylacja histonu H1 wydaje się czynnikiem warunkującym rozmiary włókien chromatyny i jej dostępność dla nukleaz. Aktywne nukleosomy regenerującej wątroby zawierają niewielką ilość histonu H1, ale o wysokim stopniu włączanego radioaktywnego fosforu [41]. Wysokie piętno  $^{32}\text{P}$  było również wykrywane w histonie H2A opisywanych nukleosomów.

Paulson i Taylor [61, 83] zwracają uwagę na trudny do wytłumaczenia fakt intensywnej fosforylacji histonów H1 (Ser-38) i H3 (Ser-10) oraz białka HMG-14 przez endogenną kinazę metafazowych chromosomów komórek HeLa. Wysoki stopień fosforylacji tych białek, którego rolę wiąże się ze strukturalnymi zmianami w aktywnej chromatynie, zdaniem cytowanych badaczy może stanowić wyłącznik procesu transkrypcji podczas mitozy.

Saffer i Glazer [73, 74] badali poziom fosforylacji białek HMG ekstrahowanych 2-procentowym roztworem TCA z jąder komórkowych kilku tkanek nowotworowych. Autoradiograficzna identyfikacja rozdzielonych elektroforetycznych białek HMG, pozwoliła odnaleźć piętno  $^{32}\text{P}$  związane wyłącznie z białkami HMG-14 i HMG-17. Stopień włączania izotopu w te białka był zbliżony do obserwowanego w histonie H1. Białka HMG-1 i HMG-2 w tych warunkach nie ulegały fosforylacji. W toku dalszych eksperymentów [74] otrzymano wyniki przemawiające za tym, że fosforylacja białek HMG-14 i HMG-17 pozostaje skorelowana ze wzrostem komórek, ale nie wykazuje związku z syntezą DNA. Inkorporacja radioaktywnego fosforu w białka HMG-14 i HMG-17 komórek nowotworowych HT-29 i L1210 była wyższa około 60% w logarytmicznej fazie wzrostu komórek w porównaniu z fazą plateau, natomiast utrzymywała się na stałym poziomie w komórkach zsynchronizowanych. Maślan sodu (7,5 mM) obniża o 30-35% fosforylację niskocząsteczkowych białek HMG a także ich biosyntezę. Łagodne trawienie mikrokokalną nukleazą jąder komórkowych guza Ehrlicha (3% uwolnionego DNA) prowadzi do pojawienia się w nukleazowrażliwej frakcji chromatyny znacznych ilości białek HMG-14 i HMG-17 znakowanych  $^{32}\text{P}$ .

Arfmann i wsp. [8] udowodnili, że wszystkie cztery grupy białek HMG erytrocytów kurzczenia mogą być substratami dla jądrowej i cytoplazmatycznej kinazy proteinowej. Jednakże ilość włączonego izotopu fosforu w te białka jest odmienna dla obydwu kinaz. Kinaza cytoplazmatyczna fosforyluje w rozległym stopniu białka HMG-1 i HMG-2, podczas gdy enzym jądrowy cechuje wysokie powinowactwo z białkiem HMG-17. Z porównawczych badań fosforylacji białek HMG interfazowych i metafazowych komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) wynika, że białko HMG-17 jest głównym akceptorem grup fosforanowych w komórkach interfazowych. Przejście komórek w stan mitozy powoduje obniżenie



fosforylacji białka HMG-17 do połowy wartości obserwowanej w interfazie, natomiast włączanie  $^{32}\text{P}$  w inne białka HMG w metafazie wzrasta.

W zsynchronizowanych komórkach HeLa fosforylacja białka HMG-14 była 7-krotnie wyższa w fazie  $G_2$  niż  $G_1$ , włączanie zaś radioaktywnego fosforanu w białko HMG-17 było najwyższe w fazie S [15]. Fosforylacja białka HMG-14 może mieć istotne znaczenie dla wydarzeń, które następują po fazie  $G_2$ , tj. w kondensacji chromatyny. Białka HMG-1 i HMG-2 komórek HeLa nie ulegają fosforylacji.

Porównawcze wyniki fosforylacji histonów rdzeniowych grasicy cielęcia (bez DNA) oraz histonów w chromatynie przez cAMP-zależną kinazę dokumentują istotę konformacji chromatyny dla modyfikacji jej składników [83]. Izotop fosforu jest głównie włączany w histon H2B (Ser 32 i Ser 36), a w mniejszym stopniu w histony H3 (Ser 10) i H4 (prawdopodobnie Ser 47), wolnych od DNA histonów rdzeniowych. Fosforylacja histonów kompleksu chromatynowego (czy nukleosomu) dotyczy histonów H3 (Ser 10) oraz H1 (Ser 38).

W 1983 r. podano lokalizację miejsca fosforylacji białka HMG-14 grasicy cielęcia przez cGMP-zależną kinazę płuc wołu [59]. Jest nim reszta seryny w pozycji 6 (i być może w pozycji 7) N-końcowego fragmentu łańcucha tego białka.

Sporo dyskusji wniosły ostatnio [25, 74] rezultaty Levy-Wilsona [44], który doniósł, że działanie maślanu sodu jest powodem wzmożonej hiperacetylacji histonów oraz podwyższonej wrażliwości na DNA-azę I chromatyny komórek HeLa, a także wpływa na hiperfosforylację białek HMG-14 i HMG-17 tych komórek. W sprzeczności z tym pozostają nieco później opublikowane wyniki Saffera i Glazera [74]. Badacze ci zakomunikowali, że maślan sodu powoduje około 70 i 90% spadek fosforylacji białek HMG-14, HMG-17 oraz histonu H1 komórek guza Ehrlicha, natomiast obniżenie stopnia fosforylacji odpowiednio 30-35 i 50% w przypadku HMG-17 i HMG-14 oraz histonu H1 komórek HT-29.

Fosforylacja białek chromatyny wpływa na rozluźnienie ich oddziaływań z DNA, a także może prowadzić do osłabienia interakcji między ufosforylowanymi histonami, co może być istotnym czynnikiem w „otwarceniu” nukleosomów podczas transkrypcji.

### 3. ADP-RYBOZYLACJA

Niewiele jest danych dotyczących innych modyfikacji białek chromatyny, tj. ADP-rybozylacji, metylacji i glikozylacji oraz ich udziału w utrzymaniu aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Chromosomalny enzym poli(ADP-rybozo)polimeraza z substratu  $\beta\text{-NAD}^+$  uwalnia amid



nikotynowy i katalizuje transfer reszt 2'(5" fosforybozo)5"AMP na miejsca akceptorowe (głównie  $\gamma$ -karboksylowa grupa kwasu glutaminowego) białek jądrowych zwierząt i roślin [45, 62, 63, 90]. Histon H1 jest głównym *in vitro* i *in vivo* akceptorem ADP-rybozy [63, 91], chociaż ta modyfikacja dotyczy również histonów rdzeniowych (w największym stopniu H2B) [32] oraz wielu białek niehistonowych, głównie z grupy HMG oraz białka A24 [9, 32, 58, 62]. Enzym przenoszący ADP-rybozę jest zlokalizowany w łącznikowych fragmentach chromatyny [33, 51]. Rozdział aktywności (ADP-rybozo)polimerazy między aktywną i inertną transkrypcyjnie chromatynę jest odmienny. Jego aktywność jest niska w nieaktywnej transkrypcyjnie chromatynie komórek HeLa [51]. Levy-Wilson [43] stwierdził, że aktywność poli(ADP-rybozo)polimerazy jest związana głównie z nukleazowrażliwą chromatyną gruczołów jądrowych pstrąga, w której białka H6 i HMG-T ulegają selektywnej ADP-rybozylacji. Wzrost stężenia NAD powoduje, że polimer ADP-rybozy, kowalencyjnie włączany w cząsteczkę białkową, może osiągać znaczną długość [45, 62]. Wykrycie łańcucha homopolimeru ADP-rybozy o długości 15-16 jednostek, połączonego krzyżowo z dwiema cząsteczkami histonu H1, może mieć znaczenie w utrzymaniu zmienionej struktury chromatyny [9, 20, 28]. Reakcja ADP-rybozylacji histonu H1 pozwala na jego kowalencyjne wiązanie zarówno z sąsiadującymi nukleosomami, jak i innymi cząsteczkami histonu H1. Dimer cząsteczek histonu H1 może podlegać przejściowej ADP-rybozylacji, powodując lokalną kondensację bądź de-kondensację fragmentów chromatyny w zależności od ich biologicznej aktywności [20, 63].

Najwyższa endogenna aktywność poli(ADP-rybozo)polimerazy w chromatynie trzustki szczura jest związana głównie z odcinkami chromatyny odpowiadającym okresowi identyczności 4-5 nukleosomów [9]. Porównanie stopnia ADP-rybozylacji w zależności od złożoności architektury chromatyny, oparte na analizie autoradiogramów histonów izolowanych z fragmentów chromatyny o okresie identyczności 1-14 nukleosomów inkubowanych z ( $^{32}\text{P}$ )-NAD, udowodniło, że ta kowalencyjna modyfikacja przebiega wyłącznie z cząsteczkami histonu H1. Histony rdzeniowe i ich warianty nie ulegają ADP-rybozylacji.

Oczyszczona poli(ADP-rybozo)polimeraza grasicy cielęcia jest zdolna modyfikować histony H1, H5 oraz białka HMG erytrocytów kurczęcia [62]. Wydłużona inkubacja histonu H1 z enzymem i znakowanym NAD (30 min) prowadzi do powstania zmodyfikowanych, wolnowędrujących form histonu H1. Modyfikacja ta jest uzależniona od stężenia NAD. Pojawienie się licznych pochodnych histonu H1 po ADP-rybozylacji, w obecności wysokich stężeń NAD, może wynikać ze znacznej długości łańcucha ADP-rybozy (który może być liniowy lub rozgałęziony) przyłączonego



do białka, występowania licznych miejsc znakowania w białku bądź agregacji cząsteczek ADP-rybozylowanego histonu H1. Włączanie ADP-rybozy w cząsteczkę histonu H5 zachodzi w niewielkim stopniu i wymaga wysokiego stężenia NAD. Egzogenny enzym katalizuje tworzenie połączeń ADP-rybozy z białkami HMG-1 i HMG-2 intensywniej niż w przypadku białek HMG-14 i HMG-17. Na poziomie nukleosomu czy chromatyny tworzenie kompleksów ADP-rybozylowanych białek może być zależne od lokalnego stężenia NAD, dostępności (ADP-rybozo)polimerazy i samych białek. Poirier i wsp. [63] wyrażają opinię, że ADP-rybozylacja białek chromatyny może ułatwiać transkrypcję, zapobiegając tworzeniu struktury chromatyny o wyższej rzędowości.

Tanuma i Johnson [81] donieśli o ADP-rybozylacji 4 grup białek HMG oraz histonu H1 przez endogenną polimerazę w hodowli komórek C3H nowotworu gruczołu piersiowego myszy. In vivo tylko 0,03% cząsteczek białek HMG zawiera ADP-(rybozo)<sub>n</sub>. Inhibitor (ADP-rybozo)polimerazy, 3-aminobenzydyna obniża aktywność endogennego enzymu w przypadku histonu H1 oraz białek HMG. Jednakże ADP-rybozylacja białek HMG-14 i HMG-17, istotnych dla utrzymania aktywnej formy chromatyny, jest efektywniej zredukowana przez 3-aminobenzydynę.

#### 4. METYLACJA I GLIKOZYLACJA

Metylacja białek chromatyny dotyczy najczęściej modyfikacji reszty lizyny w przypadku histonów H3 i H4, natomiast reszt argininy w białkach HMG [16, 18]. Wprowadzenie reszty metylowej podwyższa dodatni ładunek białek chromatyny.

ADP-rybozylacja białek pozajądrowych może zachodzić na resztach argininy. Dotychczas nie wiadomo, czy mogą być w ten sposób modyfikowane reszty argininy białek jądrowych; cząsteczki argininy w białkach HMG są raczej metylowane. Allfrey [5] sugeruje, że metylacja może blokować modyfikacje innych typów na resztach argininowych.

Dla pełniejszego poznania obrazu architektury aktywnych domen chromatyny przyczynić się mogą rozpoczęte w laboratorium Reevesa [68, 69] prace nad glikozylacją białek HMG-14 i HMG-17 komórek erytroleukemicznych Frienda i grasicy cielęcia. Kowalencyjne przyłączenie reszt cukrowych do łańcuchów niskocząsteczkowych białek HMG może prowadzić do selektywnej interakcji z matriks jądrową, co może mieć znaczenie w powstawaniu zmian konformacyjnych chromatyny [69]. Trawienie za pomocą glikozydaz ( $\beta$ -galaktozydaza,  $\alpha$ -mannozydaza,  $\beta$ N-acetyloglukozoaminidaza) znakowanych trytem kompleksów białek HMG z matriks jądrową znacznie zmniejsza siłę wiązania białek HMG z tą istotną substrukturą jądra komórkowego.



Rezultaty tych badań wydają się ważne wobec licznych dowodów, że prawie cały nowo utworzony RNA a także nowo replikowany DNA [12, 13] są związane z matriks jądrową. Transkrypcyjnie aktywny gen albuminy jaja kurzego jest również preferencyjnie zasocjowany z matriks jądrową jajowodu kurczęcia, podczas gdy takie wiązanie nie występuje w komórkach wątroby kurczęcia, gdzie gen ten nie jest aktywny [71].

Wiele uwagi [30, 56, 65] skupia się na zależności między metylacją DNA a występowaniem zmodyfikowanych zasad we frakcjach chromatyny, różniących się aktywnością matrycową. Wśród organizmów eukariotycznych, cytozyna wydaje się jedyną zasadą DNA ulegającą metylacji (do 5-metylocytozyny). Sekwencje CpG są głównymi miejscami metylacji. Neveh-Many i Cedar [52] po przebadaniu wielu tkanek zwierzęcych ustalili, że około 70% sekwencji CpG podlega metylacji, podczas gdy 30-40% umetylowanych CpG znajduje się w chromatynie wrażliwej na DNAazę I, a tylko 20-30% sekwencji CpG w DNA, komplementarnym do mRNA, zostaje umetylowana. Metylowany DNA pozostaje selektywnie związany z cząsteczkami rdzeniowymi nukleazoopornej chromatyny [77]. Z kolei najwyższa aktywność DNA metylotransferazy jest związana z łącznikowym DNA skondensowanej chromatyny [30].

Z pracowni Weintrauba [88] pochodzą wyniki oparte na skomplikowanym mapowaniu genów  $\alpha$  globiny kurczęcia, poddanych działaniu endonukleaz Msp i Hpa II, hybrydyzowanych z rekombinantami klonów  $\lambda$ , świadczące o tym, że pewne domeny chromatyny o niewielkim stopniu umetylowania (lub bez 5-metylocytozyny) są jednocześnie aktywnie transkrybowane i wrażliwe na atak DNAazy I, a także są zasocjowane z białkami HMG-14 i HMG-17 oraz polimerazą RNA II. Embrionalny gen  $\beta$  globiny (nie podlegający ekspresji) w dojrzałych erytrocytach kurczęcia zostaje umetylowany, nie wiąże polimerazy RNA II, a ponadto traci nadwrażliwość na DNA-azę I oraz powinowactwo do wiązania białek HMG.

Poznanie mechanizmu zależności między obniżoną metylacją DNA aktywnych domen chromatyny i jego aktywnością matrycową wymaga dalszych doświadczeń. Na obecnym etapie badań trudno ustalić, czy białka HMG rozpoznają nukleosomy zawierające niemetylowany (bądź o niskiej metylacji) DNA, czy też ich obecność zapobiega metylacji.

W świetle przedstawionych danych należałoby oczekiwać, że zahamowanie metylacji DNA powinno uaktywnić represowane geny. W 1981 r. Mohandas i wsp. [49] wykazali, że w hodowli hybryd komórek mysich i ludzkich w środowisku zawierającym 5-azacytydynę (analog cytydyny, który po włączeniu w cząsteczkę DNA nie ulega metylacji z uwagi na zamianę węgla w pozycji 5 pierścienia na azot) następuje reaktywacja nieczynnego chromosomu X.



W transkrypcyjnie aktywnym makrojądrze *Tetrahymena thermophila* znany jest przypadek metylacji adeniny w DNA (do 6-metyloadeniny). Z kolei nieaktywne mikrojądro tego organizmu charakteryzuje obecność tylko 5-metylocytozyny. DNA umetylowany w pozycji 6-adeniny jest selektywnie trawiony przez nukleazy. Wydaje się, że modyfikacje odmiennych zasad DNA, mające miejsce w aktywnym i inertywnym materiale genetycznym *Tetrahymena*, kryją w sobie różnice w stabilności sparowanych zasad [64]. Para 6-metyloadenina — tymina, typowa dla makrojądra ulega łatwiej denaturacji niż jej odpowiednik niemetylowany, podczas gdy 5-metylocytozyna — guanina, charakterystyczna dla nieaktywnego mikrojądra, jest bardziej stabilna niż metylowana para zasad w makrojądrze.

Należy wspomnieć, dla pełniejszego zobrazowania czynników wywołujących relaksację struktury chromatyny, o konsekwencjach przejścia prawoskrętnej formy B-DNA w lewoskrętną z-DNA. Nietrwała postać z-DNA, łatwo konwertująca w formę B, może być stabilizowana przez wiązanie związków zasadowych, takich jak spermina czy spermidyna, oraz przez obecność 5-metylocytozyny [11]. Według Felsenfelda [11, 55], DNA w formie B stabilizuje strukturę nukleosomów, jego przejście zaś w postać z-DNA zapobiega ich tworzeniu. Selektywna demetylacja z-DNA w chromatynie destabilizuje go, prowadząc do napięć, które mogą być przyczyną lokalnego rozwijania podwójnej helisy, produkując odcinki jednoniciowego DNA o wybitnej, nukleazowej wrażliwości [57].

Larsen i Weintraub [40] stwierdzili, że nadwrażliwość na DNA-azę I pewnych aktywnych domen chromatyny erytrocytów kurczęcia jest wynikiem obecności jednołańcuchowych fragmentów DNA, pozbawionych nukleosomów, wykazujących jednocześnie wysoką podatność na atak nukleazy  $S_1$ , preferencyjnie trawiącej jednoniciowy DNA. Na uwagę zasługuje sugestia, że nukleazonadwrażliwe miejsca w chromatynie mogą reprezentować regiony specyficznych interakcji z białkami regulatorowymi. Selektywne wiązanie niektórych białek niehistonowych z jednoniciowym DNA może prowadzić do ich interakcji z aktywnymi nukleosomami [38, 39].

Należy również podkreślić, że DNA aktywnej transkrypcyjnie chromatyny jest bardziej wrażliwy na promieniowanie jonizujące niż DNA niefrakcjonowanej chromatyny bądź satelitarne DNA komórek myszy L929 [21].

#### UWAGI KOŃCOWE

Zaangażowanie licznych czynników w utrzymaniu architektury aktywnej transkrypcyjnie chromatyny, niepełne i często kontrowersyjne wyniki na ten temat wciąż utrudniają sformułowanie precyzyjnych wnio-



sków. Niemniej wydaje się, że postsyntetyczne modyfikacje białek chromatyny oraz różna długość nukleosomalnego DNA są głównym źródłem mikroniejednorodności nukleosomów. Z kolei mikroniejednorodność nukleosomów oraz zdolność do wiązania pewnych białek niehistonowych (np. HMG czy polimerazy RNA) może wpływać na strukturę różnych domen chromatyny, prowadząc do powstawania funkcjonalnie odmiennych stanów chromatyny. Również brak metylacji (bądź tylko nieznaczna metylacja) DNA specyficznych fragmentów genomu może stanowić dodatkowy mechanizm wspomagający utrzymanie konformacji aktywnych fragmentów chromatyny.

Składam najserdeczniejsze podziękowanie prof. dr hab. L. Kłyszewko-Stefanowicz za krytyczne uwagi w czasie pisania tej pracy.

#### LITERATURA

- [1] ALBRIGHT S. C., WISEMAN J. M., LANGE R. A., GARRARD W. T., Subunit structures of different electrophoretic forms of nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **255**: 3673-3684, 1980.
- [2] ALLFREY V. G., Structural modification of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis, *Proc. Can. Cancer Res. Conf.*, **6**: 313-335, 1964.
- [3] ALLFREY V. G., Functional and metabolic aspects of DNA-associated proteins, [w] *Histone and nucleohistones*, red D. P. M. Philips, Plenum Press, London, New York 1977, 241-294.
- [4] ALLFREY V. G., Molecular aspects of the regulation of eukaryotic transcription nucleosomal proteins and their postsynthetic modifications in the control of DNA conformation and template function, [w] *Cell Biology: A comprehensive treatise*, red L. Goldstein, D. M. Prescott, vol. 3, Academic Press, New York 1980, 347-437.
- [5] ALLFREY V. C., Postsynthetic modification, [w] *The HMG chromosomal proteins*, red E. W. Johns, Academic Press, London—Toronto 1982, 123-148.
- [6] ALLIS C. D., GLOVER C., BOWEN J., GOROVSKY M., Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*, *Cell*, **20**: 609-617, 1980.
- [7] ALLIS C. D., GOROVSKY M. A., Histone phosphorylation in macronucleus of *Tetrahymena thermophila*, *Biochemistry*, **20**: 3828-3833, 1981.
- [8] ARFMANN H-A., BAYDOUN H., Preferential phosphorylation of high mobility group protein 17 in vitro by a nuclear protein kinase, *Z. Naturforsch.*, **36c**: 319-322, 1982.
- [9] AUBIN R. J., DAM V. T., MIDETTE J., BROUSSEAU Y., POIRIER G. G., Chromosomal protein poly(ADP-ribosylation) in pancreatic nucleosomes, *Can. J. Biochem.*, **60**: 295-305, 1982.
- [10] BALLAL N. R., KANG Y. J., OLSON M. O., BUSCH H., Changes in nucleolar proteins and their phosphorylation patterns during liver regeneration, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5921-5925, 1975.



- [11] BEHE M., FELSENFELD G., Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m<sup>5</sup>dC) poly(dG-m<sup>5</sup>dC), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 1619-1623, 1981.
- [12] BEREZNEY R., Dynamic properties of the nuclear matrix, [w] *The cell nucleus*, VII, red H. Busch, Academic Press, 1979, 413-456.
- [13] BEREZNEY R., BUCHOLTZ L. A., Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver, *Expl. Cell Res.*, **132**: 1-13, 1981.
- [14] BERKOWITZ E. M., RIGGS E. A., Characterization of rat liver oligonucleosomes enriched in transcriptionally active genes: Evidence for altered base composition and a shortened nucleosome repeat, *Biochemistry*, **20**: 7284-7290, 1981.
- [15] BHORJEE J. S., Differential phosphorylation of nuclear nonhistone high mobility group proteins HMG 14 and HMG 17 during the cell cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6944-6948, 1981.
- [16] BOFFA L. C., KARN J., VIDALI G., ALLFREY V. G., Distribution of NG, NG-dimethylarginine in nuclear protein fractions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**: 969-976, 1977.
- [17] BOFFA L. C., VIDALI G., MANN R. S., ALLFREY V. G., Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate, *J. Biol. Chem.*, **253**: 3364-3366, 1978.
- [18] BOFFA L. C., STERNER R., VIDALI G., ALLFREY V. G., Post-synthetic modifications of nuclear proteins; high mobility group proteins are methylated, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 1322-1327, 1979.
- [19] BOFFA L. C., GRUSS R., ALLFREY V. G., Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function, selective and reversible inhibition of phosphorylation of histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions, *J. Biol. Chem.*, **256**: 9612-9621, 1981.
- [20] BUTT T. R., BROTHERS J. F., GIRI G. P., SMULSON M. E., A nuclear protein-modifying enzyme is responsive to ordered chromatin structure, *Nucl. Acids Res.*, **5**: 2775-2778, 1978.
- [21] CHIU S-M., OLEINICK N. L., FRIEDMAN L. R., STAMBROOK F. J., Hypersensitivity of DNA in transcriptionally active chromatin to ionizing radiation, *Biochim. Biophys. Acta*, **699**: 15-21, 1982.
- [22] CHRISTENSEN M. E., DIXON G. H., Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout, *Develop. Biol.*, **93**: 404-415, 1982.
- [23] COHEN L. H., NEWROCK K. M., ZWEIDLER A., Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin, *Science*, **190**: 994-997, 1979.
- [24] COVAULT J., CHALKLEY R., The identification of distinct populations of acetylated histone, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9110-9116, 1980.
- [25] D'ANNA J. A., TOBEY R. A., GURLEY L. R., Concentration-dependent effects of sodium butyrate in Chinese hamster cells: cell cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation, and induction of an H1 — like protein, *Biochemistry*, **15**: 2656-2671, 1980.
- [26] DAVIE J. R., CANDIDO E. P. M., Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3574-3577, 1978.



- [27] DAVIE J. R., CANDIDO E. P. M., DNase I sensitive chromatin is enriched in the acetylated species of histone H4, *FEBS Lett.*, **110**: 164-168, 1980.
- [28] DAVIE J. R., SAUNDERS C. A., Chemical composition of nucleosomes among domains of calf thymus chromatin differing in micrococcal nuclease accessibility and solubility properties, *J. Biol. Chem.*, **256**: 12574-12580, 1981.
- [29] DAVIE J. R., SAUNDERS C. A., WALSH J. M., WEBER S. C., Histone modifications in the yeast *S. cerevisiae*, *Nucl. Acids Res.*, **9**: 3205-3216, 1981.
- [30] DOERFLER W., DNA methylation and gene activity, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 93-124, 1983.
- [31] FASY T. M., INOUE A., JOHNSON E. M., ALLFREY V. G., Phosphorylation of H1 and H5 histones by cyclic AMP-dependent protein kinase reduces DNA binding, *Biochem. Biophys. Acta*, **564**: 322-331, 1979.
- [32] GIRI C. P., WEST M. H. P., SMULSON M., Nuclear protein modification and chromatin substructure. 1. Differential poly(adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal proteins in nuclei versus isolated nucleosomes, *Biochemistry*, **17**: 3495-3500, 1978.
- [33] GIRI C. P., WEST M. H. P., RAMIREZ M. L., SMULSON M. E., Nuclear protein modification and chromatin substructure. 2. Internucleosomal localization of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase, *Biochemistry*, **17**: 3501-3504, 1978.
- [34] GOLDKNOPF I. L., FRENCH M. F., DASKAL Y., BUSCH H., A reciprocal relationship between contents of free ubiquitin and protein A24, its conjugate with histone 2A in chromatin fractions obtained by the DNase II,  $Mg^{++}$  procedure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 786-793, 1978.
- [35] GOROVSKY M. A., PLEGER G. L., KEEVERT J. B., JOHMANN C. A., Studies on histone fraction H2A<sub>1</sub> in macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **57**: 773-781, 1973.
- [36] HALLECK M. S., GURLEY L. R., Histone acetylation and heterochromatin content of cultured *Peromyscus* cells, *Exptl. Cell Res.*, **132**: 201-213, 1981.
- [37] HAY C. W., CANDIDO E. P. M., Histone deacetylase, *J. Biol. Chem.*, **258**: 3726-3734, 1983.
- [38] 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.
- [39] ISACKSON P. J., REECK G. R., Nonhistone chromatin proteins HMG-14 and HMG-17 bind preferentially to single-stranded DNA, *Nucl. Acids Res.*, **9**: 3779-3791, 1981.
- [40] LARSEN A., WEINTRAUB H., An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin, *Cell*, **29**: 609-622, 1982.
- [41] LETNANSKY K., Nuclear proteins in genetically active and inactive parts of chromatin, *FEBS Lett.*, **89**: 93-97, 1978.
- [42] LEVY-WILSON B., WATSON D. C., DIXON G. H., Multiacetylated forms of H4 are found in a putative transcriptionally competent chromatin fraction from trout testis, *Nucl. Acids Res.*, **6**: 259-274, 1979.
- [43] LEVY-WILSON B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **208**: 528-534, 1981, cyt. wg poz. 5.
- [44] LEVY-WILSON B., Enhanced phosphorylation of high-mobility-group proteins in nuclease-sensitive mononucleosomes from butyrate-treated HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2189-2193, 1981.



- [45] LIPMANN F., HILZ H., ADP-ribosylation of proteins — a multifunctional process, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**: 1415-1425, 1982.
- [46] LOHR D., CORDEN J., TATCHELL K., KOVACIC R. T., van HOLDE K. E., Comparative subunit structure of HeLa, yeast, and chicken erythrocyte chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 79-83, 1977.
- [47] MCGHEE J. D., NICKOL J. M., FELSENFELD G., RAU D. C., Histone hyperacetylation has little effect on the higher order folding of chromatin, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 4065-4075, 1983.
- [48] MEZQUITA J., CHIVA M., VIDAL S., MEZQUITA C., Effect of high mobility group nonhistone proteins HMG-20 (ubiquitin) and HMG-17 on histone deacetylase activity assayed in vitro, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 1781-1797, 1982.
- [49] MOHANDAS T., SPARKES E. S., SHAPIRO L. J., *Nature*, **211**: 393-396, 1981. cyt. wg poz. 89.
- [50] MORRIS N. R., A comparison of the structure of chicken erythrocyte and chicken liver chromatin, *Cell*, **9**: 627-632, 1976.
- [51] MULLINS D. W., GIRI C. P., SMULSON M. E., Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase: The distribution of a chromosome-associated enzyme within the chromatin substructure, *Biochemistry*, **16**: 505-513, 1977.
- [52] NAVEH-MANY T., CEDAR H., Active gene sequences are undermethylated, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 4246-4250, 1981.
- [53] NELSON D. A., PERRY W. M., CHALKLEY R., Sensitivity of regions of chromatin containing hyperacetylated histones to DNase I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**: 356-363, 1978.
- [54] NELSON D., COVAULT J., CHALKLEY R., Segregation of rapidly acetylated histones into a chromatin fraction released from intact nuclei by the action of micrococcal nuclease, *Nucl. Acids Res.*, **8**: 1745-1763, 1980.
- [55] NICKOL J., BEHE M., Felsefeld G., Effect of the B-Z transition on poly(dG-m<sup>5</sup>dC) poly(dG-m<sup>5</sup>dC) on nucleosome formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 1771-1775, 1982.
- [56] NISHIO A., UYEKI E. M., Nuclease-sensitivity of methylated DNA as a probe for chromatin reconstitution by genotoxicants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**: 485-491, 1982.
- [57] NORDHEIM A., PARDUE M. L., LAFER E. M., MÖLLER A., STOLLAR B. D., RICH A., Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes, *Nature*, **244**: 417-422, 1981.
- [58] OKAYAMA H., HAYAISHI O., ADP-ribosylation of nuclear protein A24, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 755-762, 1978.
- [59] PALVIMO J., LINNALA-KANKKUNEN A., MÄENPÄÄ P. H., Differential phosphorylation of high mobility group protein HMG 14 from calf thymus and avian erythrocytes by cyclic GMP-dependent protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**: 378-382, 1983.
- [60] PASHEV I. G., DIMITROV S. I., IVANOV I. G., MARKOV G. G., Histone acetylation in chromatin containing mouse satellite DNA, *Eur. J. Biochem.*, **133**: 379-382, 1983.
- [61] PAULSON J. R., TAYLOR S. S., Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes, *J. Biol. Chem.*, **257**: 6064-6072, 1982.
- [62] POIRIER G. G., NIEDERGANG C., CHAMPAGNE M., MAZEN A., MANDEL P., Adenosine diphosphate ribosylation of chicken-erythrocyte histone H1,



- H5 and high-mobility-group proteins by purified calf-thymus poly(adenosinediphosphate-ribose) polymerase, *Eur. J. Biochem.*, **127**: 437-442, 1982.
- [63] POIRIER G. G., De MURCIA G., JONGSTRA-BILEN J., NIEDERGANG C., MANDEL P., Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 3423-3427, 1982.
- [64] PRATT K., HATTMAN S., Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in *Tetrahymena thermophila*, *Molec. Cell Biol.*, **1**: 600-608, 1981.
- [65] RAZIN A., RIGGS A. D., DNA methylation and gene function, *Science*, **210**: 604-610, 1980.
- [66] REEVES R., CANDIDO E. P. M., Effects of DNAase I on histone acetyltransferase and deacetylase activities in Friend cell nuclei, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 571-579, 1979.
- [67] REEVES R., CANDIDO E. P. M., Partial inhibition of histone deacetylase in active chromatin by HMG-14 and HMG-17, *Nucl. Acids Res.*, **8**: 1947-1963, 1980.
- [68] REEVES R., CHANG D., CHUNG C. S., Carbohydrate modifications of the high mobility group proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6704-6708, 1981.
- [69] REEVES R., CHANG D., Investigation of the possible functions for glycosylation in the high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **258**: 679-687, 1983.
- [70] RIGGS M. G., WHITTAKER R. G., NEWMANN J. R., INGRAM V. M., n-butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukemia cells, *Nature*, **268**: 462-464, 1977.
- [71] ROBINSON S. I., NELKIN B. D., VOGELSTEIN B., The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct Cells, *Cell*, **28**: 99-106, 1982.
- [72] RUIZ-CARRILLO A., WANGH L. J., ALLFREY V. G., Selective synthesis and modification of nuclear proteins during maturation of avian erythroid cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**: 273-290, 1976.
- [73] SAFFER J. D., GLAZER R., The phosphorylation of high mobility group proteins 14 and 17 from Ehrlich ascites and L1210 in vitro, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **93**: 1280-1285, 1980.
- [74] SAFFER J. D., GLAZER R. I., The phosphorylation of high mobility group proteins 14 and 17 and their distribution in chromatin, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4655-4660, 1982.
- [75] SHEWMAKER C. K., COHEN B. N., WAGNER T. E., Chemically induced gene activation: Selective increase in DNase I susceptibility in chromatin acetylated with acetyl adenylate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 342-349, 1978.
- [76] SIMPSON R. T., Structure of chromatin containing extensively acetylated H3 and H4, *Cell*, **13**: 691-699, 1978.
- [77] SOLOGE A., CEDAR H., Organization of 5-methylcytosine in chromosomal DNA, *Biochemistry*, **17**: 2934-2938, 1978.
- [78] STERNER R., VIDALI G., HEINRIKSON R. L., ALLFREY V. G., Postsynthetic modification of high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **253**: 7601-7604, 1978.
- [79] STERNER R., VIDALI G., ALLFREY V. G., Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **254**: 11577-11583, 1979.



- [80] STERNER R., VIDALI G., ALLFREY V. G., Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **256**: 8892-8895, 1981.
- [81] TANUMA S., JOHNSON G. S., ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells, *J. Biol. Chem.*, **258**: 4067-4670, 1983.
- [82] TATA J. R., BAKER B., Enzymatic fractionation of nuclei polynucleosomes and RNA polymerase II as endogenous transcriptional complexes. *J. Mol. Biol.*, **118**: 249-272, 1978.
- [83] TAYLOR S. S., The in vitro phosphorylation of chromatin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **257**: 6056-6063, 1982.
- [84] TSANEV R., Transcriptionally active chromatin, *Molec. Biol. Rep.*, **9**: 9-17, 1983.
- [85] VIDALI G., BOFFA L. C., BRADBURY E. M., ALLFREY V. G., Butyrate suppression of histone deacetylation leads to an accumulation of multi-acetylated forms of histone H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2239-2243, 1978.
- [86] VIDALI G., BOFFA L. C., MANN R. S., ALLFREY V. G., Reversible effects of Na-butyrate on histone acetylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**: 223-227, 1978.
- [87] WANGH L. J., RUIZ-CARRILLO A., ALLFREY V. G., Separation and analysis of histone subfractions differing in their degree of acetylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**: 44-56, 1972.
- [88] WEISBROD S., WEINTRAUB H., Isolation of actively transcribed nucleosomes using immobilized HMG 14 and 17 and an analysis of  $\alpha$ -globin chromatin, *Cell*, **23**: 391-400, 1981.
- [89] WEISBROD S., Active chromatin, *Nature*, **297**: 289-295, 1982.
- [90] WILLMITZER L., Demonstration of in vitro covalent modification of chromosomal proteins by poly(ADP)ribosylation in plant nuclei, *FEBS Lett.*, **108**: 13-16, 1979.
- [91] WONG M., MALIK N., SMULSON M., The participation of poly(ADP-ribosyl)ated histone H1 in oligonucleosomal condensation, *Eur. J. Biochem.*, **128**: 209-213, 1982.
- [92] WOUTERS-TYROU D., MARTIN-PONTHIEU A., SAUTIÈRE P., BISERTE G., Acetylation of histone H4 in chicken erythrocyte and cuttle-fish testis chromatin, *FEBS Lett.*, **128**: 195-200, 1981.
- [93] YAU P., IMAI B. S., THORNE A. W., GOODWIN G. H., BRADBURY E. M., Effect of HMG protein 17 on the thermal stability of control and acetylated HeLa oligonucleosomes, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 2651-2664, 1983.
- [94] YUKIOKA M., SASAKI S., HENMI S., MATSUO M., HATAYAMA T., INOUE A., Transcribing chromatin is not preferentially enriched with acetylated histones, *FEBS Lett.*, **158**: 281-284, 1983.

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

*Otrzymano: 10 lipca 1984.*

*Przyjęto: 24 lipca 1984.*



## PRZYPUSZCZALNE MECHANIZMY DZIAŁANIA NIEKTÓRYCH PRODUKTÓW WIRUSOWYCH GENÓW „ONC”

THE CONJECTURAL MECHANISMS OF ACTING SOME PRODUCTS OF VIRAL  
GENES „ONC”

Zofia Monika RUPNIEWSKA

*Streszczenie.* Dzięki badaniom renowirusów i wykorzystaniu metod transfekcji wykryto dotychczas około 24 protoonkogenów komórkowych. Tworzą one strukturalnie i czynnościowo heterogenną grupę. Obecnie sugeruje się, że wiele wirusowych onkogenów pochodzi z prawidłowych genów komórkowych, które regulują podziały i różnicowanie komórek. Dotyczy to zwłaszcza genów dla czynników wzrostu lub ich receptorów.

*Summary.* Two dozen cellular proto-oncogenes have been described to date through the study of retroviruses and the use of gene transfer. They form a structurally and functionally heterogeneous group. For some time, there was speculation that many viral oncogenes are derived from normal cellular genes that regulate cellular division and differentiation. These include genes for growth factors or their receptors.

### WSTĘP

Geny *onc* renowirusów, tzw. onkogeny, czy *v-onc* (viral-*onc*) są genami bezpośrednio zapoczątkowującymi i utrzymującymi transformację, ponieważ wszystkie zakażone komórki w ciągu kilku dni ulegają transformacji, a ponadto fenotyp transformowanych komórek zakażonych wirusami, które mają np. wrażliwe na temperaturę *v-onc*, jest także czuły na temperaturę [105, 108]. U zwierząt doświadczalnych transformujące renowirusy po krótkim okresie utajenia wywołują białaczki, chłoniaki i mięsaki [99], stąd ich nazwa wirusów „ostrych” białaczek, chłoniaków i mięsaków. Jako jedni z pierwszych Stehelin i wsp. [98] wykazali, że transformujący gen *src* wirusa mięsaka drobiu Rousa (Rous sarcoma virus, w skrócie RSV) nie jest w istocie genem wirusowym, ale



pochodzi z genomu drobiu. Ten komórkowy gen *onc*, czy *c-onc* (cellular-*onc*), będący być może potencjalnym onkogenem komórkowym — proto-onkogenem, jest prawidłowym genem komórkowym i integralną częścią genomu drobiu. A zatem *v-onc* są, jak się wydaje, autostopowiczami („hitch-hiker”) zabranymi przez wirusa podczas jego podróży przez geny komórki. Retrowirusy umożliwiają więc badania genomu komórkowego na obecność protoonkogenów.

Dzięki nowoczesnym metodom badawczym, takim jak klonowanie molekularne i porównywanie prototypów komórkowych z *v-onc*, stwierdzono odpowiednie homologie, chociaż jest wiele różnic między korespondującymi *c-onc* a *v-onc*. Te ostatnie w większości są hybrydami i stanowią połączenie wirusowego genu, najczęściej genu *gag* (kodującego białka wnętrza wirionu) z *c-onc*. Mają one ogólną strukturę *gag-x*, a definiuje je hybrydowy produkt białkowy [29]. Pierwszy hybrydowy *v-onc* został wykryty w transformującym retrowirusie mielocytomatozy ptaków szczepu MC 29 (avian MC 29 myelocytomatosis virus, w skrócie MC 29) [67]. Hybryda ta składa się z części 5' wirusowego genu *gag* i części 3' komórkowego genu *myc*. W przypadku *v-onc*, które nie są hybrydami z innym wirusowym genem, lecz w większości pochodzą z sekwencji komórkowych, jak np. *src* RSV, istnieją także różnice. Różnice te dotyczą rozproszonych punktowych mutacji obejmujących 1-2% sekwencji [60, 101]. Tak więc *c-src* i *v-src* nie są izogeniczne, co zgadza się z inną pracą opisującą różnice między produktami białkowymi *c-src* i *v-src* [97]. Duesberg [29] nie bez racji pyta, czy istotnie transformujące geny retrowirusów występują w prawidłowych komórkach?

W tabeli 1 [wg 58] przedstawiono 24 onkogeny wykryte bezpośrednio w różnych retrowirusach lub metodą transfekcji\* oraz podano ich właściwości.

Geny te są opisane trzema inicjałami w zależności od zwierzęcia lub nowotworu, z których je po raz pierwszy wyizolowano. Niektóre z genów *onc* wywołują różne typy nowotworów, jak np. gen *myc* MC 29, który powoduje mielocytomatozę, mięsaki i raki, podczas gdy inne geny *onc* zbliżone do genów *src* RSV lub *myb* wirusa mieloblastozy ptaków (avian myeloblastosis virus, w skrócie AMV) wywołują zwykle nowotwory jednego typu. Ponadto gen *myc* jest znany z tego, że wchodzi w związki aż z czterema różnymi szczepami retrowirusów ptaków (MC 29, NH 2,

---

\* Transfekcja polega na przeniesieniu badanego, biologicznie aktywnego eukariotycznego DNA w DNA komórek-biorców. Do badań transformujących genów zarówno wirusowych, jak i komórkowych, jako biorcy zwykle służą komórki NIH 3T3. Jest to linia prawidłowych fibroblastów myszy, które pod wpływem transformującego DNA ulegają konwersji nowotworowej, tworząc charakterystyczne ogniska w jednowarstwowej hodowli.



CM II, OK 10) [11]. Co więcej, istnieją szczątkowe homologie między genami *myc* i *myb* a antygenem E1A adenowirusów, które należą do nowotworowych wirusów DNA [79]. Mięsak kotów, wywołany przez wirusa szczepu Parodi-Irgensa (Parodi-Irgens feline sarcoma virus, w skrócie PI-FeSV), ma onkogen *sis*, o którym z wcześniejszych prac było wiadomo, że jest genem wirusa mięsaka małpy wełnistej (simian sarcoma virus, w skrócie SSV) [5]. Natomiast inny wirus mięsaka kotów (Hardy-Zuckerman 2-feline sarcoma virus, w skrócie HZ.2-FeSV) nosi gen *abl* pierwotnie opisany jako część genomu wirusa białaczki myszy Abelsona (Abelson murine leukemia virus, w skrócie A-MLV) [4].

Przedstawione w tab. 1 onkogeny retrowirusów można podzielić na kilka grup:

1. Pierwszą grupę stanowią onkogeny od *src* do *raf*, przy czym *fps* i *fes* są homologiczne, chociaż wyizolowane z różnych gatunków [39, 41]. V-*fps* wyizolowano z wirusa mięsaka drobiu Fujinami, a v-*fes* — z wirusa mięsaka kotów Snyder-Theilina. W komórkach człowieka występuje gen *fps/fes* [41]. Onkogeny te albo kodują białko o aktywności fosfokinazy tyrozynowej, albo wykazują podobieństwa strukturalne, chociaż ich produkty nie posiadają aktywności enzymatycznej. Badania sekwencji nukleotydowych, zwłaszcza w częściach kodujących fosfokinazy białkowe, ujawniły duże podobieństwa między *yes*, *fps* i *abl* [18, 40, 44, 56, 93], co sugeruje, że odpowiadające im c-*onc* pochodzą od wspólnego przodka. Pomimo homologii strukturalnych, podobieństwa czynnościowe onkogenów z tej grupy są problematyczne. Kodowane przez prototypy komórkowe *onc* produkty są rozmieszczone w różnych miejscach w komórce (w błonie komórkowej, w cytoplazmie, w błonach cytoplazmatycznych) [cyt. wg 58]. Wszystkie te onkogeny są w jakimś stopniu związane z genem kodującym podjednostki cyklazy adenylanowej [3]. W procesie ewolucji mogą rozwijać się odmienne właściwości czynnościowe różnych członków tej grupy, tak że próby połączenia wszystkich tych genów w jeden typ czynności transformujących są obecnie nieusprawiedliwione.

2. Rodzina genów *ras*. W przypadkach trzech genów *ras* człowieka — Ha-*ras* 1, Ki-*ras* 2 i N-*ras* (ten ostatni został wykryty metodą transfekcji w mięsakach, chłoniakach, w linii komórkowej HL-60 wyprowadzonej z białaczki promielocytowej, w linii SK-N-SH wyprowadzonej ze złośliwego nerwiaka i w raku okrężnicy) [42, 63, 68, 69, 94, 95, 96], zasada, że homologie strukturalne implikują niekiedy analogie czynnościowe wydaje się uzasadniona. Chociaż geny te różnią się w całości sekwencji, to kodowane przez nie białka mają prawie w 90% identyczną sekwencję aminokwasów [24, cyt. wg 58, 94, 95, 96, 106].

3. Geny *myc* i *myb*.



TABELA 1

Geny *onc* transformujących retrowirusów ([wg 58] zmodyfikowane)

1	2	3	4	5	6
Źródło, z którego zostały wyizolowane	Prototyp wirusa lub onkogeny komórek nowotworowych	Geny <i>v-onc</i>	Lokalizacja chromosomowa u człowieka	Lokalizacja w komórce białek kodowanych przez <i>v-onc</i>	Czynność lub sekwencja białek kodowanych przez <i>v-onc</i>
Drób	a) Prototypy wirusa: mięsaka Rousa	<i>src</i>	20	Błona plazmatyczna	Fosfokinaza tyrozynowa
Drób	mięsaka Y 73	<i>yes</i>			Fosfokinaza tyrozynowa
Drób (Koty)	mięsaka Fujinami	<i>fps = fes</i>	15 prażki q24-q26	Cytoplazma	Fosfokinaza tyrozynowa
Myszy	(mięsaka kotów Snyder-Theilina) białaczki myszy Abelsona	<i>abl</i>	9 prażek q32	Błona plazmatyczna	Fosfokinaza tyrozynowa
Drób	mięsaka ptaków UR 2	<i>ros</i>		Błony cytoplazmatyczne	Fosfokinaza tyrozynowa
Koty	mięsaka kotów Gardner-Rasheeda	<i>fgr</i>			Fosfokinaza tyrozynowa
Drób	erytroblastozy ptaków	<i>erbB</i>	7		Białko o sekwencji zbliżonej do receptora EGF
Koty	mięsaka kotów McDonougha	<i>fms</i>	5	Cytoplazma	
Myszy	mięsaka myszy Moloneya	<i>mos</i>	8 prażek q22	Cytoplazma	
Myszy	mięsaka myszy 3611	<i>raf</i>	3		
Szczury	mięsaka myszy Harvey'a	Ha- <i>ras</i> 1	11 prażek p13	Błona plazmatyczna	Wiąże dwu- lub trójfosforan guaniny
Szczury	mięsaka myszy Kirstena	Ki- <i>ras</i> 2	12	Błona plazmatyczna	
Drób	mielocytomatozy ptaków szczep MC 29	<i>myc</i>	8 prażek q24	Zrąb jądra	



1	2	3	4	5	6
Drób	mieloblastozy ptaków	<i>myb</i>	6 prażek q23	Zrąb jądra	
Myszy	mięśnaka kości myszy FBJ	<i>fos</i>	2	Jądro	
Drób	ptaków SKV 770	<i>ski</i>	1		
Indyki	retikuloendoteliozy indyków	<i>rel</i>			
Małpy wełniste	mięśnaka małpy wełnistej	<i>sis</i>	22 prażek q11	Cytoplazma	Białko o sekwencji zbliżonej do PDGF-II
Ludzie	b) Spokrewnione onkogeny znane z hybrydyzacji lub transfekcji				
Ludzie	Złośliwe nerwiaki	N- <i>myc</i>	2		
	Złośliwe nerwiaki, białaczki, mięsaki	N- <i>ras</i>	1		
	c) Niespokrewnione onkogeny znane tylko z transfekcji				
Drób	Chłoniaki torebki Fabrycjusza	<i>Blym</i>	1		
Myszy, ludzie	Raki sutka	<i>mam</i>			
Szczury	Złośliwe nerwiaki, glejaki	<i>neu</i>			



4. Należy wyróżnić również dużą grupę genów, które nie wykazują homologii z innymi genami.

Geny *mam* [59] i *neu* [73] nie zostały jeszcze wyizolowane klonowaniem molekularnym. Została wprowadzie odkryta, ale jeszcze niecałkowicie scharakteryzowana grupa innych genów, które mogą wykazywać właściwości onkogenów; są to geny *erbA*, *ets* i *mil*. Wykryto je razem z onkogenami *erbB*, *myb* i *myc* odpowiednio w genomach: wirusa erythroblastozy ptaków (avian erythroblastosis virus, w skrócie AEV), szczepów E 26 i MH 2. Geny *int 1* i *int 2* są zmienione przez prowirusa DNA guza sutka myszy, a geny *ML VI 1* i *ML VI 2* — przez prowirusa DNA białaczki myszy. Te ostatnie cztery geny mogą być aktywowane w podobny sposób, w jaki wirus leukozy ptaków (avian leukosis virus, w skrócie ALV) wywołuje aktywację genów *myc*, lub *erbB* [34, 45, 79] z następowym rozwojem chłoniaków B komórkowych lub erythroblastozy.

Należałoby postawić pytanie, jakie są właściwości białek kodowanych przez *v-onc* i transformujących komórki. Jak dotychczas nie znamy czynności większości tych białek, jednakże nagromadzone w ciągu ostatniego roku dane pozwalają podzielić je na kilka grup.

#### ONKOGENY KODUJĄCE FOSFOKINAZY TYROZYNOWE

Kaskadowe układy fosforylacji — defosforylacji stanowią główny mechanizm regulujący prawie wszystkie procesy komórkowe. Układy te składają się z kinaz białkowych zależnych od cyklicznego AMP i fosfataz białkowych. Jeśli więc *v-onc* koduje enzym o aktywności kinazy białkowej, to łatwy do przewidzenia będzie jego wpływ na wzrost i różnicowanie komórek.

Przedstawicielem grupy onkogenów kodujących fosfokinazy tyrozynowe jest *v-src* wyizolowany z RSV. Koduje on fosfoproteinę 60 Kd, tzw. pp 60 *v-src* (w odróżnieniu od pp 60 *c-src*). Oba enzymy katalizują przenoszenie grup fosforanowych na rodniki tyrozyny białek [47]. Fosfokinaza tyrozynowa *v-src* w komórkach stransformowanych przez RSV występuje pod postacią kompleksu złożonego z trzech cząsteczek, przy czym dwie inne cząsteczki 50 Kd i 90 Kd zabezpieczają transport kompleksu przez błony plazmatyczne w nieaktywnej postaci. Po dysocjacji kompleksu uwolniona aktywna fosfokinaza może już fosforylować rodniki tyrozyny [6, 17]. Wówczas lokalizuje się na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej [36, 92]. Dokładne zależności między zdolnością fosforylacji tyrozyny a właściwościami transformacyjnymi produktu *v-src* nie są ostatecznie ustalone, a o powiązaniu tych dwu zjawisk dowiedziano się z badań mutantów z delecją rejonu *onc*. W komórkach



stransformowanych przez RSV ilość tyrozyny, która uległa fosforylacji, wzrasta 5-10-krotnie w porównaniu z komórkami prawidłowymi, chociaż w bezjądrowych komórkach krwi ilość ufosforylowanej tyrozyny jest także podwyższona [76]. Pp 60 *v-src* może wpływać na wiele białek komórkowych, których rodniki tyrozyny ulegają fosforylacji. Dotychczas jednak nie ustalono, które z tych białek pod wpływem pp 60 *v-src* są odpowiedzialne za transformację komórki. Być może białkiem tym jest winkulina [48, 84] (130 Kd), chociaż nie jest wykluczone, że ważną rolę odgrywa również fosforylacja enzymów cyklu glikolitycznego: enolazy (46 Kd), fosfogliceromutazy (28 Kd) i dehydrogenazy mleczanowej (35 Kd) [16]. Według niektórych autorów [2, 10, 15, 31, 77, 78, 87] przedmiotem działania pp 60 *v-src* wydają się białka błony komórkowej o stosunkowo niskim ciężarze cząsteczkowym od 34 do 39 Kd. Istnieje korelacja między fosforylacją enolazy i fosfogliceromutazy a modyfikacją transportu heksoz, który jest charakterystyczny dla komórek nowotworowych [15]. Wiele danych wskazuje na związek między fosforylacją winkuliny a transformacją komórki. Winkulina jest szczególnie bogata w przyczepy dla mikrofilamentów, co ułatwia jej adherencję do wewnętrznej powierzchni błony. Wykazano korelację między obecnością winkuliny a prawidłowym rozmieszczeniem aktyny w mikrofilamentach komórkowych, a także występowaniem fibronektyny na powierzchni komórki. Fosforylacja rodników tyrozyny w winkulinie może modyfikować jej czynność, zmieniać adherencję z następowym rozproszeniem mikrofilamentów w komórce, z przypadkowym rozmieszczeniem aktyny w mikrofilamentach i utratą fibronektyny z powierzchni komórki, przy czym zmiany te charakteryzują stransformowane komórki [48]. Podobne zmiany obserwuje się po dokomórkowym podaniu czystego pp 60 *v-src* [62]. Obecność pp 60 *src* w stransformowanych komórkach koreluje zwłaszcza z utratą fibronektyny z powierzchni komórki.

Jak wynika z tab. 1, produkty sześciu innych genów *v-onc*, jak: *v-yes*, *v-fps/fes*, *v-abl*, *v-ros*, *v-fgr* wykazują również aktywność zbliżoną do fosfokinazy tyrozynowej. Wirusowe fosfokinazy tyrozynowe, poza pp 60 *v-src*, są białkami mieszanymi kodowanymi przez hybrydy będące połączeniem wirusowego genu *gag* i przynajmniej części korespondującego *c-onc*. Nie jest więc pewnym czy działają one w podobny sposób jak pp 60 *v-src*, którego gen jest w większości pochodzenia komórkowego. Wykazano jednak, że mają one zdolność fosforylacji winkuliny [cyt. wg 61].

Teoria pochodzenia onkogenów transformujących retrowirusów z prawidłowych genów komórkowych, które regulują podziały i różnicowanie, znalazła potwierdzenie w odkryciach grupy Waterfielda i wsp. [28]. Autorzy ci wykazali, że jeden z dotychczas mniej znanych *v-onc*, a mianowicie *v-erbB* AEV, który u drobiu wywołuje erytroleukemia, a rzadziej



mięśaki i raki, pochodzi z genu komórkowego, kodującego receptor dla czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF), lub przynajmniej z genu bardzo zbliżonego do genu dla tego receptora.

Komórkowy gen dla receptora EGF jest doskonałym kandydatem na onkogen, ponieważ jego produkt ma wspólną, z co najmniej siedmioma produktami innych onkogenów wirusowych (których przedstawicielem jest *v-src* RSV) aktywność fosfokinazy tyrozynowej. Autorzy z grupy Waterfielda rozszczepili oczyszczoną cząsteczkę receptora, która jest glikoproteidem 175 Kd, na mniejsze peptydy i w czternastu z nich ustalili sekwencję aminokwasów. Sekwencja *v-erbB* szczepu AEV-H została opublikowana przez Yamamoto i wsp. [111], przy czym wykazano, że zawiera ona segment znamienne podobny do *v-src* i innych onkogenów kodujących białka o aktywności fosfokinazy tyrozynowej. Pomimo to przynajmniej trzy różne laboratoria nie zdołały wykazać aktywności fosfokinazy tyrozynowej produktu onkogeny *erbB*, podobnie jak onkogeny *mos* [74] i *fms* [43].

Grupa Waterfielda metodą komputerową ustaliła podobieństwo między sześcioma peptydami receptora EGF a segmentami białka kodowanego przez *v-erbB*. W tych sześciu peptydach 74 z 83 aminokwasów było wspólnych z sekwencją produktu *erbB*, cztery zaś inne aminokwasy uległy zmianom konserwacyjnym.

Sugestię, że *erbB* pochodzi z genu kodującego receptor dla EGF potwierdza także odkrycie, że u człowieka zarówno komórkowy odpowiednik *v-erbB*, jak i gen dla receptora EGF znajduje się w podobnej pozycji na długich ramionach chromosomu 7 [cyt. wg 64]. Nie jest jednak wykluczone, że na chromosomie 7 jest zlokalizowana cała rodzina genów o podobnej strukturze i konieczne są dalsze badania, czy onkogen *erbB* pochodzi z genu dla receptora EGF, czy z innego genu komórkowego o bardzo podobnej strukturze.

Nie wykazano natomiast podobieństw między sekwencją aminokwasów tworzących osiem innych peptydów receptora dla EGF a produktem *erbB*. Nie stanowi to jednak zaskoczenia, ponieważ białko dla receptora EGF jest znacznie większe niż produkt onkogeny *erbB*. Produkt onkogeny *erbB* składa się z 604 aminokwasów, podczas gdy białko osiowe receptora EGF składa się z około 1250 aminokwasów (na węglowodany przypada 37 Kd całej cząsteczki receptora, na białko zaś około 138 Kd). Grupa Waterfielda sądzi, że onkogen *erbB* w zasadzie odpowiada okrojonej wersji genu komórkowego. Receptor EGF składa się z trzech części: pierwsza wystaje poza komórkę i ma miejsce wiążące EGF, druga osadzona jest w błonie komórkowej i trzecia wystająca do cytoplazmy, przy czym właśnie część cytoplazmatyczna receptora wykazuje aktywność fosfokinazy tyrozynowej [12]. Sekwencje kodowane przez onkogen



*erbB* odpowiadają części błonowej i cytoplazmatycznej receptora EGF. Natomiast AEV nie nabywa segmentu genu kodującego zewnątrzkomórkową część receptora, która ma miejsce wiążące EGF. W warunkach prawidłowych sygnał do podziałów komórkowych pojawia się, gdy powierzchniowy receptor zwiąże EGF, chociaż mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze znany. Nasuwają się więc co najmniej dwa pytania: w jaki sposób komórka jest stymulowana do podziałów przez produkt onkogenu *erbB*, który nie ma miejsca wiążącego EGF oraz dlaczego ten produkt nie wykazuje aktywności fosfokinazy tyrozynowej (o ile oczywiście nie wynika to z niedoskonałości metod badawczych). Być może klucz do rozwiązania obu tych problemów stanowi niedawne odkrycie przez Tamura i wsp. [102], że proteolityczne działanie trypsyny aktywuje fosfokinazę tyrozynową w receptorze insuliny, a zatem okrojenie wierzchołka receptora EGF mogłoby powodować jego aktywację i stanowić sygnał do bezustannych podziałów komórki. Chociaż AEV ma inny onkogen *erbA*, to badania delecyjnych mutantów wirusów wykazały, że sam *erbB* może transformować odpowiednie komórki docelowe.

Odkrycie związku między genem dla receptora EGF i *erbB* stanowi niewątpliwie bodziec do badań receptorów dla innych czynników wzrostu, zwłaszcza tych, które mają aktywność fosfokinazy tyrozynowej, jak receptory dla płytkowo pochodnego czynnika wzrostu, insuliny i 1-cynnika wzrostu podobnego do insuliny (insulin-like growth factor-1). Być może inne onkogeny wirusowe, zwłaszcza wykazujące strukturalne podobieństwa do onkogenów kodujących fosfokinazy tyrozynowe, pochodzą z genów dla tych receptorów.

#### ONKOGEN *SIS* I INNE ONKOGENY KODUJĄCE CZYNNIKI WZROSTU

Od czasu gdy latem 1983 r. dwa ośrodki badawcze (grupa Waterfielda [107] i grupa Doolittla [27]) niezależnie od siebie wykryły homologię sekwencji między jednym z dwu peptydów tworzących płytkowo pochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor-II, w skrócie PDGF-II), a białkiem kodowanym przez onkogen *sis* transformującego SSV, rozważa się możliwości, że cały szereg *v-onc* pochodzi z komórkowych genów kodujących czynniki wzrostu.

Wydaje się, że większość komórkowych genów, z których pochodzą onkogeny wirusowe, powstała u ewolucyjnie wczesnych wielokomórkowych zwierząt jako wewnątrzkomórkowe regulatory wzrostu komórki [72]. W miarę jednak jak organizmy stawały się bardziej złożone, dalsze wykorzystywanie wewnątrzkomórkowych czynników wzrostu, które zapewniały poszczególnym komórkom pewną autonomię, nie było celowe.



U wyższych kręgowców te wewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu są prawdopodobnie wypierane przez liczne pozakomórkowe czynniki wzrostu o charakterze endokrynowym i parakrynowym, takie jak: hormon wzrostu, insulina, EGF, PDGF. W tym aspekcie szczególnie interesująca wydaje się homologia między sekwencjami produktu *v-sis* a PDGF-II. Sugeruje się też [72], że albo gen dla komórkowych czynników wzrostu działa także jako wewnątrzkomórkowy regulator wzrostu, albo współczesne geny dla pozakomórkowych czynników wzrostu pochodzą z wcześniejszego genu dla wewnątrzkomórkowych czynników wzrostu.

Onkogen *sis* [19], o czym już wspomniano, występuje co najmniej w dwu retrowirusach, a mianowicie w SSV i szczepie PI-FeSV. Produktem wirusowego onkogeny jest białko 28 Kd — p 28 *v-sis* [23], prawdopodobnie jednak nieco odmienne od PDGF-II, co przypuszcza się na podstawie różnych sekwencji nukleotydowych w części 5' korespondujących *c-sis* i *v-sis* [52], przy czym *c-sis* należy do unikalnych genów w genomie człowieka [19]. Obecnie nie dysponujemy jeszcze żadnymi danymi dotyczącymi czynności p 28 *v-sis*, ale dzięki porównawczym badaniom sekwencji stwierdzono znamienne homologię, rzędu 87%, między p 28 *v-sis* a PDGF-II. Wynik ten sugeruje, że *v-sis* powstał wskutek włączenia przez retrowirus części genu wytwarzającego PDGF [27, 82]. Obserwowane różnice sekwencji mogą wynikać z dewiacji zachodzących podczas ewolucji między genem małpy, który stanowi punkt wyjścia, a ludzkim genem dla PDGF-II, z którym *v-sis* jest porównywany. Produktem tych genów jest prawdopodobnie białko globularne, rozpuszczalne w wodzie i nie wiążące się z błoną plazmatyczną [27]. Magazynem PDGF u człowieka są ziarenka alfa płytek krwi [53, 110], skąd jest on uwalniany podczas krzepnięcia krwi. PDGF jest głównym polipeptydowym czynnikiem wzrostu, występującym w surowicy. Stymuluje on podziały komórek mezenchymalnych, mających receptory dla PDGF, jak np. fibroblasty, a także komórki neurogleju [46]. Podobnie jak receptor dla EGF [12], również receptor dla PDGF wykazuje aktywność fosfokinazy tyrozynowej [30], czym zresztą przypomina aktywność enzymatyczną produktów rodziny genów *src*. Nowotwory człowieka wykazujące ekspresję genu *sis* są mięsakami i glejakami [32] wychodzącymi z komórek wrażliwych na PDGF. Istnienie podobieństw w sposobie działania między PDGF a innymi czynnikami wzrostu, jak np. EGF lub czynniki wzrostu mięsaka (sarcoma growth factors wytwarzane przez komórki, które zostały stransformowane przez onkogenne retrowirusy [20, 54]), sugeruje, że onkogen *sis* uczestniczy w transformacji za pomocą mechanizmu odmiennego od dotychczas opisanych dla onkogenów. Mianowicie onkogen *sis*, o czym już wspomniano, prawdopodobnie działa przez wytwarzany w nadmiarze lub nieprawidłowy jakościowo czynnik wzrostu, który z ko-



lei wpływa na układ komórkowych kinaz białkowych. Czynniki typu PDGF-II istotnie jest wytwarzany przez komórki, które uległy transformacji pod wpływem SSV (transformującym genem SSV jest *sis*) [22]. A zatem niektóre onkogeny mogą stymulować podziały komórkowe albo poprzez kodowanie komponentu wspólnego z czynnikiem wzrostu, albo kodując nieprawidłowy receptor dla czynnika wzrostu, pozbawiony sekwencji kontrolującej, jak np. w przypadku *v-erbB*.

Nie jest jednak wykluczone, że inne aktywności onkogenów wytwarzających czynniki wzrostu mają również decydujące znaczenie dla rozwoju nowotworów. Wykazano, że np. we wczesnym okresie odpowiedzi na PDGF występuje indukcja genu *myc* w limfocytach [55], która być może zależy od uaktywnienia fosfokinazy tyrozynowej w następstwie wiązania się PDGF ze swoim receptorem.

Należy jeszcze wspomnieć o genie *Blym*, który jest transformującym genem chłoniaków torebki Fabrycjusza u drobiu. Wydaje się, że produkt tego genu, przynajmniej częściowo homologiczny z mitogennym peptydem surowicy — transferryną [37] działa w sposób analogiczny jak czynniki wzrostu.

#### MYC — GEN „UNIEŚMIERTELNIĄCY” („IMMORTALIZING”) „IN VITRO” LINIE KOMÓRKOWE

Onkogen *myc* występuje w kilku leukemogennych retrowirusach ptaków (szczepy: MC 29, CM II, NH 2, OK 10). Produktem *myc* jest białko około 48 Kd, znajdujące się w jądrze komórki. Jedyną znaną właściwością biochemiczną produktu *myc* jest zdolność wiązania się z DNA [1, 26], można więc przypuszczać, że odgrywa on rolę w regulacji ekspresji DNA. Ta niezwykła dla produktu onkogeny właściwość różni go dość istotnie od produktów takich onkogenów jak *src* i *ras*, które działają raczej na poziomie błony komórkowej (tab. 1).

Nieprawidłową ekspresję *myc* obserwowano w nowotworach występujących u tak różnych organizmów, jak ptaki domowe, myszy i ludzie. Jeśli więc onkogen ten ma jakieś znaczenie w procesie nowotworowym, to nie jest to rola specyficzna. Wydaje się, że aktywacja samego *c-myc* nie wystarcza dla wywołania pełnej transformacji nowotworowej. Tak np. w przypadku transformacji „in vitro” komórek NIH 3T3 (linia komórkowa wyprowadzona z prawidłowych fibroblastów myszy i mająca wysoką zdolność integracji DNA podczas transfekcji) *myc* nie jest właściwym genem transformującym [14]. Później wykryto, że transformacja zależy od genu *Blym* [37], co ujawniło udział dwu genów. Współdziałanie *myc* i *Blym* zostało potwierdzone w ludzkich chłoniakach Burkitta [25]. W linii białaczkowej HL-60 występuje kooperacja między *myc* i *N-ras*



[13, 68]. Niedawno wykazano, że *c-myc* pośredniczy w „unieśmiertelnianiu” fibroblastów, nie wpływając na ich fenotyp i dopiero drugi gen, z rodziny genów *ras*, powoduje przynajmniej „in vitro” zakończenie złośliwej transformacji [57, 70, 86]. Wstępne doświadczenia z *myc* i innymi „unieśmiertelniającymi” genami sugerują, że działają one poprzez indukcję transkrypcji genów, które w warunkach prawidłowych są milczące [cyt. wg 83]. W transformacji fibroblastów, a także w niektórych nowotworach uczestniczą więc dwie uzupełniające się grupy genów (tab. 2).

TABELA 2

Uzupełniające się geny, które uczestniczą w transformacji fibroblastów [wg 61]

Grupa I — geny „unieśmiertelniające”	Grupa II — geny „transformujące”
— wirus polioma: antygen wielki T (large T antigen)	— wirus polioma: antygen średni T (middle T antigen)
— adenowirus 12: E1A	— adenowirus 12: E1B
— wirus Epsteina-Barr: antygen EBNA? (Epstein-Barr virus nuclear antigen)	
— <i>c-myc</i>	— <i>N-ras</i>
	— <i>c-Ki-ras 2</i>
	— <i>c-Ha-ras 1</i>
	— <i>Blym</i>

Doświadczenia za pomocą transfekcji, w których do hodowli fibroblastów wprowadzano kombinację dwu genów, sugerują, że czynność onkogenowa *myc* różni się od czynności *ras*, ale jest podobna do czynności onkogenów transformujących wirusów DNA, jak np. rejonu E1A adenowirusa typu 12 i wielkiego T wirusa polioma [57, 86]. Onkogeny te, w przeciwieństwie do onkogenów transformujących retrowirusów, są pochodzenia prawdziwie wirusowego. Działają „unieśmiertelniająco” na komórki bez pełnego procesu transformacji i wpływają na aktywację innych genów, które w warunkach prawidłowych są milczące. Wykazano, że także fragmenty DNA wirusa Epsteina-Barr „unieśmiertelniają” komórki epitelialne [38]. Co więcej, zarówno produkt *myc*, antygen wielki T wirusa polioma i E1A adenowirusa wiążą się ze zrębem jądra [1, 26, 33, 50]. Istnieje także pewna homologia sekwencji między *myc* a E1A [79]. Natomiast produkty rodziny genów *ras* i antygen średni T są związane z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej [49, 91, 109].



Takie rozmieszczenie zgadza się z położeniem witalnych miejsc docelowych dla działania onkogenu, które w jednych komórkach znajdują się w jądrze, a w innych w pobliżu błony plazmatycznej. Być może oba miejsca docelowe, dla wystąpienia pełnej transformacji, muszą zostać uaktywnione przez produkty onkogenów [58].

Nie jest jednak wykluczone, że do powstania komórki nowotworowej konieczne jest jeszcze dodatkowe działanie odmienne od typu aktywności genów *myc* i *ras*. Jednakże poszukiwania onkogenu dostarczającego aktywności trzeciego typu wymagają nowych prób biologicznych. Najbardziej zachęcająca wydaje się perspektywa istnienia wielu genów włączonych w proces onkogenezy, przy czym uaktywnienie każdego z nich odpowiadałoby kolejnemu etapowi onkogenazy [58].

#### RODZINA GENÓW „RAS”, MAJĄCA ZDOLNOŚĆ W WARUNKACH IN VITRO TRANSFORMOWANIA KOMÓREK Z CIĄGLYCH „UNIEŚMIERTELNIONYCH” LINII

Rodzina genów *ras* składa się ze spokrewnionych ze sobą genów [21, 51, 65, 71, 88, 89], które najpierw zostały wykryte w dwu transformujących retrowirusach, a mianowicie w wirusie mięsaka myszy Harvey'a (Harvey murine sarcoma virus, w skrócie HaMSV) i w wirusie mięsaka myszy Kirstena (Kirsten murine sarcoma virus, w skrócie KiMSV); były to odpowiednio *v-Ha-ras* i *v-Ki-ras*. Trzeci gen wirusowy *v-bas* został wyizolowany z innego wariantu wirusa mięsaka myszy i jest analogiczny do *v-Ha-ras*. Te *v-onc* koresponują z czterema genami człowieka, z których dwa są aktywne — *c-Ha-ras 1* i *c-Ki-ras 2* [9], a dwa inne, *c-Ha-ras 2* i *c-Ki-ras 1*, stanowią pseudogeny i są nieczynne [9, 66]. Trzeci gen *N-ras* został wykryty metodą transfekcji w komórkach nowotworowych i występuje tylko w genomie człowieka, natomiast nie jest znany jego odpowiednik wirusowy. W genomie człowieka gen *c-Ha-ras 1* występuje na chromosomie 11 w prążku p13 [21, 65, 71], *c-Ki-ras 2* zaś znajduje się na chromosomie 12 [71, 89]. Chromosomy 11 i 12 mają podobny wzór prążkowy, a także są homologiczne genetycznie i przypuszcza się, że w odległej przeszłości powstały przez podwojenie [85]. Natomiast gen *N-ras* leży na chromosomie 1 [cyt. wg 58].

Produktami zarówno komórkowych, jak i wirusowych genów *ras* są białka około 21 Kd (p 21) spokrewnione immunologicznie [35]. Ich rola fizjologiczna nie jest znana. W komórce znajdują się one przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej (endoproteiny) [74], ale nie wykazują aktywności fosfokinazy tyrozynowej. Jediną znaną czynnością p 21 jest zdolność wiązania nukleotydów guaninowych [74].

Istnienie odmiennych rejonów między rodnikami 164 i 184 [94, 103] sugeruje, że rejon ten może być modyfikowany zależnie od czynności



komórek, dzięki rozszczepieniu proteolitycznemu, które zachodzi przy jednym z dwudziestu aminokwasów końca C terminalnego, co może wiązać się albo z uwolnieniem aktywnego czynnika działającego niezależnie od reszty cząsteczki, albo modyfikować strukturę C terminalną cząsteczki, co z kolei pozwoli na jej interakcję z różnymi substratami [94]. Można więc przypuszczać, że różne komórki wytwarzają odmienne produkty *ras*, które są odpowiedzialne za ich odmienne czynności.

Jak się wydaje, transformujące działanie produktów komórkowych onkogenów *ras* (onkogenów uzyskanych z nowotworów człowieka) zależy od zmian strukturalnych. I tak w linii komórkowej T 24 (lub ekwiwalentu EJ), wyprowadzonej z raka pęcherza moczowego człowieka, onkogen powstaje wskutek prostej punktowej mutacji. Mutacja ta zmienia *c-Ha-ras 1* w silny onkogen, który w transfekcji transformuje komórki NIH 3T3. Natomiast prawidłowy gen *c-Ha-ras 1* nie ma zdolności transformowania komórek NIH 3T3. Związana z mutacją transwersja G do T powoduje, że glicyna występująca w prawidłowo kodowanym p 21 jako 12 rodnik zostaje zastąpiona przez walinę [7, 80, 81, 100, 104]. W innej wersji aktywacji, *Ha-ras 1* koduje w tej pozycji rodnik asparaginy [90]. Nieprawidłowość dotyczącą 12 rodnika p 21 wykryto w linii SW 480 wyprowadzonej z raka okrężnicy, gdzie glicyna zostaje zastąpiona przez walinę, oraz w linii Calu-1 wyprowadzonej z raka płuc, gdzie 12 glicynę zastępuje cysteina [8], przy czym w tych dwu liniach komórkowych występuje onkogen *Ki-ras 2*. Podobne zmiany obejmujące 12 rodnik stwierdzono w produktach różnych *v-ras* [24, 81, 106]. Jak wynika z tab. 3,

TABELA 3

Mutacje genów *ras* [wg 61]

Gen	Mutacja p 21	Linia nowotworowa, lub wirus
<i>Ha-ras 1</i>	12 glicyna → 12 walina	T 24 (EJ, rak pęcherza moczowego)
<i>Ha-ras 1</i>	12 glicyna → 12 asparagina	mutacja prawidłowego genu podczas pasażowania na NIH 3T3
<i>Ki-ras 2</i>	12 glicyna → 12 walina	SW 480 (rak okrężnicy)
<i>Ki-ras 2</i>	12 glicyna → 12 cysteina	Calu-1 (rak płuc)
<i>v-Ha-ras</i> (szczury)	12 glicyna → 12 arginina	wirus Harvey'a
<i>v-Ha-ras</i> (myszy)	12 glicyna → 12 lizyna	Balb-MSV
<i>v-Ki-ras</i>	12 glicyna → 12 seryna	wirus Kirstena
<i>Ha-ras 1</i>	61 glutamina → 61 leucyna	HS 242 (rak płuc)
<i>N-ras</i>	61 glutamina → 61 lizyna	SK-N-SH (złośliwy nerwiak)



zastąpienie 12 glicyny jest najważniejszą zmianą modyfikującą. Ponadto w większości przypadków zmutowane białko różni się od prawidłowego migracją w elektroforezie. Inne wyniki pochodzą z badań onkogenu *Ha-ras 1*, występującego w linii HS 242 raka płuc, gdzie mutacja zmienia 61 aminokwas p 21. W tej mutacji glutamina zostaje zastąpiona leucyną [112]. Również w linii SK-N-SH wyprowadzonej ze złośliwego nerwiaka, mutacja genu *N-ras* powoduje zastąpienie 61 glutaminy lizyną [103]. Wyniki te sugerują, że kodowane specyficzne rodniki 12 i 61 reprezentują krytyczne miejsca, które w przypadku mutacji są często kreowane na onkogenne allele. Wydaje się, że inne miejsce punktowej mutacji może inaktywować te geny.

Jak wcześniej powiedziano, onkogen z rodziny *ras* jest zdolny do transformacji nowotworowej komórek z ciągłych „nieśmiertelnionych” linii, jak np. NIH 3T3. Ciągły wzrost komórek w hodowli wywołują bądź onkogeny wirusów — polioma (antygen wielki T) i adenowirusa (E1A), bądź onkogen *myc*. Dopiero współdziałając z onkogenem wirusów DNA lub zmienioną formą komórkowego genu *myc* albo onkogenu *myc* MC 29, *ras* może indukować onkogenezę. Pojedynczy onkogen *ras*, jak np. *Ha-ras*, nie transformuje fibroblastów oddalonych zaledwie o kilka generacji od fibroblastów zarodka szczurzego [58]. Powstanie komórki nowotworowej w tkance wymaga, jak się wydaje, daleko rozleglejszej aktywacji niż uczynienie pojedynczego onkogenu komórkowego. Onkogeneza jest wieloetapowym procesem, aktywacja zaś takiego onkogenu jak *Ha-ras* stanowi pojedyncze, odosobnione zdarzenie i być może reprezentuje tylko jedną ze składowych wieloetapowego procesu.

W pracy niniejszej przedstawiono zaledwie kilka mechanizmów działania produktów onkogenów, które również wiążą się z wieloma niewiadomymi. Większość mechanizmów działania tych produktów jest wciąż jeszcze nieznana.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAMS H. D., ROHRSCHEIDER L. R., EISENMAN R. N., Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus, *Cell*, **29**: 427-439, 1982.
- [2] AMINI S., KAJI A., Association of pp36, a phosphorylated form of the presumed target protein for the *src* protein of Rous sarcoma virus, with the membrane of chicken cells transformed by Rous sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 960-964, 1983.
- [3] BARKER W. C., DAYHOFF M. O., Viral *src* gene products are related to the catalytic chain of mammalian cAMP-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 2836-2840, 1982.
- [4] BESMER P., HARDY W. D. Jr., ZUCKERMAN E. E., BERGOLD P., LEDERMAN L., SNYDER H. W. Jr., The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline



- retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV. *Nature*, **303**: 825, 1983.
- [5] BESMER P., SNYDER H. W. Jr., MURPHY J. E., HARDY W. D. Jr., PARODI A., The Parodi-Irgens feline sarcoma virus and simian sarcoma virus have homologous oncogenes, but in different contexts of the viral genomes, *J. Virol.*, **46**: 606-613, 1983.
- [6] BRUGGE J., YONEMOTO W., DARROW D., Interaction between the Rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins: Analysis of the turnover and distribution of this complex. *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 9-19, 1983.
- [7] CAPON D. J., CHEN E. Y., LEVINSON A. D., SEEBURG P. H., GOEDDEL D. V., Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue, *Nature*, **302**: 33-37, 1983.
- [8] CAPON D. J., SEEBURG P. H., McGRATH J. P., HAYFLICK J. S., EDMAN U., LEVINSON A. D., GOEDDEL D. V., Activation of *Ki-ras2* gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations, *Nature*, **304**: 507-513, 1983.
- [9] CHANG E. H., GONDA M. A., ELLIS R. W., SCOLNICK E. M., LOWY D. R., Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 4848-4852, 1982.
- [10] CHENG Y. S. E., LAN BO CHEN, Detection of phosphotyrosine-containing 34,000-dalton protein in the framework of cells transformed with Rous sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 2388-2392, 1981.
- [11] COFFIN J. M., VARMUS H. E., BISHOP J. M., ESSEX M., HARDY W. D., Jr., MARTIN G. S., ROSENBERG N. E., SCOLNICK E. M., WAINBERG R. A., VOGT P. K., A proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes. *J. Virol.*, **40**: 953-957, 1981.
- [12] COHEN S., CARPENTER G., KING L., Jr., Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4834-4842, 1980.
- [13] COLLINS S. J., GROUDINE M. T., Amplification of endogenous „myc”-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line, *Nature*, **298**: 679-681, 1982.
- [14] COOPER G. M., NEIMAN P. E., Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukosis virus-induced neoplasm, *Nature*, **292**: 857-853, 1981.
- [15] COOPER J. A., NAKAMURA K. D., HUNTER T., WEBER M. J., Phosphotyrosine-containing proteins and expression of transformation parameters in cells infected with partial transformation mutants of Rous sarcoma virus, *J. Virol.*, **46**: 15-28, 1983.
- [16] COOPER J. A., REISS N. A., SCHWARTZ R. J., HUNTER T., Three glycolytic enzymes are phosphorylated at tyrosine in cells transformed by Rous sarcoma virus, *Nature*, **302**: 218-223, 1983.
- [17] COURTNEIDGE S. A., BISHOP J. M., Transit of pp60v-src to the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 7117-7121, 1982.
- [18] CZERNILOFSKY A. P., LEVINSON A. D., VARMUS H. E., BISHOP J. M., TISHER E., GOODMAN M. H., Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (*src*) and proposed amino acid sequence for gene product, *Nature*, **287**: 198-203, 1980.



- [19] DALLA-FAVERA R., GELMANN E. P., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., A human oncogene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus, *Nature*, **292**: 31-35, 1981.
- [20] DeLARCO J. E., TODARO G. J., BARTFELD D., FUCHS S., Growth factors from murine *sarcoma virus* — transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 4001-4005, 1978.
- [21] DeMARTINVILLE B., GIACALONE J., SHIH C., WEINBERG R. A., FRANC-KE U., Oncogene from human EJ bladder carcinoma is located on short arm of chromosome 11. *Science*, **219**: 498-501, 1983.
- [22] DEUEL T. F., HUANG J. S., HUANG S. S., STROOBANT P., WATERFIELD M. D., Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells, *Science*, **221**: 1348-1350, 1983.
- [23] DEXARE S. G., REDDY E. P., DORIA-LAW J., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., Nucleotide sequence of the simian sarcoma virus genome: Demonstration that its acquired cellular sequences encode the transforming gene product p28 *sis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 731-735, 1983.
- [24] DHAR R., ELLIS R. W., SHIH T. Y., OROSZLAN S., SHAPIRO B., MAIZEL J., LOWY D. R., SCOLNICK E. M., Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus, *Science*, **217**: 934-936, 1982.
- [25] DIAMOND A., COOPER G. M., RITZ J., LANE M. A., Identification and molecular cloning of the human *Blym* transforming gene activated in Burkitt's lymphomas, *Nature*, **305**: 112-116, 1983.
- [26] DONNER P., GREISER-WILKE I., MOELLING K., Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus, *Nature*, **296**: 262-266, 1982.
- [27] DOOLITTLE R. F., HUNKAPILLER M. W., HOOD L. E., DEVARE S. G., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., ANTONIADES H. N., Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*, **221**: 275-277, 1983.
- [28] DOWNWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCRACE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESSINGER J., WATERFIELD M. D., Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences, *Nature*, **307**: 521-527, 1984.
- [29] DUESBERG P. H., Retroviral transforming genes in normal cells? *Nature*, **304**: 219-225, 1983.
- [30] EK B., WESTERMARK B., WASTESON A., HELDIN C-H., Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor, *Nature*, **295**: 419-421, 1982.
- [31] ERIKSON E., ERIKSON R. L., Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product, *Cell*, **21**: 829-836, 1980.
- [32] EVA A., ROBBINS K. C., ANDERSEN P. R., SRINIVASAN A., TRONICK S. R., REDDY E. P., ELLMORE N. W., GALEN A. T., LAUTENBERGER J. A., PAPAS T. S., WESTIN E. H., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., AARONSON S. A., Cellular genes analogous to retroviral *onc* genes are transcribed in human tumour cells, *Nature*, **295**: 116-119, 1982.
- [33] FELDMAN L. T., NEVINS J. R., Localization of the adenovirus E1A<sub>a</sub> protein, a positive-acting transcriptional factor, in infected cells, *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 829-838, 1983.



- [34] FUNG Y-K. T., LEWIS W. G., KUNG H-J., CRITTENDEN L. B., Activation of the cellular oncogene *c-erbB* by LTR insertion: Molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus. *Cell*, **33**: 357-368, 1983.
- [35] FURTH M. E., DAVIS L. J., FURDELYS B. M., SCOLNICK E. M., Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular *ras* gene family, *J. Virol.*, **43**: 294-304, 1982.
- [36] GARBER E. A., KRUEGER J. G., HANAFUSA H., GOLDBERG A. R., Only membrane-associated RSV *src* proteins have amino-terminally bound lipid, *Nature*, **302**: 161-163, 1983.
- [37] GOUBIN G., GOLDMAN D. S., LUCE J., NEIMAN P. E., COOPER G. M., Molecular cloning and nucleotide sequence of transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA, *Nature*, **302**: 114-119, 1983.
- [38] GRIFFIN B. E., KARRAN L., Immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA, *Nature*, **309**: 78-82, 1984.
- [39] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., GROSVELD F., Van de VEN W., STEPHENSON J. R., Isolation of human oncogene sequences (*v-fes* homolog) from a cosmid library, *Science*, **216**: 1136-1138, 1982.
- [40] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., REYNOLDS F. H., Jr., STEPHENSON J. R., Homology between phosphotyrosine acceptor site of human *c-abl* and viral oncogene products, *Nature*, **304**: 167-169, 1983.
- [41] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., SHIBUYA M., HANAFUSA H., STEPHENSON J. R., Transforming genes of avian (*v-fps*) and mammalian (*v-fes*) retroviruses correspond to a common cellular locus, *Virology*, **125**: 480-486, 1983.
- [42] HALL A., MARSHALL C. J., SPURR N. K., WEISS R. A., Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the *ras* gene family located on chromosome 1, *Nature*, **303**: 396-400, 1983.
- [43] HAMPE A., GOBET M., SHEER C. J., GALIBERT F., Nucleotide sequence of the feline retroviral oncogene *v-fms* shows unexpected homology with oncogenes encoding tyrosine-specific protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 85-89, 1984.
- [44] HAMPE A., LAPREVOTTE I., GALIBERT F., FEDELE L. A., SHERR C. J., Nucleotide sequences of feline retroviral oncogenes (*v-fes*) provide evidence for a family of tyrosine-specific protein kinase genes, *Cell*, **30**: 775-785, 1982.
- [45] HAYWARD W. S., NEEL B. G., ASTRIN S. M., Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis, *Nature*, **290**: 475-480, 1981.
- [46] HELDIN C. H., WESTMARK B., WASTESON A., Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 3664-3668, 1981.
- [47] HUNTER T., SEFTON B. M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 1311-1315, 1980.
- [48] HYNES R., Phosphorylation of vinculin by pp60 *src*: What might it mean? *Cell*, **28**: 437-438, 1982.
- [49] ITO Y., Polyoma virus-specific 55K protein isolated from plasma membrane



- of productively infected cells in virus-coded and important for cell transformation, *Virology*, **98**: 261-266, 1979.
- [50] ITO Y., SPURR N., DULBECCO R., Characterization of polyoma virus-T antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 1259-1263, 1977.
- [51] JHANWAR S. C., NEEL B. G., HAAYWARD W. S., CHAGANTI R. S. K., Localization of *c-ras* oncogene family on human germ-line chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 4794-4797, 1983.
- [52] JOSEPH S. F., DALLA-FAVERA R., GELMANN E. P., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., 5' viral and human cellular sequences corresponding to the transforming gene of *simian sarcoma virus*, *Science*, **219**: 503-505, 1983.
- [53] KAPLAN D. R., CHAO F. C., STILES C. D., ANTONIADES H. N., SCHER C. D., Platelet alfa granules contain a growth factor for fibroblasts, *Blood*, **53**: 1043-1052, 1979.
- [54] KAPLAN P. L., ANDERSON M., OZANNE B., Transforming growth factor(s) production enables cells to grow in the absence of serum: An autocrine system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 485-489, 1982.
- [55] KELLY K., COCHRAN B. H., STILES C. D., LEDER P., Cell-specific regulation of the *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet derived, growth factor, *Cell*, **35**: 603-610, 1983.
- [56] KITAMURA N., KITAMURA A., TOYOSHIMA K., HIRAYAMA Y., YOSHIDA M., Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of *Rous sarcoma virus*, *Nature*, **297**: 205, 1982.
- [57] LAND H., PARADA L. F., WEINBERG R. A., Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature*, **304**: 596-602, 1983.
- [58] LAND H., PARADA L. F., WEINBERG R. A., Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis, *Science*, **222**: 771-778, 1983.
- [59] LANE M. A., SAINTEN A., COOPER G. M., Activation of related transforming genes in mouse and human mammary carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 5185-5189, 1981.
- [60] LEE W-H., NUNN M., DUESBERG P. H., *src* genes of ten Rous sarcoma virus strains, including two reportedly transduced from the cell, are completely allelic; Putative markers of transduction are not detected, *J. Virol.*, **39**: 758-776, 1981.
- [61] LÉVY J-P., Les oncogènes (1-ere partie). *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **26**: 1-11, 1984.
- [62] MANESS P. F., LEVY B. T., Highly purified pp60 *src* induces actin transformation in microinjected cells and phosphorylates selected cytoskeletal proteins in vitro, *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 102-112, 1983.
- [63] MARSHALL C. J., HALL A., WEISS R. A., A transforming gene present in human sarcoma cell lines, *Nature*, **299**: 171-173, 1982.
- [64] MARX J. L., Oncogene linked to growth factor receptor. The viral oncogene, *erbB*, may be derived from the cellular gene for epidermal growth factor, or at least from a very similar cellular gene, *Science*, **223**, 806, 1984.
- [65] McBRIDE O. W., SWAN D. C., SANTOS E., BARBACID M., TRONICK S. R., AARONSON S. A., Localization of the normal allele of T24 human bladder carcinoma oncogene to chromosome 11, *Nature*, **300**: 773-774, 1982.
- [66] McGRATH J. P., CAPON D. J., SMITH D. H., CHEN E. Y., SEEBURG P. H., GOEDEL D. V., LEVINSON A. D., Structure and organization of the



- human *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene, *Nature*, **304**: 501-506, 1983.
- [67] MELLON P., PAWSON A., BISTER K., MARTIN G. S., DUESBERG P. H., Specific RNA sequences and gene products of MC29 avian acute leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 5874-5878, 1978.
- [68] MURRAY M. J., CUNNINGHAM J. M., PARADA L. F., DAUTRY F., LEBO-WITZ P., WEINBERG R. A., The HL-60 transforming sequence: A *ras* oncogene coexisting with altered *myc* genes in hematopoietic tumors, *Cell*, **33**: 749-757, 1983.
- [69] MURRAY M. J., SHILO B-Z., SHIH C., COWING D., HSU H. W., WIENBERG B. A., Three different human tumor cell lines contain different on-cogenes, *Cell*, **25**: 355-361, 1981.
- [70] NEWBOLD R. F., OVERELL R. W., Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-*Ha-ras* oncogene, *Nature*, **304**: 648-651, 1983.
- [71] O'BRIEN S. J., NASH W. G., GOODWIN J. L., LOWY D. R., CHANG E. H., Dispersion of the *ras* family of transforming genes to four different chromo-somes in man, *Nature*, **302**: 839-842, 1983.
- [72] OHNO S., YAZAKI A., Simple construction of human c-*myc* gene impli-cated in B-cell neoplasmas and its relationship with avian v-*myc* and human lymphokines, *Scand. J. Immunol.*, **18**: 373-388, 1983.
- [73] PADHY L. C., SHIH C., COWING D., FINKELSTEIN R., WEINBERG R. A., Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastoma, *Cell*, **28**: 865-871, 1982.
- [74] PAPKOFF J., NIGG E. A., HUNTER T., The transforming protein of Mo-loney murine sarcoma virus is a soluble cytoplasmic protein, *Cell*, **33**: 161-172, 1983.
- [75] PAYNE G. S., BISHOP J. M., VARMUS H. E., Multiple arrangements of viral DNA and an activated oncogene in bursal lymphomas, *Nature*, **295**: 209-214, 1982.
- [76] PHAN DINH TUY F., HENRY J., ROSENFELD C., KAHN A., High tyrosine kinase activity in normal non-proliferating cells, *Nature*, **305**: 435-438, 1983.
- [77] RADKE K., GILMORE T., MARTIN G. S., Transformation by Rous sarcoma virus: A cellular substrate for transformation-specific protein phosphory-lation contains phosphotyrosine, *Cell*, **21**: 821-828, 1980.
- [78] RADKE K., MARTIN G. S., Transformation by Rous sarcoma virus: Effects of *src* gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 5212-5216, 1979.
- [79] RALSTON R., BISHOP J. M., The protein products of the *myc* and *myb* oncogenes and adenovirus E1A are structurally related, *Nature*, **306**: 803-806, 1983.
- [80] REDDY E. P., Nucleotide sequence analysis of the T24 human bladder car-cinoma oncogene, *Science*, **220**: 1061-1063, 1983.
- [81] REDDY E. P., REYNOLDS R. K., SANTOS E., BARBACID M., A point mu-tation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene, *Nature*, **300**: 149-152, 1982.
- [82] ROBBINS K. C., ANTONIADES H. N., DEVARE S. G., HUNKAPILLER M. W., AARONSON S. A., Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet derived growth factor, *Nature*, **305**: 605-608, 1983.
- [83] ROBERTSON M., Paradox and paradigm: The message and meaning of *myc*, *Nature*, **306**: 733-736, 1983.



- [84] ROHRSCHEIDER L., ROSOK M. J., Transformation parameters and pp60 *src* localization in cells infected with partial transformation mutants of Rous sarcoma virus, *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 731-746, 1983.
- [85] ROWLEY J. D., Human oncogene locations and chromosome aberrations, *Nature*, **301**: 290-291, 1983.
- [86] RULEY H. E., Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture, *Nature*, **304**: 602-606, 1983.
- [87] RÜBSAMEN H., SALTENBERGER K., FRIIS R. R., EIGENBRODT E., Cytosolic malic dehydrogenase activity is associated with a putative substrate for the transforming gene product of *Rous sarcoma virus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 228-232, 1982.
- [88] RYAN J., BARKER P. E., SHIMIZU K., WIGLER M., RUDDLE F. H., Chromosomal assignment of a family of human oncogenes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 4460-4463, 1983.
- [89] SAKAGUCHI A. Y., NAYLOR S. L., SHOWS T. B., TOOLE J. J., McCOY M., WEINBERG R. A., Human *c-Ki-ras2* proto-oncogene on chromosome 12, *Science*, **219**: 1081-1082, 1983.
- [90] SANTOS E., REDDY E. P., PULCIANI S., FELDMANN R. J., BARBACID M., Spontaneous activation of a human proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 4679-4683, 1983.
- [91] SCHAFFHAUSEN B. S., DORAI H., ARAKERE G., BENJAMIN T. L., Polyoma virus middle T antigen: Relationship to cell membranes and apparent lack of ATP-binding activity, *Mol. Cell. Biol.*, **2**: 1187-1198, 1982.
- [92] SEFTON B. M., TROWBRIDGE I. S., COOPER J. A., SCOLNICK E. M., The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus, and Abelson virus contain tightly bound lipid, *Cell*, **31**: 465-474, 1982.
- [93] SHIBUYA M., HANAFUSA H., Nucleotide sequence of Fujinami sarcoma virus: Evolutionary relationship of its transforming gene with transforming genes of other sarcoma viruses, *Cell*, **30**: 787-795, 1982.
- [94] SHIMIZU K., BIRNBAUM D., RULEY M. A., FASANO O., SUARD Y., EDLUND L., TAPAROWSKY E., GOLDFARB M., WIGLER M., Structure of the "Ki-ras" gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1, *Nature*, **304**: 497-500, 1983.
- [95] SHIMIZU K., GOLDFARB M., PERUCHO M., WIGLER M., Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 383-387, 1983.
- [96] SHIMIZU K., GOLDFARB M., SUARD Y., PERUCHO M., LI Y., KAMATA T., FERAMISCO J., STAVNEZER E., FOGH J., WIGLER M. H., 3 human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 2112-2116, 1983.
- [97] SMART J. E., OPPERMAN H., CZERNILOFSKY A. P., PURCHIO A. F., ERIKSON R. L., BISHOP J. M., Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of *Rous sarcoma virus* (pp60v-*src*) and its normal cellular homologue (pp60c-*src*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 6013-6017, 1981.
- [98] STEHELIN D., VARMUS H. E., BISHOP J. M., VOGT P. K., DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA, *Nature*, **260**: 170-173, 1976.
- [99] STEPHENSON J. R., KHAN A. S., van de VEN J. M., REYNOLDS F. H.,



- Jr., Type C retroviruses as vectors for cloning cellular genes with probable transforming functions, *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**: 1111-1119, 1979.
- [100] TABIN C. J., BRADLEY S. M., BARGMANN C. I., WEINBERG R. A., PAPPAGEORGE A. G., SCOLNICK E. M., DHAR R., LOWY D. R., CHANG E. H., Mechanism of activation of a human oncogene, *Nature*, **300**: 143-149, 1982.
- [101] TAKEYA T., HANAFUSA H., Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV *src* gene and the mechanism for generating the transforming virus, *Cell*, **32**: 881-890, 1983.
- [102] TAMURA S., FUJITA-YAMAGUCHI Y., LANER J., Insulin-like effect of trypsin on the phosphorylation of rat adipocyte insulin receptor, *J. Biol. Chem.*, **258**: 14749-14752, 1983.
- [103] TAPAROWSKY E., SHIMIZU K., GOLDFARB M., WIGLER M., Structure and activation of the human *N-ras* gene, *Cell*, **34**: 581-586, 1983.
- [104] TAPAROWSKY E., SUARD Y., FASANO O., SHIMIZU K., GOLDFARB M., WIGLER M., Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change, *Nature*, **300**: 762-765, 1982.
- [105] TOOZE J., The molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1973.
- [106] TSUCHIDA N., RYDER T., OHTSUBO E., Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus, *Science*, **217**: 937-938, 1982.
- [107] WATERFIELD M. D., SCRACE G. T., WHITTLE N., STROOBANT P., JONSSON A., WATESON A., WESTERMARK B., HELDIN C-H., HUANG J. S., DEUEL T. F., Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 *sis* of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**: 35-39, 1983.
- [108] WEISS R. A., TEICH N. M., VARMUS H., COFFIN J. M., The molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982.
- [109] WILLINGHAM M. C., PASTAN I., SHIH T. Y., SCOLNICK E. M., Localization of the *src* gene product of Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry, *Cell*, **19**: 1005-1014, 1980.
- [110] WITTE L. D., KAPLAN K. L., NOSSEL H. L., LAGES B. A., WEISS H. J., GOODMAN D. S., Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells, *Circulation Res.*, **42**: 402-409, 1978.
- [111] YAMAMOTO T., NISHIDA N., MIYAJIMA N., KAWAI S., OOI T., TOYOSHIMA K., The *erbB* gene of avian erythroblastosis virus is a member of the *src* gene family, *Cell*, **35**: 71-78, 1983.
- [112] YUASA Y., SRIVASTAVA S. K., DUNN C. Y., RHIM J. S., REDDY E. P., AARONSON S. A., Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within *c-bas/ras* human proto-oncogene, *Nature*, **303**: 775-779, 1983.

Adres autorki: ul. Jaczewskiego 8, Lublin 20-950.

Nadano: 24 września 1984.

Przyjęto: 16 listopada 1984.



## Warunki prenumeraty kwartalnika

### POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 400 zł,      półrocznie 200 zł

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

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

Instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

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

Prenumeratę ze 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 pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić ze Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 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

J.	KOŁODZIEJCZYK, Koordynacja oscylacyjnej aktywności skurczowej w plazmodium śluzowca <i>Physarum polycephalum</i> . . . . .	1
J.	WOJCIEROWSKI, H. ANTOSZ, Enzymy jądrowe, których aktywność wpływa na wbudowywanie prekursorów RNA in vitro . . . . .	17
Z.	KILIAŃSKA, Aktywna transkrypcyjnie chromatyna. I. Białka niehistonowe aktywnej transkrypcyjnie chromatyny . . . . .	55
Z.	KILIAŃSKA, Aktywna transkrypcyjnie chromatyna. II. Modyfikacje składników aktywnej transkrypcyjnie chromatyny . . . . .	81
Z.	M. RUPNIEWSKA, Przypuszczalne mechanizmy działania niektórych produktów wirusowych genów „onc” . . . . .	99