



Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

Geny i genomy — struktura i funkcja



ROK XXXIV

WARSZAWA 1985

ZESZYT 1 (186)

PAŃSTWOWE

WYDAWNICTWO

NAUKOWE

POLSKIE TOWARZYSTWO PRZYRODNIKÓW im. KOPERNIKA

ROK XXXIV

ZESZYT 1 (186)

K O S M O S

ROK ZAŁOŻENIA 1876



WARSZAWA 1985

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

prof. dr Leszek Kuźnicki (wiceprzewodniczący), *prof. dr Włodzimierz Michajłow*, *prof. dr Włodzimierz Ostrowski*, *prof. dr Henryk Szarski*, *prof. dr Przemysław Trojan*
prof. dr Adam Urbanek (przewodniczący), *prof. dr Kazimierz Zieliński*
sekretarz: *mgr Jadwiga Kobuszewska*

KOMITET REDAKCYJNY

doc. dr Władysław Golinowski, *prof. dr Krystyna Kisielewska*, *prof. dr Adam Lomnicki*,
prof. dr Włodzimierz Michajłow (redaktor naczelny), *prof. dr Halszka Osmólska*,
prof. dr Aleksandra Przełęcka, *prof. dr Andrzej Wierciński*,
prof. dr Kazimierz Lech Wierzchowski (zastępca redaktora naczelnego), *prof. dr Jerzy Żuk*
sekretarz: *mgr Jadwiga Kobuszewska*

Redaktorzy tomu: *prof. Aleksandra Putrament*, *prof. Jerzy Żuk*

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XIX p.
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. M. Kopernika
(tel. 20-02-11, wewn. 25-44)

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA, MIODOWA 10

Nakład 1004+106 Ark. wyd. 18,0 Ark. druk. 14.250+wkł. Papier
druk. mat. III 71 g. B-1

Oddano do składania 3.XII.1984 r. Podpisano do druku 26.III.1985 r.

Druk ukończono w marcu 1985 r.

Zam. 733/84

N-26

Cena zł. 130,—

WARSZAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA, WARSZAWA, ul. ŚNIADEKICH 8

SŁOWO WSTĘPNE

Tytuł numeru sugeruje, że przedstawia on, oczywiście w ograniczonym zakresie, obecny stan badań nad kwasami nukleinowymi.

Znajdujemy się obecnie na początku drugiej (po odkryciu struktury DNA) rewolucji w biologii molekularnej, związanej głównie z rekombinacją materiału genetycznego. Obecnie istnieje możliwość wyselekcjonowania, np. z genomu człowieka składającego się z 3×10^9 par nukleotydów, pojedynczego genu zawierającego kilka tysięcy par nukleotydów. Stało się to możliwe dzięki opracowaniu i wprowadzeniu do badań nowych, niezwykle precyzyjnych technik. Pozwoliły one nie tylko na wydzwignięcie na wyższy poziom badań teoretycznych nad strukturą i funkcją aparatu genetycznego, lecz również w bliższej i dalszej perspektywie będą miały ogromne znaczenie praktyczne. Na ich podstawie powstają i rozwijają się nowe technologie produkcji leków, otwierają się perspektywy otrzymania i wyselekcjonowania pożytecznych szczepów mikroorganizmów oraz wysoko wydajnych i odpornych odmian roślin uprawnych.

Prace prowadzone w Polsce w tym kierunku mają skromny zakres. Zaledwie w paru ośrodkach profil badań zahacza o problemy inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Wynika to głównie z wysokich kosztów tego typu badań. Niemniej jednak istnieje szerokie społeczne zainteresowanie problemami biologii molekularnej, zwłaszcza inżynierii genetycznej. Dlatego też Redakcja „Kosmosu” postanowiła umożliwić szerszemu gronu czytelników zapoznanie się z niektórymi zagadnieniami z tej dziedziny.

Zeszyt zawiera czternaście artykułów, ułożonych w pewnej logicznej kolejności, poczynając od najbardziej podstawowych wiadomości o strukturze DNA, a kończąc na mechanizmach ewolucyjnych na poziomie molekularnym. Zostały one opracowane przez autorów bezpośrednio zajmujących się danymi dziedzinami, co z pewnością podniesie atrakcyjność tego numeru.

Różne aspekty biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, omówione w poszczególnych artykułach, pokazują jak współczesna biologia osiąga cenne informacje, które stają się podstawą nowych technik biotechnologicznych, mogących mieć zastosowanie przy rozwiązywaniu ważnych przemysłowych, medycznych i rolniczych problemów.

Zeszyt nie obejmuje wszystkich, nawet najbardziej aktualnych problemów genetyki molekularnej. Jest to zrozumiałe ze względu na obszerność i różnorodność tematyki, której nie sposób pomieścić w jednym numerze.

Oddając do rąk Czytelników numer poświęcony aktualnym zagadnieniom inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, Redakcja wyraża nadzieję, że okaże się on pożyteczny dla szerszego grona Czytelników, również nie zajmujących się profesjonalnie genetyką.

Wszystkim Autorom artykułów, którzy znaleźli czas i nie szczędzili trudu przy ich opracowaniu serdecznie dziękuję.

Jerzy Żuk

JAN KŁYSIK

Instytut Fizjologii
i Biochemii, A. M.
Łódź

STRUKTURY PRZESTRZENNE DNA

WSTĘP

Obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach komórkowych została zauważona przez F. Mieschera w 1869 roku. O tym, że DNA zawiera w sobie informację genetyczną dowiedzieliśmy się 75 lat później. Avery i współpracownicy spostrzegli bowiem, że niezjadliwy szczep *Diplococcus pneumoniae* może zostać przekształcony w szczep chorobotwórczy po prostu przez dodanie do hodowli niezjadliwych bakterii roztworu DNA otrzymanego ze szczepu zjadliwego. Wkrótce pojawiły się kolejne prace mówiące, że ilość DNA w komórce danego gatunku lub organizmu jest stała (cecha, której należało się spodziewać w przypadku substancji zawierającej informację genetyczną) oraz że ilość DNA u organizmów niższych jest mniejsza a u wyższych większa (komórka bakteryjna zawiera około 0,01 pg DNA podczas gdy komórka zwierzęca około 6 pg). Chemiczna analiza cząsteczek DNA wykazała, że jest to polimer złożony z podstawowych elementów — nukleotydów. Różnice w budowie chemicznej zależą od sekwencji nukleotydów w łańcuchu DNA. Bardzo istotnej obserwacji dokonał Chargaff i współpracownicy. Izolując DNA z rozmaitych organizmów dowiedli, że niezależnie od źródła DNA molowa zawartość tyminy jest taka sama jak adeniny, a guaniny taka sama jak cytozyny. Powyższe informacje sugerowały pewien stopień przestrzennej organizacji cząsteczek DNA zdolnych do przechowywania informacji genetycznej i przenoszenia jej do komórek potomnych.

Tak więc struktura DNA była (i jest obecnie) intensywnie badana na podstawie bardzo zasadnych przesłanek. Przełomowym odkryciem było niewątpliwie ustalenie struktury drugorzędowej dokonane przez Watsona i Cricka ponad 30 lat temu. Ale i ostatnie lata przyniosły zdumiewający postęp. Wykryto bowiem cząsteczki o strukturze kolistej i superhelikalnej oraz udowodniono istnienie struktur krzyżowych w obszarze sekwencji palindromowych. Dokonano wreszcie niezwykle zaskakującego odkrycia Z-DNA czyli lewoskrętnego heliksu, a istota tego odkrycia polega również na tym, że przelamuje

pewien stereotyp myślenia o drugorzędowej strukturze DNA ugruntowany triumfalną trzydziestoletnią historią modelu Watsona i Cricka.

W niniejszym artykule przedstawione zostaną w skrócie wybrane zagadnienia dotyczące przestrzennej organizacji cząsteczki DNA. Nie będzie dyskutowana struktura DNA w kompleksach z białkami, struktura DNA w chromatynie czy struktura DNA w kompleksach z metalami i substancjami chemicznymi.

PRAWOSKRĘTNY HELIKS

Pierwszy, ogólnie przyjęty model budowy cząsteczki DNA przedstawili Watson i Crick w 1953 roku [1]. Na podstawie tego modelu, znanego pod nazwą modelu Watsona i Cricka lub modelu B-DNA można było wytłumaczyć wiele chemicznych i fizycznych właściwości cząsteczki jak również sposób w jaki informacja genetyczna może w precyzyjny sposób podlegać procesowi replikacji. Struktura B-DNA była przedmiotem wielu wyczerpujących publikacji [2, 3] dlatego wymienię tylko najważniejsze jej cechy.

Cząsteczka B-DNA wg modelu Watsona i Cricka jest zbudowana z dwóch łańcuchów polinukleotydowych okręcających się prawoskrętnie wzdłuż tej samej osi tworząc podwójny heliks. Polinukleotydowe łańcuchy ułożone są antyrównolegle, tzn. fosfodwuestrowe wiązania 3'-5' między nukleotydami biegną w przeciwnych kierunkach na każdej z dwóch nici. Zasady purynowe i pirymidynowe skierowane są do wewnątrz podwójnego heliksu; ich płaszczyzny pozostają równoległe względem siebie i prostopadłe do osi cząsteczki. Zasada purynowa jednego łańcucha łączy się z zasadą pirymidynową drugiego łańcucha wiązaniami wodorowymi tworząc pary zasad. Parę zasad stanowi adenina i tymina lub guanina i cytozyna, a skutkiem tego sekwencja nukleotydowa jednej nici wyznacza sekwencję nukleotydową drugiej. Niezależnie od wiązań wodorowych występujących między parami zasad podwójny heliks jest stabilizowany przez siły spiętrzające czyli apolarne oddziaływania między zasadami. Zewnętrzna część cząsteczki o średnicy około 20 Å posiada dwie bruzdy: małą i dużą. Pełny skręt heliksu przypada na 10 par zasad a podstawową, powtarzającą się jednostką jest jedna para zasad. Reszty dezoksyrybozy przyjmują względem puryn i pirymidyn konformację *anty*.

Powyższy model zbudowany został m.in. na podstawie obrazów dyfrakcji promieni X przez włókna DNA. Obrazy dyfrakcyjne wskazują jednak na istnienie kilku odmian strukturalnych prawoskrętnego heliksu. Strukturę A (A-DNA) obserwowano we włóknach o 75% wilgotności względnej (B-DNA występuje we włóknach o 92% wilgotności względnej) gdy do badań wzięto DNA w postaci soli sodowej, potasowej lub cezowej. Odległości między parami zasad wynoszą wówczas 2,8 Å (3,4 Å w B-DNA). Formę C otrzymano przy użyciu soli litowej DNA o wilgotności względnej 66%. C-DNA jest

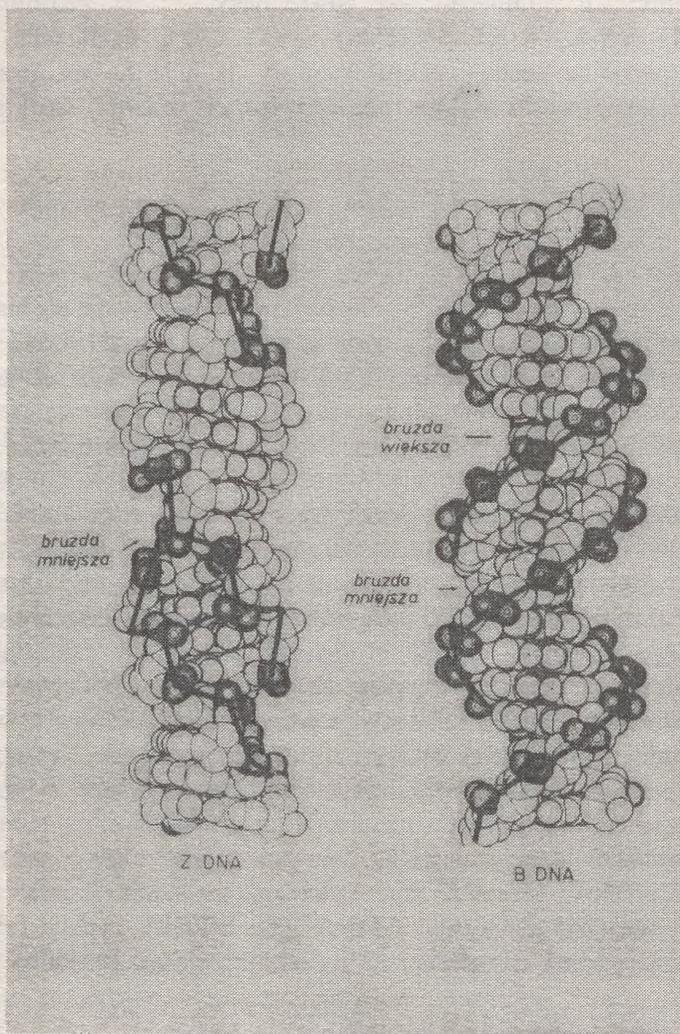
prawdopodobnie zbiorem prawoskrętnych struktur o bardzo zróżnicowanej ilości par zasad (od 7,9 do 9,6) przypadających na pełny skręt heliksu. Włókna niektórych syntetycznych DNA takich jak: poli[d(A-T)·d(A-T)] czy poli[d(I-C)·d(I-C)] wykazują w warunkach obniżonej wilgotności obraz dyfrakcyjny promieni X charakterystyczny dla prawoskrętnej odmiany D-DNA, w której pełny skręt heliksu przypada na 8 par zasad. D-DNA obserwowano także we włóknach polimerów nie zawierających reszt guaninowych np. poli[d(A-A-T)·d(A-A-T)] lub poli[d(A-I-T)·d(A-C-T)]. Podkreślić należy, że podstawową wspólną cechą struktur typu A, B, C i D jest prawoskrętny heliks i z tego powodu należą one do jednej rodziny struktur prawoskrętnych.

LEWOSKRĘTNY HELIKS

W 1979 roku w pracowni A. Richa dokonano niezwykle ważnego odkrycia [4]. Otrzymano bowiem po raz pierwszy kryształ heksanukleotydu o sekwencji CGCGCG i rozwiązano jego strukturę. Częsteczki tego oligonukleotydu okazały się lewoskrętne o strukturze przestrzennej dramatycznie odmiennej od struktury B-DNA (rys. 1). Autorzy podkreślają, że istnieją tylko dwie cechy wspólne modelu Watsona i Cricka oraz modelu lewoskrętnego DNA (tzw. Z-DNA): oba typy struktur tworzą podwójny heliks złożony z dwóch antyrównoległych nici oraz guanina łączy się z cytozyną wiązaniami wodorowymi. Pozostałe parametry różnią się w sposób zasadniczy. Przede wszystkim cząsteczka Z-DNA jest lewoskrętna w przeciwieństwie do prawoskrętnego heliksu B-DNA. Konformacja nukleotydów guaninowych różni się od konformacji nukleotydów cytozynowych i dlatego podstawową powtarzającą się jednostką jest dwunukleotyd w przeciwieństwie do mononukleotydu tworzącego taką jednostkę w B-DNA. Guanina przyjmuje konformację *syn* względem dezoksyrybozy podczas gdy cotozyna pozostaje w konformacji *anty* (wszystkie nukleotydy w modelu Watsona i Cricka mają konformację *anty*). Bardzo charakterystyczna jest konformacja przestrzenna wiązań fosfodwuestrowych w Z-DNA. Atomy fosforu tworzą na zewnętrznej części cząsteczki zygzakowaty wzór (stąd nazwa Z-DNA); w B-DNA atomy fosforu rozmieszczone są wzdłuż regularnej linii wyznaczającej helikalny charakter cząsteczki.

Na przestrzeni ostatnich 4 lat Z-DNA stał się przedmiotem niezwykle intensywnych badań ze względu na dramatycznie odmienną budowę przestrzenną w stosunku do B-DNA. Odkrycie lewoskrętnej struktury zrodziło bowiem wiele istotnych pytań. Oto najważniejsze z nich: Czy Z-DNA może istnieć w bezpośrednim sąsiedztwie B-DNA? Czy jest to struktura możliwa do uzyskania w warunkach fizjologicznych? Czy jest to struktura ograniczona jedynie do sekwencji d(CG)_n? Czy Z-DNA może istnieć *in vivo* i pełnić jakąś funkcję biologiczną?

Obecnie wiemy, że lewoskrętny heliks obserwowany w kryształach $d(CG)_3$ i $d(CG)_2$ [4, 5] jest strukturą możliwą do uzyskania w roztworze [6, 7]. Poli[d(C-G)·d(C-G)] przyjmuje tę strukturę zarówno w roztworach soli o bardzo dużej sile jonowej jak i w roztworach o fizjologicznej sile jonowej np. roztwory o milimolowych lub submilimolowych stężeniach $MnCl_2$,



Rys. 1. Model budowy B-DNA i Z-DNA

$MgCl_2$ lub $CoCl_2$ powodują strukturalne przekształcenie B-Z. Technikami rekombinacji DNA *in vitro* otrzymano fragmenty DNA złożone w części z sekwencji $d(CG)_n$ oraz sekwencji tworzącej wyłącznie prawoskrętny heliks. Przy użyciu takich metod jak: NMR [8], dichroizm kołowy [8, 9] czy

spektroskopia Ramana [10] udowodniono, że Z-DNA może występować w bezpośredniej bliskości B-DNA. Udowodniono także, że cząsteczki DNA mające strukturę superhelikalną mogą lokalnie tworzyć odcinki sekwencji o strukturze Z, podczas gdy cała reszta cząsteczki ma strukturę drugorzędową typu B (to zagadnienie będzie dyskutowane w dalszej części artykułu). Lewoskrętny heliks występować może na bardzo krótkich obszarach długiej nici DNA [11, 12, 13]. Najkrótszą sekwencją obserwowaną w formie Z jest odcinek ośmionukleotydowy onkogenego wirusa SV40 [14]. Okazało się także, iż istnieją sekwencje, które łatwiej uzyskać w formie lewoskrętnej oraz takie, które przyjmują tę strukturę stosunkowo trudno. Najłatwiej przekształceniu podlegają sekwencje typu $d(CG)_n$, nieco trudniej odcinki purynowo-pirymidynowe o sekwencji $d(AC)_n$ [6, 7]. Można jednak obserwować struktury typu Z w odcinkach DNA nie będących traktami purynowo-pirymidynowymi [15].

SUPERHELIKS

19 lat temu Vinograd i współpracownicy odkryli, że dwuniciowe cząsteczki DNA wirusa *polioma* są koliste i mają strukturę superhelikalną [16]. Superhelikalna organizacja cząsteczek DNA jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie [17]. Strukturę tego typu mają niektóre DNA-wirusy bakteryjne, zwierzęce, plazmidy, chromosom bakteryjny itp. Nie można wykluczyć istnienia superhelikalnych obszarów w DNA chromosomów organizmów wyższych. Superheliks pojawia się wówczas, kiedy dwa komplementarne łańcuchy dwuniciowej, kolistej cząsteczki są nadmiernie rozkręcone (underwound) w stosunku do stopnia skręcenia podwójnego heliksu w DNA liniowym lub zrelaksowanym, co powoduje powstanie negatywnych superhelikalnych skrętów. Podwójny heliks kolistej cząsteczki może mieć większy stopień skręcenia (overwound) w stosunku do cząsteczki zrelaksowanej lub liniowej i wtedy pojawiają się pozytywne superhelikalne skręty. Wytworzenie pewnej liczby superhelikalnych skrętów wymaga nakładu energii a więc energia swobodna tego procesu ma wartość dodatnią. Każdy strukturalny proces redukujący stopień skręcenia superheliksu będzie zatem faworyzowany (np. lokalna denaturacja, lokalne tworzenie struktur krzyżowych lub odcinków lewoskrętnych w cząsteczkach mających negatywne superhelikalne skręty). Istnieje kilka podstawowych parametrów charakteryzujących superheliks. Liczba wiązania α (linking number) obrazowo mówiąc jest liczbą oznaczającą ile razy jeden łańcuch okręca się wokół drugiego w dwuniciowej kolistej cząsteczce. Jeżeli cząsteczka DNA o długości N wyrażonej w parach zasad jest zrelaksowana (lub np. ma pęknięcie jednego z dwóch łańcuchów) liczba razy, jaką obie nici okręcają się wokół siebie równa jest wartości α_0 :

$$\alpha_0 = \frac{N}{h^0},$$

gdzie h^0 stanowi liczbę par zasad przypadających na pełny skręt heliksu.

Liczba superhelikalnych skrętów τ może być zatem zdefiniowana jako różnica liczb wiązania $\alpha - \alpha_0$:

$$\tau = \alpha - \alpha_0$$

Gęstość superhikalna δ jest wtedy liczbą superhelikalnych skrętów przypadających na jednostkę długości 10 par zasad:

$$\delta = \frac{\alpha - \alpha_0}{\alpha_0}$$

Jak już wspomniano wcześniej tworzenie superheliksu wymaga nakładu energii. Energia swobodna tego procesu jest zależna od różnicy liczb wiązania lub gęstości superhelikalnej w myśl równań:

$$\Delta G_j = (K/N)\tau^2 \text{ lub } \Delta G_j = NK'\delta^2,$$

gdzie N stanowi liczbę par zasad kolistej cząsteczki, a K lub K' jest stałą niezależną od długości dla cząsteczek dłuższych niż kilka tysięcy par zasad.

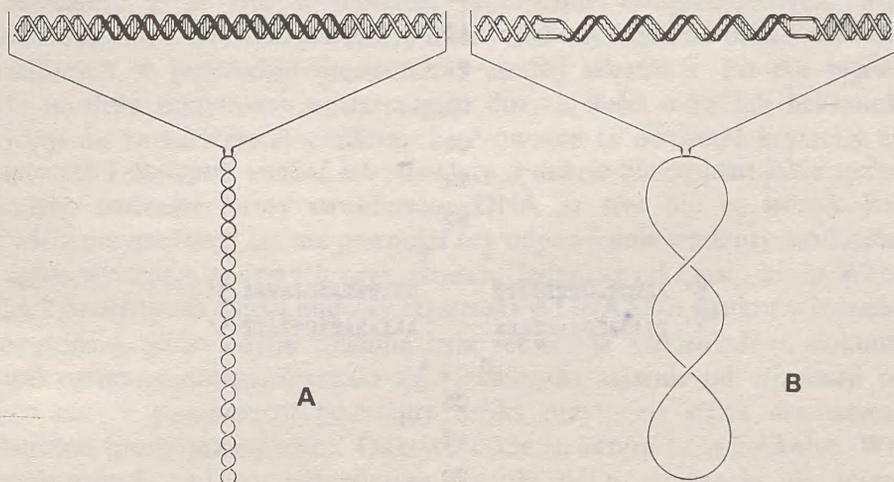
Z-DNA I STRUKTURY KRZYŻOWE W CZĄSTECZKACH SUPERHELIKALNYCH

Superhelikalne struktury są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie a ich powstawanie zależne jest od enzymatycznego procesu przebiegającego przy udziale gyrazy i ATP [18]. Energia zużyta na wytworzenie odpowiedniej gęstości superhelikalnej cząsteczki DNA może być wtórnie źródłem procesów, które spontanicznie nie zachodzą. Przykładem takich procesów jest lokalne tworzenie Z-DNA lub struktur krzyżowych [6, 7]. Tworzenie struktury lewoskrętnej w odcinku DNA będącym częścią kolistej i superhelikalnej cząsteczki plazmidu opisano w 1982 roku niezależnie w dwu laboratoriach [19, 20]. Procesowi temu towarzyszy częściowa relaksacja cząsteczki (zmniejszenie liczby superhelikalnych skrętów), której rozmiar zależy od długości sekwencji przyjmującej strukturę Z (rys. 2). Zjawisko to ma bardzo istotne znaczenie, albowiem gęstość superhelikalna ($-\delta$) jest prawdopodobnie tym czynnikiem który stabilizuje Z-DNA *in vivo*. Jest jednocześnie doskonałym przykładem zależności struktury drugorzędowej od superheliksu (i odwrotnie). Wyznaczono wartość energii swobodnej przekształcenia 1 pary zasad CG ze struktury B w strukturę Z pod wpływem gęstości superhelikalnej. Wynosi ona +0,33 kcal/mol.

Wytworzeniu struktury Z w bezpośrednim sąsiedztwie struktury B towarzyszy powstanie nowego nieznanego dotąd typu drugorzędowego heliksu zlokalizowanego między lewo i prawoskrętną częścią cząsteczki. Jest to swoistego rodzaju „połączenie” (junction) między obu strukturami, mające

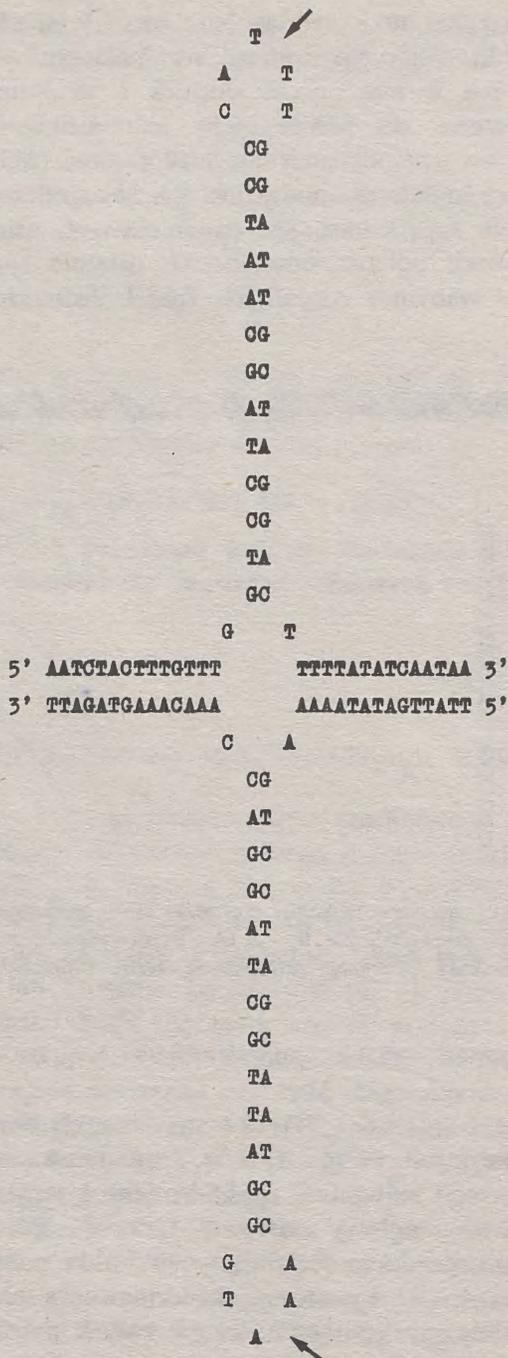
miejsce na odcinku kilku nukleotydów. Nukleaza S1 (specyficzna względem jednoniciowego DNA) wybiórczo rozpoznaje owo połączenie w superhelikalnym DNA wtedy, gdy jest w nim obecny odcinek o strukturze Z. Sądzi się, że powyższe połączenie ma pewne cechy jednoniciowości. Wytworzenie takiego połączenia jest termodynamicznie niekorzystne ($\Delta G = +5$ kcal/mol).

Innym typem przekształcenia podwójnego heliksu zależnym od struktury wyższego rzędu czyli superheliksu jest tworzenie tzw. struktur krzyżowych w obszarach sekwencji polindromowych. Te ostatnie spotykane są dość często w DNA izolowanym z rozmaitych źródeł. Jednakże w cząsteczkach



Rys. 2. Schematyczny rysunek superhelikalnej cząsteczki DNA zawierającej krótką sekwencję zdolną do strukturalnego przekształcenia B—Z (A). Przekształcenie prawoskrętnego heliksu tej sekwencji w lewoskrętny powoduje zmniejszenie liczby superhelikalnych skrętów (B)

liniowych zawierających odcinki polindromowe nie można było wykryć obecności struktur krzyżowych. Wykryto je po raz pierwszy w 1978 roku w cząsteczkach superhelikalnych [21], skonstruowanych *in vitro* drogą ligacji fragmentów restrykcyjnych w taki sposób, aby połowa sekwencji kolistej cząsteczki było ułożona odwrotnie (palindromowo) w stosunku do identycznej sekwencji drugiej połowy cząsteczki. Gęstość superhelikalna okazała się dla tego procesu czynnikiem decydującym. Wkrótce potem udowodniono, że fizjologiczne wartości $-\delta$ wystarczają do formowania struktur krzyżowych w krótkich naturalnie występujących w przyrodzie palindromach [7, 22] (rys. 3). Cechą charakterystyczną tych struktur jest obecność jednoniciowej pętli, którą specyficznie rozpoznaje i hydrolizuje nukleaza S1. Wrażliwość na tę nukleazę pozwoliła opracować jedyną dotychczas znaną metodę obserwowania struktur krzyżowych tworzących się na obszarach krótkich, kilkunastonukleotydowych sekwencji.



Rys. 3. Przykład struktury krzyżowej tworzącej się w obszarze sekwencji polindromowej plazmidu pVH 51 [22] pod wpływem gęstości superhelikalnej ($-\delta$). Strzałki oznaczają miejsca specyficznym rozpoznawane przez nukleazę S1

UWAGI KOŃCOWE

Celem tego artykułu jest zwrócenie uwagi czytelników na kilka wybranych zagadnień ilustrujących dynamiczny rozwój badań, mający miejsce w ostatnim czasie z zakresu struktury kwasu dezoksyrybonukleinowego. Niektóre z przedstawionych tutaj doniosłych odkryć były poprzedzone i stymulowane przez wiele wspaniałych dokonań z dziedziny biologii molekularnej. Fizykochemicy i biolodzy molekularni badający strukturę DNA mieli bowiem możliwość stosowania technik będących podstawą inżynierii genetycznej. Mogli więc konstruować *in vitro* cząsteczki złożone z wygodnych do badań sekwencji i namnażać je *in vivo* w ilościach praktycznie nieograniczonych. Mogli sekwencjonować DNA co stworzyło możliwość używania do badań naturalnie istniejących w przyrodzie cząsteczek o znanej sekwencji. Po raz pierwszy było możliwe otrzymanie wystarczająco dużych ilości tetra lub heksanukleotydów do badań krystalograficznych. Pozwoliło to otrzymać kryształy tych cząsteczek i następnie zbadać ich strukturę. Funkcje biologiczne jakie spełniać mogłyby rozmaite formy strukturalne DNA *in vivo* nie są jednak jasne. W wielu przypadkach nie ma pewności czy odpowiednie warianty strukturalne w ogóle występują w żywych organizmach. Jednakże od czasu, kiedy Watson i Crick przedstawili model budowy cząsteczki B-DNA jako struktury jednolitej, monotonnej, gdzie jedyną zmienną była sekwencja nukleotydów, dokonany został ogromny postęp. Okazało się bowiem, że zależnie od sekwencji oraz wielu innych parametrów podwójny heliks przybierać może dramatycznie odmienne formy przestrzenne. Odkryto także struktury superhelikalne. Wielu współczesnych badaczy przypuszcza, że nie tylko sekwencja ale również organizacja cząsteczki DNA w przestrzeni może być źródłem trudnych dziś do jednoznacznego zdefiniowania sygnałów biologicznych regulujących procesy genetyczne. Przypuszczać należy, że najbliższe lata przynieść mogą wiele przełomowych rozstrzygnięć w tej dziedzinie.

LITERATURA

- [1] Watson J. D., Crick F. H. C. — *A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature (London) 171: 737, 1953.
- [2] Davidson J. N. — *Biochemia kwasów nukleinowych*. (tłum. polskie), PWRiL, Warszawa, str. 158, 1977.
- [3] Dux K., Chorąży M. — *Wstęp do biologii nowotworów*. PWN, Warszawa, str. 56, 1973.
- [4] Wang A. H.-J., Quigley G. J., Kolpak F. J., Crawford J. L., van Boom J. H., van der Marel G., Rich A. — *Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution*. Nature 282: 680-686, 1979.
- [5] Drew H., Takano T., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E. — *High-salt d(CpGpCpG), a left-handed Z' DNA double helix*. Nature 286: 567-573, 1980.
- [6] O'Connor T., Kilpatrick M. W., Klysik J., Larson J. E., Martin J. C., Single-

- ton C. K., Stirdivant S. M., Zacharias W., Wells R. D.— *Left-handed Z-DNA helices in polymers, restriction fragments, and recombinant plasmids*. J. Biomolec. Struct. Dynam. 1: 999-1009, Adenine Press, 1983.
- [7] Wells R. D., Erlanger B. F., Gray H. B. Jr., Hanau L. H., Jovin T. M., Kilpatrick M. W., Klysik J., Larson J. E., Martin J. C., Miglietta J. J., Singleton C. K., Stirdivant S. M., Venezia C. M., Wartell R. M., Wei C. F., Zacharias W., Zarlind D.— *Left-handed Z-DNA helices, cruciforms, and supercoiling*. Gene Expression, wyd. Alan R. Liss, Inc., New York, str. 3-18, 1983.
- [8] Klysik J., Stirdivant S. M., Larson J. E., Hart P. A., Wells R. D.— *Left-handed DNA in restriction fragments and a recombinant plasmid*. Nature 290: 672-677, 1981.
- [9] Klysik J., Stirdivant S. M., Singleton C. K., Zacharias W., Wells R. D.— *Effects of 5 cytosine methylation on the B-Z transition in DNA restriction fragments and recombinant plasmids*. J. Molec. Biol. 168: 51-71, 1983.
- [10] Wartell R. M., Klysik J., Hillen W., Wells R. D.— *Junction between Z and B conformations in a DNA restriction fragment: evaluation by Raman spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2549-2553, 1982.
- [11] Singleton C. K., Klysik J., Wells R. D.— *Conformational flexibility of junctions between contiguous B- and Z-DNAs in supercoiled plasmids*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2447-2451, 1983.
- [12] Stirdivant S. M., Klysik J., Wells R. D.— *Energetic and structural inter-relationship between DNA supercoiling and the right-to left-handed Z helix transitions in recombinant plasmids*. J. Biol. Chem. 257: 10159-10165, 1982.
- [13] Nordheim A., Lafer E. M., Peck L. J., Wang J. C., Stollar B. D., Rich A.— *Negatively supercoiled plasmids contain left-handed Z-DNA segments as detected by specific antibody binding*. Cell 31: 309-318, 1982.
- [14] Nordheim A., Rich A.— *Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences*. Nature 303: 674-679, 1983.
- [15] Lang M. C., Malfroy B., Freund A. M., Daune M., Leng M.— *Visualization of Z sequences in form V of pBR 322 by immuno-electron microscopy*. EMBO J. 1: 1149-1153, 1982.
- [16] Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R., Laipis P.— *The twisted circular form of polyoma DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53: 1104-1111, 1965.
- [17] Bauer W. R., Crick F. H. C., White J. H.— *Supercoiled DNA*. Sci. Amer. 243: 118-129, 1980.
- [18] Otter R., Cozzarelli N. R.— *Escherichia coli DNA Gyrase*. Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., 100: 171-180, 1983.
- [19] Singleton C. K., Klysik J., Stirdivant S. M., Wells R. D.— *Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions*. Nature 299: 312-316, 1982.
- [20] Peck L. J., Nordheim A., Rich A., Wang J. C.— *Flipping of cloned d(pCpG)_n·d(pCpG)_n DNA sequences from right-to left-handed helical structure by salt, Co(III), or negative supercoiling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4560-4564, 1982.
- [21] Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M. H., Ohmori H., Tomizawa J.— *DNA gyrase and DNA supercoiling*. Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol. 43: 35-40, 1978.
- [22] Panayotatos N., Wells R. D.— *Cruciform structures in supercoiled DNA*. Nature 289: 466-470, 1981.

ANDRZEJ JERZMANOWSKI

Instytut Biochemii

UW. Warszawa

CHROMOSOMY EUKARIOTYCZNE I STRUKTURA AKTYWNYCH GENÓW

WSTĘP

Chromosomy eukariotyczne są strukturami subkomórkowymi, w których zgromadzony jest cały jądrowy DNA, a więc przytłaczająca większość genów komórkowych. Poza chromosomami jądrowymi znajdują się tylko niewielkie genomy mitochondriów i chloroplastów.

W skład chromosomów wchodzi DNA, białka i RNA. Spośród białek część, zwana histonami, odpowiedzialna jest za przestrzenną organizację DNA w chromosomach. Histony są silnie zasadowymi białkami o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej. Występują w pięciu podstawowych klasach nazywanych: H1, H2a, H2b, H3 i H4. Pozostałe białka chromosomowe, zwane białkami niehistonowymi, pełnią bardzo zróżnicowane funkcje, od elementów strukturalnych (białka HMG, białka podporowe szkieletu chromosomalnego) przez enzymy (np. polimeraza RNA, DNaza) aż po występujące w ilości kilku kopii na genom białka regulatorowe. RNA w chromosomach jest przede wszystkim produktem bieżącej transkrypcji DNA. Być może pełni jeszcze jakąś rolę, np. strukturalną, lecz nie wykryto jej dotychczas.

Szczegóły struktury włókna chromosomowego rozstrzygnięto na przełomie lat 1974/1975, głównie w wyniku prac Kornberga, Hewisha i Burgoyne'a, Olinsów i Kluga i wsp. Struktura ta została omówiona w artykule w Kosmosie w 1978 roku [1]. Tutaj omówimy ją po krótko raz jeszcze by móc, na tej podstawie, zarysować postęp jaki się dokonał w badaniach nad strukturą i aktywnością chromosomów.

W 1973 roku Hewish i Burgoyne [2] a potem, w 1974 roku Noll [3] wykazali, że działanie na jądra komórkowe lub delikatnie wyizolowane chromosomy (tzw. chromatynę) endonukleazami, to jest enzymami przeciwnającymi DNA, powoduje uderzająco regularną fragmentację jądrowego DNA, przy czym powstające fragmenty stanowią całkowitą wielokrotność podstawowego odcinka o długości około 200 par zasad (p.z.). W 1974 roku Kornberg [4] zaproponował, że powtarzającą się, podstawową jednostkę strukturalną chromosomów jest oktamer białkowy zawierający po dwie cząsteczki każdego z czterech typów histonów: H2a, H2b, H3 i H4 (nazywanych histonami

rdzeniowymi), skompleksowany z odcinkiem DNA o długości około 200 p.z. Propozycja Kornberga opierała się na następujących przesłankach: 1) danych Hewisha i Burgoyne'a; 2) obserwacji, że na każde 200 p.z. DNA przypadają średnio po dwie cząsteczki każdego z histonów rdzeniowych (lecz tylko jedna cząsteczka histonu H1); 3) zdolności histonów H3 i H4 do tworzenia w roztworze tetrametrów: H₃₂-H₄₂ i 4) niezbędności wszystkich czterech histonów rdzeniowych do odtworzenia w procesie rekonstrukcji z DNA kompleksu, który daje obraz dyfrakcji promieni X zgodny z obrazem uzyskiwanym dla natywnej chromatyny. Niezależnym potwierdzeniem istnienia podjednostkowej struktury chromatyny były zdjęcia z mikroskopu elektronowego uzyskane przez Olinsów [5] przy zastosowaniu nowej techniki przygotowywania preparatów. Zdjęcia te pokazywały, że podstawowe włókno chromatynowe przypomina budową „perły nanizane na sznurek”. Wykazano, że regularne ziarnistości — „perły” — są identyczne z podstawową jednostką strukturalną chromosomów, zawierającą 200 p.z. DNA i po dwie kopie każdego z czterech histonów rdzeniowych. W 1975 roku podjednostkę chromosomową nazwano „nukleosomem”.

W następnych latach wykazano, że nukleosomy występują we wszystkich komórkach eukariotycznych. Strukturę nukleosomową wykazują również wewnątrzkomórkowe formy dwuniciowych DNA-wirusów (np. SV 40). Jedyne rodzaje komórek eukariotycznych, w których DNA nie jest zorganizowane w strukturę nukleosomową, to plemniki tych organizmów, w których w czasie spermatogenezy histony zastępowane są przez mniejsze i jeszcze bardziej zasadowe białka — protaminy.

W jądrze eukariotycznym co najmniej 85-90% DNA występuje w strukturze nukleosomowej. Procent ten nie zmienia się widocznie w cyklu komórkowym, między interfazą a metafazą. Również powtarzające się sekwencje DNA oraz aktywnie transkrybowane geny wykazują organizację nukleosomową.

HISTONY

Cztery histony rdzeniowe: H2a, H2b, H3 i H4 wykazują znaczne podobieństwo ogólnej budowy przestrzennej. Charakterystyczne dla tych białek jest zróżnicowanie cząsteczki na silnie zasadowy N-koniec nie mający regularnej struktury drugo- ani trzeciorzędowej i C-koniec o składzie aminokwasowym typowym dla białek globularnych, który wykazuje regularną strukturę trzeciorzędową o znacznej zawartości α -heliksu.

W histonach H3 i H4 sekwencja aminokwasowa całej cząsteczki jest konserwatywna ewolucyjnie. Cząsteczka H2b i najprawdopodobniej również H2a pod względem konserwatywności struktury pierwszorzędowej (sekwencji aminokwasowej) są typowymi hybrydami. W przypadku H2b fragment o dłu-

gości odpowiadającej 2/3 całej cząsteczki, leżący przy C-końcu, jest silnie konserwatywny, niewiele tylko mniej niż struktury pierwszorzędowe H3 i H4. Pozostała 1/3 cząsteczki przyległa do N-końca, o charakterze silnie zasadowym, wykazuje niewielką konserwatywność struktury pierwszorzędowej.

Inny typ budowy reprezentuje histon H1. Ma on około dwukrotnie większą masę cząsteczkową niż histony rdzeniowe i występuje w jednej kopii na nukleosom. Cząsteczki histonu H1 mają centralny, globularny rdzeń rozciągający się od pozycji 45 do pozycji 117 (pozycje aminokwasów określone arbitralnie dla cząsteczek H1 z różnych źródeł ułożonych według sekwencji homologicznych), zawierający w większości aminokwasy hydrofobowe. W centralnym rdzeniu H1 sekwencja aminokwasowa jest silnie konserwatywna. Większość H1 z różnych źródeł wykazuje w tym obszarze sekwencje identyczne lub bardzo zbliżone. W kierunku N-końca (rejon od pozycji 1 do 44, według ułożenia arbitralnego) w cząsteczce H1 występuje obszar o małej konserwatywności sekwencji, bogaty w aminokwasy zasadowe oraz w alaninę, prolinę i serynę. Od hydrofobowego rdzenia H1 w stronę C-końca rozciąga się drugi obszar zasadowy (pozycje 120-263). Jest to obszar bogaty w lizynę i alaninę z dużą ilością leżących pomiędzy nimi reszt proliny. Sekwencja zasadowych rejonów C-końcowych jest mniej konserwatywna niż środkowej części globularnej, ale bardziej niż fragmentów N-końcowych.

W komórkach istnieją warianty sekwencyjne histonów. Dotyczy to w szczególności histonów H2b i H2a oraz H1. Rozwój jaja jeżowca stanowi klasyczny przykład zmian H2b w toku różnicowania. Komórki wczesnego stadium gastruli zawierają tylko jeden, główny typ H2b. Już w późnej gastruli występuje kilka wyraźnych wariantów sekwencyjnych H2b. Po zakończeniu różnicowania tkankowego typowa komórka diploidalna zawiera znowu tylko jeden, dominujący wariant H2b, jest on jednak inny niż którykolwiek z wariantów z rozwoju embrionalnego. Ilość wariantów sekwencyjnych histonu H1 jest największa wśród wszystkich typów histonów. Warianty występują nie tylko wśród H1 pochodzących z odległych grup systematycznych i różnych tkanek bądź stadiów rozwojowych, lecz również w obrębie tkanki jednego typu. Przykładowo większość tkanek ssaczy zawiera od 3 do 6 wariantów sekwencyjnych H1.

ODDZIAŁYWANIA HISTONÓW RDZENIOWYCH

Pochodzące głównie z pracowni D'Anna i Isenberga [6] oraz Thomas [7] wyniki badań nad kompleksowaniem, czyli specyficznymi oddziaływaniami między histonami rdzeniowymi zachodzącymi w roztworach, okazały się bardzo przydatne dla interpretacji danych dotyczących struktury chromatyny. Wspominaliśmy już, że zdolność H3 i H4 do tworzenia tetramerów:

H3₂-H4₂ była jedną z kilku podstawowych przesłanek koncepcji podjednostkowej budowy chromatyny.

Histony rdzeniowe kompleksują ze sobą tylko w stanie całkowitego zrenaturowania. Do tworzenia kompleksów nie dochodzi w wodzie bez soli. Kompleksy nie tworzą się również w warunkach, w których zachodzi niespecyficzna agregacja. Badanie powstawania kompleksów między oczyszczonymi histonami w wodnych roztworach soli doprowadziło do ustalenia następującej ich hierarchii. Silne oddziaływania występują między H2a a H2b oraz między H2b a H4, prowadząc do powstawania par (dimerów): H2a-H2b oraz H2b-H4, jak również między H3 a H4, prowadząc do powstania tetrameru: H3₂-H4₂. Słabe oddziaływania występują między H2a a H3, zaś zupełnie nikłe między H2a a H4 oraz między H2b a H3 (rys. 1).

	H2a	H2b	H3	H4
H2a		++++	++	+
H2b	++++		+	++++
H3	++	+		++++
H4	+	++++	++++	

Rys. 1. Oddziaływania między histonami rdzeniowymi w roztworze.

Identyczną hierarchię oddziaływań ustalono dla histonów izolowanych ze zwierząt, roślin, grzybów i pierwotniaków. Co więcej, hierarchia ta jest zachowana dla układów mieszanych, w których jeden histon jest pochodzenia np. zwierzęcego a drugi roślinnego. Jest to dowód na to, że powierzchnie oddziaływające histonów stanowią wybitnie konserwatywny element w ewolucji tych białek. Wiadomo, że pokrywają się one w większości z C-końcowymi, globularnymi fragmentami histonów. Fragmenty N-końcowe są nieistotne dla oddziaływań międzyhistonowych.

Tworzenie kompleksów międzyhistonowych prowadzi do wyraźnego zwiększenia zawartości α -heliksu w cząsteczkach histonów. W roztworach o dużym stężeniu soli (2M NaCl) histony rdzeniowe tworzą oktamerami o składzie: (H2a, H2b, H3, H4)₂, identyczne z oktamerami histonowymi w natywnych nukleosomach.

KONFORMACJA I ODDZIAŁYWANIA HISTONU H1

W roztworze o dużym stężeniu soli cząsteczka H1 ma centralny, globularny rdzeń i sterzącą zeń w stronę N- i C-końca dwa rejony zdestrukturu-

realizowane. Zrenaturowany H1 wiąże się kooperatywnie z nukleosomami. W przeciwieństwie jednak do histonów rdzeniowych zrenaturowany H1 nie tworzy ani niespecyficznych agregatów ani specyficznych kompleksów ze sobą lub z innymi histonami. Ważne jest również to, że zdolności do kompleksowania i agregacji nie wykazują również same części globularne cząsteczki H1, uzyskane przez odcięcie zdestrukturalizowanych, N- i C-końcowych ogonów. Świadczy to o tym, że zadania H1 w chromatynie nie są realizowane poprzez oddziaływania H1-H1 (chyba, że pewne postsyntetyczne modyfikacje H1 zmieniałyby tę zasadę). Wykazano natomiast zdolności H1 do oddziaływań z niektórymi białkami niehistonowymi.

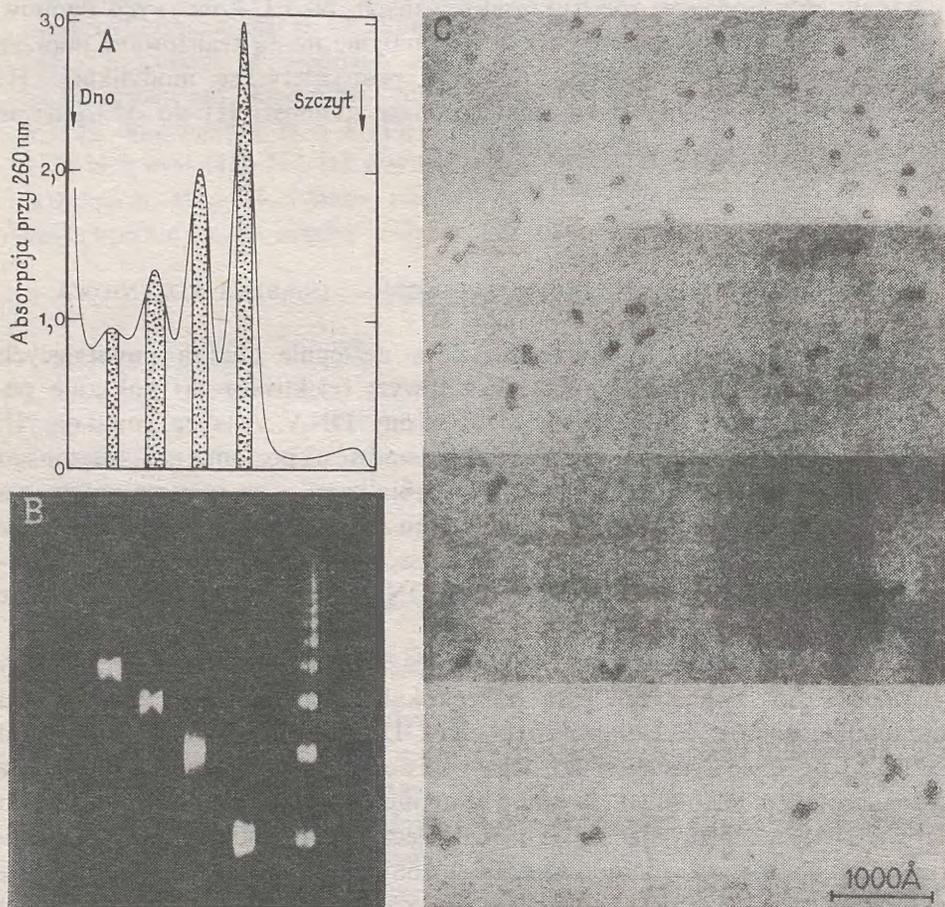
WEWNĘTRZNA STRUKTURA NUKLEOSOMU — CZĄSTKA RDZENIOWA

Trawienie chromatyny endonukleazą a następnie analiza powstających fragmentów DNA w żelu poliakrylamidowym (elektroforeza) pokazuje periodyczność budowy chromosomów od strony DNA. Analizę powstających produktów trawienia można również przeprowadzić na poziomie nienaruszonego nukleoproteidu — czyli kompleksu DNA z białkami — za pomocą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy. Z gradientu uzyskuje się homogenne frakcje mono-, di-, tri-, tetra- i wyższych oligonukleosomów, których skład potwierdza zarówno analiza zawartego w nich DNA, jak i obraz w mikroskopie elektronowym (rys. 2).

Delikatne trawienie chromatyny nukleazą (zwykle używa się nukleazy z *Micrococcus*, zwanej nukleazą mikrokokalną) prowadzi do powstawania mononukleosomów zawierających odcinek DNA o długości średnio około 200 p.z., po dwie cząsteczki każdego z histonów H2a, H2b, H3 i H4 oraz jedną cząsteczkę histonu H1. W miarę postępującego trawienia mononukleosom tej wielkości nie nagromadza się jednak, lecz przekształca w cząstkę zawierającą około 168 p.z. DNA, oktamer złożony z histonów rdzeniowych oraz cząsteczkę H1. Cząstkę tę nazywa się chromatosomal. Pod względem długości zawartego w niej DNA jest ona, dla chromatyn z różnych organizmów, bardziej jednolita aniżeli nukleosom. Również i chromatosomal jest niestabilny i w trakcie trawienia przekształca się w produkt zwany „nukleosomową cząstką rdzeniową”, zawierający odcinek DNA o długości 146 p.z. oraz oktamer złożony z histonów rdzeniowych. Cząstka rdzeniowa nie zawiera H1 i jest stosunkowo stabilnym produktem trawienia chromatyny. Jej skład i budowa są identyczne w chromatynach z różnych źródeł. Ze względu na łatwość otrzymania i jednolitość składu, cząstki rdzeniowe są podstawowym materiałem do badania wewnętrznej struktury nukleosomu.

DNA przebiega na zewnątrz cząstki rdzeniowej. Dowodem na to jest z jednej strony podatność DNA na trawienie nukleazami, szczególnie DNazą I, z drugiej — wyniki pomiarów fizykochemicznych. Cząstka rdzenio-

wa jest w przybliżeniu spłaszczonym dyskiem o średnicy ok. 10 nm i wysokości 5,5 nm, wykazującym parzystą symetrię względem osi zaznaczonej na rysunku 3. Odcinek DNA owinięty jest wokół oktameru histonowego w postaci lewoskrętnej superspirali tworząc $1\frac{3}{4}$ pełnego skrętu z około

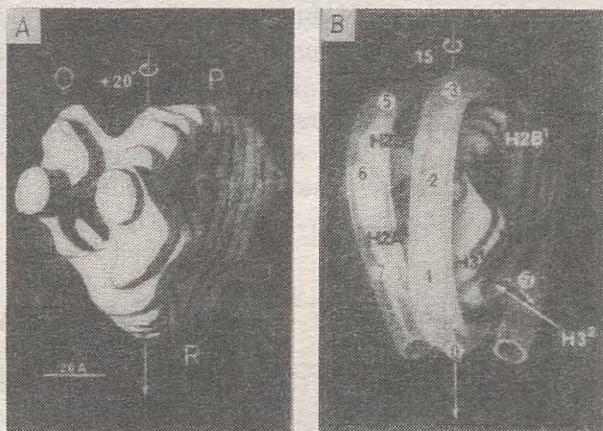


Rys. 2. Preparatyka odcinków chromatyny o określonej długości. A — Wirowanie w gradiencie gęstości sacharyzy, B — Analiza długości odcinków DNA we frakcjach z gradientu sacharozowego metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. C — Analiza frakcji z gradientu sacharozowego w mikroskopie elektronowym (od góry: frakcje monomerów, dimerów, trimerów i tetramerów). Wg Finch J.T. i in., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3320-3322, 1975 (za pozwoleniem autorów)

80 p.z. przypadającymi na skręt. Odległość między skrętami (skok superspirali) wynosi 2,7 nm. Owinięcie DNA wokół rdzenia histonowego nie powoduje naruszenia granicznych warunków dotyczących kątów między wiązaniami i odległości międzyatomowych heliksu w formie B. Energia

potrzebna do owinięcia 146 p.z. DNA w formie B wokół cząstki rdzeniowej wynosi ok. 25 kcal na mol nukleosomu.

DNA cząstki rdzeniowej jest dostępny dla szeregu nukleaz. DNaza I (dezoksyrybonukleaza trzustkowa) i DNaza II (dezoksyrybonukleaza ze śledziony) dokonują w rdzeniowym DNA jednoniciowych nacięć w miejscach odległych do 10 nukleotydów. Elektroforeza produktów takiego trawienia w żelu denaturującym daje charakterystyczny obraz „drabinki” złożonej



Rys. 3. A — Model oktameru histonowego (bez DNA) otrzymany metodą trójwymiarowej konstrukcji obrazu z mikroskopu elektronowego; oś parzystej symetrii zaznaczona strzałką. B — Brzozy na powierzchni modelu tworzą lewoskrętną, helikalną ścieżkę, wzdłuż której można owinać 1,8-2,0 zwoje superhelikalnego DNA; odległość wzdłuż DNA opisano numerami od -7 do +7 z początkiem na osi symetrii, dla oznaczenia 14 powtórzeń podwójnej helisy DNA, przypadających na 146 par zasad w nukleosomie; zaznaczono również położenie poszczególnych histonów. Wg: Klug A. i in., *Nature* (London) 287: 509-516, 1980 (za pozwoleniem autorów)

z odcinków stanowiących całkowite wielokrotności fragmentu o długości 10 nukleotydów. Regularność nacięć jednoniciowych dokonywanych przez wspomniane nukleazy odzwierciedla periodyczność struktury samego DNA, w którym okres powtarzalności wynosi właśnie 10 p.z. (dla formy B). Szczegółowa analiza kinetyki nacięć wskazuje, że niektóre miejsca w DNA cząstki rdzeniowej są bardziej niż inne podatne na działanie enzymu. Zatem o ich podatności musi również decydować histonowe otoczenie. Na podstawie obserwacji, że częstość przecinania przez DNazę I jest taka sama lub zbliżona dla par miejsc odległych od siebie o około 70–90 p.z. (w szczególności silnie ochraniają się miejsca odległe o 30 i 110 p.z. od 5' końca) zaproponowano, że pojedynczy superskręt DNA wokół cząstki

rdzeniowej zawiera 80 p.z. Miejsca odległe o ten odcinek powinny znajdować się w bliskim sąsiedztwie na powierzchni oktameru białkowego.

Mimo, że obszar DNA związany bezpośrednio z częścią rdzeniową jest w chromatynie stosunkowo najmniej podatny na atak nukleolityczny, to jednak około 40% wiązań fosfodwuestrowych w tym DNA przecinanych jest przez taką lub inną nukleazę. Badania z użyciem próbników chemicznych i spektroskopii ramanowskiej wykazały, że większa bruzda DNA w części rdzeniowej nie jest zaangażowana w oddziaływania z histonami i pozostaje całkowicie dostępna dla innych oddziaływań, np. z białkami niehistonowymi. Wydaje się, że oddziaływania DNA-histony zachodzą głównie w mniejszej bruzdzie. Również sam DNA na powierzchni rdzenia histonowego zachowuje znaczną swobodę ruchów lokalnych. Zatem struktura cząstki rdzeniowej, mimo swej stosunkowo znacznej stabilności, nie stanowi poważnej przeszkody ani w lokalnych ruchach DNA ani w oddziaływaniu z innymi białkami. Nie oznacza to oczywiście, że nie istnieją procesy (jednym z nich może być transkrypcja), dla których stanowi wystarczającą zawadę.

UŁOŻENIE HISTONÓW W RDZENIU — MIEJSCA ODDZIAŁYWAŃ Z DNA

Tetramer $H3_2-H4_2$ pełni szczególną rolę w generowaniu cząstki rdzeniowej. W zasadzie już sam tetramer wystarcza do owinięcia około 145 p.z. DNA i utworzenia struktury zbliżonej do cząstki rdzeniowej. Podobnych właściwości nie mają same histony $H2a$ i $H2b$.

Histony w oktamerze rdzeniowym oddziałują ze sobą C-końcowymi fragmentami globularnymi o wysokiej konserwatywności ewolucyjnej sekwencji aminokwasowych. Co ciekawsze, odcięcie zasadowych N-końców nie zmienia w zasadzie struktury cząstki rdzeniowej. Wskazuje to, iż zasadowe N-końce nie tylko nie biorą udziału w tworzeniu oktameru, ale odgrywają również ograniczoną rolę w wiązaniu DNA. Tym niemniej w histonach $H3$ i $H4$ są one wysoce konserwatywne w swej sekwencji aminokwasowej, są więc prawdopodobnie zaangażowane w inne, bardzo specyficzne oddziaływania (być może z powierzchniami białkowymi sąsiadujących nukleosomów lub z globularną częścią histonu $H1$). Co się tyczy wiązania DNA wydaje się, że powierzchnia oktameru wyposażona musi być w bardzo precyzyjnie rozmieszczone obszary zawierające dodatnio naładowane reszty aminokwasów zasadowych zdolne do elektrostatycznych oddziaływań z fosforanami łańcucha polinukleotydowego.

ROZMIESZCZENIE HISTONU $H1$

Histon $H1$ stabilizuje pozycje końców DNA na powierzchni cząstki rdzeniowej. W obecności histonu $H1$ DNA „wchodzi” i „schodzi” po tej samej stronie cząstki rdzeniowej, a oba końce ułożone są pod tym samym

kątem do osi podłużnej rdzenia. Histon H1 musi być również związany z odcinkiem DNA łączącym nukleosomy w chromatynie, zwanym „linkerem”. Konserwatywność sekwencji aminokwasowej w globularnej części H1 może świadczyć albo o zachodzeniu oddziaływań z równie konserwatywnymi fragmentami białkowymi oktameru rdzeniowego, albo o konieczności zapewnienia szczególnej konformacji, niezbędnej do optymalizacji oddziaływań z DNA.

Wspominaliśmy już, że cząsteczki H1 nie wykazują zdolności ani do agregacji, ani do kompleksowania w roztworach. Tym niemniej w chromatynie występują w bezpośredniej styczności jedna z drugą.

Szczególnie charakterystyczną cechą H1 jest jego wpływ na zdolność chromatyny do kontrakcji pod wpływem zmiany stężenia kationów. Tylko chromatyna zawierająca H1 ulega kontrakcji przy przejściu krytycznego stężenia soli. W tym samym, krytycznym punkcie stężenia soli następuje zmiana sposobu wiązania H1 z DNA z niekooperatywnego na kooperatywny.

NUKLEOSOMY W CHROMATYNIE

Wśród problemów dotyczących wzajemnych relacji między nukleosomami w chromatynie do najważniejszych należy problem fazy oraz problem średniej długości powtarzalnej. Problem fazy sprowadza się do pytania o specyficzność lub brak specyficzności rozmieszczenia nukleosomów w stosunku do sekwencji DNA. Wprawdzie badania *in vitro* na układach rekonstruowanych wskazują, że oddziaływania prowadzące do tworzenia nukleosomów są niezależne od sekwencji, to jednak nie można wykluczyć, że w układach natywnych pewne dodatkowe czynniki (np. białka niehistonowe) mogą predeterminować rozmieszczenie nukleosomów w stosunku do określonej sekwencji DNA. Ze względu na geometrię włókna nukleosomowego wystarczy prawdopodobnie zdeterminowanie miejsca pierwszego nukleosomu, by określić również fazę pewnej ilości nukleosomów leżących za nim. Tego rodzaju „ustalenie ramki” mogłoby mieć duże znaczenie w regulacji np. aktywności transkrypcyjnej DNA chromatyny. Dotychczasowe badania wskazują, że ustalenie ramki lub „fazowanie” nukleosomów ma rzeczywiście miejsce. Wykazano fazowanie nukleosomów na DNA satelitarnym szczura, na genach 5S RNA żaby *Xenopus* i *Drosophila*, na genach tRNA w chromatynie erytrocytów kurczęcia, na stałym rejonie genu lekkiego łańcucha kappa immunoglobulin myszy. Interesująca jest obserwacja Weintrauba i Groudine'a [8] wskazująca, że nukleosomy ułożone są w ustalonych w stosunku do sekwencji miejscach na i wokół genu embrionalnej β -globiny w erytrocytach kurczęcia, w których gen ten nie jest wyrażany, natomiast w komórkach mózgowych, gdzie gen embrionalnej β -globiny również nie jest transkrybowany, nukleosomy ułożone są na nim w sposób przypadkowy. Ten przykład wskazuje na ewentualne,

regulacyjne znaczenie fazowania nukleosomów w procesie różnicowania.

W przypadku średniej długości powtarzalnej chodzi o wielkość odcinka DNA związanego z chromatynową podjednostką nukleosomową. Waha się ona od 166 p.z. dla drożdży (co odpowiada długości DNA w chromatosome, w drożdżach brak jest zatem międzychromatosomalnych łączników) do 246 p.z. w plemnikach jeżowca (łącznik ma tu długość ok. 80 p.z.). Różnice mogą również dotyczyć średniej długości powtarzalnej w obrębie chromatyny jednego rodzaju. Na przykład geny 5S RNA w erytrocytach *Xenopus* zorganizowane są w nukleosomy o średniej długości powtarzalnej 175 p.z. podczas, gdy średnia długość powtarzalna dla całej chromatyny *Xenopus* (jak również średnia długość powtarzalna dla genów 5S RNA w wątrobie *Xenopus*!) wynosi 189 p.z. Zaobserwowano, że średnia długość powtarzalna ulega zmianie w czasie erytropoezy u kurczęcia. Podobnie, jak w przypadku fazowania wskazuje to na związek między strukturą chromatyny a dyferencjacją.

STRUKTURY WYŻSZEGO RZĘDU W CHROMOSOMACH — WŁÓKNO 30 nm

Rozciągnięte włókno nukleosomowe o grubości 10 nm (tj. odpowiadające średnicy nukleosomu) widoczne jest tylko w preparatach chromatyny zawieszonych w małym stężeniu soli, np. od 0 do 5 mM NaCl i w obecności związków chelatujących kationy dwuwartościowe. W fizjologicznym stężeniu soli (120-160 mM Na⁺ lub K⁺ i 1-2 mM Mg²⁺) większość chromatyny występuje w postaci tak zwanego włókna grubego, o grubości 25-30 nm. Określa się je również mianem włókna chromatynowego lub „włókna 30 nm”. Odwracalne przejścia między włóknem 10 nm a włóknem 30 nm następuje pod wpływem zmiany stężenia soli. Istnienie włókna 30 nm po raz pierwszy wykazane przez Fincha i Kluga [9] za pomocą mikroskopii elektronowej w izolowanych preparatach chromatyny, zostało również udokumentowane metodami dyfrakcyjnymi na żywych komórkach, jądrach komórkowych i chromosomach mitotycznych. Dane zebrane do tej pory wskazują, że włókno 30 nm jest superspiralą (solenoidem) powstałą przez zwinięcie cienkiego (10 nm) włókna chromatynowego. Przy średnicy 30 nm i skoku 10-11 nm solenoid zawiera 6-7 nukleosomów na skręt. Przyjmuje się, że zarówno średnica jak skok solenoidu wykazują lokalne nieregularności.

Kluczowe dla poznania wewnętrznej struktury solenoidu jest określenie orientacji w stosunku do osi podłużnej włókna, płaszczyzn nukleosomów oraz rozmieszczenie histonu H1. Nukleosom można traktować w przybliżeniu, jako dysk o brzegu wysokości 5,5 nm i powierzchniach twarzowych o średnicy około 10 nm. Skok spirali solenoidu (10-11 nm) wskazuje, że nukleosomy stykają się brzegiem dysków, zaś ich powierzchnie twarzowe są zorientowane

mniej więcej równoległe do osi włókna. Szczegółowe modele uwzględniają od 20 do 40° odchylenia powierzchni twarzowych od osi podłużnej włókna.

Obecność H1 jest niezbędna, aby solenoid mógł się wytworzyć przy przejściu z mniejszego do większego stężenia soli. Bez H1 chromatyna ulega wprawdzie pewnej kontrakcji w zwiększonym stężeniu soli, ale powstające struktury są mało uporządkowane. Znaczenie H1 dla tworzenia się solenoidu w połączeniu z danymi o bliskim sąsiedztwie cząsteczek H1 w chromatynie wskazuje na możliwość udziału oddziaływań H1-H1 w stabilizacji struktur wyższego rzędu. Nie wyklucza to roli w stabilizacji solenoidu również innych oddziaływań, np. między histonami rdzeniowymi a DNA sąsiadujących nukleosomów. Mogłoby to uzasadniać istnienie zasadowych „ogonów” histonów rdzeniowych, których rola w utrzymywaniu nukleosomu jest trudna do stwierdzenia.

STRUKTURA CHROMOSOMU METAFAZALNEGO

Osiągnięcie stopnia skondensowania DNA właściwego dla chromosomu metafazalnego wymaga jeszcze około 100-200-krotnego upakowania włókna 30 nm. Najwięcej dowodów przemawia w tej chwili za tak zwaną „domenową budową chromosomów” określaną też, jako „model promienistych pętli”. Model ten przedstawia chromosom, jako strukturę zbudowaną ze zbioru pętli (domen), z których każda zawiera od 30 do 70 tysięcy p.z. DNA zorganizowanych we włókno 30 nm. Domeny przytwierdzone są do pewnej, osiowej struktury podporowej, na której ułożone są w określonym, liniowym porządku.

Najważniejsze dowody na istnienie autonomicznych, kolistych domen chromosomowych pochodzą z analizy sedymentacyjnej i z mikroskopii elektronowej. Delikatna liza jąder komórkowych pochodzących z różnych komórek eukariotycznych i wirowanie ostrożnie odbiałzonego DNA (chodzi tu przede wszystkim o usunięcie histonów) w odpowiednio gęstych ośrodkach, wykazuje istnienie kolistych DNA o wielkości kilkudziesięciu tysięcy par zasad. Szybkość sedymentacji takich preparatów zmniejsza się po wprowadzeniu do cząsteczki DNA nacięć oraz pod wpływem związków interkalujących z DNA (np. bromku etydy). Są to właściwości odpowiadające kolistym cząsteczkom DNA o strukturze superhelikalnej. Na zdjęciach z mikroskopu elektronowego chromosomów metafazalnych, z których usunięto histony za pomocą delikatnej ekstrakcji 2 M NaCl, widać wyraźnie pętlową organizację chromosomowego DNA, przy czym liczące około 50 tysięcy p.z. pętle utrzymywane są przez związanie z centralnym rusztowaniem białkowym. Białkową naturę tego ostatniego udowodniono na podstawie wrażliwości na czynniki denaturujące lub hydrolizujące białka. Większość dowodów na domenową strukturę chromosomów, uzyskanych za pomocą mikroskopii

elektronowej, pochodzi z prac Laemmliego i jego współpracowników [10].

Ważnym dowodem pętlowej struktury chromosomów są również obserwacje Rattnera i wsp. [11], którzy badali kondensację chromatyd w profazie mejotycznej u *Bombyx mori*. Zaobserwowali oni w jądrze wyraźne pętle zbudowane z włókna 30 nm, ułożone jedna za drugą w pewnym liniowym porządku. W trakcie postępującej kondensacji, podczas fazy leptotenu i zygotenu, pętle były coraz wyraźniej ściągane do centralnej osi, która w pachytenie uległa ostatecznie przekształceniu w wyraźny element osiowej struktury chromosomu. Po pierwszej metafazie mejotycznej chromosom uległ skróceniu wzdłuż podłużnej osi, bez zmiany długości pętli.

Dodatkowe dane przemawiające za domenową strukturą chromosomów pochodzą z analizy dwóch szczególnego rodzaju typów chromosomów. Jednym z nich są chromosomy politeniczne, drugim — chromosomy szczoteczkowe. Chromosomy politeniczne odkryte po raz pierwszy w gruczołach śliniankowych larw owadów (np. *Drosophila*), ale występujące również w oocytach innych zwierząt, zawierają kilkaset razy powieloną nić chromosomalnego DNA (np. u *Drosophila* 1024 razy). Poszczególne kopie genomu składające się na chromosom politeniczny pozostają w stosunku do siebie w idealnej zgodności wszystkich pozycji, są tylko przesunięte równolegle w stosunku do osi podłużnej chromosomu. Wszystkie poprzeczne szczegóły struktury chromosomu są dzięki temu zwielokrotnieniu jak gdyby powiększone i stanowią szczególnie dogodny obiekt analizy. Ciemne i jasne, poprzeczne prążki na tych chromosomach odpowiadają bardziej i mniej skondensowanemu DNA. Obszary aktywnych transkrypcyjnie genów odpowiadają na chromosomach politenicznych tak zwanym pufom, strukturom znanym od dawna cytologom. Szczegółowa analiza mikroskopowa pufów wykazała obecność w nich pętli aktywnego transkrypcyjnie DNA. Jeszcze wyraźniej, bo w zwykłym mikroskopie świetlnym pętle widoczne są w chromosomach szczoteczkowych z oocytów płazów. Znajdujące się w fazie diplotenu chromosomy szczoteczkowe, oprócz oocytów płazów, występują również w innych komórkach, roślinnych i zwierzęcych.

Powyższe dowody przemawiają wprawdzie silnie za domenową organizacją DNA w chromosomie, nie umożliwiają jednak jeszcze osiągnięcia zgody co do relacji między strukturami obserwowanymi przy użyciu różnych metod i w różnych materiałach. Czy pętle w chromosomach szczoteczkowych i pufach chromosomów politenicznych oraz pętle obserwowane w chromosomach metafazalnych po usunięciu histonów — to jedna i ta sama struktura? Jeśli tak, czy jest ona identyczna z domenami obserwowanymi w analizie sedimentacyjnej? Podobnie brak jest zgodności w sprawie składu i własności białek należących do chromosomowych struktur podporowych.

Wśród białek struktur podporowych zidentyfikowanych do tej pory na szczególną uwagę zasługuje białka przypominające charakterem laminy. Te ostatnie są białkami o masie cząsteczkowej rzędu 60-80 kilodaltonów,

tworzącymi siateczkowatą strukturę między wewnętrzną błoną jądrową a peryferyjną warstwą chromatyny. Drugą interesującą grupą są metaloproteidy zawierające Cu^{2+} i Ca^{2+} . Odwarcalne wiązanie metalu z tymi białkami wydaje się mieć wpływ na unieruchamianie i relaksację końców domen. Wymienione metaloproteidy mogłyby odgrywać kluczową rolę w regulacji stanu skondensowania chromosomów. W przeciwieństwie do lamin, które odnajdywane są tylko w strukturach podporowych chromosomów interfazalnych, metaloproteidy występują również w szkieletach białkowych izolowanych z chromosomów metafazalnych.

Znaczenie domen, jako jednostek nie tylko struktury, ale być może również transkrypcji i replikacji w ciągłej cząsteczce chromosomowego DNA, wzbudza zainteresowanie rozmieszczeniem w nich charakterystycznych sekwencji. Dotychczas stwierdzono wzbogacenie obszarów DNA znajdujących się u nasady domen i oddziaływujących z białkami podporowymi w powtarzające się sekwencje. Nieprzypadkowy rozkład w stosunku do obszaru domeny wykazują geny ludzkie α - i β -globiny, jak również sekwencje wirusowe w genomie myszy transformowanej wirusem SV 40.

TRÓJWYMIAROWA ARCHITEKTURA JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Jak rozmieszczone są chromosomy w jądrze komórkowym? Można tu rozważać kilka istotnych kwestii: a) Jak w przestrzeni jądra przebiegają osie chromosomów? b) Czy rozmieszczenie chromosomów w jądrach jest powtarzalne, to znaczy czy określone rejony chromosomów w jądrach komórek tego samego gatunku zajmują stale to samo miejsce? c) Jaka jest funkcja błony jądrowej w utrzymywaniu topologii chromosomów? d) Czy istnieje relacja między umiejscowieniem rejonu chromosomu w jądrze a jego funkcją? Dotychczasowe dane uzyskane głównie z badań wykonanych metodą stanowiącą odpowiednik tomografii komputerowej, na jądrach politenicznych z gruczołów śliniankowych *Drosophila* wskazuje, że ułożenie chromosomów w jądrze jest ściśle powtarzalne z pokolenia na pokolenie. Chromosomy tworzą w przestrzeni jądra siatkę o wyraźnej geometrii złożoną z wzajemnie zplecionych zwojów oraz z odcinków równoległych przy czym gros tych struktur znajduje się w pobliżu błony jądrowej pozostawiając wolną przestrzeń w środku jądra. Tylko około 30% tej wolnej przestrzeni zajmuje jąderko. Jądra z komórek tej samej tkanki wykazują identyczne rozmieszczenie chromosomów. Specyficzność tego rozmieszczenia zapewniają oddziaływania międzychromosomowe, a w znacznie mniejszym stopniu oddziaływanie z błoną jądrową.

STRUKTURA OBSZARÓW CHROMATYNY ZAWIERAJĄCYCH GENY AKTYWNE
TRANSKRYPCYJNIE

Podstawowym celem badań nad strukturą aktywnych genów w chromatynie jest odpowiedź na pytanie: czy zorganizowane są one w strukturę nukleosomową, a jeśli tak — czym różni się ona od struktury nukleosomowej genów nieaktywnych? W badaniach tych stosuje się zarówno bezpośrednie metody mikroskopii elektronowej pozwalające na obserwacje obszarów aktywnych bez uprzedniego wydzielenia ich z pozostałej chromatyny (np. pierścienie Bialbianego w chromosomach politenicznych lub pętle transkrypcyjne w chromosomach szczoteczkowych), jak i metody biochemiczne wymagające wstępnego frakcjonowania chromatyny na aktywną i nieaktywną. Rozwój technik inżynierii genetycznej znacznie wzbogacił możliwości tych ostatnich. Użycie sklonowanych genów lub ich fragmentów jako sond molekularnych czyni możliwym badanie struktury i losów konkretnych genów w całej chromatynie.

W mikroskopie elektronowym badano obszary chromatynowego DNA o różnym stopniu aktywności transkrypcyjnej, od całkowicie nieaktywnej heterochromatyny poprzez odcinki o umiarkowanej aktywności aż po superaktywne transkrypcyjnie DNA. Badano zarówno aktywne transkrypcyjnie geny rybosomalnego DNA (np. w chromatynie z oocytów żaby *Xenopus laevis*), jak i geny kodujące białka (np. w pętlach transkrypcyjnych chromosomów politenicznych i szczoteczkowych). Interpretację uzyskanych obrazów komplikują w pewnym stopniu elementy artefaktowe wprowadzane przez technikę Millera stosowaną powszechnie przy przygotowywaniu preparatów. Stosowanie małej siły jonowej i detergentów powoduje sztuczną likwidację struktury ponadnukleosomowej (solenoidu) oraz rozluźnienie struktury nukleosomowej przejawiające się w spadku upakowania DNA (stosunek całkowitej długości DNA do długości odcinka chromatyny, w którym jest zawarty) z ok. 5 w natywnej chromatynie do ok. 2. Preparaty sporządzone techniką Millera z chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie ukazują typową, paciorkową organizację DNA we włóknie nukleosomowym. Włókno jest tylko bardziej rozciągnięte niż w natywnych preparatach a poszczególne nukleosomy nie upakowane blisko siebie, lecz przedzielone różnej długości odcinkami DNA. Daje to w rezultacie wspomniany wyżej, nienaturalnie mały stopień upakowania DNA we włóknie. W przypadku aktywnych transkrypcyjnie genów rybosomalnych na obrazach z mikroskopu elektronowego nie widać nukleosomów a stopień upakowania DNA zmniejsza się do około 1,1. Jest to więc praktycznie całkowicie rozciągnięty DNA, pozbawiony zupełnie struktury nukleosomowej. Czy jest to goły DNA? Analiza biochemiczna wykazuje, że jest on nadal zasocjowany z białkami zasadowymi. Ostatnio jednak pojawiły się nowe dowody na to, że w szybko transkrybowanych genach rybosomalnego DNA w oocytach żaby *Xenopus*, jak również w minichromosomach

zawierających rybosomalny DNA u *Dictyostelium*, DNA może być istotnie niezasocjowany z żadnym białkiem poza polimerazą RNA.

Brak struktury paciorkowej i wyraźnego upakowania wykazują nie tylko geny rybosomalne o pełnej aktywności transkrypcyjnej, lecz również te geny rybosomalne, które znajdują się bezpośrednio przed lub zaraz po procesie aktywnej transkrypcji. Z kolei nieaktywne geny rybosomalnego RNA w jąderku wykazują typową strukturę paciorkową o normalnym (z uwzględnieniem poprawki wynikającej ze stosowania techniki Millera) stopniu skondensowania. Powyższe dane wskazują, że rozciągnięta, niepaciorkowa struktura DNA aktywnych genów nie jest konsekwencją zachodzącego procesu transkrypcji, lecz raczej predeterminuje go i powodowana jest przez jakieś inne, wcześniej działające czynniki.

W przypadku aktywnych transkrypcyjnie genów nierybosomalnych stwierdzono również znaczne zmniejszenie upakowania DNA i brak struktury paciorkowej. Jednakże w genach o zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej pojawiają się nukleosomy, choć ich gęstość na jednostkę długości DNA (4-5 na μm) jest znacznie mniejsza niż w nieaktywnej chromatynie (28 na μm). Wydaje się, że w przeciwieństwie do genów rybosomalnego RNA, w genach kodujących białka gęstość nukleosomów w transkrybowanym odcinku DNA jest odwrotnie proporcjonalna do ilości cząsteczek polimerazy RNA zasocjowanej z tym odcinkiem. Innymi słowy odtwarzanie nukleosomów po przejściu polimerazy zachodzi szybciej w genach kodujących białka niż w genach kodujących rRNA. Odtwarzaniu ulega przy tym nie tylko podstawowe włókno 10 nm (nukleosomowe), lecz również włókno 30 nm — solenoid. Zachodzi ono wszędzie tam, gdzie odległość między cząsteczkami polimerazy jest wystarczająco duża. Wszystko to wskazuje, że stan strukturalny chromatyny aktywnej transkrypcyjnie nie jest statyczny, lecz znajduje się w dynamicznej równowadze. Wymaga to oczywiście, by histony rdzeniowe a również i histon H1 były cały czas na DNA lub obok — do natychmiastowego wykorzystania.

PODATNOŚĆ CHROMATYNY AKTYWNEJ TRANSKRYPCYJNIE NA NUKLEAZY

W klasycznej już pracy Weintraub i Groudine [12] wykazali, że DNaza I, enzym który z powodzeniem stosowano do badania wewnętrznej struktury nukleosomu, rozróżnia w chromatynie DNA, który jest lub ma być transkrybowany od tego, którego transkrypcja nie odbywa się i w bliskiej przyszłości nie będzie się odbywać. Gen globiny w jądrach erytrocytów kurczęcia (w komórkach tych zachodzi intensywna synteza globiny) jest wybiórczo wytrawiany przez DNazę I. Ten sam enzym nie wykazuje jednak podobnej wybiórczości w stosunku do genu globiny w jądrach z komórek jajowodu kurczęcia, gdzie globina nie jest syntetyzowana. I *vice versa*: wytrawiany

wybiórczo w jądrach komórek jajowodu gen owoalbuminy (białka syntetyzowanego w komórkach jajowodu) nie jest wytrawiany w jądrach erytrocytów.

Podatność na trawienie przez DNazę I obejmuje również geny przygotowane do transkrypcji, lecz aktualnie nietranskrybowane. I tak w embrjonalnych erytrocytach kurczęcia enzym wytrawia wybiórczo zarówno gen syntetyzowanej w tym etapie rozwoju globiny embrjonalnej, jak i gen β -globiny dorosłej, która będzie syntetyzowana dopiero w późniejszej fazie rozwoju. Co ciekawsze, w późniejszej fazie rozwoju zachowuje zwiększoną podatność na DNazę I również gen nie syntetyzowanej już globiny embrjonalnej. Sam proces transkrypcji nie może więc być przyczyną zwiększonej podatności obszarów chromatynowego DNA na DNazę I. Przyczyną jest raczej spowodowane wcześniej przeorganizowanie struktury chromatyny, przygotowujące ją do transkrypcji. Wniosek taki pozostaje w zgodzie z analizą obrazów w mikroskopie elektronowym, dyskutowaną powyżej.

Obszar zwiększonej podatności na DNazę I nie ogranicza się ściśle do rejonu genu, lecz rozciąga się dość daleko zarówno w stronę 3', jak i 5' od jego końców. Zwiększona podatność na DNazę I może obejmować od kilku do kilkudziesięciu tysięcy par zasad po obu stronach genu, choć obszary niekodujące trawione są zazwyczaj nieco wolniej niż sam gen.

Również nukleaza z *Micrococcus*, podstawowe narzędzie w badaniu nukleosomowej struktury chromatyny, trawi szybciej obszary aktywnych transkrypcyjnie genów. Analiza produktów trawienia tą nukleazą obszarów aktywnych genów wskazuje w pewnych przypadkach na całkowity brak typowej struktury nukleosomowej (np. w genach białek szoku cieplnego u *Drosophila*), natomiast w innych — na zachowanie typowej struktury nukleosomowej.

Ogólnie wydaje się, że w chromatynie obszary aktywne lub potencjalnie aktywne transkrypcyjnie oraz znaczne fragmenty DNA do nich przyległe, znajdują się w bardziej otwartej konformacji, o większej dostępności dla nukleaz. Stopień zachowania struktury nukleosomowej jest w nich różny — od zupełnego braku do struktury typowej dla reszty chromatyny.

W obszarach chromatynowego DNA zawierających aktywne lub potencjalnie aktywne geny wykryto jeszcze jeden rodzaj podatności na nukleazy, tak zwaną „superpodatność”. Miejsca superpodatne na DNazę I są około 10-krotnie szybciej wytrawiane przez ten enzym niż obszary aktywnych genów i około 100-krotnie szybciej niż DNA chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie. Miejsca superpodatne na DNazę I odkryto trawiąc DNA jąder komórkowych *Drosophila* bardzo niewielkimi stężeniami DNazy I i analizując uwolniony DNA przez hybrydyzację z próbnikami DNA z rejonu genów szoku cieplnego. Miejsca superpodatne znajdowały się w dwóch obszarach blisko 5' końca rejonu kodującego genów szoku cieplnego. Podobne obszary odkryto również w sąsiedztwie 5' końców rejonów kodujących genów globinowych w jądrach z erytrocytów kurczęcia, w systemie genów preproinsuliny II szczura, w zespole genów histonowych *Drosophila* i w wielu innych.

Miejsca superpodatne na DNazę I (wykazują one podobnie zwielokrotnioną podatność na inne endonukleazy) znajdują się w odległości od kilku do kilkunastu tysięcy par zasad od 5' końca rejonów kodujących genów. Występują również w sąsiedztwie 3' końców aktywnych genów. Są tkankowo specyficzne, to znaczy występują tylko w tkankach, w których dany gen jest transkrybowany.

Długość odcinka superpodatnego na DNazę I wynosi od 50 do 350 par zasad. Superpodatność leży w zasadniczej mierze w drugorzędowej strukturze samego DNA, określonej przede wszystkim przez sekwencję nukleotydową krytycznego odcinka. Dowody przemawiające za powyższym stwierdzeniem są następujące: a) miejsca superpodatne na DNazę I są przecinane przez nukleazy specyficzne dla jednoniciowego DNA (np. nukleazę S1) i wiążą się wybiórczo z odczynnikami reagującymi specyficznie z jednociniowym DNA (np. z bromoacetaldehydem) — zatem konformacja podwójnego heliksu musi być znacznie zmieniona; b) wstawienie wyizolowanych z chromatyny odcinków zawierających miejsca superpodatne na DNazę I i wrażliwe na nukleazę S1, do kolistego plazmidu, pociąga za sobą zanik superpodatności, gdy plazmid jest zrelaksowany i pojawienie się jej (w tym samym odcinku DNA, w którym pojawia się ona w natywnej chromatynie), gdy plazmid jest w formie superspiralnej. Zatem naprężenie związane z superspiralizacją ujawnia niejako miejsca już przedtem potencjalnie superpodatne na enzym.

W chromatynie ujawnienie się takiego, predeterminowanego sekwencyjnie miejsca, mogłoby nastąpić np. przez usunięcie z niego nukleosomu — uwolnione w ten sposób dwa skręty superspiralnego DNA mogłyby wprowadzić dostateczne naprężenie dla pojawienia się charakterystycznej struktury jednoniciowej, rozpoznawanej przez nukleazę S1. Tego rodzaju zmiany mogłyby następować, jako konsekwencja pewnych lokalnych modyfikacji w chromatynie, np. w obecności białek HMG 14 i 17, zmian w sposobie metylacji DNA (zobacz poniżej).

O znaczeniu sekwencji dla rozpoznawania przez DNazę I i nukleazę S1 świadczy również fakt, że miejsca podatne na nukleazę S1 w wyizolowanym, superspiralnym plazmidzie pBR 322 zachowują swoją podatność po transfekcji i integracji w chromatynę komórek L myszy. Szereg danych świadczy również o tym, że sekwencje szczególnie podatne na nukleazę S1 wykazują znacznie zmniejszoną zdolność do wiązania się z histonami. Superpodatność na trawienie nukleazami może więc oznaczać, że pewien rejon o szczególnej sekwencji jest całkowicie pozbawiony histonów. Potrzeba jeszcze dalszych danych doświadczalnych, aby ustalić czym w strukturze chromatyny są miejsca superpodatne na nukleazy. Dotychczas rozważano kilka możliwości. Mogłyby to być beznukleosomowe odcinki regulatorowego DNA, które wyznaczają miejsca inicjacji i terminacji transkrypcji przez ustalenie w tym rejonie pewnej ramki (fazy) dla graniczących z nimi nukleosomów. Mogłyby to być również miejsca wiązania specyficznych białek regulatorowych wpływających na lokalną strukturę chromatyny.

MODYFIKACJE POSTSYNTEZYCYZNE HISTONÓW A STRUKTURA I FUNKCJA CHROMATYNY

Oprócz wariantów sekwencyjnych histony występujące w chromatynie charakteryzują się różnym stopniem modyfikacji łańcuchów bocznych aminokwasów. Modyfikacje te zachodzą już po translacji i, w większości przypadków, po skompleksowaniu histonów z DNA w chromatynie. Przeprowadzają je odpowiednie enzymy, często zlokalizowane również w chromatynie. Do tej pory znane są następujące modyfikacje: 1) acetylacja, 2) fosforylacja, 3) metylacja, 4) poli(ADP)rybozylacja, 5) dołączenie białka ubikwityny (dotyczy histonów H2a i H2b).

ACETYLACJA.

W histonach H1, H2a i H4 większości dotąd zbadanych gatunków (wyjątkiem jest *Tetrahymena*) N-końcowa seryna jest zacetylowana. Modyfikacja ta zachodzi jeszcze w cytoplazmie, prawdopodobnie w trakcie translacji, przed transportem histonów do jądra.

Wewnątrz łańcucha polipeptydowego histonów modyfikacji przez acetylację ulega inny aminokwas — lizyna, tworząc ϵ -N-acetylizynę. Zacetylowaną formę lizyny znaleziono we wszystkich czterech histonach rdzeniowych. W histonach H3 i H4 ϵ -N-acetylizyna występuje w kilku pozycjach w silnie zasadowym, N-końcowym fragmencie cząsteczek.

Przy abitralnym ułożeniu sekwencji histonów rdzeniowych z różnych gatunków okazuje się, że pozycje, w których występują ulegające acetylacji lizyny są silnie konserwatywne (niezmienne) w ewolucji. Modyfikacja histonów przez acetylację jest odwracalna. Poziom acetylacji jest różny w różnych obszarach chromatyny, zmienia się też w cyklu komórkowym. Acetylację i deacetylację prowadzą odpowiednie acetylazy i deacetylazy, z których przynajmniej część należy do enzymów związanych z chromatyną.

Odkrycie, że potraktowanie komórek maślanem zapobiega deacetylacji histonów *in vivo* (maślan jest inhibitorem deacetylazy) spowodowało intensywny rozwój badań nad wpływem acetylacji i superacetylacji zachodzącej w obecności maślanu na własności chromatyny i nukleosomów. Ponieważ efektem acetylacji lizyn znajdujących się w silnie zasadowych, N-końcowych fragmentach histonów jest zmniejszenie sumarycznego ładunku dodatniego tych fragmentów należałoby oczekiwać zmniejszenia w wyniku acetylacji siły oddziaływania histonów z DNA, a co za tym idzie, bardziej rozluźnionej struktury DNA w chromatynie. Istotnie, liczne badania potwierdzają fakt, że DNA w chromatynie zawierającej superacetylowane histony jest bardziej podatny na trawienie nukleazami (np. DNazą I). Aktywna chromatyna uzyskana jako frakcja całkowitej chromatyny, rozpuszczalna w roztworze o zwiększonym stężeniu

jonów sodowych lub magnezowych, jest wzbogacona w wysokoacetylowane formy histonów. Powyższe dane oraz fakt występowania superacetylowanych form histonów H3 i H4 w komórkach lub tkankach charakteryzujących się dużą aktywnością transkrypcyjną genomu (drożdże, erytroblasty ptasie, stadia embrionalne w rozwoju jeżowca) wskazują przynajmniej na istnienie korelacji między acetylacją histonów a procesem aktywacji transkrypcyjnej lub bezpośrednio procesem transkrypcji genomu. W cyklu komórkowym najniższy poziom acetylacji histonów przypada na metafazę, na okres maksymalnego skondensowania chromatyny.

FOSFORYLACJA

Histony H1, H3 i H2a ulegają intensywnej fosforylacji po skompleksowaniu z DNA w chromatynie. Fosforylacji na mniejszą skalę ulegają też pozostałe dwa histony: H4 i H2b. Zdecydowana większość fosforylacji polega na wytworzeniu alkali-labilnego wiązania fosfo-estrowego między fosforanem a grupą $-OH$ seryny lub treoniny. Wiązanie to jest stabilne w niskim pH i kwasowa ekstrakcja histonów nie niszczy go. W kilku przypadkach (wszystkie dotyczą tkanek aktywnie rosnących) doniesiono o występowaniu kwaso-labilnego połączenia fosforanu w postaci 3-fosfohistydyny i fosforylolizyny w histonach H4 i H1 (jest to wiązanie typu N-P).

Najmniej wiadomo o fosforylacji H2a. Poziom fosforylacji tego histonu nie wykazuje wyraźnych korelacji z pozycją w cyklu komórkowym. Jako jedyny, histon H2a ulega fosforylacji i defosforylacji w komórkach dzielących się, jego fosforylacja przeto nie wydaje się mieć związku z proliferacją.

Dokładniej poznano przebieg fosforylacji histonów H1 i H3. W dzielących się komórkach H1 ulega fosforylacji zarówno w interfazie, jak i w trakcie kondensacji chromosomów w mitozie. Fosforylacja mitotyczna jest szczególnie interesująca, obejmuje wszystkie cząsteczki H1 i wprowadza do nich maksymalną liczbę grup fosforanowych (do 6 w ssaczach H1 i do 26-28 w H1 niższego eukarionta *Physarum polycephalum*). Nazywana jest też często fosforylacją stowarzyszoną ze wzrostem. Fosforylacja w interfazie jest bardziej specyficzna — obejmuje mniejszą ilość cząsteczek H1, często jest bardziej wybiórcza pod względem rodzaju fosforylowanego aminokwasu (seryna lub treonina) i jego lokalizacji w cząsteczce (C- lub N-koniec). Niektóre miejsca, np. seryna w pozycji 37 w H1 ssaczach fosforylowane są w odpowiedzi na specyficzny sygnał, jak podanie hormonu. Fosforylacja histonu H3 jest ściśle skorelowana z kondensacją chromosomów, jej maksimum przypada w metafazie.

Rola fosforylacji histonów jest daleka od wyjaśnienia. Wciąż brak jest jednoznacznej odpowiedzi na pytanie: w jakim stopniu proces ten jest

przyczyną a w jakim skutkiem zmian strukturalnych w chromatynie. Sam proces fosforylacji histonów związany jest z obecnością kinaz białkowych, zarówno zależnych jak i niezależnych od cyklicznego AMP.

METYLACJA

Metylacja dotyczy przede wszystkim dwóch kluczowych histonów H3 i H4, chociaż wykryto ją również w H2b a także w H1 *Physarum polycephalum*. Głównym akceptorem grup metylowych jest lizyna, która ulega przekształceniu w ϵ -N-metylolizynę. W histonach znaleziono mono-, di- i tri-metylolizynę. Znane są również N-metylowe pochodne histydyny i argininy.

W odróżnieniu od acetylacji i fosforylacji metylacja jest w większości przypadków nieodwracalna, histony raz zmetylowane pozostają w tej postaci w chromatynie. Metylacja H3 (pozycje 9 i 27) oraz H4 (pozycja 10) zachodzi pod koniec fazy S oraz w fazie G2 i odbywa się prawdopodobnie niedługo po uformowaniu nowych nukleosomów. Podobnie zachodzi metylacja H1 u *Physarum*. Donoszono jednak również o zwiększeniu poziomu metylacji H2a i spadku poziomu metylacji H3 w komórkach *Drosophila* w odpowiedzi na szok cieplny. Wprowadzenie niepolarnej grupy metylowej do łańcucha polipeptydowego histonu może mieć znaczny wpływ na jego oddziaływanie z DNA. Dokładna funkcja metylacji jest to do tej pory nieznaną. Metylaza histonów jest enzymem związanym z chromatyną.

POLI(ADP)RYBOZYLACJA

Jednym z enzymów związanych ściśle z chromatyną jest ADP-rybozylotransferaza, która katalizuje przeniesienie fragmentu ADP-rybozy z NAD na różne akceptory, np. argininę, związki z ugrupowaniem argininowym i białka. W chromatynie inkubowanej z NAD głównym akceptorem grup ADP-rybozy jest histon H1. W chromatynie natywnej połączony z ADP-rybozą jest pewien procent cząsteczek histonów H1, H2a, H2b i H3. Znaczenie poli(ADP)rybozylacji nie jest jasne. Postulowano, że poli(ADP)rybozylacja zasadowych N- i C-końców H1 umożliwia bezpośrednie oddziaływanie między cząsteczkami H1 w chromatynie (w normalnych warunkach przeciwdziała temu prawdopodobnie silne oddziaływanie tych fragmentów z DNA) i sprzyja kondensacji tych obszarów, w których H1 jest poli(ADP)rybozylowany. Jeśli tak było, ważnym elementem regulatorowym w tym procesie byłaby dostępność NAD.

PRZYŁĄCZANIE BIAŁKA UBIKWITYNY

Okolo 10% wszystkich cząsteczek histonu H2a w chromatynie badanych dotąd komórek jest zmodyfikowane przez przyłączenie do ϵ -aminowej grupy lizyny w pozycji 119 (wiązaniami izopeptydowymi) grupy COOH-końcowej

białka ubikwityny. Ubikwityna dołączona jest też do niewielkiej ilości cząsteczek histonu H2b. Ubikwityna jest bardzo konserwatywnym białkiem występującym we wszystkich organizmach (zwierzęta, rośliny, grzyby, bakterie). Histon H2a z dołączoną ubikwityną nazwano białkiem A24 (od pierwotnej klasyfikacji na podstawie położenia w elektroforezie dwukierunkowej). A24 jest normalnym składnikiem cząstek rdzeniowych (zastępuje wtedy H2a), wykazuje niezmienną w stosunku do H2a zdolność do oddziaływania z H2b. Nukleosomy, zawierające H2a zmodyfikowany ubikwityną, nie różnią się też od normalnych podatnością na trawienie DNazą I i nukleazą z *Micrococcus*, zdolnością do wiązania H1 i białek HMG. Modyfikacja H2a ubikwityną jest odwracalna. Istnieje korelacja między występowaniem A24 w nukleosomach a brakiem aktywności transkrypcyjnej. Ubikwityna jest też usuwana z H2a podczas kondensacji mitotycznej chromosomów.

BIAŁKA NIEHISTONOWE W CHROMATYNIE

Wszystkie białka skompleksowane z DNA w chromatynie a nie będące histonami noszą nazwę białek niehistonowych chromatyny. Należą do nich zarówno niehistonowe białka strukturalne (HMG, białka szkieletu chromosomalnego), enzymy związane z funkcjami DNA (DNA- i RNA-polimerazy, DNA ligaza, terminalna nukleotydotransferaza, polimeraza poli(A), DNaza), czy z modyfikacjami histonów (kinazy, acetylazy, metylazy), jak i białka regulatorowe, z których większość pełni nieznane dotąd funkcje.

BIAŁKA HMG

Białka HMG odkryto w latach 1969-71 przy okazji analizy polipeptydów towarzyszących histonowi H1 po ekstrakcji tego ostatniego z chromatyny 0,6 M NaCl lub 5% kwasem nadchlorowym [13]. Nazwa HMG (High Mobility Group) pochodzi od ruchliwości w trakcie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. HMG występuje uniwersalnie w chromatynie eukariontów stanowiąc w niej od 1 do 5% ilości DNA. Mogą być zatem obecne w nie więcej niż 10% nukleosomów. Charakteryzują się małą masą cząsteczkową (poniżej 30 000 daltonów) i nietypowym składem aminokwasowym. Aminokwasy zasadowe stanowią w nich 25%, a kwaśne 30% wszystkich aminokwasów. Białka HMG dzieli się na dwie grupy na podstawie ich rozpuszczalności w kacie trójchlorooctowym (TCA). HMG 1 i HMG 2 rozpuszczają się w 2%, a nie rozpuszczają się w 10% TCA, zaś HMG 14 i HMG 17 rozpuszczają się w 10% TCA.

HMG 1 i HMG 2 są to bardzo podobne do siebie białka o masach cząsteczkowych około 26 000 daltonów (w komórkach ssaczych). Około

50% wszystkich aminokwasów w tych białkach niesie ładunek. Po ustaleniu sekwencji okazało się, że w HMG 1 i 2 występują obszary o niespotykanych dotąd właściwościach. W C-końcowej części HMG 1 występuje sekwencja 41 aminokwasów złożona wyłącznie z kwasu glutaminowego i kwasu asparaginoowego. Podobny odcinek 35 aminokwasów występuje w C-końcowej części HMG 2. Silnie kwaśne rejony C-końcowe HMG 1 i 2 są niezestrukturalizowane. W przeciwieństwie do nich zasadowe fragmenty N-końcowe oraz rejony środkowe występują w formie zestrukturalizowanej. HMG 1 i 2 oddziałują z DNA za pośrednictwem N-końcowych rejonów zasadowych. W obecności soli oba te rodzaje HMG mają zdolność do rozwijania superskrętów kolistego DNA. HMG 1 z komórek dzielących się, lecz nie ze spoczynkowych (być może chodzi tu o wariant sekwencyjny lub modyfikację chemiczną) wykazuje również zdolność do destabilizacji podwójnego heliksu DNA i stymuluje jego enzymatyczną polimeryzację. Oba omawiane białka oddziałują z H1 głównie za pośrednictwem silnie kwaśnych fragmentów C-końcowych.

HMG 14 i HMG 17 mają masy cząsteczkowe odpowiednio 9 000 i 14 000 daltonów, są więc znacznie mniejsze niż HMG 1 i 2. Podobnie jak te ostatnie, charakteryzują się znaczną zawartością aminokwasów kwaśnych i zasadowych. Jednak w przeciwieństwie do nich nie mają prawie wcale aminokwasów niepolarnych, stabilizujących białka globularne. W HMG 14 i 17 brak więc jest jakichkolwiek rejonów zestrukturalizowanych. Natywną strukturę tych dwóch białek w chromatynie determinuje w związku z tym całkowicie ich oddziaływanie elektrostatyczne z DNA i histonami. W nukleosomach zawierających H1 istnieją miejsca wiązania dla dwóch cząsteczek HMG 14 lub HMG 17. Leżą one, podobnie jak miejsce dla H1, blisko końców DNA rdzeniowego tam, gdzie wchodzi on i opuszcza cząstkę rdzeniową. Białka HMG podlegają tym samym rodzajom modyfikacji co histony.

Obecność białek HMG w części izolowanych z chromatyny nukleosomów nie ulega dziś wątpliwości. Istnieje wiele danych przemawiających za tym, że obecność białek HMG 1 jest pozytywnie skorelowana z aktywacją transkrypcyjną chromatyny. Najważniejsze z nich to: 1) wykazanie za pomocą fluoryzujących przeciwciał obecności HMG w aktywnych transkrypcyjnie pętach w chromosomach politenicznych; 2) wykazanie, że nukleosomy z frakcji chromatyny zawierającej aktywnie transkrybowane geny są wzbogacone w HMG i pozbawione H1; 3) utrata wrażliwości na DNazę I przez aktywne transkrypcyjnie geny globiny, po wyekstrahowaniu HMG 14 i HMG 17 i ponowne przywrócenie tej wrażliwości po dodaniu do chromatyny uprzednio wyekstrahowanych HMG. Przywrócenie wrażliwości na DNazę I następuje również, gdy do chromatyny pozbawionej selektywnie HMG dodawano HMG 14 i 17 pochodzące z innych tkanek. Ten ostatni fakt świadczy, że specyficzność leży nie w białkach HMG a w wiążącej się z nimi chromatynie. Istnieje prawdopodobieństwo, że w aktywnej transkrypcyjnie

chromatynie HMG 14 i 17 wymieniają po prostu H1 i doprowadzają w ten sposób do rozluźnienia struktury włókna chromatynowego. Wskazywałoby na to zarówno podobieństwo miejsc wiązania z DNA w części rdzeniowej, jak i obserwowana dość często nieobecność lub zubożenie w H1 w aktywnej transkrypcyjnie chromatynie. Nie można jednak wykluczyć, że H1 jest nadal obecny, choć słabiej związany, a jego utrata jest artefaktem wynikającym z nie dość delikatnej preparatyki. Znacznie mniej wiadomo na temat roli i rozmieszczenia w chromatynie HMG 1^a i 2.

ZWIĄZEK MIĘDZY ACETYLACJĄ HISTONÓW, OBECNOŚCIĄ HMG 14 I HMG 17 A AKTYWNOŚCIĄ TRANSKRYPCYJNĄ GENÓW

W poprzedniej części przytoczono przekonujące dowody na to, że aktywna transkrypcyjnie chromatyna a w szczególności jej cecha zwiększonej podatności na DNazę I jest skorelowana z superacetylacją histonów. Powyżej z kolei przedstawiono dane wskazujące na to, że ta sama cecha chromatyny jest skorelowana również z występowaniem w mononukleosomach białek HMG 14 i HMG 17. Nie można jeszcze dziś stwierdzić jaka jest prawdziwa relacja między tymi dwoma czynnikami. Prawdopodobnie oba są istotne w powodowaniu bardziej rozwiniętej struktury chromatyny i większej dostępności DNA. Sugerowano, że w aktywacji chromatyny jest następująca sekwencja zdarzeń: 1) superacetylacja histonów, 2) usunięcie H1, 3) dołączenie HMG 14 i HMG 17. Jednakże, ponieważ wykrywa się mononukleosomy zawierające zarówno HMG 14 i 17 jak i H1, bardziej prawdopodobne wydaje się, że HMG mogą być w jakiś funkcjonalny sposób związane z acetylacją histonów (inhibitory deacetylaz?). W tym ostatnim przypadku krytyczna dla samego rozluźnienia struktury chromatyny byłaby acetylacja histonów, zaś specyficzność tego procesu leżałaby w nieznanym jeszcze mechanizmach kierujących HMG 14 i HMG 17 do konkretnych rejonów chromatyny.

GENY AKTYWNE TRANSKRYPCYJNIE A STRUKTURA DNA

Przeważająca część DNA w chromatynie występuje w formie B, to jest w postaci prawoskrętnego, podwójnego heliksu ze średnio 10 parami zasad przypadającymi na skręt i odległością 3,4 Å, mierzoną wzdłuż osi heliksu, między sąsiednimi parami zasad. Z badań *in vitro* wiadomo, że dla sekwencji DNA z naprzemiennym układem pirymidyn i puryn (np. typu \dots CGCGCGCG \dots) możliwa jest również struktura heliksu lewoskrętnego, tak zwana forma Z. W odpowiednich warunkach (duże stężenie soli) przejście takich, optymalnych sekwencji w formę Z odbywa się nawet

wówczas, gdy znajdują się one pośród sekwencji występujących stale w formie B. Gdy we wspomnianych sekwencjach optymalnych cytozyna lub guanina są dodatkowo zmetylowane do odpowiednio 5-metylocytozyny (5mC) i 7-metyloguaniny (7metG), przejście w formę Z jest znacznie ułatwione i odbywa się w zasadzie już przy fizjologicznym stężeniu soli.

Ciąg 50 zasad w sekwencji poli(dT·dG) odkryto w jednym z intronów ludzkiego genu aktyny z mięśnia sercowego. Obecność powtarzających się sekwencji poli(dT·dG) odkryto również w wielu innych miejscach genomu ludzkiego. Z kolei badania za pomocą przeciwciała do formy Z DNA wskazują, że w genomie istotnie w licznych miejscach DNA taki występuje. Przeciwciała do formy Z wiążą się na przykład powtarzalnie i wysoce specyficznie do rejonów położonych między prążkami w chromosomach politenicznych.

Znacznie zmieniona geometria formy Z w stosunku do formy B (lewoskrętność zamiast prawoskrętności, 13,6 par zasad na skręt w stosunku do 10) pozwala przypuszczać, że DNA w formie Z ma diametralnie różne właściwości w stosunku do DNA w formie B jeśli idzie o oddziaływania z białkami. Istotnie, wykazano, że z udziałem DNA w formie Z nie mogą powstawać nukleosomowe cząstki rdzeniowe.

Wszystko to co powiedziano powyżej nie dowodzi jeszcze, że DNA w formie Z, jeśli rzeczywiście istnieje w chromosomach, pełni w nich rolę regulatorową w procesie transkrypcji genów. Jest to jednak bardzo mocna i intrygująca przesłanka. Zmieniona struktura fragmentu DNA mogłaby z łatwością wyznaczać granice domen transkrypcyjnych, chociażby przez ustalanie fazy nukleosomów. Tego rodzaju funkcja Z DNA pozostaje jednak na razie w sferze spekulacji. Znacznie lepiej udokumentowana jest natomiast korelacja między aktywnością transkrypcyjną DNA w genomie a poziomem jego metylacji.

ZWIĄZEK MIĘDZY METYLACJĄ ZASAD W DNA CHROMATYNY A AKTYWNOŚCIĄ TRANSKRYPCYJNĄ GENÓW

W DNA prokariotycznym, obok normalnych zasad wykryto obecność N⁶-metyloadeniny (6-mA) i 5-metylocytozyny (5-mC). W DNA eukariontów jedyną występującą w wykrywalnej ilości, zmodyfikowaną zasadą jest 5-mC. Tylko u niektórych owadów i jednokomórkowców wykryto znikome ilości (0,03 mol %) 6-mA. Zawartość 5-mC w DNA eukariontów waha się od 0,03 mol% u niektórych owadów, 2-8 mol% u ssaków aż do ok. 50 mol% u niektórych roślin wyższych. U niektórych eukariontów (najlepiej znanym przykładem jest *Drosophila*) nie wykryto w ogóle 5-mC. Chociaż w DNA eukariotycznym zmetylowane cytozyny znaleziono w różnych układach dwójkowych (-CpG-, -CpA-, -CpT-, -CpC-) to jednak przeważająca ilość 5-mC występuje w sekwencji -CpG-. Układ dwunukleotydów -CG-

występuje w DNA eukariontów rzadziej niż wynikałoby to z rozkładu statystycznego. Wysuwa się przypuszczenie, że układy –CG– mogą być zlokalizowane w kluczowych dla regulacji pozycjach DNA. Istotnie, dla niektórych genów sekwencje zawierające –CG– znaleziono w pobliżu 5' końca lub obszaru promotorowego.

Opisany już efekt wpływu metylacji cytozyn w szlakach –CG– na przejściu formy B w formę Z DNA sugeruje określoną funkcję tych metylacji. Badanie stopnia zmetylowania szlaków –CG– w aktywnej transkrypcyjnie chromatynie wskazuje na ogólną prawidłowość: rejon transkrybowany wykazuje zmniejszoną metylację lub brak metylacji. W DNA komórek zwierzęcych około 70% wszystkich sekwencji –CG– jest zmetylowanych, podczas gdy w rejonach aktywnie transkrybowanych, o podwyższonej wrażliwości na DNazę I, zmetylowanych jest tylko 30-40% sekwencji –CG–. Szczegółowo wykazano obniżony poziom metylacji cytozyny w wielu szlakach –CG– w genie β -globiny w erytrocytach kurzczenia, w genach ovoalbuminy, owo-transferyny i ovomukoidu w jajowodzie kurzczenia, w aktywnie transkrybowanych genach rybosomalnego rRNA żaby *Xenopus*, w różnych zintegrowanych z genomem DNA wirusowych. Wykazano też bezpośrednią korelację między niedometylowaniem DNA a wrażliwością chromatyny na DNazę I i wydajnością transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem endogennej polimerazy RNA.

Jednego z najbardziej spektakularnych dowodów znaczenia metylacji DNA dostarczyły badania z użyciem 5-azacytydyny. Ten analog cytozyny zastępuje ją łatwo w DNA, nie podlega jednak metylacji i silnie hamuje aktywność DNA metylotransferazy odpowiedzialnej za metylację cytozyn. Zastąpienie 0,3% cytozyn przez 5-azacytydynę powoduje zahamowanie metylacji DNA w 95%.

Podawanie komórkom 5-azacytydyny spowodowało uaktywnienie wielu, w normalnych warunkach nieaktywnych, genów. Obserwowano w kulturze tkankowej pod wpływem 5-azacytydyny przekształcenie mysich fibroblastów w funkcjonalne komórki mięśniowe i chondrocyty, a więc zaawansowaną dyferencjację. Również nieaktywne chromosomy X w hybrydach mysich i ludzkich komórek somatycznych, po potraktowaniu 5-azacytydyną, uaktywniały niektóre zawarte w nich geny. Analog powodował również uaktywnienie wielu nieaktywnych genów zintegrowanych genomów wirusowych, np. genu *ev-1* retrowirusa w limfocytach kurzczenia. W większości tych przypadków obserwowano jednocześnie zmniejszenie metylacji sekwencji –CG– i pojawianie się miejsc wrażliwych na DNazę I w obszarach zawierających zaktywowane geny. Istnieją jednak również geny, których nie aktywuje traktowanie komórek 5-azacytydyną, np. geny globinowe w limfocytach kurzczenia. Sugeruje to, że geny wrażliwe na ten analog są już przedtem w jakiś sposób zmienione. Dowody na udział metylacji cytozyn w procesie regulacji aktywności genów są bardzo przekonujące jednak wydaje się, że samo tylko obniżenie poziomu metylacji cytozyn, jeśli nawet jest prerekwizytem aktywacji genu, nie jest warunkiem wystarczającym.

Jednym z problemów do rozstrzygnięcia przy postulowaniu regulacyjnej

roli metylacji jest brak wykrywalnych ilości 5-mC w DNA niektórych eukariontów (*Drosophila*, *Nematoda*). Być może układy sekwencji DNA w tych organizmach zapewniają dostateczną regulację na poziomie struktury DNA (przejście B-Z) bez udziału metylacji, lub też występują tam inne, nieznanne jeszcze modyfikacje zasad.

LITERATURA

- [1] D'Anna I. A., Isenberg I. — *A histone cross-complexing pattern*. *Biochemistry* 13: 4992-4997, 1974.
- [2] Finch J. T., Klug A. — *Solenoidal model for superstructure in chromatin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1897-1901, 1976.
- [3] Goodwin G. H., Sanders C., Johns E. W. — *A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic aminoacids*. *Eur. J. Biochem.* 34: 14-19, 1973.
- [4] Hewish D. R., Burgoyne L. A. — *Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 504-510, 1973.
- [5] Igo-Kemenes T., Hoerz W., Zachau H. G. — *Chromatin*. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 89-121, 1982.
- [6] Jerzmanowski A., Staroń K. — *Ostatnie osiągnięcia w badaniach nad strukturą chromosomu eukariotycznego*. *Kosmos* 6: 619-630, 1978.
- [7] Kornberg R. D. — *Chromatin structure: A repeating unit of Histones and DNA*. *Science* 184: 868-871, 1974.
- [8] Kornberg R. D., Thomas J. O. — *Chromatin structure: Oligomers of histones*. *Science* 184: 865-868, 1974.
- [9] Noll M. — *Subunit structure of chromatin*. *Nature (London)* 251: 249-251, 1974.
- [10] Olins A. L., Olins D. E. — *Spheroid chromatin units (v bodies)*. *Science* 183: 330-332, 1973.
- [11] Paulson J. R., Laemmli U. K. — *The structure of histone depleted metaphase chromosomes*. *Cell* 12: 817-828, 1977.
- [12] Rattner J. B., Goldsmith M., Hamkalo B. A. — *Chromatin organization during meiotic prophase of *Bombyx mori**. *Chromosoma* 79: 215-224, 1980.
- [13] Weintraub H., Groudine E. — *Transcriptionally active and inactive conformations of chromosomal subunits*. *Science* 193: 848-856, 1976.

WITOLD FILIPOWICZ

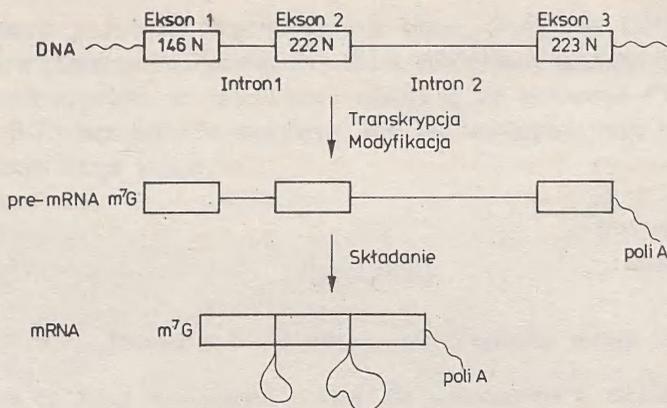
Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, Warszawa

GENY PODZIELONE I SKŁADANIE RNA

Przed kilkoma laty dokonano odkrycia, które w zasadniczy sposób zmieniło nasze poglądy na temat struktury genów. Do niedawna powszechnie przyjmowano, że geny są ciągłymi fragmentami DNA, w których informacja genetyczna (sekwencja nukleotydów) jest kolinearna ze strukturą kodowanych produktów. W 1977 roku stwierdzono, że wiele genów kodujących zarówno białka jak i strukturalne RNA ma budowę mozaikową; sekwencje DNA niosące informację genetyczną są w takich genach poprzedzielane sekwencjami niekodującymi, których nie odnajduje się w dojrzałych cząsteczkach informacyjnych RNA (mRNA), rybosomalnych RNA (rRNA) lub transferowych RNA (tRNA). Geny o takiej budowie nazywane są genami „w kawałkach”, genami mozaikowymi, złożonymi, nieciągłymi lub podzielonymi. W polskim piśmiennictwie najczęściej używa się terminu geny podzielone. Sekwencje kodujące genu podzielonego nazwano eksonami, natomiast sekwencje niekodujące — intronami.

Schemat, struktury i ekspresji genu podzielonego, na przykładzie genu dla β -globiny królika, przedstawia rysunek 1. Gen ten jest złożony z trzech eksonów, przedzielonych dwiema sekwencjami intronowymi o długości 126 i 573 nukleotydów. Transkrypcja genu β -globinowego prowadzi do syntezy mozaikowego prekursora mRNA złożonego z eksonów i intronów. W procesie obróbki prekursora, zwanej składaniem (ang. „splicing”), introny zostają wycięte a eksony precyzyjnie ze sobą połączone we właściwej kolejności. Powstaje funkcjonalny mRNA, który — pozbawiony już teraz wewnętrznych odcinków niekodujących — może uczestniczyć jako matryca w procesie biosyntezy białka.

Istnienie genów podzielonych stwierdzono u wszystkich przebadanych do tej pory eukariontów. Występują one zarówno w DNA jądrowym jak i w DNA mitochondrialnym i chloroplastowym (tabela 1). Ostatnio stwierdzono również występowanie genów podzielonych u archebakterii, *Sulfolobus sulfataricus*, oraz u bakteriofaga T4 którego gospodarzem jest *Escherichia coli*. Dwa



Rys. 1. Schemat struktury i ekspresji podzielonego genu dla β -globiny królika

zsekwencjonowane do tej pory geny tRNA *Sulfolobus* mają krótki intron zlokalizowany w identycznym miejscu jak introny w genach tRNA drożdży lub wyższych eukariontów [26]. W przypadku faga T4 obecność intronu stwierdzono w genie dla syntetazy tymidylanowej [8]. Odkrycia te mają ogromne znaczenie dla zrozumienia procesu ewolucji i historii samych genów podzielonych.

Badania nad strukturą i ekspresją genów podzielonych, szczególnie nad procesem składania RNA, doprowadziły do wielu kolejnych niespodziewanych

Tabela 1

Geny złożone występujące u eukariontów

Produkt transkrypcji genu	Przedział komórkowy	Liczba intronów	Długość intronów
mRNA	jądro	1-50	40- ~ 10 000
	mitochondrium	1-7	~ 500- ~ 2500
	chloroplast	4-9	~ 500
rRNA	jądro	1	400-10000
	mitochondrium	1	1000-2300
	chloroplast	1	870
tRNA	jądro	1	13-60
	mitochondrium	n.s.*	---
	chloroplast	1	450-950

* n.s. dotychczas nie stwierdzono.

odkryć. Między innymi, opisano cały szereg nowych enzymów uczestniczących w tych reakcjach, odkryto bezbiałkowy mechanizm „samoskładania się” niektórych prekursorowych RNA i wykazano, że sama cząsteczka RNA może pełnić rolę enzymu.

W artykule tym najwięcej miejsca poświęcono strukturze i ekspresji genów kodujących informacyjne RNA. Jest to na pewno najbardziej pasjonujący z omawianych problemów. Zagadnieniu podzielonych genów oraz składaniu RNA poświęconych jest wiele artykułów przeglądowych publikowanych w międzynarodowych czasopismach [1, 4, 6, 7, 9, 10, 16, 18, 40] i do nich odsyłam czytelników w poszukiwaniu bardziej szczegółowego piśmiennictwa. W niniejszym artykule cytowane są jedynie pozycje najnowsze oraz te, które są przedmiotem szerszego omówienia.

GENY JĄDROWE KODUJĄCE BIAŁKA

Przeważająca większość genów jądrowych kodujących białka u wyższych eukariontów (np. ssaków) — to geny podzielone. Spośród przebadanych genów pozbawione intronów są jedynie geny histonów (wyjątkiem jest mozaikowy gen histonu H3 u kur), interferonów α i β oraz geny aktywowane w czasie szoku hypertermicznego (tzw. heat shock proteins). Geny wielu wirusów rozwijających się w komórkach ssaków również zawierają introny. Należą do nich między innymi wirusy z grupy papova (SV 40, polioma) oraz adeno. Wirusy te są klasycznymi już dziś modelami do badania mechanizmu ekspresji genów podzielonych. Inaczej przedstawia się sytuacja u niższych eukariontów. Np. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono do tej pory tylko kilka genów podzielonych. Są to geny kodujące aktywną, niektóre białka rybosomalne oraz białka określające typ koniugacyjny [43].

W wielu przypadkach sekwencje intronowe stanowią przeważającą część genu. Dla przykładu, gen prokolagenu α -2 kury ma długość około 38 000 nukleotydów. Zawiera on 50 intronów o długości od 80 do ponad 2000 nukleotydów, co stanowi 85% całego genu [53]. W przypadku genu aktywny u drożdży pojedynczy intron o długości 304 nukleotydów stanowi jedynie 20% długości transkryptu. Różna może być lokalizacja intronów w obrębie genu. Zwykle przedzielają one sekwencje kodujące białka, lecz mogą znajdować się również w obrębie odcinków nie kodujących białka, szczególnie często na końcu 5' genu. Introny często oddzielają od siebie fragmenty genu kodujące odrębne — strukturalnie lub funkcjonalnie — części białka, tzw. domeny. Tak jest w przypadku genów ciężkich łańcuchów immunoglobulin, genów globiny i lizozymu. Do sprawy tej powrócimy przy omawianiu pochodzenia genów podzielonych.

Sekwencje poszczególnych intronów w obrębie jednego genu, poza obszarami granicznymi ekson-intron i intron-ekson, nie wykazują żadnego podobieństwa. Podobnie, introny w przeciwieństwie do eksonów tego samego genu, np. α - lub β -globiny u różnych gatunków nie wykazują zwykle znacznego podobieństwa sekwencji, choć zachowują charakterystyczną, identyczną dla wszystkich gatunków, lokalizację w obrębie genu. Te ostatnie obserwacje

przemawiają za tym, że sekwencje intronowe, przynajmniej dla α - i β -globiny, nie pełnią istotnej roli.

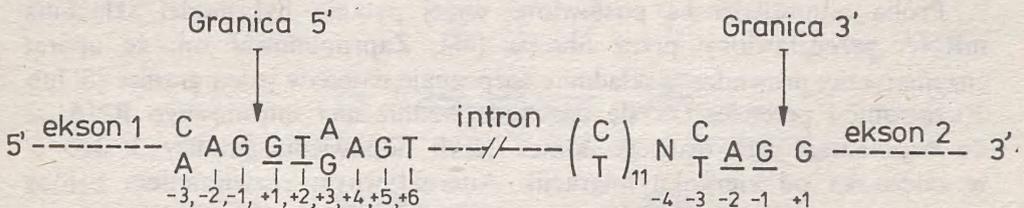
Transkrypcja genów jądrowych kodujących białka, podobnie jak i transkrypcja innych genów podzielonych, prowadzi do powstania mozaikowego transkryptu złożonego z eksonów i intronów (rys. 1). Taki RNA jest, jeszcze w czasie trwania transkrypcji, modyfikowany na końcu 5' przez dołączenie 7-metyloguanozyny i powstanie, tzw. czapeczki — struktury m^7GpppN . Po zakończeniu transkrypcji modyfikowany jest również koniec 3' RNA; dołączona zostaje do niego sekwencja poliA o długości 150-200 nukleotydów [40, 55]. Populacja takich transkryptów nosi nazwę heterogenego jądrowego RNA (hnRNA, z ang. heterogenous nuclear RNA). HnRNA są bezpośrednimi prekursorami mRNA, dlatego też określa się je często jako prekursorowe mRNA lub pre-mRNA. Proces przemiany pre-mRNA w mRNA, czyli składanie RNA polega na precyzyjnym wycinaniu intronów i łączeniu eksonów. Jest to ostatni etap dojrzewania mRNA na terenie jądra. Mechanizm składania pre-mRNA to niewątpliwie jedna z najbardziej pasjonujących zagadek biologii molekularnej, czekająca ciągle na rozwiązanie. Co decyduje o tym, że 50 eksonów wspomnianego powyżej pre-mRNA dla prokolagenu α -2 łączy się ze sobą precyzyjnie i zawsze we właściwej kolejności?

SKŁADANIE INFORMACYJNYCH RNA W JĄDRZE

Badania struktury genów podzielonych wykazały, że DNA w obszarach granicznych ekson-intron (granica 5') i intron-ekson (granica 3') w przypadku wszystkich genów (pochodzących z tak różnych organizmów, jak np. drożdże, fasola i człowiek) ma bardzo podobne sekwencje nukleotydów. Do chwili obecnej zsekwencjonowano obszary graniczne około 150 różnych intronów, na podstawie tych danych [38] ustalono coś w rodzaju sekwencji prototypowej, tzw. sekwencję największej zgodności (ang. consensus sequence). Przedstawiona jest ona na rysunku 2. Wszystkie introny mają sekwencję GT na końcu 5' i AG na końcu 3'. Ostatnio stwierdzono, że na końcu 5' intronu w genie dla globiny α^D u kaczki i kury znajduje się sekwencja GC i transkrypty tych genów ulegają prawdopodobnie również prawidłowemu składaniu [15]. Sekwencja AG znajduje się również na końcu 3' znacznej większości eksonów (rys. 2). Charakterystyczna jest także obecność na granicy 3' sekwencji bogatej w pirymidyny o długości jedenastu lub więcej nukleotydów (poz. -15 do -5).

Udowodniono, że sekwencje GT i AG na końcach intronu są rzeczywiście konieczne do prawidłowego składania. Najbardziej przekonujących dowodów dostarczyły badania struktury pierwszorzędowej genów globinowych ludzi chorych na talasemię, chorobę wywołaną brakiem lub obniżoną

produkcją α - lub β -globiny. Ustalono, że u niektórych chorych przyczyną tych defektów są właśnie zaburzenia w procesie składania globinowego pre-mRNA. I tak, powodem talasemii β^0 może być tranzycja $G \rightarrow A$ na końcu 5' intronu lub delecja pentanukleotydu w pozycjach +2 do +6 intronu [48]. Inne dowody potwierdzające rolę końcowych nukleotydów intronu w składaniu pochodzą z badań nad ekspresją konstruowanych *in vitro* genów z mutacjami punktowymi. Wieringa i wsp. [52] skonstruowali szereg mutantów punktowych w obszarze granicznym 5' większego intronu genu β -globiny królika. Podczas gdy mutacje $G \rightarrow A$ lub $A \rightarrow G$ w pozycjach



Rys. 2. Sekwencje graniczne ekson-intron i intron-ekson w jądrowym pre-mRNA. Prototypowe sekwencje największej zgodności ustalono w oparciu o strukturę pierwszorzędową blisko 140 obszarów granicznych 5' i 3', pochodzących z różnych genów i różnych organizmów. Strzałki oznaczają miejsca składania pre-mRNA. Podkreślone są nukleotydy zachowane we wszystkich intronach. N oznacza jeden z czterech nukleotydów. (Według [38])

-1, -2, -3 i w pozycjach +3 i +4 nie wpływają na poziom składania, to mutacja $G \rightarrow A$ w pozycji +1 (początek intronu!) całkowicie blokuje prawidłowe składanie pre-mRNA.

Wspomniane uszkodzenia sekwencji granicznych wywołane zmianą pojedynczego nukleotydu prowadzą często do pojawiania się produktów RNA złożonych wadliwie i przez to нефункциональных. Dla przykładu, w przypadku uszkodzenia fizjologicznej granicy 3' składanie RNA może zajść między granicą 5' danego intronu oraz sekwencją graniczną 3' sąsiedniego intronu lub między granicą 5' i sekwencją, która nie funkcjonuje normalnie jako granica 3', lecz znajduje się w jej sąsiedztwie i przypomina sekwencję największej zgodności. Podobnie dzieje się w przypadku uszkodzenia fizjologicznej granicy 5' intronu. Opisano wiele przykładów takiego wadliwego składania mRNA, „wymuszonego” uszkodzeniem fizjologicznych sekwencji granicznych [51]. W oparciu o wspomniane powyżej wyniki oraz inne dane można wyciągnąć wniosek, że nie same sekwencje graniczne decydują o miejscu i sposobie składania mRNA. Do tego samego wniosku prowadzą również proste wyliczenia statystyczne. Uwzględniając długość i skład sekwencji największej zgodności wyliczono, że powinny one występować średnio raz na 2000 (granica 5') i 500 (granica 3') nukleotydów. A istnieją przecież introny, których długość wynosi około 10 000 nukleotydów. Być może, istotną rolę w procesie składania odgrywa struktura przestrzenna pre-mRNA

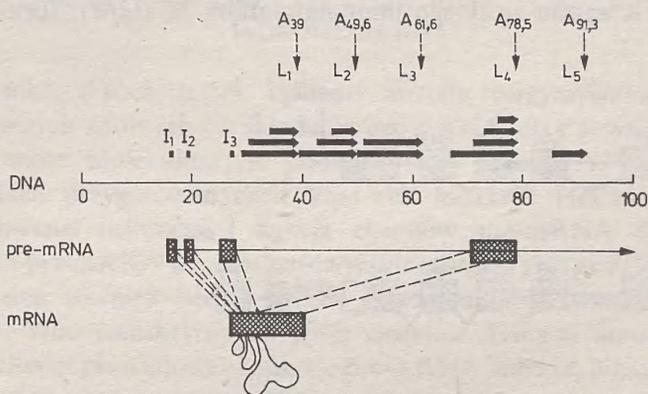
(a właściwie pre-mRNP*, gdyż pre-mRNA jest związany w jądrze z białkiem), sprawiająca, że pewne odcinki RNA są bardziej dostępne dla aparatu enzymatycznego prowadzącego składanie [31]. Przyjmując nawet takie założenie, jak jednak wytłumaczyć, że w pre-mRNA zawierającym kilkanaście lub kilkadziesiąt intronów dochodzi zawsze do prawidłowego połączenia eksonów sąsiadujących bezpośrednio ze sobą. Problem staje się jeszcze trudniejszy gdy uświadomimy sobie, że składanie wielointronowych pre-mRNA nie jest procesem polarnym, to znaczy usuwanie intronów nie odbywa się kolejno poczynając od końca 5' w kierunku końca 3' cząsteczki, lub odwrotnie (3' → 5').

Próba odpowiedzi na postawione wyżej pytania był model składania mRNA przedstawiony przez Sharpa [46]. Zaproponował on, że aparat enzymatyczny prowadzący składanie rozpoznaje najpierw jedną granicę (5' lub 3') intronu i przemieszcza się następnie wzdłuż nici intronowego RNA aż do napotkania jego drugiego końca (czyli odpowiedni granicy 3' lub 5' w zależności od kierunku migracji). Alternatywnym rozwiązaniem byłoby rozpoznanie przez aparat enzymatyczny jakiejś sekwencji w środku intronu i następnie „przeciąganie” RNA w obu kierunkach aż do napotkania sekwencji granicznych, które ulegałyby nacięciu i połączeniu ze sobą. Każda z wersji modelu Sharpa tłumaczyła w sposób dość oczywisty dlaczego w wielointronowych pre-mRNA łączą się zawsze ze sobą sąsiednie eksony. Próby sprawdzenia słuszności tego modelu podjęli Kühne i wsp. [31], wstawiając dodatkowe regiony graniczne 5' lub 3' w pobliżu normalnych granic większego intronu genu β -globiny królika (rys. 1) i badając ekspresję tak skonstruowanych genów. Z dwóch położonych w pobliżu siebie granic 5' w procesie składania rozpoznawana była zawsze granica położona dalej od środka intronu. To samo zjawisko zaobserwowano w przypadku wyboru granicy 3'. Kühne i wsp. wykazali również, że wewnętrzne sekwencje intronu nie odgrywają istotnej roli w procesie usuwania większego intronu β -globinowego pre-mRNA. Dla prawidłowego składania wystarczyło pozostawienie krótkich sekwencji końcowych: 6 nukleotydów na końcu 5' lub 15 nukleotydów na końcu 3' intronu. Wszystkie te wyniki jednoznacznie przemawiają przeciwko modelowi Sharpa i sugerują, że struktura przestrzenna samego pre-mRNA (lub pre-mRNP), poprzez eksponowanie takich a nie innych sekwencji granicznych na powierzchni cząsteczki RNA, może być jednym z czynników decydujących o prawidłowości składania.

Badając składanie różnych mRNA poczyniono jeszcze cały szereg obserwacji, które warto przytoczyć, choć znaczenie ich nie jest w pełni zrozumiałe. I tak, podczas składania pre-mRNA prokolagenu oraz β -globiny powstają cząsteczki RNA, z których usunięta została tylko część intronu. Pozostaje do ustalenia, czy są to produkty błędnie złożone, czy też autentyczne formy pośrednie wskazujące, że wycinanie intronu może zachodzić

* RNP — ang. ribonucleoprotein.

czasami w kilku etapach. Porównanie transkrypcji genów zawierających introny z transkrypcją skonstruowanych *in vitro* wariantów pozbawionych tych sekwencji wykazało, że w pewnych przypadkach obecność intronów — choć nie wpływa na samą transkrypcję — konieczna jest dla powstania stabilnego mRNA, zdolnego do prowadzenia biosyntezy białka. Zdolność do syntezy aktywnego mRNA można przywrócić wstawiając do zmutowanego genu intron pochodzący nawet z innego genu. Nie wiadomo jakie są molekularne podstawy tego sprzężenia procesu składania z innymi etapami



Rys. 3. Ekspresja późnych genów adenowirusa. Skala podzielona na 100 podjednostek przedstawia DNA adenowirusa (jedna jednostka odpowiada około 300 nukleotydów). Grube linie nad DNA przedstawiają pozycje eksonów kodujących lider (I_1 - I_3) oraz różne polipeptydy (L_1 - L_5).

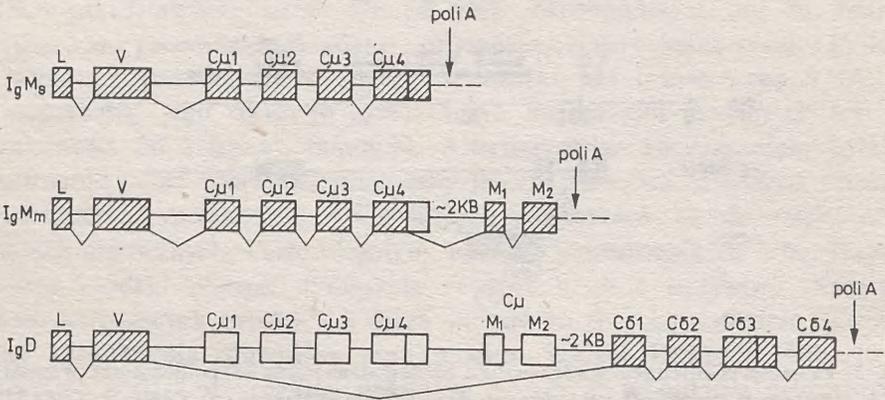
Literą A oznaczone są miejsca poliadenylacji pre-mRNA. (Według [55])

biogenezy mRNA lub jego transportu do cytoplazmy. Należy dodać że nie jest to zjawisko generalne. Istnieją geny, np. gen kodujący insulinę u szczura, w których usunięcie intronu nie wpływa na syntezę funkcjonalnego mRNA.

Na etapie składania RNA działa cały szereg mechanizmów regulacyjnych. Transkrypty tego samego genu — choć może w tym przypadku termin gen należałoby zastąpić określeniem „zespół eksonów i intronów kodujących kilka pokrewnych białek” — mogą być składane na kilka sposobów, na przykład w zależności od etapu rozwoju organizmu lub stanu komórki. Bardzo spektakularny przykład, jak zmienne składanie RNA może być wykorzystane dla wydajnej ekspresji informacji genetycznej przedstawia rysunek 3. Transkrypcja późnego regionu adenowirusa inicjowana jest tylko w jednym miejscu na DNA i prowadzi do powstania transkryptów zakończonych i poliadenylowanych w pięciu różnych miejscach [55]. Składanie wszystkich transkryptów rozpoczyna się od połączenia trzech krótkich eksonów (I_1 , I_2 , I_3), które tworzą tzw. lider, nie zawierający sekwencji kodującej białko. Segment ten jest następnie dołączany do jednej z około piętnastu

różnych sekwencji granicznych 3', co w efekcie prowadzi do powstania piętnastu mRNA kodujących różne białka. O wyborze granicy 3' decyduje miejsce poliadenylacji pre-mRNA oraz inne, nie zdefiniowane dotychczas, czynniki. Dla przykładu jeśli poliA dołączony jest w pozycji 78,5, to podczas składania wyeliminowana zostaje cała środkowa część transkryptu, a lider dołącza się do jednego z czterech segmentów kodujących białka grupy L₄.

Inny interesujący przykład alternatywnego składania mRNA przedstawia rysunek 4. Na różnych etapach rozwoju limfocytu wytwarzane są albo dwie różne formy łańcucha ciężkiego immunoglobuliny M (IgM): forma dołączona



Rys. 4. Składanie pre-mRNA kodujących ciężki łańcuch immunoglobulin M i D. Strzałki oznaczają miejsca poliadenylacji. Eksony ulegające złożeniu w mRNA zostały zakreślone. (Według [37] i [45])

do błony (m) lub wydzielana z komórki (s), albo łańcuch ciężki immunoglobuliny D (IgD). Informacyjny RNA dla IgM_s powstaje z pre-mRNA poprzez złożenie eksonów kodujących hydrofobowy lider (L), część zmienną (V) i cztery domeny części stałej (C₁₋₄) immunoglobuliny [37, 45]. Jeśli transkrypcja genu zakończy się dalej i w strukturze pre-mRNA znajdują się eksony dla części białka odpowiedzialnej za zakotwiczenie polipeptydu w błonie (eksony M₁ i M₂), składanie prekursora odbywa się nieco inaczej. Dochodzi do połączenia między środkiem eksonu C_μ4 i eksonami M₁ i M₂. Przystawienie się limfocyta na syntezę IgD następuje wtedy gdy proces transkrypcji kończy się jeszcze dalej w kierunku 3'. Eksony L i V zostają wtedy połączone z eksonami C_δ1-4 kodującymi domeny części stałej łańcucha ciężkiego IgD. W tym ostatnim przypadku segmenty RNA będące eksonami podczas składania mRNA dla IgM stają się fragmentami jednego wielkiego intronu o długości kilku tysięcy nukleotydów. Zupełnie nie wiadomo co decyduje o tym, że ta sama sekwencja RNA funkcjonuje raz jako ekson a raz jako fragment intronu. Dlaczego liczne sekwencje graniczne eksonów

nie zostają w drugim przypadku rozpoznane przez czynniki prowadzące składanie RNA? Istnieją obecnie dowody, że ten sam transkrypt genu komórkowego, a nie jego warianty poliadenylowane w różnych miejscach, może również ulegać alternatywnemu składaniu dając kilka informacyjnych RNA kodujących różne białka [47].

SKŁADANIE JĄDROWYCH PRE-mRNA *IN VITRO*, ROLA NISKOCZĄSTECZKOWYCH JĄDROWYCH RNA

W ostatnich dwóch latach opisano metody otrzymywania ekstraktów bezkomórkowych zdolnych do składania pre-mRNA, co z pewnością znacznie ułatwi poznanie molekularnych podstaw tego procesu [21, 25, 27, 41]. W ekstraktach przygotowanych z komórek ludzkich HeLa zachodzi precyzyjne usuwanie intronów i ligacja eksonów pre-mRNA β -globinowego oraz różnych pre-mRNA adenowirusowych; reakcja wymaga ATP jako źródła energii. Można również śledzić proces składania RNA wstrzykując zsyntetyzowane *in vitro* transkrypty do jąder oocytów *Xenopus laevis*. W jądrach oocytów zachodzi prawidłowe składanie pre-mRNA ludzkiej β -globiny, podczas gdy transkrypt genu zawierającego mutację wywołującą talasemię β^0 (mutacja G \rightarrow A na końcu 5' intronu) nie ulega składaniu [22].

Poszukując czynników, które mogą rozpoznawać sekwencje graniczne na końcach intronu i uczestniczyć w innych reakcjach składania zwrócono uwagę na małe jądrowe RNA (SnRNA, z ang. small nuclear RNA). Jeden z nich — RNA U1 — o długości 165 nukleotydów ma na końcu 5' sekwencję $m_3GpppA^mG^mACACCUG$. Jest ona komplementarna aż do 9 nukleotydów sekwencji 5' (${}^c_AAG/GT^A_GAGT$) lub też 4 nukleotydów granicy 3' (${}^c_TAG/G$) intronu. Przed kilkoma laty zaproponowano [33], że koniec 5' RNA U1 oddziałując jednocześnie z sekwencjami granicznymi 5' i 3' mógłby zbliżyć je do siebie i ułatwić tym samym precyzyjne wycinanie intronu i ligację eksonów. U1 RNA podobnie jak i inne małe jądrowe RNA (U2, U4, U5, U6) występuje w jądrze w formie kompleksu z białkami — jako U1 SnRNP [6]. W skład tego kompleksu wchodzi 8 różnych polipeptydów.

Bardzo pomocne w potwierdzeniu roli U1 SnRNP w składaniu mRNA było stwierdzenie, że w surowicy pacjentów chorych na liszaj rumieniowaty (*Lupus erythematosus*), chorobę o charakterze autoagresji immunologicznej, pojawiają się swoiste przeciwciała tak przeciwko cząstkom U1 RNP jak i innym SnRNP. Wykazano, że przeciwciała anty-U1 hamują składanie pre-mRNA w izolowanych jądrach oraz w ekstraktach z komórek HeLa [41]. Wykazano również, że U1 SnRNP rzeczywiście tworzy kompleks z fragmentem β -globinowego pre-mRNA, składającym się z jednego intronu oraz części przylegających doń eksonów; kompleks taki powstaje w wyniku

oddziaływania 5'-końcowej sekwencji U1 RNA z komplementarnym do niej obszarem granicznym 5' intronu [39]. Nie stwierdzono oddziaływania U1 RNP z granicą 3' intronu. Tak więc, rozpoznanie granicy 5' intronu przez U1 SnRNP i wytworzenie krótkiej dwuniciowej struktury RNA-RNA wydaje się być jednym z początkowych etapów składania.

Bardzo interesujących informacji dostarczyły ostatnie badania w laboratorium Sharpa [21]. W czasie składania *in vitro* modelowego transkryptu adenowirusowego złożonego z jednego intronu i dwóch eksonów powstaje kilka produktów pośrednich o ciągle nie w pełni zrozumiałej budowie. Analiza tych produktów wskazuje, że pierwszym etapem składania jest być może przecięcie granicy 5', w którym to procesie ma właśnie uczestniczyć U1 SnRNP. W kolejnym etapie, koniec 5' intronu ulega swojego rodzaju wywinięciu i dołącza się poprzez wiązanie 2', 5'-fosfodwuestrowe do grupy 2'-OH wewnątrz intronu, około 30-40 nukleotydów od granicy 3'. W wyniku tej reakcji powstaje rozgałęziony RNA. Przedstawiono ostatnio pośrednie dowody na istnienie tego typu struktur [50]; możliwość istnienia rozgałęzionego RNA postulowano również po stwierdzeniu, że w RNA mogą występować wiązania 2'-fosfomonoestro, 3', 5'-fosfodwuestrowe [28] (patrz również niżej). Ostatnim etapem składania jest przecięcie RNA na granicy 3' intronu, połączenie eksonów oraz uwolnienie intronu w formie kolistej ze sterzącym 30-40 nukleotydowym liniowym „ogonem” pochodzącym z końca 3' intronu. Ciągle nie wiadomo jak uniwersalny jest tego typu mechanizm, czy wszystkie introny tego samego pre-mRNA przechodzą przez tak skomplikowany cykl reakcji i jaką rolę pełni w nim rozgałęziony intron.

Niespodziewane było również stwierdzenie, że w procesie składania pre-mRNA istotną, choć ciągle bliżej nieokreśloną, rolę pełni struktura m⁷GpppN znajdująca się na końcu 5', tak pre-mRNA, jak i mRNA [29]. Dotychczas wydawało się, że główną funkcją metylowanej czapeczki na końcu mRNA jest ułatwienie oddziaływania matrycy z rybosomami w procesie biosyntezy białka.

SKŁADANIE JĄDROWYCH PRE-mRNA U DROŹDŹY

Omówione w poprzednich rozdziałach dane dotyczące składania jądrowych mRNA pochodzą głównie z badań nad organizmami wielokomórkowymi. W przypadku prostych jednokomórkowych eukariontów jak drożdże, *Saccharomyces cerevisiae*, stwierdzono pewne odrębności. Już dość dawno spostrzeżono, że geny podzielone wyższych eukariontów (np. gen β-globinowy królika) po transfekcji do komórek drożdżowych nie ulegają prawidłowej ekspresji. Przyczyną tego jest nieprawidłowe składanie pre-mRNA. Ostatnio wyjaśniono dlaczego komórki drożdżowe nie potrafią wycinać intronów z pre-mRNA pochodzących z genów organizmów wielokomórkowych. Badając

strukturę intronów genów drożdżowych stwierdzono, że poza sekwencjami granicznymi największej zgodności, identycznymi z sekwencjami granicznymi wyższych eukariontów (rys. 2), mają one dodatkowo zawsze sekwencję UACUAAC położoną w odległości od 20 do 60 nukleotydów od granicy 3'. Sekwencji takiej nie zawierają introny znajdujące się w genach organizmów wielokomórkowych. Delecja fragmentu UACUAAC z genu drożdżowego, zgodnie z oczekiwaniem, całkowicie uniemożliwia wycięcie intronu [43].

W komórkach drożdżowych nie stwierdzono dotychczas występowania odpowiednika U1 Sn RNP. Być może, właśnie wewnętrzna sekwencja intronu — UACUAAC — pełni u drożdży funkcję U1 RNA. Rzeczywiście sekwencja UACUAAC jest bardzo zbliżona do sekwencji $m_3GpppA^mU^mACAC$ w U1 RNA, która oddziałuje z sekwencją graniczną 5' (pseudourydyna w oddziaływaniach komplementarnych jest równoważna urydynie). W oparciu o te dane Rosbach i wsp. [43] zaproponowali model wycinania intronów z pre-mRNA u drożdży. Według nich wewnątrzintronowy oligonukleotyd UACUAAC tworzy komplementarną strukturę z sekwencją graniczną 5'. Prowadzi to do zbliżenia ze sobą końców 5' i 3' intronu. Jednocześnie powstała dwuniciowa struktura RNA-RNA mogłaby być elementem rozpoznawanym przez endonukleazę nacinającą granice intronu.

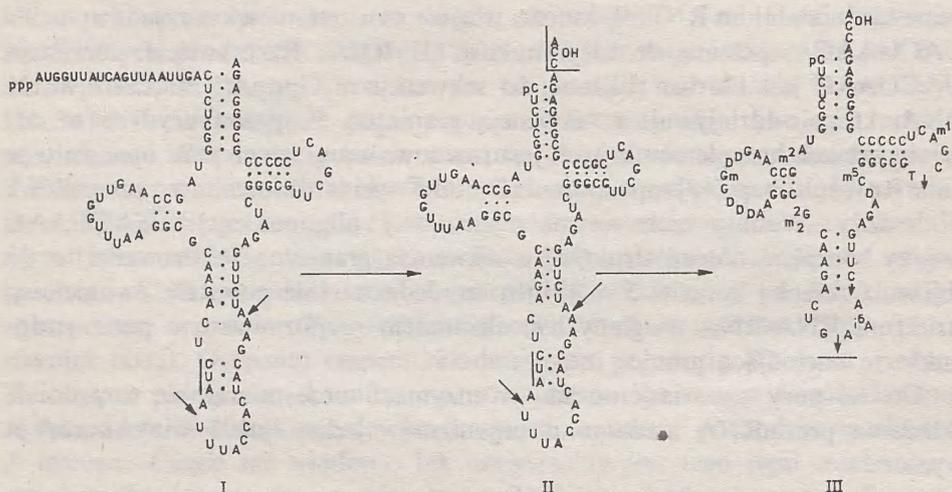
Do tej pory nie wiadomo nic o enzymach uczestniczących w procesie składania pre-mRNA zarówno u organizmów jedno- jak i wielokomórkowych.

GENY PODZIELONE KODUJĄCE tRNA W JĄDRZE

Struktura jądrowych genów tRNA została najlepiej poznana u drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*. Ocenia się, że mniej więcej 10% z około 400 genów jądrowych kodujących różne tRNA u drożdży to geny podzielone. Należą do nich wszystkie geny tRNA^{Tyr} i tRNA^{Phe}, niektóre geny tRNA^{Leu}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Ser} i kilka innych. Podzielone geny tRNA stwierdzono również u *Neurospora crassa*, *Drosophila* oraz u ropuchy, *Xenopus laevis*. Ostatnio doniesiono, że pierwsze dwa zsekwencjonowane geny tRNA u archebakterii, *Solfolobus sulfataricus*, zawierają introny [26].

We wszystkich wspomnianych wyżej przypadkach pojedyncze introny o długości od 13 do 60 nukleotydów przerywają sekwencję kodującą tRNA w identycznym miejscu — jeden nukleotyd w kierunku 3' za antykodonem. Strukturę prekursorowego tRNA oraz jego przekształcenie w dojrzałą cząsteczkę przedstawia rysunek 5. Transkrypcja genu tRNA prowadzi do powstania prekursora zawierającego obok intronu również dodatkowe sekwencje na końcach 5' i 3'. Pre-tRNA przekształcany jest w dojrzałą cząsteczkę na terenie jądra. Zwykle najpierw następuje odcinanie dodatkowych sekwencji na końcach, potem wycięcie intronu i ligacja powstałych połówek tRNA,

na końcu dołączenie sekwencji 3'-końcowej CCA [1, 13, 23]. Ani granice intronu z eksonami, ani same introny nie mają podobnych sekwencji w różnych pre-tRNA. Wydaje się, że elementem rozpoznawanym przez enzymy usuwające intron jest struktura drugo- i trzeciorzędowa prekursora. Długość intronu nie wpływa na wydajność procesu składania ponieważ stwierdzono, że sztuczne wydłużenie intronu drożdżowego genu tRNA^{Leu} o 21 nukleotydy nie zakłóca jego ekspresji.

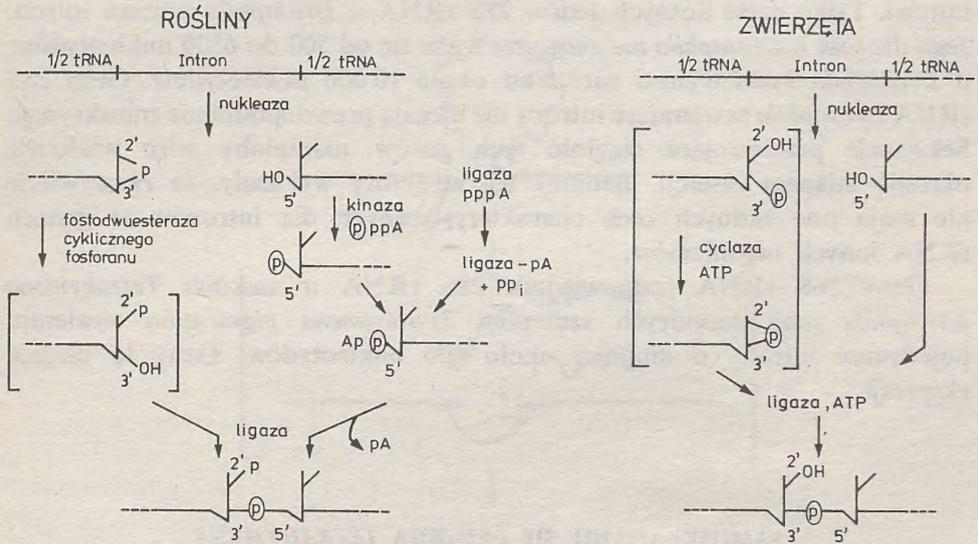


Rys. 5. Dojrzwianie drożdżowego pre-tRNA^{Tyr}. I — Transkrypt zawierający 5'-końcowy lider oraz intron; II — Produkt przejściowy z usuniętym (przez rybonukleazę P) 5'-końcowym liderem oraz dobudowaną do końca 3' sekwencją CCA; III — Dojrzały tRNA^{Tyr} z usuniętym intronem. Strzałki wskazują granice intronu oraz miejsce ligacji połówek tRNA. Podkreślony jest antykodon. W dojrzałym tRNA zaznaczone są również modyfikowane nukleotydy

W przeciwieństwie do składania prekursorów mRNA, mechanizm wycinania intronów z pre-tRNA jest dość dokładnie poznany. Scharakteryzowano również dobrze enzymy uczestniczące w tym procesie. Endonukleaza oczyszczona z komórek drożdżowych związana jest z błoną jądrową. Ten sam enzym wycina introny z wszystkich prekursorów tRNA, pozostawiając na końcu 3' lewej połówki tRNA 2',3'-cykliczny fosforan, a na końcu 5' prawej połówki — grupę hydroksylową [42]. Bardzo interesujący jest mechanizm łączenia dwóch połówek tRNA. Najpierw kinaza polinukleotydomowa w obecności ATP fosforyluje grupę 5'-OH prawej połówki tRNA. Następnie cykliczna fosfodwuesteraza przekształca 2', 3'-cykliczny fosforan na końcu 3' lewej połówki w grupę 2'-fosforanową, a ligaza RNA łączy oba końce przez nieopisany dawniej typ wiązania zwany wiązaniem 2'-fosfomono, 3', 5'fosfodwuestrowym ($-N_3^2-p-5N-$). Grupa 2'fosforanowa znajdująca się w miejscu ligacji dwóch połówek tRNA jest później usuwana przez fosfatazę, ponieważ nie odnajduje się jej w dojrzałych cząsteczkach tRNA.

Ligację eksonów tRNA przez wiązanie $N\text{---}P\text{---}N$ katalizują enzymy pochodzące z zarodków pszenicy, z drożdży oraz z glon, *Chlamydomonas*. Wydaje się, że ta droga ligacji jest charakterystyczna dla niższych jednokomórkowych eukariontów oraz dla roślin [16, 23, 28, 49].

Ligaza pochodząca z komórek zwierzęcych, choć podobnie jak enzym roślinny wymaga cyklicznego fosforanu na końcu lewej połówki tRNA, łączy ze sobą oba eksony przez normalne wiązanie 3', 5'-fosfodwustrowe



Rys. 6. Mechanizm składania jądrowych pre-tRNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Ligaza roślinna aktywuje 5'-fosforan przez tworzenie kowalencyjnego kompleksu AMP-białko. W przypadku zwierząt nie wiadomo czy endonukleaza pozostawia na końcu 3' eksonu cykliczny fosforan, czy też tworzony on jest przez enzym cyklazę 3'-fosforanu, który zidentyfikowano w komórkach zwierzęcych. Fosforan tworzący wiązanie fosfodwustrowe na granicy eksonów zamknięty jest w kółko. (Według [16])

[17]. Tak więc, proces składania pre-tRNA w komórkach zwierzęcych różni się dość zasadniczo od analogicznej reakcji u roślin i niższych eukariontów [16]. Schemat dwóch różnych dróg składania tRNA, uwzględniający dodatkowo kilka szczegółów związanych z mechanizmem ligacji eksonów przedstawia rysunek 6.

JĄDROWE GENY KODUJĄCE RYBOSOMALNY RNA

Jądrowe geny rRNA u eukariontów kodują cztery rodzaje cząsteczek RNA wchodzących w skład cytoplazmatycznych rybosomów: 5S, 5,8S, 18S i 28S. Geny dla RNA 5S transkrybowane są przez RNA-polimerazę III; nie stwierdzono występowania w nich intronów. Trzy pozostałe RNA transkry-

bowane są razem w postaci długiego prekursora przez RNA-polimerazę I. U ssaków prekursor taki, pre-rRNA 45S ma długość 12 500 nukleotydów. Sekwencje dla różnych rRNA występują w nim w kolejności, licząc od końca 5': RNA 18S — RNA 5.8S — RNA 28S. Odpowiednie nukleazy wycinają z pre-rRNA 45S poszczególne rRNA [1]. U ssaków żaden z trzech wspomnianych wyżej genów nie zawiera intronów. Występują one natomiast w genach dla 28S rRNA *Drosophila* (pojedynczy intron), śluzowca, *Physarum polycephalum* (dwa introny) oraz pierwotniaka, *Tetrahymena* (pojedynczy intron). Tylko część licznych genów 28S rRNA u *Drosophila* zawiera intron. Jego długość u *Drosophila melanogaster* waha się od 500 do 6500 nukleotydów, u *Drosophila hydei* wynosi natomiast około 10 000 nukleotydów. Geny 28S rRNA *Drosophila* zawierające introny nie ulegają prawdopodobnie transkrypcji. Sekwencje przerywające ciągłość tych genów należałoby więc właściwie określić mianem insercji. Badania ich struktury wykazały, że rzeczywiście nie mają one żadnych cech charakterystycznych dla intronów w genach rRNA innych organizmów.

Geny 26S rRNA (odpowiednik 28S rRNA u ssaków) *Tetrahymena termophila* oraz niektórych szczepów *Tetrahymena pigmentosa* zawierają pojedyncze introny o długości około 400 nukleotydów. Geny te ulegają ekspresji.

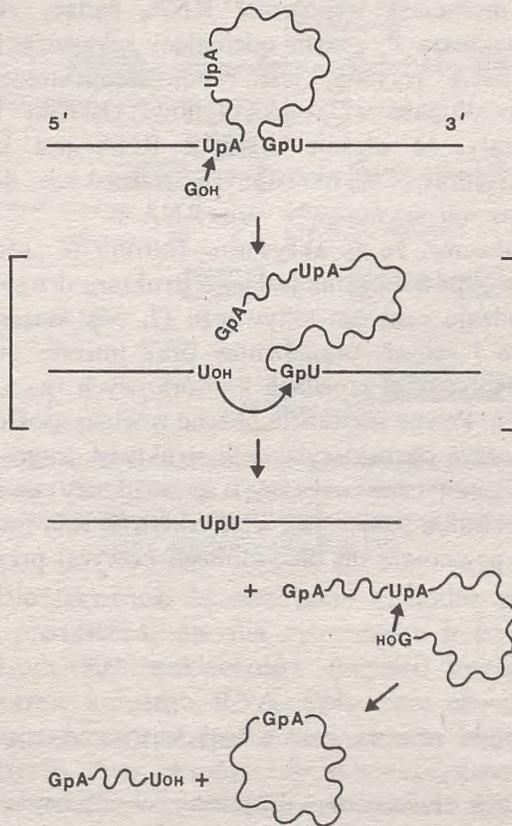
SAMOSKŁADANIE SIĘ PRE-rRNA *TETRAHYMENA*

Badania nad mechanizmem składania transkrypty pre-rRNA u *Tetrahymena termophila* doprowadziły do jednego z najbardziej sensacyjnych odkryć biologii molekularnej w ostatnim dziesięcioleciu. Cech i wsp. [30, 34, 54] wykazali, że składanie tego pre-rRNA zachodzi, przynajmniej *in vitro*, bez udziału białkowego enzymu i źródła energii z zewnątrz. W reakcji tej funkcję enzymu pełni sam intron; dodatkowe wymagane czynniki to guanozyna oraz kationy jedno- i dwuwartościowe. Składanie pre-rRNA *Tetrahymena*, przedstawione schematycznie na rysunku 7, rozpoczyna się od przyłączenia reszty guanozyny do RNA w okolicy granicy ekson/intron. Graniczne wiązanie fosfodwuestrowe między resztami U i A ulega przerwaniu i 5'-końcowy fosforan intronu zostaje przeniesiony na grupę 3'-OH wolnej guanozyny. Uwolniony koniec 5' intronu zostaje więc wydłużony o resztę G dołączoną przez wiązanie fosfodwuestrowe 3'-5'. W następnym etapie nowo powstały 3'-hydroksyl urydyny na końcu lewego eksonu atakuje wiązanie fosfodwuestrowe między resztami G i U na granicy 3' intronu. Dochodzi do kowalencyjnego połączenia obu eksonów i uwolnienia intronu w formie liniowej cząsteczki.

Wbrew oczekiwaniom reakcja toczy się dalej. Liniowy intron przekształca

się, ciągle w nieobecności białka, w formę kolistą. Wiązanie UpA położone 15 nukleotydów od końca 5' intronu ulega przerwaniu. Powstały w tej reakcji nowy koniec 5' intronu łączy się z końcem 3', dając kolistą cząsteczkę RNA. Zamknięcie intronu w kółko na ostatnim etapie zapobiega, być może cofaniu się reakcji składania, czyli ponownemu włączeniu intronu do rRNA.

Opisany proces wycinania intronu, łączenia eksonów oraz przekształcania formy liniowej intronu w kolistą jest serią transestryfikacji, swoistą wymianą



Rys. 7. Schemat „samoskładania się” pre-rRNA u *Tetrahymena thermophila*. Intron oznaczony jest linią falistą, eksony — linią ciągłą. (Według [54] i [30])

lub przelączeniem wiązań fosfodwuestrowych. Przerwaniu każdego wiązania fosfodwuestrowego towarzyszy odtworzenie innego, nowego. Dzięki temu cały proces może odbywać się bez dostarczania energii pochodzącej, np. z hydrolizy ATP. Stąd również wymaganie guanozyny, która spełnia rolę akceptora fosforanu w pierwszej transestryfikacji.

RNA zdolny do katalizowania własnych przemian nazwano rybozymem, przez analogię do enzymu — białka. Choć podobieństwo między klasycznym enzymem i rybozymem jest rzeczywiście ogromne należy pamiętać o jednej bardzo zasadniczej różnicy. Intronowy RNA może przeprowadzać tylko jeden cykl reakcji i działa jedynie w pozycji *cis* czyli wycina tylko siebie z pre-rRNA, w którym się znajduje. W komórce *Tetrahymena* reakcja składania pre-rRNA przebiega 60 razy szybciej. Prawdopodobnie wspomagana jest ona przez białka, które ułatwiają intronowemu rRNA przyjęcie właściwej struktury.

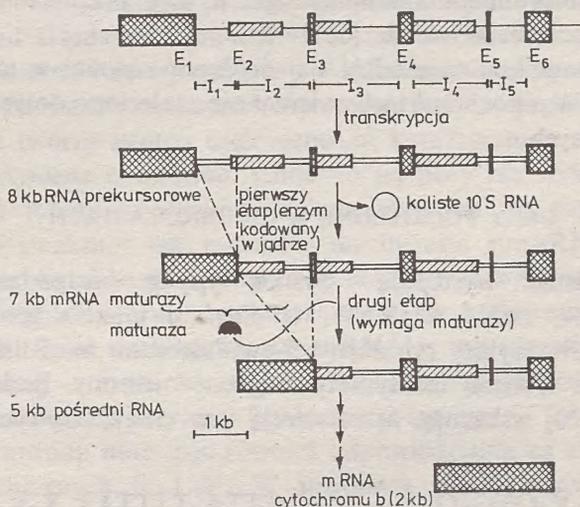
Warto w tym momencie wspomnieć RNA, będący składnikiem rybonukleazy P. Rybonukleaza P, enzym odcinający sekwencję liderową z końca 5' prekursorów tRNA (rys. 5) jest rybonukleoproteidem zawierającym cząsteczkę RNA o długość 377 nukleotydów. Ostatnie badania Atmana i wsp. [24] wykazały, że właśnie składnik RNA jest katalityczną podjednostką enzymu, zdolną w określonych warunkach do samodzielnego odcinania 5' końcowych sekwencji w pre-tRNA.

Wiadomo już obecnie, że za aktywność intronu w „samoskładaniu się” rRNA *Tetrahymena* odpowiedzialna jest jego struktura drugo- i trzeciorzędowa tworząca coś w rodzaju centrum aktywnego [7, 54]. Introny w genach dla rRNA *Tetrahymena* i innych organizmów oraz introny genów kodujących mRNA, tRNA i rRNA w organellach komórkowych (patrz niżej) zawierają wiele cech wspólnych. Pewne sekwencje obecne w wielu spośród wspomnianych intronów mogą tworzyć charakterystyczne struktury drugo- i trzeciorzędowe [11, 35]. Badania genetyczne wskazują, że struktury te są niezbędne do prawidłowego dojrzewania RNA. Tak więc, aktywna rola intronu w składaniu nie ogranicza się z pewnością do omówionego powyżej przykładu pre-tRNA *Tetrahymena*.

GENY PODZIELONE W MITOCHONDRIACH

W mitochondriach stwierdzono dotychczas występowanie genów podzielonych kodujących mRNA i rRNA; mitochondrialne geny tRNA nie zawierają intronów. Geny kodujące mRNA zostały najlepiej scharakteryzowane u grzybów, szczególnie u drożdży, *Saccharomyces cerevisiae* [3, 32, 51]. Drożdżowy gen cytochromu b składa się z 6 eksonów i 5 intronów (rys. 8); istnieją jednak szczepy drożdżowe zawierające krótszą formę tego genu, pozbawioną trzech pierwszych intronów. Inny podzielony gen w drożdżowych mitochondriach — kodujący podjednostkę I oksydazy cytochromowej — ma 7 intronów. Pre-mRNA mitochondrialne składane są z pewnością inaczej niż pre-mRNA w jądrze. Ich introny nie zawierają granicznych sekwencji największej zgodności, charakterystycznych dla intronów jądrowych. Bardzo nieoczekiwane było stwierdzenie, że niektóre z intronów w obydwu wspomnianych

nych wyżej genach mitochondrialnych mają otwarte fazy odczytu, co świadczy o kodowaniu przez nie białek [32, 51]. Wykazano, że białka takie rzeczywiście powstają; nazwano je maturazami (z ang. mature — dojrzewać) ponieważ uczestniczą one w składaniu pre-mRNA w mitochondriach. Nie wiadomo dotychczas na czym dokładnie polega ich rola w tym procesie.



Rys. 8. Składanie pre-mRNA dla cytochromu b w mitochondriach drożdży. Eksony (E_1 - E_6) oznaczone są grubą czarną linią. Introny (I_1 - I_5) oznaczono cienką linią. Części intronów mogące kodować białko zostały zakreskowane. Dokładnie przedstawiono jedynie dwa pierwsze etapy składania (Według [3])

Warto prześledzić sekwencję zdarzeń jakie zachodzą podczas składania mitochondrialnego pre-mRNA, np. dla cytochromu b (rys. 8). Z długiego transkryptu prekursora (8000 nukleotydów długości) usuwany jest najpierw intron 1 (I_1) w formie kolistego RNA. Połączenie eksonu E_1 z krótkim eksonem E_2 prowadzi do powstania RNA, w którym blok kodujący białko obejmuje nie tylko te dwa eksony, ale również otwartą fazę odczytu intronu I_2 , przylegającą bezpośrednio do fazy odczytu eksonów. Translacja tego odcinka RNA prowadzi do powstania maturazy, która jest niezbędna dla usunięcia intronu I_2 z prekursora cytochromowego mRNA. Wycięcie intronu I_2 oczywiście uniemożliwia dalszą syntezę maturazy. Białko to reguluje więc własną syntezę przez niszczenie kodującego je mRNA. Mechanizm ten zapewnia utrzymanie stałego, dość niskiego, poziomu maturazy w mitochondriach. Części intronów I_3 i I_4 przylegające do eksonów również mają otwarte fazy odczytu; kodują one inne maturazy na dalszych etapach składania cytochromowego pre-mRNA. Jedna z nich, kodowana przez intron I_4 , uczestniczy również w składaniu pre-mRNA innego genu, kodującego podjednostkę I oksydazy cytochromowej. Na czym polega działanie maturaz, dokładnie nie wiadomo. Najprawdopodobniej współdziałają one z produktami

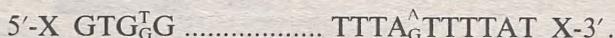
genów jądrowych, które — jak wynika z badań genetycznych — zaangażowane są również w składanie mitochondrialnych pre-mRNA.

Również introny znajdujące się w genach dla większego rRNA w mitochondriach grzybów, m.in. *Saccharomyces cerevisiae* i *Neurospora crassa*, zawierają otwarte fazy odczytu. W przypadku intronu rRNA *Neurospora* istnieją wskazówki, że może on kodować białko rybosomalne mniejszej podjednostki rybosomu mitochondrialnego, a więc produkt nie mający nic wspólnego z procesem składania [5].

Geny podzielone kodujące mRNA stwierdzono również w mitochondriach roślin wyższych. W mitochondriach zwierząt nie znaleziono dotychczas żadnych genów podzielonych.

GENY PODZIELONE W CHLOROPLASTACH

W chloroplastach występują wszystkie typy genów podzielonych: geny kodujące mRNA, rRNA i tRNA. U *Euglena gracilis* gen dla większej podjednostki karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanu ma 9 intronów, a gen jednego z białek systemu fotosyntetycznego — 4 introny. Badania struktury tych intronów [20] wskazują, że zawierają one charakterystyczne sekwencje graniczne:



Przypominają one sekwencje największej zgodności w genach jądrowych kodujących mRNA.

Introny w chloroplastowych genach tRNA różnią się od intronów w genach jądrowych długością, a często również lokalizacją. I tak, np. w chloroplastach kukurydzy introny w genach tRNA^{Ile}, tRNA^{Ala} i tRNA^{Leu} mają długość odpowiednio 949, 806 i 458 nukleotydów. Wszystkie one są umieszczone w pętli antykodonu z tym, że — w odróżnieniu od genów jądrowych — intron w genie tRNA^{Leu} znajduje się między pierwszą i drugą literą antykodonu, a w genie tRNA^{Ile} dwa nukleotydy za antykodonem. W genie tRNA^{Gly} w chloroplastach tytoniu długi intron umiejscowiony jest w ramieniu pętli I (dwuhydrourydylowej) tRNA [12]. Introny niektórych chloroplastowych genów tRNA mają podobnie do genów mitochondrialnych, długie sekwencje potencjalnie zdolne do kodowania białek. Nie wiadomo jednak czy rzeczywiście kodują one białka.

Podzielony gen kodujący większy rybosomalny RNA stwierdzono w chloroplastach glonu *Chlamydomonas*.

ROLA STRUKTURY INTRONÓW W SKŁADANIU RNA

Analiza sekwencji i prawdopodobnej struktury drugo- i trzeciorzędowej intronów genów mitochondrialnych i chloroplastowych oraz genów jądrowych

kodujących rybosomalne RNA, w tym również intronu samoskładającego się pre-rRNA *Tetrahymena*, wskazuje na ich znaczne podobieństwo. Introny te podzielono na dwie grupy [11, 35]. Wszystkie introny w obrębie jednej grupy zawierają kilka charakterystycznych sekwencji nukleotydowych oraz dwuniciowych ramion RNA. Ich umiejscowienie i oddziaływanie drugo- i trzeciorzędowe między nimi sprawiają, że wszystkie te introny mają rdzeń o bardzo podobnej strukturze przestrzennej [35]. Wyniki badań genetycznych, szczególnie nad składaniem pre-mRNA w mitochondriach grzybów [32, 51], potwierdzają istotną rolę tej struktury w składaniu. Na czym ta rola polega? Albo jest ona elementem rozpoznawanym przez enzymy prowadzące składanie, albo też sama tworzy istotną część centrum katalitycznego na podobieństwo intronu *Tetrahymena thermophila*. Choć do tej pory nie wykazano zdolności prekursorowych RNA w organelach komórkowych do samoskładania się, podobieństwo struktury ich intronów do intronu pre-rRNA *Tetrahymena* sugeruje, że autokataliza może odgrywać istotną rolę w składaniu tych RNA. Udział białek typu maturaz oraz pewnych białek kodowanych przez genom jądrowy — ich udział w składaniu pre-mRNA w mitochondriach jest dobrze udokumentowany — może polegać jedynie na utrzymaniu, poprzez oddziaływanie z RNA, właściwej aktywnej konformacji intronu.

Struktura intronu może być również odpowiedzialna za zbliżenie do siebie obszarów granicznych 5' i 3'. W intronach wielu omawianych powyżej genów występuje sekwencja RNA (tzw. sekwencja IGS — z ang. internal guide sequence), która jest komplementarna do obu obszarów granicznych intronu [11]. Może ona zbliżać do siebie końce eksonów mających ulec połączeniu. Sytuacja ta przypomina nieco udział U1 SnRNA w składaniu prekursorowych mRNA w jądrze.

ILE JEST MECHANIZMÓW SKŁADANIA RNA?

W oparciu o dotychczasowe wyniki badań można wyodrębnić trzy zasadnicze typy reakcji składania RNA [7, 16]. Omówione powyżej dane o strukturze wszystkich organelowych pre-RNA (może z wyjątkiem pre-mRNA w chloroplastach) oraz jądrowych prekursorów rRNA wskazują, że wszystkie RNA w obrębie tej grupy mogą ulegać składaniu w podobny sposób. W tej grupie prekursorów struktura intronu wydaje się odgrywać najbardziej istotną rolę. Może ona polegać na samodzielnym, jak w przypadku pre-rRNA *Tetrahymena*, katalizowaniu wszystkich reakcji składania. W przypadku innych RNA intron może pełnić rolę bardziej bierną i być elementem strukturalnym rozpoznawanym przez wiele czynników białkowych. Kolejnym wariantem tej grupy byłby mechanizm składania grzybowych pre-mRNA z udziałem maturaz kodowanych przez introny.

Zupełnie odmienny jest mechanizm składania jądrowych pre-mRNA. Czynnikiem decydującym o prawidłowości składania prekursora są w tym przypadku głównie sekwencje graniczne; struktura wewnętrzna intronu wydaje się być bez znaczenia. Składanie pre-mRNA wymaga prawdopodobnie dość rozbudowanego aparatu enzymatycznego. Być może, podobnie składane są pre-mRNA w chloroplastach.

Trzeci mechanizm, niewątpliwie najlepiej ze wszystkich scharakteryzowany, wykorzystywany jest podczas składania prekursorów tRNA w jądrze. Elementem rozpoznawanym przez enzymy (endonukleazę i ligazę) jest struktura drugo- i trzeciorzędowa pre-tRNA; intron, ani sekwencje graniczne nie odgrywają w tym procesie większej roli. Badania nad enzymologią składania jądrowych pre-tRNA wykazały znaczne odrębności w procesie ligacji eksonów u roślin i zwierząt (rys. 6).

EWOLUCJA GENÓW PODZIELONYCH, ROLA INTRONÓW

Po odkryciu genów zawierających introny i po ustaleniu, że mechanizm ich ekspresji polega na syntezie mozaikowych transkryptów i ich składaniu, pojawiło się wiele spekulacji na temat pochodzenia genów podzielonych i ich roli [2, 9, 10, 14, 19, 44]. Od początku nie ulegało wątpliwości, że geny podzielone są ewolucyjnie bardzo stare. Przemawiały za tym, między innymi, powszechność ich występowania u eukariontów, a także podobieństwo lokalizacji intronów w pokrewnych genach takich jak α - i β -globiny, powstałych prawdopodobnie w wyniku duplikacji jednego podzielonego genu globinowego około 500 mln lat temu. Przed kilkoma laty, kiedy brak było jakichkolwiek danych o istnieniu genów podzielonych u prokariontów rozważano możliwość, że geny podzielone powstały w wyniku insercji sekwencji niekodujących do genów ciągłych, charakterystycznych dla niższych form ewolucyjnych. Przyjmując takie rozwiązanie trudno było jednak wytłumaczyć jaką bezpośrednią korzyść i przewagę selekcyjną mogło dawać organizmowi wstawienie w obręb funkcjonalnego genu fragmentów obcego DNA, szczególnie jeśli organizm ten nie dysponował wydajnym mechanizmem usuwania intronów. Argument, że włączenie intronów do genów ciągłych miało służyć zwiększeniu potencjału ewolucyjnego eukariontów jest oczywiście nie do przyjęcia, ponieważ zakłada działanie celowe.

O wiele bardziej prawdopodobna wydaje się wersja, że geny praorganizmów, z których wywodzą się znane dzisiaj pro- i eukarionty miały już strukturę mozaikową. Zgodnie z tym poglądem geny ciągłe, charakterystyczne dla bakterii, byłyby strukturami wtórnymi, które powstały z genów podzielonych na skutek wyeliminowania intronów. Hipotezę o pierwotnym charakterze genów podzielonych postawili po raz pierwszy Doolittle [14] i Darnell [10] w 1978 roku. Popierają tę hipotezę ostatnie doniesienia o występowaniu

u archebakterii podzielonych genów tRNA o strukturze identycznej do genów eukariotycznych [26] oraz o obecności intronu w genie syntetazy tymidylanowej bakteriofaga T4 [8]. Dość powszechne występowanie genów podzielonych w organellach komórkowych, nawet takich organizmów jak drożdże, których geny jądrowe nie zawierają wielu intronów, popiera — jeśli przyjmiemy pogląd o prokariotycznym pochodzeniu organelli — tezę o pierwotnym charakterze genów podzielonych.

Obecnie przyjmuje się dość powszechnie, że nie DNA ale RNA był pierwotnym materiałem genetycznym [44]. Czy takie RNA-prageny na wczesnych etapach ewolucji miały już strukturę mozaikową? Jeśli tak, to jakie korzyści mogło to dawać pierwotnym organizmom i jak komórka radziła sobie ze składaniem kodujących fragmentów RNA w sytuacji gdy białkowy aparat enzymatyczny był jeszcze bardzo prymitywny? Odpowiedzi na ostatnie pytanie udzieliły przytoczone powyżej doniesienia o samoskładającym się pre-mRNA *Tetrahymena* oraz o katalitycznej endonukleolitycznej aktywności cząsteczki RNA — składnika bakteryjnej rybonukleazy P. Obie te reakcje odzwierciedlają prawdopodobnie bardzo starą formę katalizy uzupełnioną potem lub zastąpioną całkowicie przez bardziej złożone układy białkowe. Składanie RNA mogło więc być katalizowane przez RNA: albo przez sekwencje intronowe; albo przez osobne cząsteczki adaptorowe zbliżające do siebie, przez oddziaływania komplementarne, obie granice intronu. Ślady tego typu reakcji, przetrwałe do dzisiaj, nie ograniczają się prawdopodobnie do samoskładania się pre-rRNA i funkcji RNazy P. RNA intronu pełni aktywną rolę w składaniu transkryptów mitochondrialnych; udowodniona jest rola kopony rybonukleinowej różnych SnRNP, tak w składaniu jak i w przekształceniach na końcu 3' pre-mRNA.

Problemy te omawiają również obszernie Reaney i Doolittle w cytowanych już wcześniej artykułach [14, 44]. Autorzy ci twierdzą, że mozaikowe geny i możliwość składania fragmentów RNA pochodzących z jednego, a może nawet wielu różnych — nie można bowiem wykluczyć istnienia składania międzycząsteczkowego — transkryptów, mogły znacznie zwiększać potencjał kodujący pierwotnych organizmów. Szczególne znaczenie na tym etapie ewolucji mogło mieć składanie alternatywne, z pewnością bardziej niż obecnie powszechne ze względu na brak precyzyjnych enzymów. Dzięki temu transkrypcja nawet bardzo niewielkiego genomu prowadziłaby do powstania nieskończonych wprost ilości matryc, które mogły być poddane testowaniu i selekcji. Składanie mozaikowych transkryptów, tak wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe mogło być również czynnikiem kompensującym brak precyzji w replikacji i transkrypcji materiału genetycznego prymitywnych organizmów. Nawet jeśli tylko jeden z wielu podobnych do siebie eksonów był skopiowany właściwie, to dzięki składaniu istniała możliwość tworzenia cząsteczek mRNA mających w całości prawidłową strukturę.

Powyższe rozważania o występowaniu i roli podzielonych genów na wczesnych etapach ewolucji mają oczywiście charakter bardzo spekulatywny.

Bardziej wiarygodne są rozważania nad znaczeniem genów podzielonych w ewolucji eukariontów, oparte na szerokich badaniach porównawczych genów podzielonych u różnych organizmów oraz korelacji struktury mozaikowej genów ze strukturą kodowanych przez nie białek. Gilbert [19] zaproponował, że poszczególne eksony w genach podzielonych odpowiadają odrębnym funkcjonalnie lub strukturalnie fragmentom białek, tzw. domenom. Zwrócił on również uwagę na to, jak wielkie znaczenie dla ewolucji, przede wszystkim dzięki możliwości tworzenia nowych i bardziej złożonych kombinacji eksonów przez rekombinację lub duplikację DNA, mogła mieć i z pewnością ma nadal mozaikowa organizacja genów.

Związek między eksonami i domenami białkowymi rzeczywiście wykazano w bardzo wielu przypadkach (lizozym, immunoglobuliny, globiny, owomukoid, kolagen). Najlepszym przykładem są chyba geny kodujące immunoglobuliny (rys. 4). Każda z odrębnych części łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (hydrofobowy lider, część zmienna, poszczególne domeny części stałej) kodowana jest przez osobny ekson. W genach dla α - i β -globin ekson środkowy koduje fragment białka odpowiedzialny za wiązanie hemu. Większość z 50 eksonów genu dla prokolagenu α_2 ma długość 54 par zasad i każdy taki ekson koduje 18-aminokwasowy fragment białka o bardzo podobnej strukturze. Pojedynczy ekson reprezentuje prawdopodobnie prymitywną formę minigeny, który przez wielokrotne duplikacje przekształcił się w podzielony gen o tak złożonej strukturze [53].

Istnienie genów podzielonych zawierających eksony kodujące wyspecjalizowane fragmenty polipeptydowe stworzyło możliwość znacznego przyspieszenia ewolucji białek [2, 9, 10, 19]. Istniejące jednostki kodujące mogły ewoluować nie tylko przez mutacje punktowe (co jest procesem bardzo powolnym) ale również „skokowo” dzięki włączaniu się w ich obręb nowych eksonów, funkcjonujących poprzednio samodzielnie albo w innych genach złożonych. Na przykład, uzyskanie eksonu, kodującego hydrofobowy polipeptyd sygnałowy odpowiedzialny za oddziaływanie białka z błoną, mogło całkowicie zmienić dotychczasową lokalizację komórkową polipeptydu. Samo rozciągnięcie genu, a w szczególności obecność długich intronów, znacznie zwiększają częstość i skuteczność tego typu rekombinacji. Przemieszczenie w obręb istniejącego intronu, wszystko jedno w jakie miejsce, nowej sekwencji kodującej wraz z przyległymi do niej fragmentami intronów automatycznie prowadzi do powstania mRNA wydłużonego o nowy ekson (choć ekson ten nie zawsze znajdzie się w fazie odczytu zgodnej z poprzedzającym go RNA). W przypadku genów podzielonych również pojedyncze mutacje punktowe mogą mieć ogromny wpływ na strukturę produktów białkowych. Mutacja na granicy intronu może powodować zmianę w schemacie składania transkryptu prowadzącą do syntezy zupełnie nowego białka. Opisane zjawiska nie mogą zachodzić w genach o strukturze ciągłej.

Uznając rolę jaką geny podzielone mogły i mogą nadal odgrywać w ewolucji, pozostaje ciągle nie wyjaśnione pytanie dlaczego introny nie

zostały w procesie tejże samej ewolucji całkowicie wyeliminowane zgodnie z oczekiwaniem, że prostsze i bardziej wydajne energetycznie struktury ciągle powinny podlegać pozytywnej selekcji. Wydaje się, że ciągła struktura genomów prokariotów odzwierciedla właśnie naturalną tendencję do selekcjonowania rozwiązań prostych i energetycznie korzystnych. Przodkowie znanych nam dzisiaj prokariotów pozbyli się prawdopodobnie na jakimś etapie ewolucji intronów, co umożliwiło im bardzo wydajny i szybki rozwój, ale łączyło się z utratą potencjału ewolucyjnego jaki niesły ze sobą geny podzielone. Podobnie wygląda sytuacja u niższych eukariotów, na przykład u drożdży. Ich niewielki genom zawiera jedynie kilka genów podzielonych kodujących mRNA; ogranicza to ich możliwości ewolucyjne, ale pozwala na oszczędności w wydatkowaniu energii, na intensywne podziały komórkowe itp.

Z form, które nie utraciły intronów rozwinęły się znane nam dzisiaj organizmy wyższe. Z jakiego powodu nie widać u nich tendencji w kierunku eliminowania intronów? Główną przyczyną tego jest prawdopodobnie uzyskanie przez introny w procesie ewolucji różnych funkcji. Dzięki istnieniu intronów działa wiele subtelnych mechanizmów regulacyjnych (niektóre z nich omówiono wcześniej). W obrębie intronów stwierdzono występowanie, tzw. sekwencji wzmacniających (enhancers) niezbędnych do wydajnej — a często również specyficznej tkankowo — transkrypcji genów. Jeszcze bardziej intrygujące jest spostrzeżenie, że introny mogą zawierać, tzw. sekwencje identyfikujące odpowiedzialne za uaktywnianie genów w centralnym układzie nerwowym [36]. Dalsze badania, szczególnie nad rozwojem organizmów wyższych, nad różnicowaniem się komórek przyniosą z pewnością jeszcze wiele niespodzianek związanych z rolą genów podzielonych.

LITERATURA

- [1] Abelson J. — *RNA processing and the intervening sequence problem*. Ann. Rev. Biochem. 48: 1035-1069, 1979.
- [2] Blake C. — *Exons — present from the beginning?* Nature 306: 535-537, 1983.
- [3] Borst P., Grivell L. A. — *One gene's intron is another gene's exon*. Nature 289: 439-440, 1981.
- [4] Breathnach R., Chambon P. — *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins*. Ann. Rev. Biochem. 50: 349-383, 1981.
- [5] Burke J. M., RajBhandary U. L. — *Intron within the large rRNA gene of N. crassa mitochondria: a long open reading frame and a consensus sequence possibly important in splicing*. Cell 31: 509-520, 1982.

- [6] Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi Y.C. — *SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing*. Ann. Rev. Biochem. 51: 617-654, 1982.
- [7] Cech T.R. — *RNA splicing: three themes with variations*. Cell 34: 713-716, 1983.
- [8] Chu F., Maley G., Maley F., Belfort M. — *Expression of an intron-containing prokaryotic thymidylate synthetase gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, w druku, 1984.
- [9] Crick F. — *Split genes and RNA splicing*. Science 204: 264-271, 1979.
- [10] Darnell J.E. — *Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells*. Science 202: 1257-1260, 1978.
- [11] Davies R.W., Waring R.B., Ray J.A., Brown T.A., Sczarcocchio C. — *Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria*. Nature 300: 719-724, 1982.
- [12] Deno H., Sugiura M. — *Chloroplast tRNA^{Gly} gene contains a long intron in the D stem: nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Gly} (UCC) and tRNA^{Arg} (UCU)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 405-408, 1984.
- [13] De Robertis E.M., Olson M.V. — *Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes*. Nature 278: 137-143, 1979.
- [14] Doolittle W.F. — *Genes in pieces: were they ever together*. Nature 272: 581-582, 1978.
- [15] Erbil C., Niessing J. — *The primary structure of the duck α^D -globin gene: an unusual 5' splice junction sequence*. The EMBO J. 2: 1339-1343, 1983.
- [16] Filipowicz W., Gross J.J. — *RNA ligation in eukaryotes*. TIBS 9: 68-71, 1984.
- [17] Filipowicz W., Shatkin A.J. — *Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract*. Cell 32: 547-557, 1983.
- [18] Fronk J. — *Geny mazikowe — struktura, ekspresja, ewolucja*. Post. Biochem. 28: 3-24, 1982.
- [19] Gilbert W. — *Why genes in pieces*. Nature 271: 501, 1978.
- [20] Gingrich J., Stiegler G., Farlej M., Delius H., Hallick R.B. — *Chloroplast protein genes in Euglena contain multiple introns*. Cell 36: 545-553, 1984.
- [21] Grabowski P.J., Padgett R.A., Sharp P.A. — *Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate*. Cell, w druku, 1984.
- [22] Green M.R., Maniatis T., Melton D.A. — *Human β -globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in Xenopus oocyte nuclei*. Cell 32: 681-694, 1983.
- [23] Greer C., Peebles C.L., Gegenheimer P., Abelson J. — *Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing*. Cell 32: 537-546, 1983.
- [24] Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. — *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. Cell 35: 849-857, 1983.
- [25] Hernandez N., Keller W. — *Splicing of in vitro synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell extracts*. Cell 35: 89-99, 1983.
- [26] Kaine B.P., Gupta R., Woese C.R. — *Putative introns in tRNA genes of prokaryotes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3309-3312, 1983.
- [27] Kole R., Weissman S.M. — *Accurate in vitro splicing of human β -globin RNA*. Nucl. Acids Res. 10: 5429-5445, 1982.
- [28] Konarska M., Filipowicz W., Domdey H., Gross H.J. — *Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ*. Nature 293: 112-116, 1981.
- [29] Konarska M., Padgett R.A., Grabowski P.J., Sharp P. — *Messenger RNA splicing in vitro: requirement for a cap structure*. W: Abstracts of the Cold Spring Harbor Symp., str. 54, 1984.
- [30] Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sanda J., Gottschling D.E., Cech T.R. — *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*. Cell 31: 147-157, 1982.
- [31] Kühne T., Wieringa B., Reiser J., Weissmann C. — *Evidence against a scanning model of RNA splicing*. The EMBO J. 2: 727-733, 1983.

- [32] Lazowska J., Jacq C., Slonimski P. P. — *Sequence of introns and flanking exons in the wild type and box3 mutants of the mitochondrial cytochrome b gene reveals an interlaced splicing protein coded by an intron.* Cell 22: 333-348, 1980.
- [33] Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A. — *Are snRNPs involved in splicing?* Nature 283: 220-224, 1980.
- [34] Lewin R. — *RNA can be a catalyst.* Science 218: 872-874, 1982.
- [35] Michel F., Dujon B. — *Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members.* The EMBO J. 2: 33-38, 1983.
- [36] Milner R. J., Bloom F. E., Lai C., Lerner R. A. — *Brain-specific genes have identifier sequences in their introns.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 713-717, 1984.
- [37] Moore K. W., Ragers J., Hunkapiller T., Early P., Nottenburg C., Weissman I., Bazin H., Wall R., Hood L. E. — *Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1800-1804, 1981.
- [38] Mount S. M. — *A catalogue of splice junction sequence.* Nucl. Acids Res. 10: 459-472, 1982.
- [39] Mount S. M., Pettersson I., Hinterberger M., Karmas A., Steitz J. A. — *The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro.* Cell 33: 509-518, 1983.
- [40] Nevins J. R. — *The pathway of eukaryotic mRNA formation.* Ann. Rev. Biochem. 52: 441-466, 1983.
- [41] Padgett R. A., Mount S. M., Steitz J. A., Sharp P. A. — *Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein.* Cell 35: 101-107, 1983.
- [42] Peebles C. L., Gegenheimer P., Abelson J. — *Precise excision of intervening sequence from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease.* Cell 32: 525-536, 1983.
- [43] Piekkielny C. W., Teem J. L., Rosbash M. — *Evidence for the biochemical role of an internal sequence in yeast nuclear mRNA introns: implications for U1 RNA and Metazoan mRNA splicing.* Cell 34: 395-403, 1983.
- [44] Reaney D. — *RNA splicing and polynucleotide evolution.* Nature 277: 598-600, 1979.
- [45] Richards J. E., Gilliam A. C., Shen A., Tucker P. W., Blattner F. R. — *Unusual sequences in the murine immunoglobulin μ - δ heavy-chain region.* Nature 306: 483-487, 1983.
- [46] Sharp P. A. — *Speculations on RNA splicing.* Cell 23: 643-646, 1981.
- [47] Schwaizbauer J. E., Tãmkun J. W., Lemischka I. R., Hynes R. O. — *Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region.* Cell 35: 421-431, 1983.
- [48] Treisman R., Orkin S. H., Maniatis T. — *Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassaemia genes.* Nature 302: 591-596, 1983.
- [49] Tyc K., Kikuchi Y., Konarska M., Filipowicz W., Gross H. J. — *Ligation of endogenous tRNA 3' half molecules to their corresponding 5' halves via 2'-phospho-monoester,3',5'-phosphodiester bonds in extracts of Chlamydomonas.* The EMBO J. 2: 605-610, 1983.
- [50] Wallace J. C., Edmonds M. — *Polyadenylated nuclear RNA contains branches.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 950-954, 1983.
- [51] Weiss-Brummer B., Rõdel G., Schweyen R. J., Kaudewitz F. — *Expression of the split gene cob in yeast: evidence for a precursor of a "maturase" protein translated from intron 4 preceding exons.* Cell 29: 527-536, 1982.
- [52] Wieringa B., Meyer F., Reiser J., Weissmann C. — *Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit β -globin gene.* Nature 301: 38-43, 1983.

- [53] Yamada Y., Avvedimento V. E., Mudryj M., Ohkubo H., Vogeli G., Irani M., Pastan I., de Crombrughe B. — *The collagen gene: evidence for its evolutionary assembly by amplification of a DNA segment containing an exon of 54 bp.* Cell 22: 887-892, 1980.
- [54] Zaug A. J., Grabowski P., Cech T. R. — *Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction.* Nature 301: 578-583, 1983.
- [55] Ziff E. B. — *Transcription and RNA processing by the DNA tumor viruses.* Nature 287: 491-498, 1980.

MAGDALENA BOGUTA

ALEKSANDRA PUTRAMENT

Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, WARSZAWA

SPECYFIKA GENOMÓW MITOCHONDRIALNYCH

KOD GENETYCZNY NIE JEST UNIWERSALNY

WPROWADZENIE

Mitochondria są organellami występującymi w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych. Mają własny DNA (mtDNA), nazywany też genomem mitochondrialnym, oraz własne rybosomy (mitorybosomy) i z tego względu są często nazywane organellami półautonomicznymi. Badania nad genetyką i biogenezą mitochondriów są prowadzone od paru dziesiątków lat. Wyjaśniono wiele spraw dotyczących tych organelli, a jednocześnie, jak w każdym procesie badawczym, odpowiedziom na jedne pytania towarzyszyło powstawanie nowych, liczniejszych pytań. Szczegółowe omówienie genetyki i biologii mitochondriów czytelnicy znajdą w literaturze polskiej [23]. Do artykułu Borsta i Grivella [7] trudno dotrzeć ale warto spróbować.

Aby zrozumieć specyfikę genomów mitochondrialnych należy przypomnieć podstawowe dane na temat mitochondriów. Mitochondria mają zazwyczaj kształt owalny, a rozmiary rzędu $0,5 \times 5 \mu\text{m}$. Jak się wydaje, w drożdżach piekarskich, *Saccharomyces cerevisiae*, kształt mitochondriów jest znacznie bardziej skomplikowany. Mitochondria są zbudowane z dwóch warstw błon o grubości 6 nm. Przestrzeń pomiędzy błonami jest nazywana przestrzenią zewnętrzną. Błona wewnętrzna tworzy liczne fałdy (*cristae*). Przestrzeń otoczona wewnętrzną błoną mitochondrialną nosi nazwę matriks. Integralną częścią błony wewnętrznej są enzymy oddechowe uczestniczące w transporcie elektronów na tlen: kompleks cytochromów b, c_1 i oksydaza cytochromu c (cytochrom $a+a_3$), oraz enzym katalizujący syntezę ATP w procesie oksydatywnej fosforylacji, nazywany ATPazą.

Ponadto w mitochondriach zlokalizowana jest duża grupa enzymów katabolicznych, których funkcje są skoordynowane z transportem elektronów na tlen i oksydacyjną fosforylacją. Są to m.in. enzymy cyklu trójkarbonylowego, enzymy utleniające tłuszcze oraz katalizujące oksydacyjną dezaminację aminokwasów.

Nie wiadomo, na jak wielką skalę przebiegają w mitochondriach procesy anaboliczne, niezależne od mitochondrialnej syntezy białek. Jak dotąd, wiemy jedynie, że w mitochondriach zachodzi pierwszy oraz dwa ostatnie etapy syntezy hemu. W mitochondriach grzybów zachodzą niektóre etapy syntezy aminokwasów.

Drożdże odgrywają od kilku dziesiątków lat szczególną rolę w badaniach nad genetyką i biologią mitochondriów. Po pierwsze, jest to organizm jednokomórkowy, co bardzo ułatwia prowadzenie badań genetycznych. Po drugie, jest to jeden z nielicznych tlenowców fakultatywnych wśród eukariontów, co ułatwia badania fizjologiczne, a także umożliwia otrzymywanie mutantów niezdolnych do oddychania.

Mutanty oddechowe drożdży mające delecje, które obejmują ponad 50% genomu mitochondrialnego (ρ^-), a także zupełnie pozbawione mtDNA (ρ^0) są niezdolne do wzrostu na niefermentowalnych substratach, nie mają enzymów oddechowych, ATPazy, ani mitochondrialnych rybosomów. Mają natomiast podstawowe struktury mitochondrialne, jedynie *cristae* są w nich słabo rozwinięte. W mitochondriach tych mutantów funkcjonują nadal te enzymy, których aktywność nie jest bezpośrednio związana z mitochondrialną syntezą białek. Mutanty te są zdolne do syntezy hemu. Przy powstawaniu mutantów ρ^- zachodzą dwa procesy: degradacja dużych fragmentów mitochondrialnego genomu (dotąd nie wiadomo, jak i dlaczego proces ten zachodzi spontanicznie), oraz zwielokrotnienie (amplifikacja) nie zdegradowanych fragmentów mtDNA, tak, że jego suma w mutantach ρ^- jest taka sama (10-15% ogólnej ilości DNA w komórce) jak w standardowych szczepach ρ^+ . Ten zamplikowany mtDNA jest normalnie replikowany i transkrybowany, a RNA może podlegać obróbce. Dane te wskazują, że białka uczestniczące w wymienionych procesach są kodowane przez genomy jądrowe, syntetyzowane w cytosolu i transportowane do mitochondriów niezależnie od funkcjonowania mitochondrialnych enzymów oddechowych.

Mitorybosomy grzybów i zwierząt mają dwie podjednostki mitorybosomalnego RNA, obie kodowane przez genom mitochondrialny. Mitorybosomy roślin mają również trzecią, „małą” podjednostkę rRNA (podobnie jak rybosomy bakteryjne), też kodowane przez genom mitochondrialny [19]. Prawie wszystkie białka mitorybosomalne są kodowane przez genom jądrowy i syntetyzowane w cytosolu. U drożdży i *Neurospora crassa* tylko jedno białko mitorybosomalne kodowane jest przez mtDNA i syntetyzowane w mitochondriach. Określenie stałej sedymentacji mitorybosomów z drożdży nastręczało wiele trudności, a wyniki poszczególnych doświadczeń były mało powtarzalne (70-73 S). Jednym z powodów tego faktu może być luźne powiązanie z rybosomem niektórych jego białek; mogą się one gubić w trakcie izolowania i oczyszczania preparatów rybosomów. Mitorybosomy zwierzęce mają stałą sedymentacji około 55-60 S.

Genomy mitochondrialne kodują także mitochondrialne tRNA. Metodą hybrydyzacji mtDNA-mtRNA udało się wykryć w genomach mitochondrial-

nych 22-25 genów kodujących tRNA. Nie wykryto przy tym w mitochondriach żadnego tRNA nie hybrydującego z mtDNA, co wskazywało, że tRNA nie jest transportowany do mitochondriów z cytosolu.

Genom mitochondrialny koduje polipeptydy wchodzące w skład podstawowych enzymów oddechowych, a więc apocytochrom b i trzy podjednostki oksydazy cytochromowej. Pozostałe cztery podjednostki oksydazy cytochromowej kodowane są w jądrze i syntetyzowane w cytosolu, a następnie transportowane do mitochondriów, gdzie w połączeniu z podjednostkami syntetyzowanymi w mitochondriach powstaje dopiero aktywny enzym. Z 9 polipeptydów wchodzących w skład ATPazy co najmniej dwa są kodowane przez genom mitochondrialny.

Mitochondrialne genomy to koliste cząsteczki DNA. Strukturę liniową ma mtDNA niektórych pierwotniaków (*Tetrahymena*). Wielkość mitochondrialnych genomów jest różna w różnych grupach organizmów. U zwierząt liczy on około 15 000-16 000 par zasad [23], u roślin może on być nawet 100 razy większy [19]. Genom mitochondrialny drożdży ma wielkość pośrednią [24]. Sumaryczny skład zasad mtDNA jest u zwierząt i roślin zbliżony do składu zasad genomów jądrowych. MtDNA drożdży zawiera około 17-18% par GC, jest więc wyjątkowo bogaty w AT.

W komórkach zwierzęcych liczba genomów mitochondrialnych wynosi około 1000, w komórkach haploidalnych drożdży — około 30. W komórkach roślinnych poza mtDNA występuje także DNA chloroplastowy. Chyba z tego względu nawet w przybliżeniu nie wiadomo dotąd, w ilu kopiach występuje w komórkach roślinnych genom mitochondrialny.

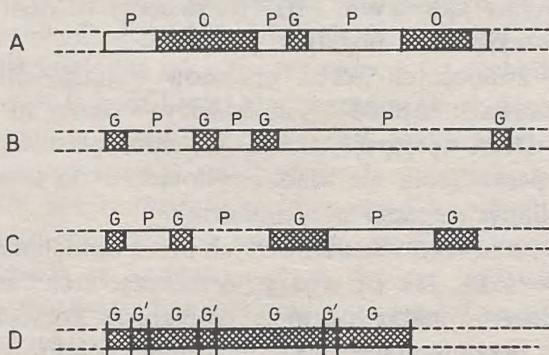
Sposób dziedziczenia cech warunkowanych przez mitochondrialne genomy jest dotąd słabo poznany. Jak się wydaje, u zwierząt cechy mitochondrialne potomstwo dziedziczy od matki być może dlatego, że komórki jajowe mają dużo cytoplazmy, a przypuszczalnie także dużo mitochondriów, w plemnikach zaś i cytoplazmy i mitochondriów jest mało.

U grzybów sytuacja jest bardziej zróżnicowana. W procesie płciowym *Neurospora* powstają bogate w cytoplazmę protoperytecja (odpowiedniki żeńskich organów rozrodczych) i zawarte w nich genomy mitochondrialne są przenoszone do potomstwa, jest więc tu również dziedziczenie maceczne (rolę gamet ojcowskich spełniają zazwyczaj konidia). Natomiast w procesie płciowym drożdży łączą się ze sobą niezróżnicowane komórki o takich samych rozmiarach. Powstałe z nich diploidy mają w porównywalnych liczbach mitochondrialne genomy obu rodziców. Bezpośrednio po powstaniu zygot między tymi genomami zachodzi rekombinacja. Zachodzenie rekombinacji między pochodzącymi od różnych rodziców genomami mitochondrialnymi wskazuje, że przynajmniej bezpośrednio po powstaniu zygot mitochondria mogą łączyć się ze sobą, a ich genomy wchodzić w bezpośredni kontakt fizyczny. Być może jest to właściwość tylko drożdży, ewentualnie także innych grzybów. Nie stwierdzono bowiem powstawania rekombinantów mitochondrialnych w innych grupach organizmów.

BUDOWA GENOMU, TRANSKRYPCJA, OBRÓBKA RNA

Jak dotąd, poza wirusami, dzięki sekwencjonowaniu w pełni poznane są genomy mitochondrialne człowieka, krowy i myszy [1, 2, 4]. Częściowo poznany jest także genom mitochondrialny drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Po to, żeby uwidocznic ich specyfikę, postaramy się je porównać z fragmentarycznymi i opartymi na innych metodach badawczych danymi na temat budowy genów i genomów bakterii oraz jądrowych genów i genomów eukariontów. Postaramy się też streścić wiadomości na temat „obróbki” czy „dojrzwania” pierwotnych produktów transkrypcji (tj. cząsteczek RNA) zanim staną się one gotowe do pełnienia swych funkcji biologicznych.

1. **Genom bakteryjny** (*Enterobacteriaceae*) charakteryzuje się głównie zgrupowaniem w operony genów kodujących enzymy danego cyklu metabolicznego. Operon transkrybowany jest zwykle w całości, a produktem tego procesu jest policistronowy (wielogenowy) mRNA. Między operonami są „prze-

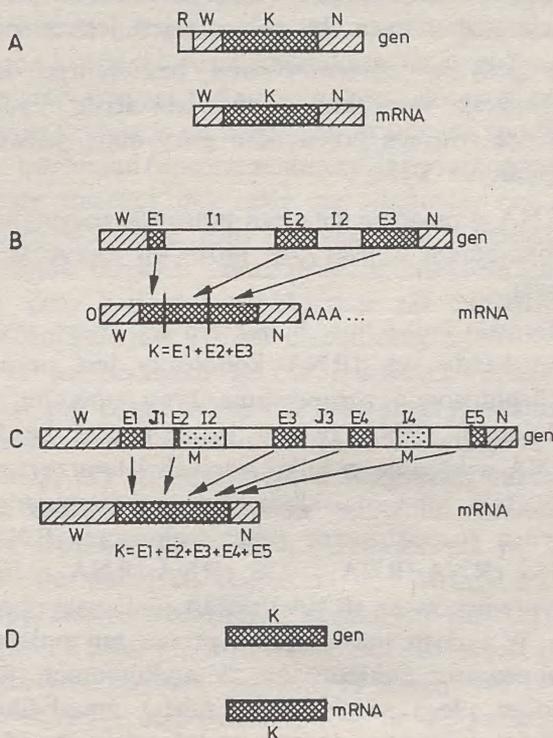


Rys. 1. Budowa genomów różnych typów organizmów. A — Genom bakteryjny. Występują tu pojedyncze geny (G) oraz geny zgrupowane w operony (O). Pomiedzy nimi występują obszary DNA nie ulegające transkrypcji — przerywniki (P), których funkcja nie jest znana. B — Genom jądrowy eukariontów. Pojedyncze geny (G) oddzielone są od siebie odcinkami DNA nie podlegającymi transkrypcji (P), których długość może znacznie przekraczać długość genu. C — Genom mitochondrialny drożdży. Geny (G) oddzielone są od siebie przerywnikami (P) bogatymi w pary A-T, prawdopodobnie nie podlegającymi transkrypcji. D — Genom mitochondrialny zwierząt. Geny kodujące białko (G) poprzedzielane są genami kodującymi tRNA (G'). Brak jest nietranskrybowanych przerywników

rywnikii” o różnej długości (rys. 1A). Nie są one transkrybowane. Z tej strony operonu, od której rozpoczyna się transkrypcja, są liczące co najmniej kilkadziesiąt par zasad odcinki DNA, które też nie są transkrybowane,

ale które odpowiedzialne są za regulację transkrypcji (rys. 2A). Są one rozpoznawane przez białka regulacyjne oraz przez polimerazę RNA.

Jak wiadomo, translacja rozpoczyna się od strony 5' mRNA, toteż będziemy tę stronę nazywali początkiem mRNA, zaś stronę 3' — końcem.



Rys. 2. Budowa genu i mRNA. A — Gen bakteryjny. Sekwencja kodująca (K) poprzedzona odcinkiem DNA pełniącym funkcje regulatorowe (R), który nie podlega transkrypcji. W mRNA wyróżnić można sekwencję wiodącą (W) na końcu 5', która nie podlega translacji, oraz sekwencję (N) na końcu 3', która również nie podlega translacji. B — Gen jądrowy eukariontów. Może, lecz nie musi, mieć strukturę nieciągłą. Składa się z części podlegających translacji — eksonów (E1, E2, E3) oraz części nie podlegających translacji — intronów (I1, I2). Introny są transkrybowane, lecz odpowiadające im odcinki RNA są wycinane w trakcie obróbki transkryptu. Na początku (5') mRNA jest sekwencja wiodąca (W), do której dosyntetyzowany jest kapturek (O-), a na końcu sekwencja niekodująca (N). Końiec 3' mRNA może być poliadenylowany. Odcinki W i N nie podlegają translacji. C — Mitochondrialny gen drożdży. Może mieć strukturę nieciągłą. Eksony (E1, E2...) są częściami genu podlegającymi ekspresji. Dojrzały mRNA stanowi połączone odcinki odpowiadające wszystkim eksonom oraz długą sekwencję wiodącą (W). Sekwencja białka będącego podstawowym produktem translacji genu odpowiada ściśle łącznej sekwencji eksonów. Introny (I1, I2, I3), uznawane za sekwencje niekodujące, mogą zawierać obszary (M), które podlegają translacji, lecz odpowiadające im polipeptydy nie wchodzą w skład białka podstawowego kodowanego przez dany gen. Są to hipotetyczne maturazy, których dotychczas nie zidentyfikowano. D — Mitochondrialny gen zwierzęcy. Gen (G) jest ściśle transkrybowany na mRNA, który następnie jest poliadenylowany od końca 3'. mRNA jest w całości tłumaczony na białko

Bakteryjny mRNA ma na początku liczącą kilkanaście do ponad stu zasad sekwencję liderową czyli wiodącą, odpowiedzialną, jak się wydaje, za wiązanie mRNA z rybosomami oraz za wydajność translacji. W policistronowym mRNA sekwencje kodujące poszczególne polipeptydy mogą, lecz nie muszą być poprzedzane kilkunastu zasadami nie podlegającymi translacji, ale utrzymującymi kontakt mRNA z rybosomami. Na końcu mRNA jest także sekwencja niekodująca. Jej rola nie jest jeszcze poznana.

Nie wszystkie geny w chromosomach bakteryjnych są zgrupowane w operony, ale ekspresja wszystkich genów jest ściśle regulowana. Należy więc przypuszczać, że również pojedyncze geny mają sekwencje regulujące analogiczne do opisanych wyżej.

Bakteryjny mRNA w zasadzie nie ulega potranskrypcyjnym modyfikacjom. Nawet przed zakończeniem transkrypcji może on łączyć się z rybosomami i sterować translacją.

Komórki *Escherichia coli* i innych bakterii tej grupy mają 50-60 typów tRNA, przy czym każdy typ tRNA kodowany jest przez kilka genów. Tworzą one w chromosomie zgrupowania typu operonu, tj. transkrypty kilku genów kodujących tRNA tworzą jedną cząsteczkę RNA. Również geny kodujące rRNA występują w kilku kopiach i tworzą zgrupowania typu operonów. Każdy taki operon składa się z następujących elementów: promotor (tj. miejsce rozpoznawane przez polimerazę RNA), a następnie geny kodujące: 16S rRNA-tRNA — 23S rRNA-tRNA — 5S rRNA-tRNA. Pierwotne transkrypty genów na tRNA i rRNA podlegają obróbce z udziałem szeregu enzymów. W dużym uproszczeniu proces ten polega: Po pierwsze, na modyfikowaniu pewnych nukleotydów. W prekursorach tRNA kilkanaście procent nukleotydów ulega modyfikacji, udział zmodyfikowanych zasad w rRNA jest mniejszy. Jest to głównie metylowanie zasad i reszt rybozy, oraz przekształcanie reszt uracylu w pseudouracyl. Po drugie, pierwotne transkrypty muszą być przecinane w ściśle określonych miejscach. Za proces ten odpowiedzialne są nukleazy RNA.

Jak się wydaje, obróbka transkryptów zachodzi w takiej właśnie kolejności. Enzymy modyfikujące nukleozydy rozpoznają prawdopodobnie przede wszystkim określone sekwencje zasad, ale także struktury przestrzenne poszczególnych odcinków polirybonukleotydu. Nukleazy rozpoznają, jak się wydaje, głównie struktury przestrzenne. Zwłaszcza dotyczy to prekursorów tRNA, które przybierają charakterystyczny układ „listka koniczyny” (por. rys. 5).

2. **Genomy jądrowe eukariontów** mają dwie najbardziej charakterystyczne cechy: są oddzielone od cytoplazmy błoną jądrową i zawierają olbrzymi nadmiar DNA w stosunku do jego ilości potrzebnej do zakodowania informacji dotyczącej białek oraz RNA nie sterującego translacją. Eukarionty niższe mają stosunkowo niewielki nadmiar DNA. Część tego DNA stanowią sekwencje repetytywne. Są to powtórzone w milionach kopii sekwencje

niczego nie kodujące (DNA satelitarny, którego rola nie jest znana) oraz powtórzone w dziesiątkach lub nawet setkach tysięcy kopii te geny, których produkty są komórkom potrzebne w dużych ilościach, np. geny kodujące białka histonowe oraz rRNA.

Poszczególne geny, nie zgrupowane w operony, są poprzedzielane przerwami nietranskrybowanymi, których długość może wynosić tysiące par zasad (rys. 1B). Ich rola nie jest znana. W obrębie genów sekwencje zasad DNA determinujące kolejność reszt aminokwasów w polipeptydach lub też zasad w tRNA czy rRNA mogą być przedzielone sekwencjami nie kodującymi (rys. 2B). Sekwencje kodujące są nazywane eksonami (podlegają ekspresji), niekodujące zaś — intronami (uproszczenie ang. *intervening sequences*, dosłownie sekwencje leżące między). Na razie nie wiadomo, czy eksonowo-intro-nową budowę mają wszystkie geny eukariontów wyższych. Do najlepiej poznanych eukariontów niższych należą drożdże. Niektóre ich geny na pewno mają introny (np. geny kodujące tRNA) inne zaś na pewno intronów nie mają (np. geny kodujące *izo-1* i *izo-2* cytochromy *c*).

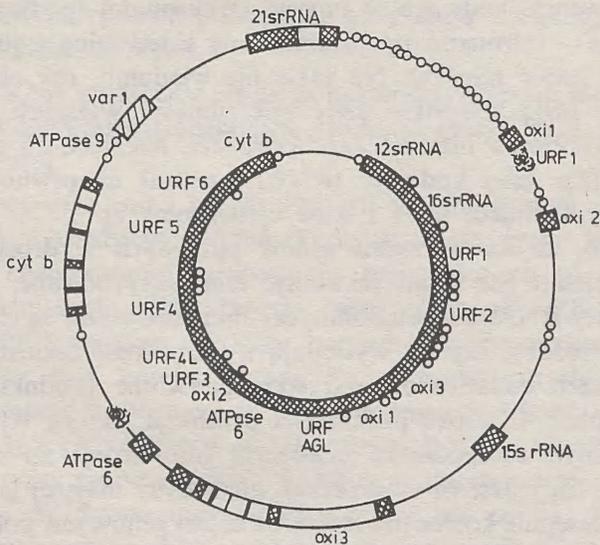
Stwierdzono, że na początku genów jądrowych u drożdży występują liczące kilkadziesiąt par zasad sekwencje nietranskrybowane, rozpoznawane przez polimerazy RNA. Nie wiadomo, czy takie sekwencje są charakterystyczne tylko dla drożdży, czy też występują u wszystkich eukariontów.

W komórkach eukariontów wszystkie pierwotne produkty transkrypcji podlegają obróbce. Obróbka pre-mRNA przebiega, jak się wydaje, w następujących etapach: do początku cząsteczki (od strony 5') dorabiany jest kapturek (ang. *cap*). Jest to trójfosforan guanozyny mającej grupę metylową w pozycji 7. Następnie koniec pre-mRNA z części genów jest poliadenylowany, tj. są do niego dosyntetyzowane nukleotydy adenylowe w liczbie 50-200. Z kolei wycinane są sekwencje intronowe, o ile oczywiście występują one w danym transkrypcie, sekwencje zaś eksonowe łączone są z udziałem ligazy RNA. Dojrzały mRNA, odróżniany na tej podstawie, że jest związany z rybosomami, a więc na pewno steruje syntezą polipeptydu, zawiera podobnie jak mRNA bakteryjny, na początku (bezpośrednio po kapturku) sekwencję wiodącą liczącą kilkanaście do kilkudziesięciu zasad, która nie podlega translacji. Na końcu cząsteczki eukariotycznego mRNA, po sygnale stop i przed ewentualną sekwencją poliA występuje sekwencja niekodująca. Jej rola nie jest znana. (rys. 2B).

Obróbka pierwotnych transkryptów zawierających pre-tRNA zachodzi u eukariontów podobnie jak obróbka pre-tRNA bakterii. Występuje tu dodatkowy etap, mianowicie wycinanie intronów i łączenie sekwencji eksonowych. Z pierwotnych transkryptów zawierających prekursor rRNA wycinane są sekwencje niekodujące, które występują na początku i w środku, a być może również na końcu transkryptu. Nie wiadomo jeszcze, jak enzymy odpowiedzialne za obróbkę transkryptów rozpoznają sekwencje, które trzeba wyciąć. Może wchodzić tu w grę struktura przestrzenna cząsteczki prekursorowej RNA, a także określone sekwencje zasad na styku eksonu i intronu:

na końcu eksonu jest zazwyczaj sekwencja UG lub AG, na początku intronu GU, zaś na końcu intronu — AG.

3. **Genom mitochondrialny drożdży** został zanalizowany za pomocą enzymów restrykcyjnych, a wiele genów również zsekwencjonowano. Na podstawie cięcia enzymami restrykcyjnymi i określania długości poszczególnych fragmentów mtDNA można było przekonać się, że długość całej jego cząsteczki



Rys. 3. Porównanie organizacji genomu mitochondrialnego człowieka i drożdży. Proporcje nie zostały zachowane: mtDNA człowieka powinien być dwukrotnie mniejszy niż na rysunku. Mitochondrialny genom człowieka nie zawiera przerywników oraz intronów. Geny kodujące tRNA oznaczono kółkami [wg 7]

waha się, zależnie od szczepu drożdży, od 68 000 do 75 000 par zasad [24]. Te różnice w wielkości genomu mitochondrialnego nie mają wyraźnego wpływu na sprawność funkcjonowania mitochondriów. Poszczególne geny są przedzielone przerywnikami, których długość może być rzędu kilkuset par zasad (rys. 1C). Przynajmniej niektóre z przerywników mają zawartość par GC poniżej 5%. Oszacowuje się, że w genomie mitochondrialnym drożdży jest co najmniej 5 miejsc, od których zaczyna się transkrypcja [16]. Ponieważ genów w mtDNA drożdży jest znacznie więcej niż 5, to albo jeszcze nie wszystkie miejsca inicjacji transkrypcji zostały zidentyfikowane, albo przynajmniej część przerywników jest transkrybowana. Są też sugestie, że oba komplementarne łańcuchy mtDNA drożdży są transkrybowane na całej swej długości, podobnie jak to ma miejsce z mtDNA zwierząt [16]. Na rysunku

3 podano mapę mitochondrialnego genomu drożdży opracowaną metodami genetycznymi i fizycznymi.

Wyniki sekwencjonowania genów mitochondrialnych wzbudziły sensację [5, 12, 18]. Okazało się przede wszystkim, że niektóre tryplety kodują inne aminokwasy niż w kodzie dotąd uważanym za powszechny. Problem ten szczegółowiej omówimy w drugiej części artykułu. W komórkach drożdży podjednostka 9 ATPazy kodowana jest przez genom mitochondrialny, natomiast w komórkach zwierząt, a także grzybów, *Aspergillus nidulans* i *Neurospora crassa*, podjednostka ta jest kodowana przez genom jądrowy i syntetyzowana w cytosolu. Wstępne dane wskazują, że w mitochondrialnym genomie *N. crassa* występuje kopia tego genu, nie jest ona jednak transkrybowana.

Geny mitochondrialne drożdży kodujące podjednostkę 6 ATPazy i 3 oksydazy cytochromowej na pewno nie mają intronów. Być może w genie kodującym podjednostkę 2 oksydazy jest kilkunastonukleotydowy intron. W niektórych szczepach drożdży (ω^- , ω^n) gen kodujący podjednostkę 21S rRNA nie zawiera intronów. W innych szczepach (ω^+) gen ten zawiera aż dwa introny, liczące 66 i 1143 pary zasad [11]. We wszystkich badanych szczepach stwierdzono obecność intronów w genach kodujących apocytochrom b (gen *cob-box*) i podjednostkę 1 oksydazy cytochromowej (gen *oxis3*). Jednak liczba intronów w obu tych genach jest różna w zależności od szczepu [5, 16, 18].

Największą jednak sensację wywołały wyniki sekwencjonowania intronów. Z definicji eksony są sekwencjami zasad w DNA kodującymi sekwencje aminokwasów w białkach lub zasad w rRNA i tRNA, introny zaś są niekodującymi sekwencjami zasad w DNA; są one transkrybowane i wycinane z RNA w czasie jego obróbki. Okazało się jednak, że w mitochondrialnych genach drożdży niektóre introny mają sekwencje kodujące, które jednak nie ulegają ekspresji jako część polipeptydu kodowanego przez dany gen. Rozpatrzmy szczegółowiej dwa przykłady.

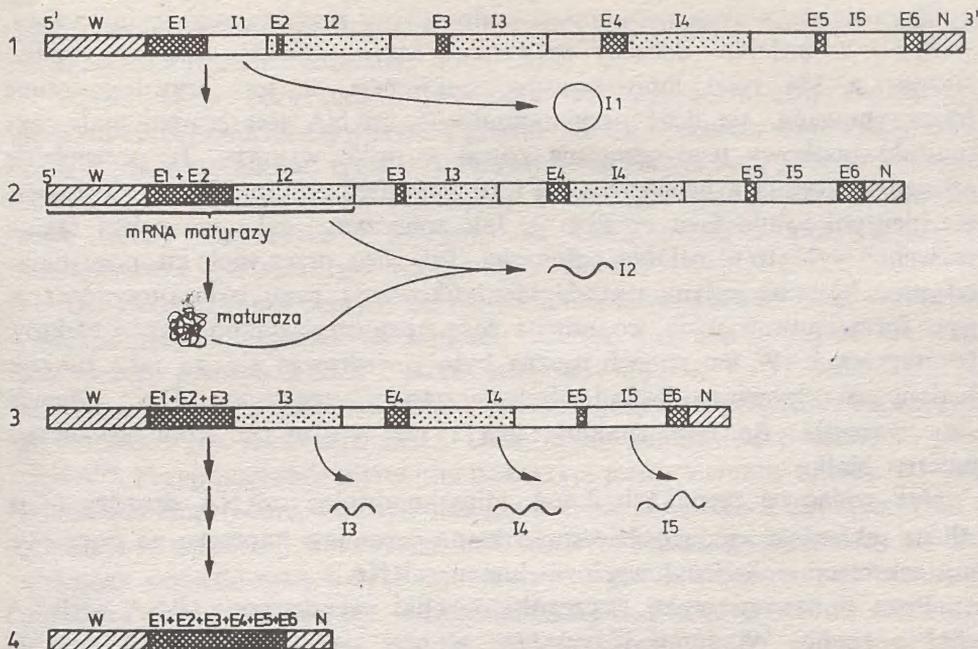
W liczącym 1143 pary zasad intronie genu kodującego 21S rRNA występuje sekwencja zasad rozpoczynająca się inicjatorowym trypletem AUG (t.j. trypletem, od którego zaczyna się translacja) i zawierająca dalej sensowne tryplety 235 aminokwasów [11]. Sekwencja kończy się trypletem stop (UAA). Można sobie wyobrazić, że pierwotny transkrypt tego genu (lub też wycięty z niego intron) zdolny jest do łączenia się z rybosomami i sterowania syntezą polipeptydu liczącego 235 reszt aminokwasów. Nie byłby więc to intron, tylko raczej „gen na białko” w „genie na rRNA”. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować produktu tego „genu na białko”. Nie wiadomo więc, czy ten potencjalny gen ulega ekspresji genotypowej, a jeśli tak, nie wiadomo, jaką funkcję spełnia to białko. Ponieważ w genach 21S rRNA szczepów ω^- i ω^n nie ma intronów, można przypuszczać, że ewentualne białko kodowane przez sekwencję intronową

w szczepach ω^+ uczestniczy w wycinaniu intronów z pre-rRNA. Sytuacja byłaby dość paradoksalna: w szczepach ω^+ intron w genie 21S rRNA byłby po to, by kodować białko, które by ten intron usuwało z pre-rRNA, podczas gdy inne szczepy drożdży nie komplikują sobie życia ani intronem ani kodowanym w jego obrębie białkiem. Istnieje oczywiście co najmniej jedna zupełnie inna ewentualność, mianowicie, że wszystkie szczepy drożdży mają gen kodujący to kłopotliwe białko. W szczepach ω^+ kodujący je gen znajduje się w intronie genu 21S rRNA, natomiast w szczepach ω^- i ω^0 znajduje się on w jakimś innym miejscu genomu mitochondrialnego.

Drugi przykład występowania w intronach sekwencji kodujących pochodzi z badań prowadzonych głównie przez Słonimskiego i jego współpracowników [16, 18]. Autorzy ci już na podstawie wyników analizy genetycznej (mapowanie mutantów, test na komplementację) doszli do wniosku, że w genie cob-box eksony kodujące apocytochrom b są przedzielone intronami. Następnie ustalono sekwencję zasad w odcinku genu obejmującym trzy pierwsze eksony i dwa introny. Okazało się, że pierwszy intron zawiera taką sekwencję zasad, która nie może kodować żadnego polipeptydu, gdyż w każdej z trzech możliwych faz odczytu zawierałaby liczne kodony stop (UAA). Natomiast drugi intron zawiera taką sekwencję zasad, która w określonej fazie odczytu, takiej samej jak sekwencji eksonowych, zawiera sensowne kodony 318 aminokwasów. Autorzy zakładają, że jest to białko uczestniczące w obróbce pre-mRNA, nazwane przez nich maturazą. Schemat tłumaczący ich hipotezę przedstawiono na rysunku 4.

Schemat taki zakłada, że obróbka pre-mRNA zachodzi jednokierunkowo, poczynając od końca 5' pre-mRNA. Jak wynika z innych badań, poszczególne sekwencje intronowe nie muszą być wycinane w takiej właśnie kolejności. Ale wszystkie dotychczasowe badania potwierdzają rolę maturaz w obróbce pre-mRNA apocytochromu b. Co więcej, szczepy z mutacjami w intronach 2 i 4 są pozbawione nie tylko apocytochromu b lecz także podjednostki I oksydazy cytochromowej. Słonimski i współautorzy zakładają, że maturazy apocytochromu b uczestniczą również w obróbce pre-mRNA podjednostki I oksydazy cytochromowej. Mógłby to być mechanizm regulujący skoordynowaną syntezę mRNA dla obu polipeptydów. Jak wskazują wyniki sekwencjonowania genu *oxi 3*, kodującego podjednostkę I oksydazy cytochromowej [5], w jego intronach jest także kilka sekwencji, które mogłyby kodować maturazy. Nie ma jednak dotąd danych wskazujących na uczestnictwo tych maturaz w obróbce pre-mRNA apocytochromu b.

Poznane dotąd sekwencje intronowe w genach jądrowych drożdży i zwierząt nie zawierają sekwencji kodujących. Być może sekwencje takie występują tylko w niektórych genach jądrowych, lub też nie występują wcale. Warto podkreślić, że zaproponowany przez Słonimskiego schemat obróbki pre-mRNA z udziałem kodowanych w intronach maturaz zakłada konieczność ich syntezy



Rys. 4. Obróbka pre-mRNA apocytochromu b. Niekodujące sekwencje: wiodąca na początku (W) i terminalna na końcu (N) pre-mRNA oraz dojrzałego mRNA. E — eksony ■, I — sekwencje kodujące COOH- terminalną część maturaz □ wraz z niekodującymi sekwencjami intronów □. 1 — Pierwotny transkrypt składa się z liczącej około 1000 zasad sekwencji wiodącej (W), 6 eksonów (E₁-E₆) i 5 intronów (I₁-I₅). Zakropkowane części intronów zawierają sekwencje kodujące maturazę. 2 — Pierwszym etapem obróbki pre-mRNA jest wycięcie I₁. W wycinaniu I₁ biorą udział nukleazy z jądra komórkowego. Liczący około 750 nukleotydów, wycięty fragment RNA ma połączone końce, tworzy więc kółko. Jednocześnie w właściwej części pre-mRNA ekson 1 łączy się z eksonem 2. Powstaje ciągła sekwencja kodująca złożona od początku do eksonów 1 i 2, dalej zaś występuje kodująca maturazę sekwencja intronu 2. Ten pre-mRNA łączy się z rybosomami i steruje syntezę maturazy pierwszej. Maturaza uczestniczy w wycinaniu intronu 2. Następuje przyłączenie eksonu 3 do eksonów 1 i 2. 3 — Z kolei następuje wycięcie intronu 3 i przyłączenie eksonu 4 do poprzednich. Taka cząsteczka pre-mRNA może sterować syntezą drugiej maturazy, której część COOH-terminalna zakodowana jest w intronie 4. Przymuszczalna maturaza druga uczestniczyłaby w wycinaniu intronu 4, po czym ekson 5 połączyłby się z poprzednimi. Ostatnim etapem obróbki pre-mRNA byłoby wycięcie intronu 5 i przyłączenie eksonu 6 do poprzednich. 4 — Gotowa cząsteczka mRNA apocytochromu b. T.zw. „krótki” gen cob-box nie zawiera intronów 1, 2 i 3, zaś eksonowe sekwencje 1, 2, 3 i 4 stanowią jeden ciąg. Obróbka pre-mRNA zachodziłaby więc tylko w dwu etapach (wycięcie intronu 4 i 5). Bezpośrednio po transkrypcji pre-mRNA mógłby sterować syntezą maturazy 2 [wg 18]

przed zakończeniem obróbki pre-mRNA. W mitochondriach rybosomy są dostępne na miejscu, a więc synteza maturaz mogłaby być bezpośrednio połączona z obróbką pre-mRNA. Natomiast w jądrach jak dotąd rybosomów nie wykryto, a wszystkie dotychczasowe dane wskazują, że obróbka pre-mRNA zachodzi w nich od początku do końca. Wydaje się więc, że maturazy są specjalnością mitochondriów grzybów.

Poza potencjalnymi maturazami kodowanymi przez sekwencje intronowe, wykryto w mtDNA drożdży sekwencję, która mogłaby kodować białko złożone z 386 reszt aminokwasów. Sekwencja ta jest prawdopodobnie transkrybowana, ale ilość przypuszczalnego mRNA jest bardzo mała, zaś produkt białkowy tego genu nie został w ogóle wykryty. Tę potencjalną sekwencję kodującą nazwano URF1 (unidentified reading frame, dosłownie niezidentyfikowana faza odczytu*). Jak zobaczymy dalej, aż osiem takich sekwencji wykryto w mtDNA człowieka. Tak więc, przez wiele lat, poczynając od prac Mendla, jedyną metodą identyfikowania genu było otrzymywanie jego form zmutowanych, co można było rozpoznać na podstawie efektów fenotypowych. W ten sposób można było zorientować się, za jaką funkcję badany gen odpowiada. Odkąd jednak zaczęto sekwencjonować DNA sytuacja się odwróciła. Badacze znajdują gen i nie wiedzą, co robi kodowane przezeń białko.

Jak widać na rysunkach 2 i 4, mitochondrialne mRNA drożdży mają długie sekwencje wiodące. Nie stwierdzono natomiast kapturka na początku, ani sekwencji poliadenylowych na końcu mRNA.

Poza podanymi wyżej, szczegóły obróbki prekursorów rRNA i tRNA nie są znane. Wiadomo jedynie, że w obu tych typach RNA procent zmodyfikowanych zasad jest znacznie mniejszy niż w rRNA i tRNA cytosolowym czy bakteryjnym.

4. Genom mitochondrialny człowieka jest dwuniciową, kolistą cząsteczką DNA złożoną z 16 569 par zasad [1]. Cząsteczkę tę można rozdzielić na łańcuch lekki, L (ang. light) i ciężki, H (ang. heavy). Olbrzymia większość sekwencji sensownych, tj. takich, jak w rRNA, tRNA i mRNA, występuje w łańcuchu L. Wynika z tego, że RNA transkrybowany z łańcucha H, i wobec tego mający sekwencje zasad takie jak L, przenosi większość informacji. Odcinek mitochondrialnego genomu złożony z około 1100 par zasad i znajdujący się między genami tRNA^{Pro} i tRNA^{Fen} nie zawiera, jak się wydaje, żadnych sekwencji kodujących. Zawiera natomiast informacje dotyczącą inicjacji replikacji łańcucha H. W tym też odcinku rozpoczyna się transkrypcja obu łańcuchów DNA. Pozostała część genomu, tj. 15 469 zasad, koduje następujące cząsteczki: dwie podjednostki rRNA, 22 typy tRNA, trzy podjednostki oksydazy cytochromowej, apocytochromu b i podjednostkę 6 ATPazy. Okazało się ponadto, że jest tu 8 odcinków DNA, które w określonej fazie odczytu mogłyby kodować polipeptydy o ciężarach cząsteczkowych od 7900 do 66 600. Te odcinki, nazwane URF (unidentified reading frame) rozpoczynają się kodonami AUG, AUA lub AUU. Nic dotąd nie wiadomo o ich produktach białkowych. Przypuszcza się, że mogłyby to być

* Znając sekwencję zasad w DNA możemy odliczyć trójki, np. ATC ACA TGU..., lub AT CAC ATG U..., lub A TCA CAT GU... Zazwyczaj tylko w jednym z trzech sposobów odliczania natrafiamy na ciąg trypletów sensownych, wyznaczających aminokwasy, trypletów stop. Jest to właśnie otwarta faza odczytu.

białka uczestniczące w obróbce RNA lub związane z funkcjonowaniem mitochondrialnych rybosomów.

Rzuca się w oczy daleko posunięta redukcja rozmiarów zwierzęcego genomu mitochondrialnego. Między genami nie ma obszarów nietranskrybowanych — „przerywników” (rys. 1D). Podjednostki rRNA liczą 1559 i 954 zasad, są więc o połowę mniejsze niż bakteryjne. Zidentyfikowano po dwa izoakceptorowe tRNA dla seryny i leucyny, dla każdego zaś z pozostałych 18 aminokwasów jest tylko po jednym typie tRNA.

Geny kodujące polipeptydy nie mają ani intronów, ani sekwencji wiodących i niekodujących sekwencji na końcach mRNA. Co więcej, często nie mają one nawet pełnego kodonu stop, lecz urywają się na T lub TA. Na przykład, w miejscu gdzie kończy się gen kodujący apocytochrom b i zaczyna gen tRNA^{Gli} jest sekwencja TGG. Dwie reszty guaniny są początkiem genu tRNA^{Gli}. Przepuszczalnie pierwotny transkrypt jest przecinany między T i GG, kodon zaś stop (ochre, UAA) kończący sekwencję kodującą apocytochrom b powstaje w wyniku poliadenylacji mRNA. W miejscu, gdzie kończy się gen kodujący podjednostkę 6 ATPazy i zaczyna gen kodujący podjednostkę II oksydazy cytochromowej jest sekwencja TAATG. Prawdopodobnie pierwotny transkrypt jest przecinany między dwiema resztami A, a kodon UAA terminalny dla ATPazy powstaje w wyniku poliadenylacji końca mRNA.

Jest więc to najbardziej zwarty i oszczędny ze znanych genomów.

W transkryptach z łańcucha H zawarte są prekursorzy obu podjednostek rRNA, mRNA dla 12 spośród 13 białek kodowanych przez mitochondrialny DNA oraz 14 tRNA. Sekwencje kodujące tRNA w większości przypadków są między sekwencjami, które kodują mRNA i rRNA. Ojala i wsp. [21, 22] sugerują, że drugorzędowa struktura tRNA („listek koniczyny”) jest głównym, a być może jedynym sygnałem rozpoznawczym w obróbce pierwotnych transkryptów (rys. 2D). Byłaby to sytuacja analogiczna do opisanej poprzednio obróbki transkryptów *E. coli* zawierających pre-rRNA i pre-tRNA. Te odcinki transkryptów, w których sekwencje odpowiadające dwu różnym mRNA nie są przedzielone sekwencją tRNA, mogłyby przybierać konformację podobną do tRNA, tj. występowałyby tam fragmenty struktury dwuniciowej i pętle zasad nie sparowanych. Cytowani autorzy zakładają, że obróbka transkryptów z łańcucha H zachodziłaby równolegle z transkrypcją. Pocięte w ten sposób transkrypty byłyby dalej modyfikowane.

KOD GENETYCZNY NIE JEST UNIWERSALNY

ZASADY OGÓLNE

Na podstawie badań nad kilku wybranymi organizmami, jak *E. coli*, wirus mozaiki tytoniowej i wirusy bakteryjne, a także sekwencjonowania białek (w tym hemoglobiny) stwierdzono, że kod genetyczny jest we wszystkich organizmach jednokowy. Wniosek ten potwierdziły późniejsze wyniki sekwencjonowania DNA bakterii, wirusów i eukariontów. Jak zobaczymy jednak,

uniwersalność kodu genetycznego została podważona przez wyniki badań nad sekwencjonowaniem DNA mitochondrialnego.

Każdy kodon składa się, jak wiadomo, z trzech liter — nukleotydów. W kwasach nukleinowych występują cztery różne nukleotydy, liczba więc możliwych kodonów wynosi 64, aminokwasów zaś jest tylko 20. W „powszechnym” kodzie genetycznym tylko metionina i tryptofan kodowane są przez jeden tryplet. Pozostałe aminokwasy mogą być kodowane przez 2 do 6 trypletów; jest to t.zw. właściwość degeneracji (wieloznaczności) kodu genetycznego. W danym systemie translacji określony trójnukleotyd koduje zawsze ten sam aminokwas. W tym sensie kod jest jednoznaczny i dzięki temu zapewniona jest wierność i powtarzalność translacji.

Pośrednikami między mRNA a powstającym łańcuchem polipeptydowym są cząsteczki tRNA. tRNA przenoszący odpowiedni aminokwas może przy udziale rybosomu rozpoznać właściwy kodon w mRNA, gdyż ma we własnej sekwencji tzw. antykodon, czyli trójnukleotyd komplementarny do kodonu odpowiadającego danemu aminokwasowi. Oddziaływanie kodon-antykodon jest oddziaływaniem dwóch cząsteczek RNA o przeciwnej polarności: pierwsza od strony 5' zasada kodonu oddziałuje z trzecią zasadą antykodonu, np.:

kodon	(5')	AUG	
antykodon		UAC	(5')

Kodony UAG, UAA i UGA, będące sygnałami do zakończenia syntezy polipeptydu, nie są rozpoznawane przez tRNA, lecz przez białka zwane czynnikami terminującymi translację. Kodon AUG, zwany kodonem inicjującym, oddziałuje ze specjalnym tRNA inicjatorowym przenoszącym formylometioninę.

Stwierdzono, że w komórce znajduje się 50-60 typów tRNA mających różne antykodony, a więc jeden aminokwas może być przenoszony przez kilka różnych tRNA nazywanych izoakceptorowymi. Wiąże się to z cechą niejednoznaczności kodu genetycznego: jeden antykodon nie wystarczyłby do rozpoznania kilku, często dość znacznie różniących się trypletów kodujących jeden aminokwas. Jednakże liczba typów tRNA o różnych antykodonach jest mniejsza niż liczba kodonów, więc w oddziaływaniu kodon-antykodon musi istnieć pewna tolerancja. Zasadę tolerancji określił Crick, formułując tzw. hipotezę chwiejności [10]. Według Cricka pierwsza i druga zasada kodonu tworzą z trzecią i drugą zasadą antykodonu wyłącznie „klasyczne” pary zasad G-C i A-U, np.:

kodon	(5')	G	G	U	
antykodon		C	C	A	(5')
		3	2	1	

Guanina wiąże się z cytozyną trzema wiązaniami wodorowymi, natomiast adenina wiąże się z uracylem tylko dwoma wiązaniami, a więc to oddziaływanie

jest nieco słabsze. Trzecia zasada kodonu oddziałuje z pierwszą zasadą antykodonu w sposób mniej precyzyjny. Na podstawie analizy budowy przestrzennej poszczególnych nukleotydów Crick dopuszcza możliwość powstawania następujących par zasad:

pierwsza zasada antykodonu:	trzecia zasada kodonu:
C	G
A	U
U	A lub G
G	U lub C

Crick sugerował także, że po pewnych określonych zmianach konformacyjnych polegających na obrocie wiązań C(5')-C(4') i P-O(5') w nukleotydzie uracylowym możliwe byłoby powstanie wiązań między dwiema cząsteczkami uracylu oraz między uracylem i cytozyną. Jednakże wskutek zmiany konformacji grupy fosforanowej względem pierścienia rybozy, cząsteczki nukleotydów byłyby położone znacznie bliżej siebie niż w układzie par G-C i A-U. Ze względu na to Crick wyklucza więc możliwość powstawania tzw. „krótkich par” w oddziaływaniach kodon-antykodon, gdyż mogłyby one być źródłem błędów w translacji. Przenoszony bowiem przez tRNA aminokwas byłby w tym przypadku w pozycji utrudniającej powstanie wiązania peptydowego. Z zasady tolerancji wynika, że najmniejsza liczba różnych typów tRNA musi wynosić 32.

Alternatywny w stosunku do hipotezy Cricka sposób odczytywania kodu genetycznego zaproponował Langervist [17]. Założył on, że stabilność oddziaływań kodon-antykodon jest funkcją całkowitej liczby wiązań wodorowych utworzonych przez dwie pierwsze pary zasad kodonu z antykodonem. Kodony można więc podzielić na trzy grupy (N oznacza dowolną zasadę):

1. Kodony mocne, typu GCN, CGN, CCN;
2. Kodony pośrednie, typu GAN, AGN, GUN, UGN, CAN, ACN, UCN, CUN;
3. Kodony słabe, typu AUN, UAN, AAN, UUN.

Kodony mocne tworzą z antykodonem dwie silne pary G-C, które zapewniają prawidłowe odczytanie kodonu i bez względu na to, jaki nukleotyd występuje w trzeciej pozycji zawsze kodują ten sam aminokwas. Analizując tabelę kodonów można dostrzec, że mocne kodony tworzą zawsze tzw. rodziny kodonów, czyli grupy po 4 kodony tego samego typu, różniące się tylko trzecią zasadą. Kodony słabe tworzą z antykodonem dwie słabe pary typu A-U i w tym przypadku decydujące dla specyficznego wiązania kodon-antykodon jest wiązanie trzeciej zasady kodonu z pierwszą zasadą antykodonu. Okazuje się, że kodony słabe są albo kodonami typu stop, czyli nie łączą się z żadnym antykodonem tRNA, albo występują poza rodzinami kodonów.

Stabilność oddziaływań kodon-antykodon zbadano doświadczalnie w sposób

pośredni [14]. Założono, że z punktu widzenia fizykochemii proces odczytywania kodonów (tj. oddziaływanie kodon-antykodeon) jest analogiczny do oddziaływania między trójnukleotydami w dwu pętłach tRNA. Porównywano więc trwałość kompleksów utworzonych przez pary cząsteczek tRNA wynikające z oddziaływania ich sekwencji antykodeonowych. Wyniki badań były zgodne z genetycznymi regułami kodowania. Stwierdzono jednak pewną niezgodność z hipotezą tolerancji proponowaną przez Cricka. Mianowicie, pary typu U-U i U-C powstawały i wykazywały względnie dużą stabilność (tab. 1).

Tabela 1

Stabilność oddziaływania par zasad

	U	C	G	A
U	+	+	+	+
C	+	-	+	-
G	+	+	-	-
A	+	-	-	-

+ = oddziaływanie stabilne, - = niestabilne. Wyniki te otrzymano badając trwałość kompleksów między antykodeonami w odpowiednio dobranych parach cząsteczek tRNA.

Pozostałe aspekty hipotezy Cricka zostały w pełni potwierdzone. Jak się okazało, na stabilność oddziaływania kodon-antykodeon nie miał wpływu udział par G-C. Autorzy postulują, że pary typu U-U i U-C są trwałe w układzie *in vitro*, ale w układzie *in vivo* rybosom nie dopuszcza do powstawania w tRNA określonych zmian konformacyjnych, które są niezbędne do ich utworzenia.

KODONY I TRANSLACJA W SYSTEMIE MITOCHONDRIALNYM

Poznanie pełnej sekwencji zasad mtDNA człowieka, a także krowy i myszy [1, 2, 4], oraz niekompletne jeszcze wyniki badań nad mitochondrialnymi genomami grzybów okazały się zaskakujące.

Zestawienie sekwencji zasad w genach z sekwencją aminokwasów w znanych polipeptydach pozwoliło na stwierdzenie, że kod genetyczny nie jest uniwersalny. Oto obserwowane w genomach mitochondrialnych odstępstwa od uniwersalnego kodu: w mitochondrialnym genomie ssaków kodon UGA oznacza nie sygnał stop, lecz tryptofan. Ponadto tryplet AUA koduje metioninę, a nie izoleucynę; AUA oraz AUU najprawdopodobniej mogą być kodonami inicjującymi translację. Tryplety AGA i AGG, normalnie kodujące argininę, w mitochondrialnym genomie ssaków są kodonami stop. W mitochondrialnych genomach drożdży, *N. crassa* i *A. nidulans* kodon UGA także oznacza tryptofan. Ponadto w mitochondrialnym genomie drożdży tryplety CUU, CUC,

Tabela 2

Kodony występujące w mitochondrialnym DNA zwierząt i drożdży

Aminokwasy	Kodony	Antykodony	Zwierzęta				Aminokwas	Kodony	Antykodon	Zwierzęta				Aminokwas	Kodony	Antykodony	Zwierzęta										
			Człowiek	Krowa	Mysz	Drożdże				Człowiek	Krowa	Mysz	Drożdże				Człowiek	Krowa	Mysz	Drożdże							
Fen	UUU	GAA	77	107	109	144	Ser	UCU	UGA	32	51	43	82	Tyr	UAU	GUA	46	64	65	215	Cys	UGU	GCA	5	6	11	54
Leu	UUC		141	133	132	79		UCC		99	66	47	11		UAC		89	74	59	29		UGC		17	16	20	0
	UUA	UAA	73	110	131	414	Pro	UCA	UGG	83	99	148	124	Ter*	UAA	GUA	—	6	7	6	Trp	UGA	UCA	93	92	97	66
	UUG		16	16	16	13		UCG		7	5	4	3		UAG		—	—	0	0		Trp		UGG	11	12	7
Leu	CUU	UAG	65	62	87	15	Pro	CCU	UGG	41	42	30	92	His	CAU	GUG	18	30	34	99	Arg	CGU	UCG	7	7	8	7
(Tre)	CUC		167	95	65	0		CCC		119	63	34	5		CAC		79	63	63	8		CGC		25	11	18	0
	CUA		276	285	266	31		CCA		52	85	139	52		CAA		81	79	79	71		CGA		29	42	36	0
	CUG		45	29	26	2		CGG		7	3	2	5		CAG		9	8	3	7		CGG		(ACG)	2	3	3
Ile	AUU	GAU	125	165	234	343	Tre	ACU	UGU	51	44	58	86	Asn	AAU	GUU	33	60	60	317	Ser	AGU	GCU	14	12	14	68
(Ile, Met)	AUC		196	160	140	44		ACC		155	96	80	12		AAC		131	102	108	33		AGC		39	43	35	7
Met	AUA	CAU	167	218	218	116	Ala	ACA	UGC	133	153	157	109	Liz	AAA	UUU	85	90	100	298	Arg	AGA	(UCU)	1	1	0	137
	AUG		40	44	31	99		ACG		10	15	6	16		AAG		10	11	2	21		AGG		1	1	0	7
Wal	GUU	UAC	30	40	63	93	Ala	GCU	UGC	43	52	47	108	Asp	GAU	GUC	15	22	31	141	Gli	GGU	UCC	24	29	36	176
	GUC		49	48	34	6		GCC		124	91	82	12		GAC		51	46	43	10		GGC		88	62	39	5
	GUA		70	87	76	143		GCA		80	103	97	76		GAA		64	78	83	175		GGA		67	97	109	73
	GUG		18	15	10	13		GCG		8	2	7	9		GAG		24	17	11	18		GGG		34	31	29	18

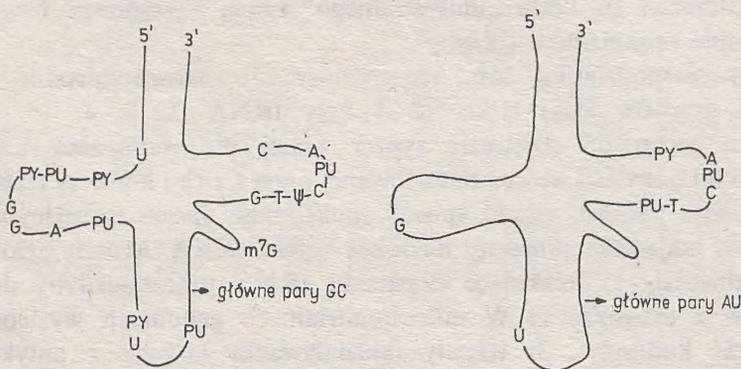
Normalnymi literami oznaczono aminokwasy kodowane przez takie same tryplety jak w kodzie uniwersalnym. Kursywą i tłustym drukiem oznaczono odstępstwa od kodu uniwersalnego (dotyczącego zarówno kodonów jak i antykodonów), stwierdzone odpowiednio, w genomach drożdży i zwierząt. Liczby poszczególnych trypletów są oparte na porównywalnych wartościach, np. suma kodonów podanych w tabeli w mitochondrialnym genomie myszy wynosi 3760, drożdży zaś — 4416. Sekwencje antykodonów podano zaczynając od końca 5'. Ter* — kodon terminacyjny (stop) sygnalizujący koniec translacji.

CUA i CUG kodują treoninę, a nie leucynę [5, 6]. W sumie więc treonina jest kodowana aż przez 8 trypletów. Dotąd znana jest sekwencja DNA tylko jednego mitochondrialnego genu roślinnego, kodującego podjednostkę 2 oksydazy cytochromowej [13]. Ponieważ nie wiadomo, jakie są różnice w sekwencji aminokwasów między tym polipeptydem i jego odpowiednikami w mitochondriach zwierząt i grzybów, nie można jednoznacznie stwierdzić wszystkich odstępstw od „uniwersalnego” kodu. Wydaje się jednak, że tryplet CGG koduje tu tryptofan, a nie argininę. Wynika z tego, że nie ma jednolitego systemu mitochondrialnego kodu genetycznego. Wprost przeciwnie, różne odstępstwa od kodu „uniwersalnego” mogą występować nawet w tej samej grupie organizmów (grzyby).

Drugą niespodzianką było stwierdzenie, że mitochondrialne genomy ssaków i grzybów mają tylko 22-24 typy tRNA [1, 2, 4, 15, 20, 24], a więc o osiem do dziesięciu typów mniej niż minimalna ich liczba potrzebna do translacji według postulowanej przez Cricka hipotezy chwiejności. Powstaje więc pytanie, w jaki sposób funkcjonuje aparat translacyjny mitochondriów, mając tak poważny niedobór typów tRNA. Można było założyć trzy możliwości. 1) Brakujące cząsteczki tRNA przechodziłyby do mitochondriów z cytosolu. 2) W mitochondrialnych genomach występowałyby tylko część kodonów. 3) Reguły oddziaływania kodonu z antykodonem w mitochondrialnym systemie translacji są inne niż w systemie translacji cytosolowej czy bakteryjnej. Pierwsza możliwość została doświadczalnie wykluczona, stwierdzono bowiem, że tRNA z cytoplazmy nie przenika do mitochondriów. Druga możliwość została także odrzucona na podstawie danych doświadczalnych. Po zsekwencjonowaniu bowiem genów mitochondrialnych lub ich części (tab. 2) okazało się, że spośród kilku trypletów kodujących dany aminokwas jedno występuje często, inne rzadko, ale tylko bardzo nieliczne nie występują wcale. Jak widać w tabeli 2, u ssaków kodony zakończone na A występują częściej niż kodony zakończone na G. W mitochondrialnych genach drożdży kodony zakończone na U i A występują o wiele częściej niż kodony zakończone na C i G. Oczywiście kodony występujące rzadziej też muszą być odczytywane przez odpowiednie tRNA. Należy więc przyjąć, że reguły oddziaływania kodonu z antykodonem są w mitochondrialnym systemie translacji odmienne niż w poznanych dotąd systemach.

Badanie specyficzności mitochondrialnych tRNA ssaków, drożdży i *N. crassa* wykazało, że aminokwasom kodowanym przez rodzinę czterech różnych kodonów odpowiada zawsze tylko jeden tRNA (tab. 2), podczas gdy w systemie translacji cytosolowej takiej czwórce kodonów odpowiadać muszą co najmniej dwa izoakceptorowe typy tRNA. Różnica ta wskazuje na występowanie rozszerzonej tolerancji w mitochondrialnym systemie odczytywania kodu genetycznego. Sekwencjonowanie wybranych mitochondrialnych tRNA grzybów i ssaków wykazało, że we wszystkich tRNA odpowiadających rodzinom kodonów pierwszą zasadą antykodonu jest uracyl. Jedynym wyjątkiem jest

antykodon ACG argininowego tRNA drożdży. Wynika stąd prosty wniosek, że uracyl jako pierwsza zasada antykodonu w mitochondrialnym tRNA może oddziaływać z dowolną zasadą w trzeciej pozycji kodonu. A więc w mitochondrialnych oddziaływaniach kodon-antykodon muszą powstawać „krótkie” pary typu U-U i U-C. Być może mitorybosomy ułatwiają, a przynajmniej nie utrudniają zmian konformacyjnych prowadzących do powstawania tego typu par. Kodony typu NN_C^U występujące poza rodzinami kodonów (tj. w przypadkach, gdy tylko dwa kodony oznaczają



Rys. 5. Porównanie struktury tRNA cytosolowego i tRNA mitochondrialnego. Konserwatywny układ zasad nadający strukturę liścia koniczyny wszystkim cytosolowym tRNA eukariontów i prokariontów (A). W tRNA mitochondrialnym (B) zachowało się niewiele z tych „stałych” zasad [wg 14]. PY — pirymidyna (t.j. U lub C), PU — puryna, m⁷G — guanina metylowana w pozycji N7, ψ (psi) — pseudourydyna

jeden aminokwas) odczytywane są przez tRNA mające w pierwszej pozycji antykodonu guaninę lub zmodyfikowaną guaninę. Nie stwierdzono także istnienia izoakceptorowych tRNA przenoszących aminokwasy kodowane przez tego typu kodony. A więc w mitochondriach oddziaływanie kodon-antykodon zachodzi zgodnie z zasadą tolerancji wg. Cricka, z tym, że powstają również pary U-U i U-C, jak to wynikało z prac Grosjeana i wsp. [14]. Dzięki temu do syntezy białek w mitochondriach wystarczają tylko 22 typy cząsteczek tRNA.

Zmieniony sposób oddziaływań kodon-antykodon w mitochondriach może się wiązać z innymi właściwościami mitochondrialnych tRNA w porównaniu z tRNA kodowanymi przez genomy jądrowe eukariontów oraz przez genomy bakteryjne. Mitochondrialne tRNA są zdolne do utworzenia drugorzędowej struktury „liśka koniczyny”, nie mają jednak szeregu specyficznych cech tRNA jądrowych, jak to przedstawiono schematycznie na rysunku 5 [14]. Prawdopodobnie w mitochondrialnych tRNA nie występują pewne oddziaływania trzeciorzędowe. Może to powodować ich większą swobodę i odmienny sposób oddziaływania z rybosomami. Warto podkreślić, że różnice między

tRNA mitochondrialnym i cytosolowym w obrębie organizmu są większe niż różnice między tRNA bakteryjnymi i eukariotycznymi, kodowanymi przez jądrowe genomy.

Mitorybosomy są mniej dokładnie poznane niż mitochondrialny tRNA. Mitorybosomy roślin mają stałą sedymentacji 70S. Zawierają one trzy typy cząsteczek rRNA: 23S, 16S i 5S [19], są więc pod tym względem podobne do rybosomów bakteryjnych. Natomiast mitorybosomy grzybów i zwierząt zawierają tylko dwie większe podjednostki rRNA. Stała sedymentacji mitorybosomów grzybów wynosi około 70S, zwierząt zaś — 55-60S. rRNA drożdży zawiera mały procent reszt G i C (25-40%), w porównaniu z cytosolowym rRNA (50-60%) i zawiera mniej niż 0,1% metylowanych nukleotydów, podczas gdy cytosolowy rRNA ma 1-2% metylowanych nukleotydów. Mała stała sedymentacji mitorybosomów zwierzęcych jest prawdopodobnie związana z bardzo małymi rozmiarami rRNA (por. str. 79).

EWOLUCJA GENOMÓW MITOCHONDRIALNYCH

Toczą się burzliwe debaty na temat pochodzenia mitochondriów. Jedni autorzy uważają, że powstały one na drodze endosymbiozy: prabakterie tlenowe zadomowiły się w komórkach protoeukariontów. Inni autorzy są zdania, że mitochondria powstały w wyniku oddzielenia i amplifikacji części genomu jądrowego protoeukariontów. Obecnie dostępne dane na pewno nie wystarczają do rozstrzygnięcia tego problemu. Wątpliwe jest zresztą, czy problemy tego rodzaju można w ogóle rozstrzygnąć w oparciu o ściśle naukowe dowody. Warto natomiast zastanowić się nad specyfiką ewolucji genomów mitochondrialnych.

We wszystkich zbadanych pod tym kątem organizmach eukariotycznych mitochondria spełniają tę samą podstawową funkcję, mianowicie produkują energię w wyniku utleniania biologicznego i oksydatywnej fosforylacji. Wymaga to określonych struktur molekularnych. Chodzi tu głównie o kompleksy cytochromów i ATPazy. Część wchodzących w ich skład polipeptydów kodowana jest przez genom jądrowy, część zaś — przez genom mitochondrialny. W mitochondriach są rybosomy. Ich rRNA kodowany jest przez genom mitochondrialny, olbrzymia zaś większość białek — przez genom jądrowy. Jak wiadomo, przy formowaniu się rybosomów ich białka rozpoznają określone sekwencje zasad w RNA. W mitochondriach pre-mRNA podlega obróbce enzymatycznej. Przynajmniej część enzymów uczestniczących w tym procesie kodowana jest przez genom jądrowy. Wynika z tego, że ewolucja genomów mitochondrialnych musi zachodzić w ściślejszej zależności od genomów jądrowych. Otóż zsekwencjonowano odpowiadające sobie fragmenty mtDNA człowieka i najbliższej z nim spokrewnionych małp człekosształtnych [9]. Na podstawie otrzymanych wyników oszacowano, że ewolucja genów mitochondrialnych kodujących białka zachodzi 10 razy szybciej niż genów jądrowych.

wych, zaś ewolucja mitochondrialnych tRNA — 100 razy szybciej niż jądrowych.

Jak już wspomniano, kod genetyczny w genomach mitochondrialnych różnych organizmów wykazuje różne odstępstwa od kodu uniwersalnego. Podobnie jest z rRNA i tRNA.

Uderzające jest zróżnicowanie rozmiarów genomów mitochondrialnych. Z dotąd poznanych, rozmiary genomów mitochondrialnych zwierząt, od robaków do ssaków, są podobne, rzędu 15 000-16 000 par zasad. W obrębie grzybów zaliczanych do workowców największe genomy mitochondrialne mają drożdże (68 000-75 000 par zasad), najmniejsze zaś, takie jak zwierzęce — *Schizosaccharomyces pombe* [23]. Rośliny kwiatowe mają genomy mitochondrialne co najmniej trzykrotnie większe niż drożdże [19]. Są też sugestie, że genomy mitochondrialne roślin mogą się składać z dwu lub więcej różnych cząsteczek DNA. Przypomnijmy, że podjednostka 9 ATPazy jest w drożdżach kodowana przez genom mitochondrialny, w innych zaś grzybach, a także w komórkach zwierząt — przez genom jądrowy. Można przypuszczać, że mitochondrialne genomy roślin kodują więcej białek niż genomy zwierząt i grzybów. Co więcej, w genomach jądrowych wykryto kopie genów mitochondrialnych, a więc między tymi genomami może zachodzić wymiana DNA.

Na szybkie tempo ewolucji genomów mitochondrialnych musi mieć wpływ następujący fakt. Jak wiadomo, genomy jądrowe występują w komórkach haploidalnych w pojedynczych kopiach, zaś w diploidach — w dwu kopiach. Natomiast genomy mitochondrialne występują w dziesiątkach lub nawet setkach kopii. Przy porównywalnych częstościach mutacji samorzutnych w przeliczeniu na jeden określony gen i jeden podział komórkowy, prawdopodobieństwo zajścia mutacji w genach mitochondrialnych jest więc kilkadziesiąt do kilkuset razy większe niż prawdopodobieństwo mutacji w genach jądrowych. Ponadto nawet w przypadku mutacji selektywnie ujemnych dla organizmu, ich niekorzystne skutki mogą być tym łatwiej maskowane im więcej jest w komórce niezmutowanych kopii genomów. Taka sytuacja może ułatwiać ewolucję genomów mitochondrialnych i skutecznie przeciwdziałać ograniczeniom przemian ewolucyjnych, narzuconym genomom mitochondrialnym przez genomy jądrowe.

LITERATURA

- [1] Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreider P. H., Smith A. J. H., Stoden R., Young I. G. — *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 290: 457-465, 1981.
- [2] Anderson S., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Eperon I. C., Sanger F., Young I. G. — *The complete sequence of bovine mitochondrial DNA: Conserved features of the mammalian mitochondrial genome*. J. Molec. Biol. 156: 683-719, 1982.

- [3] Barrell B. G., Anderson S., Bankier A. T., de Bruijn M. H., Chen E., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Smith A. J., Staden R., Young I. G. — *Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3164-3166, 1980.
- [4] Bibb M. J., Van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. — *Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA*. Cell 26: 167-180, 1981.
- [5] Bonitz S. G., Coruzzi G., Thalenfeld B. E., Tzagoloff A., Macino G. J. — *Assembly of the mitochondrial membrane system. Structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit 1 of yeast cytochrome oxidase*. J. Biol. Chem. 255: 11927-11941, 1980.
- [6] Bonitz S. G., Berlani R., Coruzzi G., Li M., Macino G., Tzagoloff A. — *Codon recognition rules in yeast mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3167-3170, 1980.
- [7] Borst P., Grivell L. A. — *The mitochondrial genome of yeast*. Cell 15: 705-723, 1978.
- [8] Borst P., Grivell L. A. — *Small is beautiful — portrait of a mitochondrial genome*. Nature 290: 443-444, 1981.
- [9] Brown W. M., Prager E. M., Wang A., Wilson A. C. — *Mitochondrial DNA sequences in primates: Tempo and mode of evolution*. J. Molec. Evol. 18: 225-239, 1982.
- [10] Crick F. H. C. — *Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis*. J. Molec. Biol. 19: 548-555, 1966.
- [11] Dujon B. — *Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the ω and rib-1 loci*. Cell 20: 185-197, 1980.
- [12] Fox T. D. — *Five TGA "stop" codons occur within the translated sequence of the yeast mitochondrial gene for cytochrome c oxidase subunit II*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6534-6538, 1979.
- [13] Fox T. D., Leaver C. J. — *The Zea mays mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons*. Cell 26: 315-323, 1981.
- [14] Grosjean H., Cedergren R. J., McKay W. — *Structure in tRNA data*. Biochimie 64: 387-456, 1982.
- [15] Heckman J. — *Novel features in the genetic code and codon reading patterns in Neurospora crassa mitochondria based on sequence of six mitochondrial tRNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3159-3163, 1980.
- [16] Kroon A. M., Saccone C. (red.) — *The organization and Expression of the Mitochondrial Genome*. Elsevier, North Holland, Biomed. Press, 1980.
- [17] Lagerkvist U. — *Unorthodox codon reading and the evolution of the genetic code*. Cell 23: 305-306, 1981.
- [18] Lazowska J., Jacq C., Slonimski P. P. — *Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron*. Cell 22: 333-348, 1980.
- [19] Leaver C. J., Gray M. W. — *Mitochondrial genome organization and expression*. Ann Rev. Plant Physiol. 33: 373-407, 1982.
- [20] Miller D., Martin N. C., Pham H. D., Donelson J. E. — *Sequence analysis of two yeast mitochondrial DNA fragments containing the genes for tRNA^{Ser}_{UCR} and tRNA^{Phe}_{UU \bar{Y}}* . J. Biol. Chem. 254: 11735-11740, 1979.
- [21] Montoya J., Ojala D., Attardi G. — *Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs*. Nature 290: 465-470, 1981.
- [22] Ojala D., Montoya J., Attardi G. — *tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria*. Nature 290: 470-475, 1981.

- [23] *Postępy Mikrobiologii* 17, zes. 3/4, 1978. (Cały zeszyt poświęcony genetyce mitochondrialnej).
- [24] van Ommen G. J. B., Boer P. H., Groot G. S. P., de Haan M., Rozendal E., Grivell L. A., Haid A., Schweyen R. J. — *Mutations affecting RNA splicing and the interaction of gene expression of the yeast mitochondrial loci cob and oxi-3*. *Cell* 20: 173-183, 1980.

ANDRZEJ PASZEWSKI

Instytut Biochemii i Biofizyki

PAN, Warszawa

MOLEKULARNE PODSTAWY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

W 1944 roku O. T. Avery, M. J. McCarty i C. M. MacLeod wykazali jednoznacznie, że DNA jest „materiałem”, z którego zbudowane są geny. Dziewięć lat później J. Watson i F. Crick opisali jego strukturę. W ciągu następnych trzydziestu lat poznano w znacznym stopniu całą „maszynę” komórkową, za pomocą której informacja zakodowana w genach zostaje zrealizowana w postaci określonych białek.

Mechanizmy odczytywania genów są w zasadniczych aspektach podobne u wszystkich żywych organizmów, chociaż istnieją liczne różnice w szczegółach. Droga od genu do białka stanowi tylko jedną stronę zagadnienia. Drugą stronę stanowi problem; kiedy i w jakich okolicznościach określony gen ulega ekspresji, czyli realizowana jest zakodowana w nim informacja genetyczna.

Obserwacje najprostszych mikroorganizmów wskazują dobitnie, że mogą one, zależnie od warunków środowiska, wytwarzać zupełnie inne białka, pomimo że nie zmienia się w tym czasie ich wyposażenie genetyczne, czyli genotyp. U organizmów wyższych widzimy olbrzymie zróżnicowanie komórek zarówno pod względem morfologii, jak też fizjologii, również przy zachowaniu niezmiennego genotypu. Wszystko to świadczy, że ekspresja genów podlega regulacji, która ma zasadnicze znaczenie dla organizmu.

Ekspresja genów u wszystkich organizmów przebiega w kilku etapach, z których każdy może być regulowany. Pierwszym z nich jest transkrypcja, w wyniku której informacja zawarta w sekwencji nukleotydów DNA zostaje przepisana przy udziale enzymu polimerazy RNA na sekwencje nukleotydów informacyjnego RNA (mRNA). W następnym etapie informacja zawarta w sekwencji mRNA jest tłumaczona na sekwencje aminokwasów w białku. Ten złożony proces, zwany translacją, przebiega z udziałem wielu składników komórki. W artykule tym zajmiemy się wyłącznie pierwszym etapem, tj. transkrypcją, a ściślej mówiąc — warunkami, w których ona następuje, pomijając ściśle enzymatyczne aspekty tego procesu.

W przypadku prokariotów, wiele z nich zdolnych jest żyć w środowisku zawierającym proste sole mineralne oraz organiczne źródło węgla, z których wytwarzają wszystkie składniki komórki dzięki posiadaniu odpowiednich układów enzymatycznych. Jednakże zdają się, że organizmy takie przebywają

wpodłożach bogatych, zawierających liczne związki organiczne, np. aminokwasy, gotowe do wykorzystania. W takiej sytuacji dalsze wytwarzanie enzymów potrzebnych do syntezy tychże związków organicznych byłoby marnotrawstwem materiału i energii. Komórki mają systemy regulujące, pozwalające w określonych sytuacjach przerwać wytwarzanie zbędnych enzymów, zazwyczaj przez blokowanie ekspresji kodujących je genów. Zamiast tego, wykorzystując dostępne w podłożu składniki, zapewniają sobie maksymalne tempo wzrostu komórek i ich populacji.

Organizmy eukariotyczne stanowią grupę bardzo zróżnicowaną poczynając od prostych grzybów na człowieku kończąc. U tych pierwszych, mających zwykle prosty cykl życiowy i podobne wymagania pokarmowe co prokarioty, w regulacji ekspresji genów dominują jeszcze reakcje na zmieniające się warunki środowiska, zwłaszcza dostępność substancji pokarmowych. W miarę wzrostu złożoności organizmów coraz większego znaczenia nabiera regulacja ekspresji genów związana z rozwojem i różnicowaniem.

W opracowaniu tym zostaną omówione najpierw najważniejsze właściwości systemów regulujących ekspresję genów u organizmów prokariotycznych. Pozwoli to na wprowadzenie szeregu podstawowych pojęć związanych z regulacją i będzie stanowić dobry punkt odniesienia przy omawianiu regulacji ekspresji genów u organizmów eukariotycznych.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW U PROKARIONTÓW

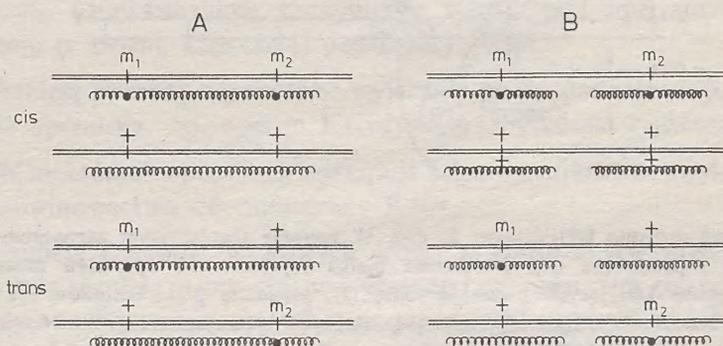
OPERONY

Prokarioty cechuje wysoki stopień skoordynowania ekspresji genów kodujących białka związane z określonym szlakiem metabolicznym. Podstawą tej skoordynowanej regulacji jest zablokowanie tych genów w jednym odcinku DNA. Cały ten blok, zwany operonem, ulega wspólnej transkrypcji — powstaje mRNA zawierające informacje dla szeregu białek. O takim mRNA mówimy, że jest policistronowy. Termin cistron pochodzi od testu na komplektację cis-trans, którego zasadę przedstawiono na rysunku 1. Odcinki mRNA, odpowiadające poszczególnym cistronom, ulegają oddzielnej translacji — powstaje szereg polipeptydów. Ponieważ, jak wspomniano wyżej, operony tworzą geny kodujące białka związane z określonym szlakiem metabolicznym, oczywista jest korzyść z ich skoordynowanej ekspresji regulowanej jednym „włącznikiem”.

Pierwszym poznanym operonem był operon laktozowy bakterii *Escherichia coli*. Opisali go w początkach lat sześćdziesiątych Jacob i Monod. Oni też wprowadzili ten termin. Strukturę tego operonu przedstawiono schematycznie na rysunku 2.

Najbardziej istotnym elementem wszystkich operonów jest region regulacyjny znajdujący się po stronie 5' bloku genów struktury (kodujących po-

szczególne białka). Jest to region, w którym przyłącza się polimeraza RNA oraz czynniki regulujące przyłączenie polimerazy i transkrypcję danego operonu [2, 3]. W operonie laktozowym wyróżniamy odcinek promotora, do którego przyłącza się polimeraza RNA. Dołączenie polimerazy uzależnione jest jednak od przyłączenia w pobliżu kompleksu złożonego ze specjalnego białka oraz cyklicznego AMP (cAMP), który destabilizuje strukturę DNA, ułatwiając przyłączenie enzymu. Okazało się, że ten kompleks spełnia bardziej



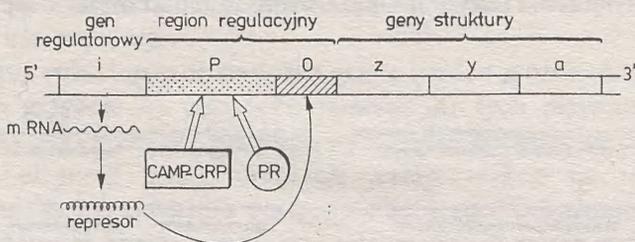
Rys. 1. Dwie leżące blisko siebie mutacje m_1 i m_2 mogą znajdować się w odcinku DNA kodującym jeden polipeptyd (A) lub w odcinkach kodujących różne polipeptydy (B). W pierwszym przypadku zniesienie efektu tych mutacji (zaznaczone ciemnymi punktami na wężyku symbolizującym łańcuch białkowy) przez uzupełnianie czyli komplementację wymaga wystąpienia w komórce odcinka DNA mającego na jednej cząsteczce dzikie, tj. niezmienione allele tych mutacji (cis) ponieważ wystąpienie tych alleli na różnych cząsteczkach (trans) nie prowadzi do powstania niezmienionych polipeptydów. W drugim przypadku niezależnie od konfiguracji alleli zmutowanych i dzikich na chromosomach, zarówno w układzie cis jak i trans powstają niezmienione polipeptydy (obok zmienionych) czyli jest komplementacja. Cistron jest to odcinek DNA, w obrębie którego mutacje komplementują w układzie cis, a nie komplementują w układzie trans. Koduje on jeden polipeptyd. Termin ten stosowany jest często jako synonim genu

uniwersalną rolę w regulacji metabolizmu komórkowego — bierze on udział w aktywowaniu operonów podlegających, tzw. katabolicznej represji węglowej. Białko wchodzące w skład kompleksu oznacza się skrótem CRP (ang. catabolite repression protein). Chodzi o to, że uruchamianie tej grupy operonów następuje w sytuacji wyczerpania się w podłożu preferowanego źródła węgla, jakim najczęściej jest glukoza. Z tą chwilą zaczyna być syntetyzowana w komórce większa ilość cAMP, którzy tworząc kompleks z białkiem CRP umożliwia przyłączenie polimerazy RNA w rejon promotora operonu, w tym także laktozowego.

Na tym nie kończy się jednak system regulacji tego operonu. Jest on blokowany specyficznym białkiem, tzw. represorem lac, które przyłącza się do rejonu operatora (patrz rys. 2). Białko to jest inaktywowane przez laktozę (lub jakiś inny galaktozyd) czyli cukier, którego pobieranie i rozkład

jest warunkowany enzymami kodowymi przez ten operon. Kompleks represora z laktozą (którą w takim przypadku nazywa się induktorem) traci zdolność łączenia się z operatorem dzięki czemu operon zostaje odblokowany.

Widzimy więc, że w regulacji omawianego operonu biorą udział przynajmniej dwa białka, tj. CRP i represor-lac, z tym, że pierwszy jest



Rys. 2. Schemat operonu laktozowego *E. coli*. W regionie regulacyjnym zaznaczono obszar operatora (O) i promotora (P). Dołączenie białka represora do operatora uniemożliwia transkrypcję genów kodujących β -galaktozydazę (z), permeazę β -galaktozydów (y) i trans-acetylazę (a). Induktor (laktoza lub inny β -galaktozyd) unieczynnia represor dzięki czemu region operatora nie jest blokowany i polimeraza RNA, która dołącza się do promotora przy obecności kompleksu cAMP-CRP może transkrybować operon. Występowanie genu regulatora (i) w sąsiedztwie kontrolowanego przezeń operonu nie jest regułą. Kompleks cAMP-CRP bierze udział w regulacji tylko operonów podlegających katabolicznej represji węglowej. cAMP-CRP — kompleks cAMP z białkiem CRP, PR — polimeraza RNA

elementem kontroli pozytywnej, drugi zaś kontroli negatywnej. Oba pojęcia są bardzo ważne w opisach mechanizmów regulacyjnych. O regulacji pozytywnej mówimy w przypadkach, gdy dołączenie czynnika regulacyjnego umożliwia transkrypcję, zaś o regulacji negatywnej, gdy dołączenie takiego czynnika transkrypcję hamuje. Należy zwrócić uwagę na łatwość mylenia tych dwóch typów regulacji, np. w przypadku operonu laktozowego mówimy o jego indukcji przez laktozę, co sugeruje jakieś oddziaływanie pozytywne. Ta regulacja dotyczy jednak przyłączania i odłączania represora, a więc elementu regulacji negatywnej omawianego operonu.

Obecnie poznano dokładnie (łącznie z sekwencją nukleotydów) regiony regulatorowe wielu różnych operonów. Stwierdzono, że większość z nich podlega obu omawianym tu typom regulacji, co nie było takie oczywiste 10 lat temu. Badania tych operonów potwierdziły zasadniczy model regulacji, chociaż ujawniły jednocześnie istnienie różnych modyfikacji tego modelu. Do najważniejszych z nich należą:

1. Tzw. sekwencje wiodące (liderowe) między regionem promotorowo-operatorem w przypadku operonu tryptofanowego, leucyna w przypadku operonu kodujących enzymy szlaków biosyntetycznych niektórych aminokwasów. W odcinku tym może nastąpić odpadnięcie polimerazy RNA od matrycy i przerwanie transkrypcji — tzw. atenuacja [23, 27]. Atenuacja transkrypcji

jest jednym ze sposobów, którym biosynteza aminokwasu może być regulowana przez tenże aminokwas. Sekwencja wiodąca koduje krótki peptyd bogaty w ten właśnie aminokwas, którego syntezę warunkuje dany operon, np. tryptofan w przypadku operonu tryptofanowego, leucynę w przypadku operonu leucynowego itp. Peptyd taki tworzy się natychmiast przez translację początkowego fragmentu syntetyzowanego mRNA, tym efektywniej, im większe jest w komórce stężenie wchodzącego w jego skład głównego aminokwasu. Synteza tego peptydu powoduje, że mRNA przybiera taką strukturę drugorzędową, która utrudnia kontynuację transkrypcji operonu i powoduje odłączenie (z pewną częstością) polimerazy RNA.

2. Istnieją operony regulowane wyłącznie na drodze atenuacji, nie mające w ogóle operatora, np. operon histydynowy *Salmonella typhimurium*.

3. W niektórych operonach występuje kilka promotorów, zwykle mających różne powinowactwo do polimerazy RNA.

4. Istnieją operony, w których jedno z kodowanych przez nie białek spełnia rolę regulatora transkrypcji własnego operonu. Jest to, tzw. regulacja autogenna. Występuje ona także w przypadku regulacji transkrypcji przynajmniej niektórych genów regulatorowych.

Bez względu jednak na wymienione tu modyfikacje podstawowa idea bloków genów podlegających wspólnej regulacji, wysunięta przez Jacoba i Monoda, pozostaje wciąż najogólniejszą teorią tłumaczącą regulację ekspresji genów u organizmów prokariotycznych.

Trzeba wspomnieć, że nie we wszystkich szlakach metabolicznych kontrolujące je geny tworzą operony — czasem są one rozmieszczone w różnych miejscach chromosomu. Pomimo to ich ekspresja podlega wspólnej regulacji. W tych przypadkach mówi się o regulonach. Regulon jest więc pojęciem bardziej ogólnym niż operon — ten ostatni jest szczególnym przypadkiem regulonu.

NADRZĘDNE SYSTEMY REGULACYJNE

Dotychczas omawialiśmy w zasadzie mechanizmy regulujące ekspresję specyficznych operonów bakteryjnych w odpowiedzi na zmieniające się warunki pokarmowe w otoczeniu. Istnieją jednak jeszcze bardziej złożone układy regulacyjne o bardziej uniwersalnej roli. O jednym z nich wspominaliśmy przy omawianiu regulacji operonu laktozowego. Chodzi o system katabolicznej represji węglowej, w której funkcję efektora pełni kompleks cAMP-CRP. Podlegające jej operony są aktywowane w przypadku wyczerpania się preferowanego źródła węgla i pojawia się konieczność przestawienia na źródła gorszego typu.

Innym przykładem nadrzędnego systemu regulacyjnego jest kataboliczna

represja azotowa, analogiczna do katabolicznej represji węglowej. W tym przypadku chodzi o uaktywnianie genów kodujących białka niezbędne do wykorzystania alternatywnych źródeł azotu z chwilą wyczerpania się źródła preferowanego, jakim jest jon amonowy. Interesujące jest, że w tym systemie rolę regulacyjną spełnia enzym syntetaza glutaminowa, a ściślej jej nieadenylowana forma, której ilość zwiększa się w sytuacji niedoboru dobrego źródła azotu.

Do systemów regulacji nadrzędnej zaliczyć należy także mechanizm ograniczania licznych funkcji komórki w warunkach zahamowania syntezy białka. Pojawia się wtedy w komórce zwiększona ilość czterofosforanu guanozyny (ppGpp), który jest inhibitorem polimerazy RNA, a także pośrednio syntezy lipidów, fosfolipidów, nukleotydów i innych związków [6]. W ten sposób komórka dostosowuje poziom ich syntezy do poziomu odpowiadającego syntezie białka. Ames nazwał związki typu cAMP czy ppGpp, które są efektorami nadrzędnych systemów regulacyjnych, alarmonami.

Bakterie mają też systemy regulacyjne, które dotyczą mechanizmów obronnych na szkodliwe oddziaływanie środowiska. Jeden z najważniejszych omówimy poniżej.

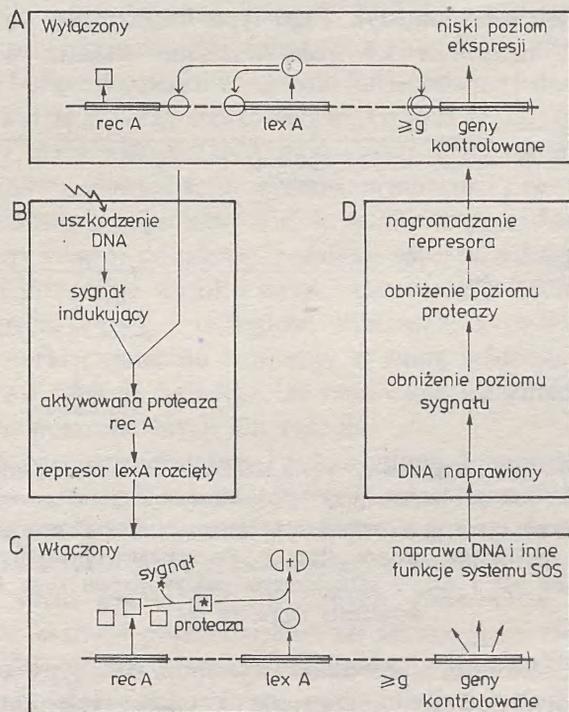
SYSTEM REGULACYJNY SOS *ESCHERICHIA COLI*

Bakteria *Escherichia coli*, w warunkach powodujących uszkodzenie DNA lub hamowanie jego replikacji, reaguje uruchomieniem złożonego systemu obronnego zwanego SOS, na który składają się takie zjawiska jak zwiększona zdolność do reperacji DNA, zwiększona częstość mutacji, inhibicja podziału komórkowego (filamentacja) oraz wiele innych, których wzajemne powiązania i rola biologiczna nie są dotąd całkowicie wyjaśnione [15] (szczegółowemu opisowi systemu SOS poświęcony jest specjalny artykuł).

Centralne znaczenie w tym systemie przypisuje się dwóm białkom nazywanym *lexA* i *recA*, zgodnie z nazwami kodujących je genów. Białko *lexA* jest represorem wielu genów (zidentyfikowano już 11), z których niektóre kodują enzymy niezbędne do naprawy uszkodzonego DNA, funkcja kilku innych nie jest w pełni jasna. Wiadomo już, że białko to przyłącza się do specyficznych sekwencji w operatorach tych genów, blokując ich ekspresję. Białko *recA* jest niezbędne dla genetycznej rekombinacji, ale także ma właściwości proteazy specyficznie rozcinającej białko *lexA*, a także niektóre represory fagowe. Schemat systemu regulacyjnego SOS przedstawiono na rysunku 3.

Jest rzeczą pewną, że do pełnienia funkcji proteazy białko *recA* musi być aktywowane i ono najprawdopodobniej jest pierwszym obiektem odbierającym sygnał indukujący cały system SOS. Sygnałem takim mogą być najrozmaitsze zmiany w strukturze DNA, chociaż nie jest znany dokładny mechanizm

aktywacji. Postuluje się np., że aktywna forma białka *recA*, mająca właściwość proteazy, jest wynikiem tworzenia kompleksu tego białka z jednoniciowym DNA i ATP z tym, że prawdopodobnie pojawienie się w komórce jakiegokolwiek metabolitu DNA, normalnie w niej nie występującego, może być sygnałem indukującym. Nie jest też do końca wyjaśnione, czy są jeszcze

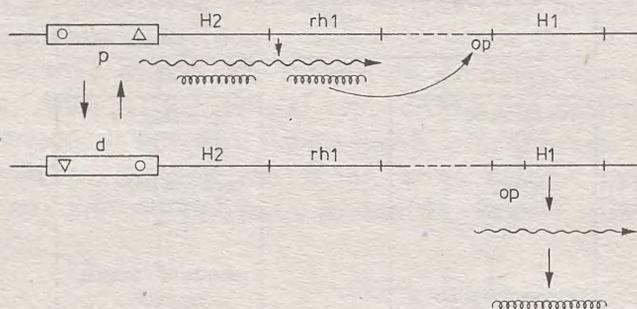


Rys. 3. Schemat regulacji systemu SOS. A — stan systemu w eksponencjalnie rosnących komórkach; B — przechodzenie w stan zaindukowany; C — stan zaindukowany; D — przechodzenia w stan normalnego wzrostu (powrót do A); □ — białko *recA*, ○ — białko *lexA*, D+D — produkty rozcięcia białka *lexA*. Grube strzałki w C — ekspresja różnych genów regulowanych przez system SOS w warunkach depresji. W B jako czynnik indukujący podano uszkodzenie DNA, ale wydaje się, że sygnał indukujący system SOS może być wywołany także innymi czynnikami

inne, nie zidentyfikowane geny podlegające represji przez białko *lexA*; czy proteaza *recA* może degradować także inne białka oraz jaka jest rola fizjologiczna wielu zidentyfikowanych już genów mających wpływ na wyrażenie się systemu SOS. Niewątpliwie jest to wciąż jeden z ciekawszych systemów regulacyjnych badanych obecnie w bakteriach.

ZMIANA TYPU ANTYGENOWEGO WICI U *SALMONELLA*

Istnieje u bakterii jeszcze inny mechanizm regulacji ekspresji genów polegający na przegrupowaniu segmentów DNA. (Pomijam tu wszystkie efekty związane z wbudowywaniem się w geny struktury lub ich sąsiedztwo różnych elementów mobilnych jak plazmidy, transpozony i fagi. (Pomimo, że często pociąga to za sobą zmianę ekspresji genu, nie wydaje się jednak, że tego typu zjawiska należą do mechanizmów regulacyjnych bakterii, gdyż zachodzą w sposób nieregularny). Tego typu mechanizmy są raczej rzadkie u prokariotów, natomiast ich rola wyraźnie wzrasta u eukariotów.



Rys. 4. Schemat zmian typu antygenowego wici u *Salmonella* przez zmianę orientacji promotora (p) obejmującego ok. 800 par zasad, przy jednej orientacji (góra) następuje transkrypcja genu H_2 warunkującego typ antygenowy 2 oraz genu $rh1$ kodującego represor blokujący ekspresję genu $H1$ kodującego antygen typu 1. Po zmianie orientacji promotora (dół) ustaje ekspresja genów H_2 i $rh1$, z jednoczesnym uaktywnieniem genu $H1$. op — miejsce dołączenia represora $rh1$

W populacji *Salmonella typhimurium* występują dwa typy komórek: jedne z wicią typu antygenowego 1 i drugie z wicią typu antygenowego 2, przy czym komórki mogą zmieniać jeden typ w drugi z częstością 10^{-2} do 10^{-3} , a więc znacznie częściej, niż by to mogło wynikać z typowych mutacji. Te dwa typy antygenów kodowane są przez loci $H1$ i $H2$ [25]. Analiza genetyczna wykazała, że element genetyczny powodujący zmianę typu wici, tzw. determinator fazy (ang. phase determiner), znajduje się obok genu $H2$ oraz sąsiadującego z nim genu $rh1$, kodującego represor genu $H1$. Ekspresja tych dwóch genów zależy od stanu (fazy) determinatora. Badania na poziomie molekularnym doprowadziły do stwierdzenia, że taka zmiana fazy polega na odwróceniu o 180° sekwencji determinatora długości, ok. 800 par zasad. Schemat mechanizmu zmiany typu antygenowego wici przedstawiono na rysunku 4. Podobny mechanizm występuje w przypadku zmiany zakresu gospodarzy (host-range) u bakteriofaga Mu-1, gdzie w grę wchodzi odwrócenie odcinka DNA długości ok. 3 tys. par zasad. Z dotychczasowych badań wynika jednak, że u prokariotów regulacja ekspresji genów w oparciu o przegrupowanie segmentów DNA nie ma szerszego znaczenia.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW U EUKARIONTÓW

Regulacja ekspresji genów u eukariontów poznana jest w znacznie mniejszym stopniu niż u prokariotów! Składają się na to liczne przyczyny. Wymieńmy główne z nich: 1) Jest to bardzo różnorodna grupa organizmów od prostych jednokomórkowych grzybów do człowieka. 2) Genomy eukariontów są 10 do 1000 razy bardziej złożone od genomów prokariotycznych. 3) Ich komórki mają złożoną budowę cechującą się występowaniem wyspecjalizowanych organelli, jak jądro, mitochondria i chloroplasty, mające własne błony i będące wyspecjalizowanymi funkcjonalnie jednostkami, w których przebiegają swoiste procesy metaboliczne. Oprócz jądra, także mitochondria i chloroplasty mają własne DNA zawierające część informacji genetycznej komórki, związaną głównie z funkcjonowaniem danej organelli. 4) Większość eukariontów stanowią organizmy wielokomórkowe przechodzące w swej ontogenezie złożony rozwój połączony z daleko idącym różnicowaniem, którego wynikiem jest powstanie wysoko wyspecjalizowanych komórek wchodzących w skład różnych tkanek i narządów. Ponieważ, z nielicznymi wyjątkami, wszystkie komórki organizmu zawierają tę samą informację genetyczną, ich różna budowa i funkcje świadczą, że inna część informacji genetycznej jest realizowana w poszczególnych ich typach.

Zasadnicze różnice między pro- i eukariontami dotyczą struktury materiału genetycznego — „nagi” DNA bakteryjny (w rzeczywistości jest on połączony z pewnymi białkami), u eukariontów zostaje zastąpiony chromatyną o złożonej budowie (patrz artykuł A. Jerzmanowskiego). Badania ostatnich lat wykazały ważną cechę wielu genów eukariotycznych, mianowicie, że ich sekwencje kodujące (tzw. eksony) poprzedzielane są sekwencjami niekodującymi (tzw. introny) [5]. W wyniku transkrypcji powstaje pre-mRNA, które podlega dalszej obróbce polegającej, m.in. na wycinaniu intronów i łączeniu egzonów w dojrzałe mRNA. Jest to proces tzw. składania (ang. splicing). Poza tym mRNA eukariontów ma często na końcu 5', tzw. czapkę, czyli 7'-metyloguanozynę [1], a na końcu 3' odcinek poliadenylowy. Są to dodatkowe modyfikacje nie spotykane u prokariotów. Nie będziemy ich szczegółowo omawiać, gdyż w tym miejscu chodzi tylko o zwrócenie uwagi na to, że u eukariontów ekspresja genu ma więcej etapów niż u prokariotów [7], co implikuje szereg dodatkowych mechanizmów regulacyjnych poza tymi regulującymi samą transkrypcję.

W tym artykule zajmiemy się tylko etapem transkrypcji i podobnie jak w przypadku prokariotów nie będziemy omawiać enzymatycznych aspektów tego procesu lecz warunki decydujące o jego zachodzeniu. Zaczniemy od problemu koordynacji ekspresji niektórych genów.

U EUKARIONTÓW NIE WYSTĘPUJĄ OPERONY

Model operonu był tak sugestywny, że przez wiele lat badacze poszukiwali operonów u eukariontów. Najwięcej badań nad regulacją ekspresji genów w tej grupie organizmów, szczególnie na początku, poczyniono na grzybach, gdyż stanowią one niezwykle dogodny obiekt zarówno do badań genetycznych (krótki czas generacji, duża liczebność potomstwa, prostota otrzymywania mutantów) jak i biochemicznych (łatwość otrzymywania dużej ilości materiału do analizy). Wiele z nich może rosnąć, podobnie jak bakterie, zarówno na prostych podłożach mineralnych, jak też na podłożach bogatych w związki organiczne, dostosowując do nich swój metabolizm [16]. Stwierdza się, że grzyby bardzo podobnie jak bakterie reagują na zmiany warunków pokarmowych w podłożu, co przejawia się pojawianiem się lub zanikaniem enzymów warunkujących określone procesy. Znamienny jest przy tym fakt, że geny kodujące analogiczne enzymy, które u bakterii tworzą operony, u grzybów rozmieszczone są w różnych miejscach jednego chromosomu, lub nawet różnych chromosomach. Pomimo to geny te jednak podlegają skoordynowanej regulacji, czyli tworzą regulony. W kilku przypadkach opisano u grzybów zgrupowania powiązanych ze sobą funkcjonalnie genów, tworzących blok mający wiele cech operonu [11]. Jednym z intensywniej badanych przykładów jest zespół pięciu genów AROM kodujących enzymy związane z biosyntezą aminokwasów aromatycznych u *Neurospora crassa*. W obrębie tego złożonego locus otrzymywano mutacje komplementujące w układzie trans, a także mutacje polarne sugerujące, że powstaje tylko jeden transkrypt. Badania enzymatyczne wykazały jednak, że w wyniku translacji powstaje jedno polifunkcyjne (konkretnie pięciofunkcyjne) białko o masie ok. 120 tys. daltonów. Aktywny pięciofunkcyjny enzym jest dimerem. Sytuacja jest więc odmienna, niż w przypadku klasycznego operonu, gdzie na policistronowym mRNA przebiega oddzielnie translacja poszczególnych białek.

Tego typu złożone loci co AROM nazywa się czasem „genami zespolonymi” w odróżnieniu od zespołu genów, by pozostać w zgodzie z klasycznymi pojęciami genetyki, że gen jest jednostką kodującą pojedynczy polipeptyd. Do innych, dobrze zbadanych genów zespolonych należy locus HIS-4 u drożdży, kodujący białko o trzech funkcjach enzymatycznych związanych z biosyntezą histydyny. Obecnie jest już znanych około 10 podobnych przykładów u różnych organizmów.

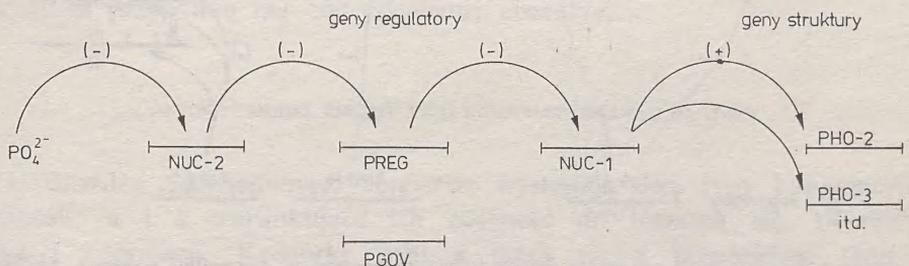
Niemniej znane są też zespoły sąsiadujących ze sobą genów podlegających wspólnej regulacji, np. zespół trzech genów kodujących enzymy katabolizmu kwasu chinowego u *Neurospora crassa*, czy też trzech genów kodujących enzymy metabolizmu galaktozy u drożdży. W tych przypadkach poszczególne aktywności enzymatyczne związane są z oddzielnymi białkami, co byłoby zgodne z modelem operonu, o ile powstawałby jeden policistronowy transkrypt. Wiadomo już jednak na pewno, że w przypadku genów katabolizmu kwasu chinowego każdy z nich jest oddzielnie transkrybowany [21]. Istnieją

przesłanki, że podobna sytuacja ma miejsce w innych zespołach genów tego typu. Należy więc przyjąć, że nawet jeśli u eukariontów zostaną odkryte prawdziwe operony, będą to sytuacje wyjątkowe.

REGULONY EUKARIOTYCZNE

Jak wspomniano wyżej, u eukariontów występują regulony. Opisywano je przede wszystkim u grzybów, u których łatwość otrzymywania na wielką skalę mutantów pozwoliła identyfikować zarówno geny struktury jak i geny regulatorowe składające się na określone układy regulacyjne, z których niektóre są dosyć złożone, co pokażemy na dwóch przykładach.

Neurospora crassa w warunkach głodu fosforowego zaczyna wytwarzać całą grupę enzymów mogących uwalniać fosforan z rozmaitych związków organicznych. Zidentyfikowano kilka powstających w tych warunkach enzymów

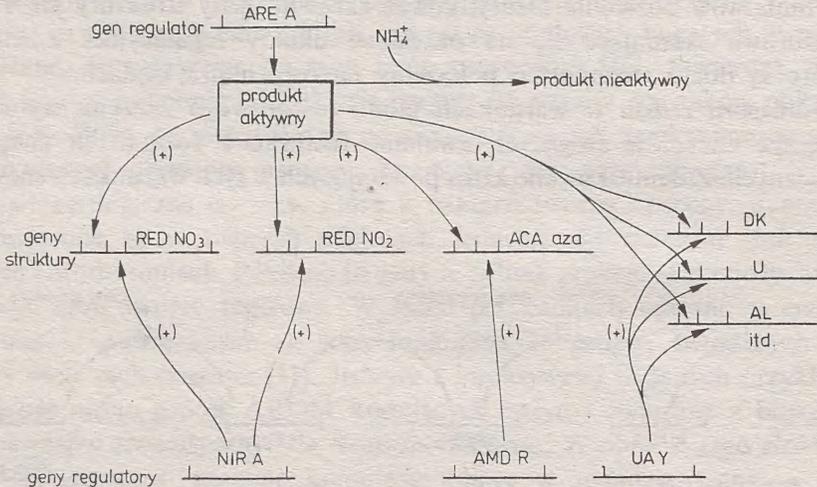


Rys. 5. Model regulacji syntezy enzymów związanych z metabolizmem fosforu u *Neurospora crassa*. Produkt genu NUC-1 jest niezbędny do wyrażenia się genów struktury (tu zaznaczono tylko PHO-2, kodujący reprimowalną alkaliczną fosfatazę i gen PHO-3, kodujący kwaśną fosfatazę). Produkty genów PREG i PGOV hamują ekspresję genu NUC-1 względnie inaktywują jego produkt. Ekspresja tych dwóch genów jest z kolei hamowana przez produkt genu NUC-2, ten zaś gen regulowany jest przez fosforan nieorganiczny, względnie powstający z niego efektor. W przypadku małego stężenia fosforanu w pożywce „włączony” jest gen NUC-2, hamowana jest ekspresja genów PREG i PGOV, co w rezultacie prowadzi do wytwarzania produktu genu NUC-1 i indukcji enzymów. (-) oznacza regulację negatywną, (+) regulację pozytywną

(m.in. specyficzne rybonukleazy i fosfatazy), w niektórych przypadkach także kodujące je geny. Indukcja syntezy tych enzymów wymaga współdziałania produktów kilku genów regulatorowych tworzących system kaskadowy [17]. Schemat regulacji całego układu przedstawia rysunek 5.

Bardzo interesujący jest system regulacji syntezy enzymów metabolizmu azotowego u *Aspergillus nidulans* przedstawiony na rysunku 6. Grzyb ten preferuje jon amonowy jako źródło azotu. Z chwilą jego wyczerpania uruchamiana jest synteza enzymów potrzebnych do wykorzystania azotanu lub też innych związków organicznych jako źródła azotu [22].

Jeśli kilka nie sprzężonych genów jest regulowanych w sposób skoordynowany przez produkt jednego lub kilku genów regulatorowych należy sądzić, że w segmentach promotorowo-operatorowych tych genów występują jakieś podobne sekwencje nukleotydów, do których dołącza się czynnik regulacyjny [8]. W ostatnich latach, dzięki klonowaniu genów i możliwości ich sekwencjonowania, można było sprawdzić czy to przypuszczenie jest słuszne. Stwierdzono



Rys. 6. Schemat regulacji enzymów metabolizmu azotowego u *Aspergillus nidulans*. Ekspresja genów strukturalnych podlega wspólnemu systemowi regulacji amoniakalnej, w której uczestniczy gen regulatorowy ARE A. Poza tym ekspresja genów strukturalnych podlega kontroli innych genów regulatorowych o bardziej specyficznym działaniu: NIR A, AMD R i UA Y. RED NO₃ — reduktaza azotanowa. RED NO₂ — reduktaza azotanowa, ACAaza — acetamidaza, DK — dehydrogenaza ksantynowa, U — urikaza, AL — alantoinaza

w ten sposób, że u drożdży w 5' regionach regulacyjnych czterech zbadanych genów, których ekspresja jest indukowana głodem aminokwasowym, występuje sekwencja AAGTGACTC. Wspólną sekwencję CTNGAATNTTCTAGA (N oznacza nukleotydy zmieniające się w poszczególnych przypadkach) znaleziono w ośmiu genach *Drosophila* indukowanych szokiem cieplnym. Potrzebne jest zbadanie sekwencji regulatorowych w większej liczbie zespołów genów wspólnie regulowanych, aby przekonać się, czy wspólne sekwencje są rzeczywiście zawsze warunkiem niezbędnym dla ich skoordynowanej regulacji. Podkreślić należy, że u grzybów, podobnie jak u bakterii, występują nadrzędne systemy regulacyjne, jak np. kataboliczna represja węglowa i kataboliczna represja azotowa (należy do niej opisany wyżej system u *Aspergillus nidulans*). Bardzo ciekawy system wspólnej regulacji biosyntezy aminokwasów opisano u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Polega on na tym, że niedobór któregośkolwiek z pięciu aminokwasów, tj. histydyny, waliny,

argininy, tryptofanu i lizyny, powoduje derepresję szlaków biosyntetycznych wszystkich pięciu [9, 13]. Jest to system, tzw. ogólnej regulacji biosyntezy aminokwasów działający niezależnie od systemów specyficznych dla poszczególnych aminokwasów.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ ICH PRZEMIESZCZANIE W CHROMOSOMACH

Omawiając regulację ekspresji genów u prokariotów podano przykład zmiany typu antygenowego wici u *Salmonella* w wyniku inwersji segmentu promotorowego warunkującego ekspresję dwóch kontrolowanych przez niego genów struktury. Był to prosty przykład regulacji przez reorganizację segmentu DNA.

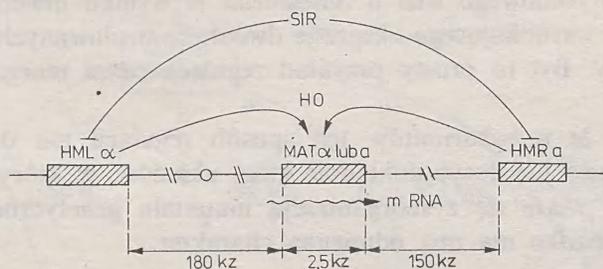
Wydaje się, że u eukariotów ten sposób regulacji ma dużo większe znaczenie. Opisano już dosyć dokładnie kilka układów, w których regulacja ekspresji genów wiąże się z reorganizacją materiału genetycznego, chociaż w każdym przypadku ma ona odmienny charakter.

„KASETOWY” MODEL ZMIANY TYPU KONJUGACYJNEGO U DROŻDŻY

U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* występują dwa typy konjugacyjne komórek: α i a warunkujące ich zdolność do łączenia się, tworzenia zygot i sporulacji. Komórki typu α łączą się z komórkami typu a tworząc diploidy α/a . Diploidy nie są już zdolne do konjugacji ani z komórkami α ani z a , nabierają natomiast zdolności do sporulacji, w czasie której zachodzi mejoza i powstają 4 haploidalne spory: 2 typu α i 2 typu a . Istnieją szczepy drożdży, u których komórki powstające w drodze podziałów z pojedynczej spory zachowują jej wyjściowy typ konjugacyjny (są to tzw. szczepy heterotaliczne). Obok tego istnieją jednak inne szczepy, w których w czasie kolejnych podziałów komórek pochodzących z pojedynczej spory zachodzą częste (do 70%) zmiany typu konjugacyjnego z α na a i z a na α tak, że w efekcie powstający z takiej spory (będącej wyjściowo α lub a) klon komórek składa się plus minus z jednakowej liczby komórek a i α zdolnych do konjugowania. Są to tzw. szczepy homotaliczne [18].

Już dość dawno stwierdzono, że gen typu konjugacyjnego MAT zlokalizowany jest w III chromosomie i występuje w postaci dwóch alleli MAT α i MAT a warunkujących odpowiednie typy konjugacyjne. Stwierdzono także, że homotalizm warunkowany jest dominującym genem HO. Szczepy heterotaliczne mają jego recesywny allel ho. Początkowo sądzono, że gen HO powoduje dużą częstość mutacji jednego typu konjugacyjnego w drugi. W wyniku dalszych prac, prowadzonych w kilku laboratoriach, zidentyfikowano dalsze geny związane ze zmianą typu konjugacyjnego, tj. HML i HMR, warunkujące zmianę typu konjugacyjnego odpowiednio na α i a , zlokalizowane

również w III chromosomie. Okazało się, że geny HML i HMR to nic innego, jak „ciche” kopie genów kodujących informacje α i a . Geny te nie ulegają normalnie ekspresji, mogą one być natomiast „wstawiane” w locus typu konjugacyjnego MAT, gdzie ulegają ekspresji. Tak np. jeśli istniejąca do tej pory w locus MAT sekwencja a (MAT a) zostanie zastąpiona sekwencją α pochodzącą z genu HML, następuje zmiana typu konjugacyjnego na α (MAT α). Proces ten przypomina wymianę kaset w magnetofonie, stąd powstał „kasetowy” model zmiany typu konjugacyjnego. Istotny jest



Rys. 7. Kasetowy model zmiany typu konjugacyjnego u drożdży. Informacja zawarta w genie MAT (α lub a) ulega ekspresji. Może być ona zastąpiona informacją z „cichych” genów HML i HMR, z których pierwszy zawiera zwykle informacje α a drugi a . Wszystkie trzy geny zlokalizowane są w chromosomie III. Przeniesienie informacji z genów HML i HMR do locus MAT warunkowana jest obecnością produktu dominującego genu HO. Szczepy heterotaliczne noszą recesywny allel ho . Geny HML i HMR pozostają nieaktywne, ponieważ podlegają represji przez produkty genów SIR. W mutantach sir^- ekspresji ulegają wszystkie trzy geny typu konjugacyjnego

przy tym fakt, że przeniesienie informacji do locus MAT nie pociąga za sobą jej utraty w locus „cichym”. Świadczy to o tym, że przed lub w czasie przeniesienia odpowiedni odcinek DNA ulega replikacji. Przypuszcza się, że zmiana typu konjugacyjnego przypomina proces konwersji genów. Wykazano również, że normalnie przekazywanie informacji w tym systemie przebiega jednokierunkowo, tj. od genów „cichych” do locus MAT. Sytuacja zmieni się jednak w przypadku zajścia mutacji w jednym z genów SIR (od ang. silent information regulator). W wyniku takich mutacji nie tylko zostaje zniesiona kierunkowość przekazywania informacji, ale także zachodzi ekspresja nieaktywnych normalnie genów HML α i HMR a , przez co komórki nabierają cech fenotypu α/a typowego dla diploidów powstałych w wyniku konjugacji. Schemat mechanizmu zmian typu konjugacyjnego u drożdży przedstawiono na rysunku 7. Trzeba dodać, że produkty genu MAT (a lub α) regulują ekspresję licznych genów kodujących białka określające stan fizjologiczny komórek α lub a i wiążących się z cyklem komórkowym. Zmiana typu konjugacyjnego może być więc uważana za prosty proces różnicowania.

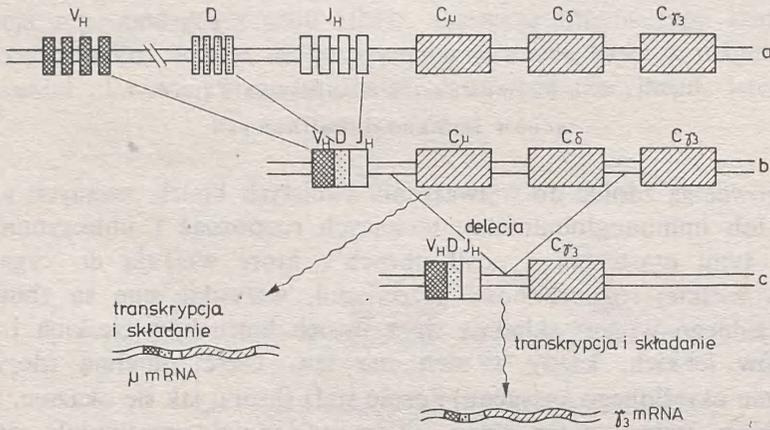
Sam mechanizm tej zmiany, polegający na wstawieniu nieaktywnego genu w miejsce umożliwiające jego ekspresję, stanowi interesujący model sposobu uaktywniania genów w czasie rozwoju organizmu. Nie wiadomo, w jakiej mierze sposób ten ma znaczenie ogólniejsze, na pewno nie jest jedynym sposobem.

Formowanie i różnicowanie genów immunoglobulinowych

Kręgowce są zdolne do wytwarzania swoistych białek, zwanych przeciwciałami lub immunoglobulinami, mogących rozpoznać i unieczynnić wiele różnego typu cząsteczek i „ciał obcych”, które wnikają do organizmu. Pomimo wielkiej różnorodności przeciwciał, wszystkie one są zbudowane według jednego wzoru: składają się z dwóch łańcuchów ciężkich i dwóch łańcuchów lekkich, każdy z nich ma tzw. część zmienną (decydującą o wiązaniu określonego antygeny) i część stałą (która, jak się okazuje, nie jest tak całkiem stała — patrz niżej). O specyficzności przeciwciała decydują części zmienne łańcuchów. Skąd bierze się taka ich różnorodność? Czy jest tak dużo genów mających część wspólną i zróżnicowane segmenty kodujące części zmienne, czy też istnieje ograniczona liczba genów immunoglobulinowych, mogących jednak mutować z wyjątkowo dużą częstością? Odpowiedzi na te pytania dostarczyły badania kilku ostatnich lat, w których posłużono się technikami inżynierii genetycznej. Najważniejszym odkryciem było stwierdzenie, że w komórkach embrionalnych nie istnieją gotowe geny kodujące łańcuchy immunoglobulinowe, występują natomiast ich różne segmenty, z których w czasie różnicowania limfocytów następuje „montowanie” genów w drodze rekombinacji genetycznej. Proces ten prześledzimy na przykładzie genów kodujących łańcuchy ciężkie u myszy, na których wykonano znaczną część badań [14].

Jak pokazano na rysunku 8, poszczególne segmenty, z których powstają geny łańcucha immunoglobulinowego, rozmieszczone są w różnych miejscach chromosomu, często w znacznej odległości jedno od drugich. Znamienne jest przy tym, że istnieje znaczna liczba (oceniana na 200 do 1000) różniących się w mniejszym lub większym stopniu segmentów V_H oraz kilka segmentów D i J_H . Istnieje też kilka różnych segmentów kodujących części stałe łańcucha, od których biorą nazwy klasy immunoglobulin: IgM , IgD , IgG itd. Formowanie genu powstaje w wyniku rekombinacji i prowadzi do usunięcia (delecji) znacznych odcinków DNA, w wyniku czego tworzy się zwarty blok VDJ kodujący część zmienną łańcucha [10]. Miejsca, w których zachodzi rekombinacja są precyzyjnie określone sekwencjami DNA w odcinkach przyległych do segmentów V , D i J , rozpoznawanych przez specjalny enzym (γ). Jak widać, sam mechanizm powstawania bloku VDJ pozwala na olbrzymią jego różnorodność, ponieważ blok taki może powstać przez

dowolną (jak się obecnie wydaje) kombinację poszczególnych segmentów V, D i J [24]. Doskonale tłumaczy to powstawanie tak dużej liczby przeciwciał wytwarzanych przez organizm [20].



Rys. 8. a — Schemat organizacji segmentów kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin mysich. Nie są zachowane proporcje długości poszczególnych odcinków DNA. Zaznaczono tylko kilka segmentów V. Po stronie 3' od C_{γ_3} znajdują się jeszcze segmenty C_{γ_1} , $C_{\gamma_{26}}$, C_2 i C_{α} . Nie są znane odległości między zgrupowaniem segmentów V i D, między D i J wynosi ona ponad 1000 p.z. Segmenty J są oddzielone od siebie odcinkami kilkuset p.z. Segmenty J oddzielone są od C_{μ} 7,5 tys. p.z. segment C_{μ} dzieli od C_{δ} ok. 2,5 tys. p.z. W obrębie segmentów C nie zaznaczono egzonów i intronów. b — Rekombinacja prowadząca do powstania pełnego genu C_{μ} . W wyniku transkrypcji i składania pre-mRNA powstaje μ mRNA łańcucha ciężkiego immunoglobuliny klas IgM. (Dla uproszczenia nie uwzględniono przebiegającej często jednoczesnej transkrypcji C_{μ} i C_{δ}). c — Zmiana klasy immunoglobuliny — w wyniku delecji dużego odcinka DNA zawierającego segmenty C_{μ} i C_{δ} następuje przyłączenie segmentu C_{γ_3} w pobliże regionu VDJ. W wyniku transkrypcji i składania powstaje γ_3 mRNA kodujący łańcuch ciężki immunoglobuliny klasy IgG

W wyniku opisaney wyżej rekombinacji powstaje odcinek DNA stanowiący już „gotowy” gen immunoglobulinowy, podlegający transkrypcji. Konkretnie transkrypcja obejmuje blok VDJ oraz odcinek DNA sięgający segmentów C_{μ} i C_{δ} . Powstały transkrypt zawiera jeszcze sekwencje nie kodujące, tzw. introny, często spotykane w genach organizmów eukariotycznych. Transkrypt ten ulega składaniu, w wyniku czego powstaje μ mRNA lub (z mniejszą częstością) δ mRNA.

Na tym jednak nie kończy się zwykle różnicowanie limfocytu. Często następuje w nim zmiana klasy wytwarzanej immunoglobuliny w wyniku usunięcia jednego lub kilku segmentów C, kodujących części stałe. Usunięcie to odbywa się też przez swoistą rekombinację. Przykład takiej zmiany klasy przedstawiono

na rysunku 8 — w wyniku wycięcia segmentów C_{μ} i C_{δ} w pobliżu bloku VDJ dostaje się segment C_{γ_3} , który teraz wchodzi w skład transkryptu. Komórka przestaje wytwarzać immunoglobulinę typu IgM, a zaczyna wytwarzać immunoglobulinę typu IgG. Należy zwrócić uwagę, że zmiana klasy nie prowadzi do zmiany specyficzności antygenowej wytwarzanej przez tę komórkę immunoglobuliny, ponieważ warunkujący tę specyficzność blok VDJ już się nie zmienia w wyniku nowej rekombinacji. Na podobnej zasadzie przebiega „montowanie” genów kodujących łańcuchy lekkie.

Widzimy więc, że system tworzenia przeciwciał jest niezwykle elastyczny. Łatwo jest też zrozumieć, dlaczego organizm może wytwarzać tak dużą ich różnorodność. System ten reprezentuje jednocześnie ciekawy mechanizm różnicowania. Trudno w tej chwili powiedzieć, czy jest on swoisty dla immunoglobulin, czy też ma on znaczenie ogólniejsze.

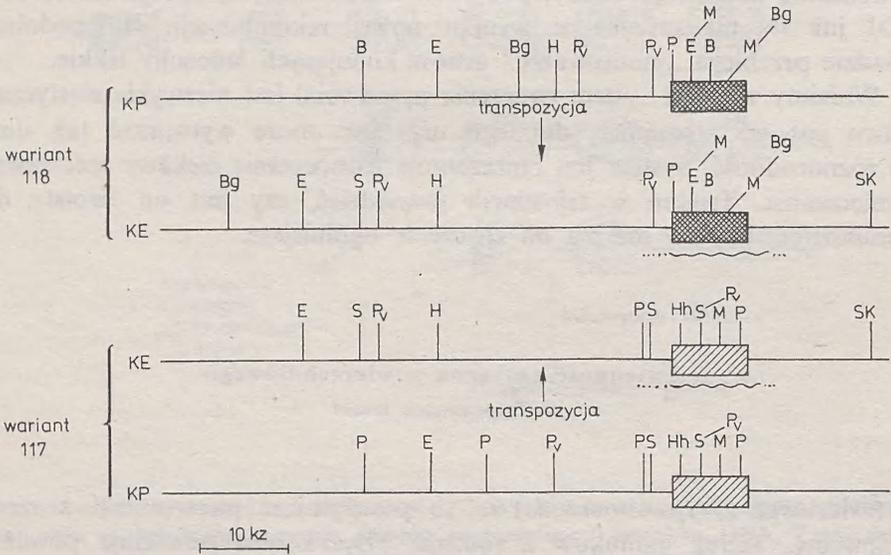
Zmienność antygeny powierzchniowego u *Trypanosoma brucei*

Świdrowce (*Trypanosomatida*) są to pasożytnicze pierwotniaki z rzędu wiciowców. Szereg gatunków z rodzaju *Trypanosoma* powoduje poważne schorzenia u zwierząt i ludzi w Afryce. Cechą charakterystyczną tych organizmów jest zdolność do neutralizowania skutków obrony immunologicznej żywiciela przez częstą zmianę typu glikoproteidu powierzchniowego będącego silnym antygenem [4]. Najwięcej badań nad zmiennością antygeny powierzchniowego prowadzono na *Trypanosoma brucei*, powodującą u koni i bydła chorobę nagana objawiającą się gorączką, obrzękami, sztywnością kończyn, a później zmianami patologicznymi w wątrobie, śledzionie i rdzeniu kręgowym.

Stwierdzono, że ten świdrowiec może wytwarzać ponad sto antygenów powierzchniowych, na tyle różnych pod względem sekwencji aminokwasów, że przeciwciała wytworzone przeciwko jednemu typowi nie reaguje z innymi antygenami pozostałymi w repertuarze pasożyta. Dzięki sklonowaniu genów kodujących te antygeny na plazmidach bakteryjnych i używając ich jako sond molekularnych, można było ustalić ich liczbę i rozmieszczenie w genomie pasożyta. Okazało się, że istnieją „rodziny” bardzo podobnych genów (kodowane przez nie białka należą do jednego typu antygenowego) oraz że geny te występują w zgrupowaniach. Z badań tych wynika, że liczba wszystkich genów kodujących antygeny powierzchniowe wynosi ok. 2 tysiące, co stanowi ok. 10% jądrowego DNA świdrowca.

Przez hybrydyzację plazmidów noszących całe geny antygenów powierzchniowych lub ich części z DNA świdrowca trawionego różnymi enzymami restrykcyjnymi stwierdzono, że ten sam gen może występować w dwóch

kopiach zlokalizowanych w różnych miejscach. Okazało się przy tym, że w jednym z tych miejsc kopia tego genu może być zastępowana kopią genu kodującego inny antygen powierzchniowy. Jedną z kopii genu nazwano kopią podstawową (KP), zaś tę, która może być podstawiona innym genem — kopią podlegającą ekspresji (KE). W jaki sposób to odkryto?



Rys. 9. Dwa lub więcej genów VSG może ulegać transpozycji w to samo miejsce chromosomu, w którym ulegają ekspresji. Przedstawione są odcinki DNA otaczające kopie podstawowe tych genów (KP) oraz kopie ulegające ekspresji (KE) z zaznaczeniem miejsc rozpoznawanych przez poszczególne enzymy restrykcyjne. Jak widać w obu przypadkach KE mają po lewej i po prawej stronie te same fragmenty chromosomu co świadczy, że mają identyczną lokalizację. Podkreślono segmenty transponowane z kopii podstawowych. Granice tych segmentów będzie można dokładnie wyznaczyć po ustaleniu sekwencji zasad w otoczeniu kopii podstawowych i transponowanych. Litery symbolizują enzymy restrykcyjne: B — BamHI, Bg — Bgl II, E — EcoRI, H — HindIII, Hh — HhaI, M — MspI, P — PstI, Pv — PvuII, S — SalI. SK oznacza skupienie miejsc wrażliwych na przynajmniej 10 enzymów restrykcyjnych

Otóż okazało się, że różne antygeny powierzchniowe mają prawie identyczne sekwencje C-terminalne i że sekwencje nukleotydowe mRNA, odpowiadające tej części łańcucha białkowego mają swoje odpowiedniki w DNA kopii podlegających ekspresji, a nie kopii podstawowych. Oznacza to, że gen transkrybowany składa się z części zmiennej, tj. fragmentu przeniesionego z kopii podstawowej, i z części stałej.

Na rysunku 9 przedstawiono sklonowane fragmenty DNA zawierające kopie podstawowe dwóch genów antygenów powierzchniowych oraz fragmenty zawierające kopie podlegające ekspresji tych samych genów. Jak widać, te drugie mają identyczne lokalizacje, o czym świadczy rozmieszczenie miejsc rozpoznawanych przez poszczególne enzymy restrykcyjne w regionach przyległych do tych genów.

Nie jest jeszcze znany mechanizm przenoszenia informacji z kopii podstawowych do miejsc aktywnej ekspresji. Ze znanych sposobów, tj. udziału czynnika mobilnego typu transpozomu, transpozycji kopii DNA wytworzonej przez odwrotną transkrypcję mRNA oraz konwersji genowej, ten trzeci sposób wydaje się najprostszy. Byłby to mechanizm przypominający kasetowy model zmiany typu konjugacyjnego u drożdży.

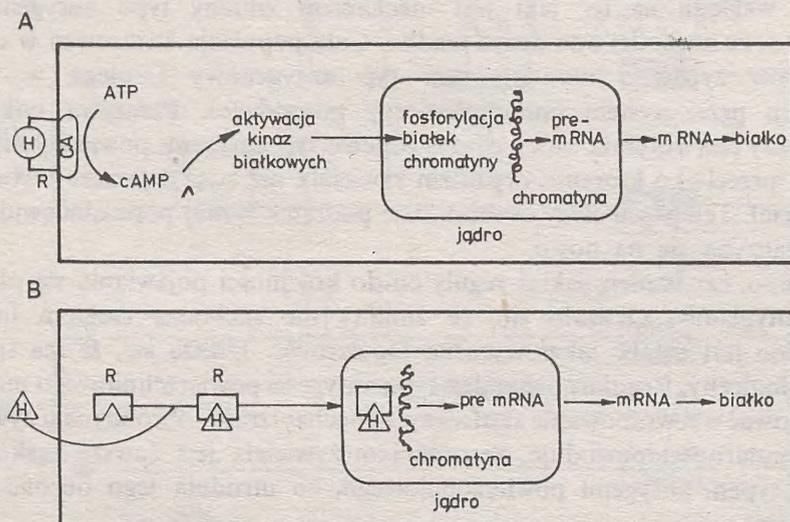
Bez względu na to, jaki jest mechanizm zmiany typu antygenowego wiadomo, że zachodzi ona dosyć rzadko. Cała populacja świdrowca w danym organizmie żywiciela ma ten sam typ antygenowy i ulega w 99,9% destrukcji przez system immunologiczny gospodarza. Przeżywa tylko ten pojedynczy pierwotniak, który zdążył zmienić typ antygenu powierzchniowego na taki, przeciwko któremu organizm żywiciela nie zdążył jeszcze wytworzyć przeciwciał. Ten pojedynczy osobnik daje początek nowej populacji świdrowca i cykl zaczyna się na nowo.

Badano, czy istnieją jakieś reguły co do kolejności pojawiania się określonych antygenów. Okazało się, że zmiany nie zachodzą całkiem losowo, ale trudno jest ustalić jakąś wyraźną regularność. Uważa się, że ma to swój sens biologiczny. Regularność zmian typu antygenu powierzchniowego mogłaby spowodować wyewoluowanie skutecznych mechanizmów obronnych u żywicieli. Brak regularności powoduje, że organizm żywiciela jest zawsze zaskoczony nowym typem antygenu powierzchniowego, co utrudnia jego obronę przed pasożytem.

HORMONALNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

Powyżej omówiliśmy kilka mechanizmów regulacji ekspresji genów poprzez przegrupowanie odcinków DNA. Znane są również inne mechanizmy, np. przez działanie hormonów, które są wytwarzane w jednych typach komórek i jako sygnały chemiczne przenoszone w układzie krążenia do innych komórek, gdzie wywołują określone zmiany metaboliczne, często związane również z hamowaniem lub stymulowaniem ekspresji określonych genów. Hormony płciowe spotyka się już u najprostszych eukariontów, jakimi są grzyby. U wyższych organizmów, szczególnie zwierzęcych, regulacja hormonalna stanowi bardzo istotny mechanizm regulacji funkcjonowania organizmu. Istnieją dwie grupy hormonów: jedne nie wynikające do wnętrza komórek docelowych, np. hormony białkowe oraz drugie — wnikające do komórek, np. hormony sterydowe. Hormony pierwszej grupy mają swoiste receptory na powierzchni komórek docelowych, które występują w kompleksie z enzymem cyklazą adenylową syntetyzującą cykliczne AMP (cAMP) (rys. 10A). Zależnie od hormonu, jego przełączenie do receptora powoduje aktywację lub inhibicję tego enzymu, co z kolei odbija się na poziomie syntetyzowanego

w komórce cAMP. Spełnia on rolę, tzw. wtórnego posłańca (ang. secondary messenger), który powoduje aktywację kinaz białkowych fosorylujących, jak się wydaje, określone białka w chromatynie. Przypuszcza się, że wiąże się to ze zmianą struktury chromatyny i ekspesją określonych genów. Widzimy, że pomiędzy sygnałem specyficznym, jakim jest hormon, a genem występuje



Rys. 10. Aktywacja genów przez hormony. A — Działanie hormonów, które mają receptory na zewnątrz komórki i do niej nie wnikają (np. hormony peptydowe). Receptory te powiązane są z cykłązą adenylową. Pod wpływem hormonu wzrasta ilość cAMP, który stymuluje kinazy białkowe. Te z kolei fosforylują określone białka w chromatynie powodując, jak się mniema, lokalne zmiany w jej strukturze umożliwiające ekspesję genów. Te ostatnie etapy stymulacji hormonalnej są jeszcze słabo poznane, zwłaszcza w aspekcie specyficznego uaktywniania genów. B — Hormony, które wnikają do wnętrza komórki docelowej (np. hormony sterydowe) mają w niej swoiste receptory białkowe. Kompleks hormon-receptor dostaje się do jądra, gdzie oddziałuje na określone regiony chromatyny charakteryzujące się specyficznymi białkami. Dołączenie kompleksu powoduje zmiany w chromatynie umożliwiające ekspesję genów

pośredni sygnał niespecyficzny, jakim jest cAMP. Należy więc sądzić, że komórka reagująca na hormon została już w procesie różnicowania swoiście zaprogramowana, tak że zmiany w poziomie cAMP mogą oddziaływać na ekspesję tylko określonych genów. Hormony sterydowe mogą wnikać do różnego typu komórek, jednak nagromadzają się i wywołują określone reakcje tylko w tych, które mają wiążące je receptory. Powstaje kompleks hormon-receptor, który dołącza się do określonego miejsca chromatyny, powodując jej rozluźnienie i możliwość transkrypcji (rys. 10B).

Często jeden hormon może stymulować syntezę kilku białek, na przykład

estrogen stymuluje syntezę trzech polipeptydów białka jaja kurzego owoalbuminy, konalbuminy i lizozymu. Najwięcej badań poświęcono regulacji genu kodującego owoalbuminę [19, 26]. Gen ten został już sklonowany i poznano sekwencję jego DNA od strony 5', obejmującą również nie kodujący region regulacyjny, który jest dosyć typowy dla genów eukariotycznych. Występuje w nim sekwencja AAAATGGGC znajdująca także w regionach regulacyjnych genów konalbuminy i lizozymu. Być może ma ona jakieś znaczenie w regulacji ekspresji tych genów.

Trzeba jednak pamiętać, że kompleks hormon-receptor łączy się nie tyle z określonym odcinkiem DNA, co z określonym odcinkiem chromatyny, który zawiera swoiste białka. Nie oznacza to jednak, że sekwencja DNA nie ma znaczenia. Wyizolowano frakcję białkową z chromatyny jajowodu kury, która łączy się z tym kompleksem. Znamienne jest przy tym, że tego typu frakcji nie znajdowano w białkach chromatyny izolowanej z innych tkanek. Stwierdzono ponad to, że w komórkach jajowodu dosyć znaczny odcinek chromosomu, obejmujący ok. 100 kb, zawierający gen owoalbuminy, ma wiele miejsc wrażliwych na DNAzę I, przy czym ten sam odcinek izolowany z komórek innych tkanek nie wykazuje tej cechy. Pojawienie się miejsc wrażliwych na DNAzę I (jest to jeden z enzymów przecinających DNA) jest dowodem na rozluźnienie struktury chromatyny [26]. Powoduje to łatwiejszy dostęp do DNA różnych enzymów, np. wspomnianej wyżej DNAzy, a także polimerazy RNA. Zjawisko to obserwowano już w przypadku aktywacji wielu genów.

Stwierdzono także, że różnice tkankowe tego odcinka chromosomu dotyczą też stopnia metylacji cytozyny w określonym segmencie DNA — w komórkach jajowodu jest on mniejszy. Ważne jest przy tym stwierdzenie, że zarówno występowanie miejsc wrażliwych na DNAzę I, jak i zmniejszona metylacja omawianego odcinka chromatyny charakteryzują komórki jajowodu niezależnie od tego, czy są one poddawne działaniu hormonu, czy też nie. Oznacza to, że całe domeny chromatynowe, znacznie większe od pojedynczego genu, są w danej tkance przygotowane do ekspresji znajdujących się w niej genów, tak że działanie kompleksu hormon-receptor jest tylko sygnałem wywoławczym. W ciągu ostatnich kilku lat bardzo posunęły się techniki badania ekspresji sklonowanych genów *in vitro* i *in vivo*. Jeśli chodzi o tę drugą technikę, do badań używa się bakterii i drożdży, które transformuje się DNA zawierającym sklonowane geny, a także oocyty *Xenopus leavis*, do których wstrzykuje się DNA i śledzi produkty jego transkrypcji i translacji. Ostatnio coraz częściej transformuje się komórki zwierzęce hodowane *in vitro*. Można w tych doświadczeniach badać wpływ na ekspresję różnych czynników, np. hormonów. Bardzo istotna jest możliwość modyfikowania genu *in vitro* przed wprowadzeniem go do komórki w celu sprawdzenia jak określone modyfikacje odbijają się na jego ekspresji. Chociaż ekspresja tak wprowadzonych genów często wyraźnie różni się od ekspresji obserwowanej

w warunkach naturalnych, niewątpliwie techniki te pozwolą wyjaśnić wiele szczegółów mechanizmów regulacyjnych na poziomie molekularnym.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW W ROZWOJU

Problemem, który najbardziej intryguje i chyba przez dłuższy czas będzie intrygował biologów molekularnych, jest ekspresja genów specyficzna dla danego stadium rozwojowego, dla danego typu komórek.

Omawialiśmy powyżej różne mechanizmy regulujące ekspresję genów, z których każdy może mieć znaczenie przy uaktywnianiu bądź wyłączaniu określonych genów w poszczególnych stadiach rozwojowych. Jeszcze kilka lat temu były one nieznanne. Jest rzeczą oczywistą, że w procesie rozwoju i różnicowania wydarzenia następują w określonej kolejności. Chromatyna każdej komórki ma swoją historię, na którą mogą się składać przegrupowania materiału genetycznego lub jego modyfikacje, na przykład metylacja lub demetylacja cytozyn. Chociaż można już często powiedzieć, na czym polega różnica w strukturze DNA lub chromatyny danego genu w stanie aktywnym i nieaktywnym, trudno jest wskazać przyczynę wystąpienia określonych zmian, tzn. stwierdzić kiedy i pod wpływem jakich czynników te zmiany następowały, np. co spowodowało, że przegrupowanie segmentów jakiegoś chromosomu nastąpiło w jednej tkance, a nie nastąpiło w innej. Herskowitz i jego współpracownicy, autorzy kaskadowego modelu zmiany typu konjugacyjnego u drożdży sugerują, że w tego typu regulacji (o ile ma ona ogólniejsze znaczenie) każda wprowadzona w miejsce ekspresji kasetka określa jednocześnie, jaki typ następnej kasety ma być wprowadzony na jej miejsce. Uogólniając to można powiedzieć, że każda zmiana w genotypie komórki w czasie różnicowania wyznacza następne możliwe typy zmian [12].

Dość powszechne jest przekonanie, że istnieje hierarchiczność genów, tzn. są geny o zasadniczym znaczeniu dla regulacji, które determinują reakcje komórki na bodźce zewnętrzne i które z kolei regulują ekspresję innych genów, przez co komórka może przechodzić w inny stan rozwojowy i być wrażliwa na inne sygnały zewnętrzne, a także sama takie sygnały wysyłać.

Trzeba tu dodać, że omawialiśmy w zasadzie tylko mechanizmy regulujące transkrypcję, a trzeba pamiętać o istnieniu regulacji posttranskrypcyjnej (obróbka mRNA) i posttranslacyjnej (modyfikacje syntetyzowanych białek). Dopiero one wszystkie razem określają stan fizjologiczny komórki, a ten rzutuje znowu na ekspresję genów — mamy tu do czynienia ze sprzężeniem zwrotnym.

Nie można w tej chwili zaproponować modelu tłumaczącego regulację ekspresji genów u organizmów eukariotycznych, mającego ten sam stopień ogólności, co model operonu u prokariotów. Być może, że takiego modelu w ogóle nie będzie można opracować ze względu na bardzo szeroki wachlarz mechanizmów regulacyjnych.

LITERATURA

- [1] Banerjee A. K. — 5' Terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 44: 175-205, 1980.
- [2] Barkley M. D., Bourgeois S. — *The lac operon*. W: *Regulatory biology*. J. Copeland, G. A. Marzluf (red.), Ohio State University Press, Columbus, str. 67-127, 1977.
- [3] Beckwith J., Zisper D. — *The lactose operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1970.
- [4] Borst P., Cross G. A. M. — *Molecular basis for trypanosome antigenic variation*. *Cell* 29: 291-303, 1982.
- [5] Breathnach R., Chambon P. — *Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins*. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349-383, 1981.
- [6] Cashel M. — *Pleitropic regulatory effects of ppGpp in bacteria*. W: *Regulatory Biology*. J. Copland, G. A. Marzluf (red.), Ohio State University Press, Columbus, 1977.
- [7] Darnell J. E. — *Variety in the level of gene control in eukaryotic cells*. *Nature* 297: 365-371, 1982.
- [8] Davidson E. H., Jacobs H. T., Britten R. J. — *Very short repeats and coordinate induction of genes*. *Nature* 301: 468-470, 1983.
- [9] Donhue T. F., Daves R. S., Lucchini G., Fink G. R. — *A short nucleotide sequence required for regulation of his4 gene by the general control system in yeast*. *Cell* 32: 89-98, 1983.
- [10] Early P., Huang H., Calune K., Hood L. — *An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H*. *Cell* 19: 981-992, 1980.
- [11] Giles N. H. — *The organization, function, and evolution of gene clusters in eukaryotes*. *Amer. Naturalist* 112: 641-657, 1978.
- [12] Herskowitz J., Blair L., Forbes D., Hicks J., Kassir Y., Kushnev P., Rine J., Sprague G., Strathern J. — *Control of cell type in the yeast Saccharomyces cerevisiae and a hypothesis for development in higher eukaryotes*. W: *Molecular genetics of development*. T. Leighton, W. F. Loomis (red.), Academic Press, New York, 1980.
- [13] Hinnebusch A. G., Fink G. R. — *Positive regulation in the general amino acid control of Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5374-5378, 1983.
- [14] Hozumi N., Tonegawa S. — *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin gene coding for variable and constant regions*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 3628-3632, 1976.
- [15] Little J. W., Mount D. W. — *The SOS regulatory system of E coli*. *Cell* 29: 11-22, 1982.
- [16] Marzluf G. A. — *Regulation of gene expression in fungi*. W: *Regulatory biology*. J. Copeland, G. A. Marzluf (red.), Ohio State University Press, Columbus, 1977.
- [17] Metzzenberg R. L., Gleason M. K., Littlewood B. S. — *Genetic control of alkaline phosphatase synthesis in Neurospora: The use of partial diploids in dominance studies*. *Genetics* 77: 25-43, 1974.
- [18] Nasmyth K. A. — *Molecular genetics of yeast mating type*. *Ann. Rev. Genet.* 16: 439-500, 1982.
- [19] O'Malley B. W., Schrader W. T. — *The receptors of steroid hormones*. *Sci. Amer.* 234: 32-43, 1976.
- [20] Paszewski A. — *Immunoglobuliny — zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem*. *Post. Biochem.* 28: 175-190, 1982.
- [21] Patel V. B., Schweitzer M., Dykstra C. C., Kushnev S. R., Giles N. H. — *Genetic organization and transcriptional regulation in the qa gene cluster of Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5783-5787, 1981.
- [22] Pateman J. A., Kinghorn J. R. — *Genetic regulation of nitrogen metabolism*. W: *Genetics and Physiology of Aspergillus*. J. E. Smith, J. A. Pateman (red.), Academic Press, London, 1977.

- [23] Platt T. — *Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of E. coli.* Cell 24: 10-23, 1981.
- [24] Sakano H., Maki R., Kurosawa Y., Roeder W., Tenegawa S. — *Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes.* Nature 286: 676-683, 1980.
- [25] Simon M., Zieg J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R. — *Phase variation: evolution of a controlling element.* Science 209: 1370-1374, 1980.
- [26] Stumph W. E., Beaz M., Lawson G. M., Tsai M.-J., O'Malley B. W. — *Chromatin structure of the ovoalbumin gene domain.* W: *Gene regulation.* B. W. O'Malley (red.), Academic Press, New York, 1982.
- [27] Yanofsky C. — *Attenuation in the control of expression of bacterial operons.* Nature 289: 751-758, 1981.

EWA BARTNIK

Zakład Genetyki

Uniwersytet Warszawski

ONKOGENY

Komórki nowotworowe różnią się od normalnych licznymi właściwościami morfologicznymi i biochemicznymi, najważniejszą jednak różnicą jest szybki i niezależny od jakiegokolwiek kontroli ich wzrost i podział. Komórki w niektórych rodzajach nowotworów są zdolne do wędrowania przez układ limfatyczny i tworzenia kolejnych nowotworów w innych miejscach. Takie nowotwory, zwane złośliwymi, są na ogół letalne. Rak powoduje około 20% wszystkich zgonów i jest drugą najważniejszą przyczyną śmierci człowieka po chorobach układu krążenia. Lekarze zajmują się rakiem od bardzo dawna. Zagadnienie to interesuje także biologów, ponieważ zrozumienie powodu drastycznych zaburzeń normalnego wzrostu i podziałów komórek może wyjaśnić, w jaki sposób te procesy są normalnie regulowane.

Do niedawna istniały dwie teorie powstawania nowotworów: wirusowa i karcynogenów. Pierwsza zakładała, że nowotwory wywołują wirusy, druga zaś, że powstawanie raka indukują różne czynniki fizyczne i chemiczne.

Wykryto bardzo wiele różnych wirusów, które wywołują nowotwory u zwierząt doświadczalnych, choć nie są znane tego typu wirusy u człowieka. Wirusy nowotworowe mogą mieć jako swój materiał genetyczny DNA (np. SV40, polyoma) lub RNA. Wirusy zbudowane z RNA zwane są retrowirusami, ponieważ w swoim cyklu życiowym ich materiał genetyczny musi być przepisany na DNA, co jest odwrotnym kierunkiem przepływu informacji od normalnie spotykanego w komórce (DNA → RNA → białko). Pierwszy, wykryty na początku tego wieku wirus nowotworowy, który wywołuje mięsaka u ptaków (wirus mięsaka Rousa) jest właśnie retrowirusem.

W latach sześćdziesiątych naszego wieku wykazano, że wirusy nowotworowe są zdolne do wywoływania, tzw. transformacji nowotworowej komórek hodowanych poza organizmem, w hodowlach tkankowych. Normalne komórki hodowane na podłożu stałym przestają się dzielić po wytworzeniu warstwy o grubości jednej komórki; zjawisko to nazywa się inhibicją kontaktową. Komórki nowotworowe nie są wrażliwe na inhibicję kontaktową i dzielą się dalej, tworząc wiele warstw komórek. Jeśli jedna komórka, wśród

wielu normalnych, ulegnie przekształceniu w komórkę nowotworową stworzy ona tzw. ognisko, które łatwo zauważyć; tego typu ogniska zaobserwowano w hodowlach tkankowych po infekcji różnymi wirusami nowotworowymi. Komórki wyizolowane z tych ognisk są zdolne do wywoływania raka po wprowadzeniu do odpowiednich zwierząt doświadczalnych.

Stosując transformację komórek w hodowlach tkankowych ustalono, które części wirusów są odpowiedzialne za zmiany wzrostu komórek. Stwierdzono, że wirusy powodujące transformację mają jeden lub czasem dwa geny, niezbędne do zajścia tego procesu. Geny te nazwano onkogenami; obecnie znanych jest około 20 różnych onkogenów. Geny homologiczne do onkogenów wirusowych, tzw. protoonkogeny, znajduje się w komórkach normalnych i geny te są silnie konserwowane w procesie ewolucji, występują np. u wszystkich kręgowców, niektóre także u bezkręgowców, a nawet u drożdży. Obecność odpowiedników onkogenów w normalnych komórkach i fakt że ulegają niewielkim zmianom w procesie ewolucji sugeruje, że pełnią one istotną funkcję w życiu komórki.

W czasie gdy przeprowadzano badania nad wirusami nowotworowymi, badano także jakie czynniki fizyczne i chemiczne warunkują powstawanie nowotworów i stwierdzono, że wszystkie karcynogeny mogą oddziaływać z materiałem genetycznym i powodować powstawanie mutacji. Komórki zawierają jednak tysiące genów i nie było jasne, w których zachodzą mutacje powodujące powstawanie raka.

W ciągu ostatnich trzech lat wyniki badań nad wirusami oraz nowotworami nie wywoływanymi przez wirusy zaczęły się uzupełniać i doprowadziły do przynajmniej częściowego zrozumienia mechanizmów powstawania nowotworów. Niestety jeszcze w tej chwili nie jest jasne, jak można wykorzystać tę wiedzę do leczenia raka.

Kluczowym odkryciem było stwierdzenie, że jest możliwa transformacja nowotworowa komórek w hodowlach tkankowych przez DNA izolowany z ludzkiego raka pęcherza moczowego. Połączenie tej techniki z metodami inżynierii genetycznej pozwoliło na wyizolowanie genu odpowiedzialnego za transformację nowotworową. Wyizolowano także odpowiedni protoonkogen z normalnych komórek ludzkich i stwierdzono, że różnica między tymi dwoma genami sprowadza się do zmiany jednego nukleotydu, co powoduje zmianę dwunastego aminokwasu w kodowanym przez protoonkogen białku z glicyny na walinę.

Stwierdzono także, że gen odpowiedzialny za transformację nowotworową, wyizolowany z komórek raka pęcherza jest bardzo podobny do onkogenu *ras* z wirusa mięsaka szczura. W tym momencie stało się jasne, że ten sam gen związany jest z powstawaniem raka w wyniku działania wirusa oraz czynnika powodującego mutacje. Podobne wyniki uzyskano dla innych onkogenów — stwierdzono obecność odpowiedników wirusowych onkogenów w różnych nowotworach. Wydaje się, że transformacja nowotworowa zachodzi w wyniku wniknięcia wirusa niosącego onkogen lub onkogeny do

komórki, lub też jest powodowana przez zmiany w protoonkogenach komórkowych. Te zmiany są dwóch rodzajów: albo zmieniona jest sekwencja nukleotydów w genie, co powoduje powstanie zmienionego białka, albo też sam gen nie zmienia się, ale jest wytwarzana większa ilość białka. Może to być wywołane przez amplifikację odcinka DNA niosącego protoonkogen, jego translokację do innego chromosomu, gdzie ulega aktywnej transkrypcji lub podłączenie do protoonkogeny promotora lub enhancera wirusowego.

Pozostały do rozwiązania jeszcze dwa problemy. Po pierwsze, dane epidemiologiczne świadczyły o tym, że rak nie powstaje w wyniku jednej mutacji, ale kilku, a dane o transformacji nowotworowej komórek w hodowli sugerowały, że do transformacji wystarcza obecność jednego onkogeny. Po drugie, nie było jasne, jaką funkcję pełnią w komórce protoonkogeny.

Pod koniec lat siedemdziesiątych stwierdzono, że onkogen *src* wirusa mięsaka Rousa oraz odpowiednie protoonkogeny komórkowe kodują kinazę białkową — enzym, który przyłącza grupę fosforanową do tyrozyny. Ponieważ kinazy mogą przez fosforylowanie szeregu białek komórkowych powodować wiele zmian równocześnie, wydawało się w tym momencie, że wystarczy stwierdzić co jest naturalnym substratem dla kinaz kodowanych przez *src* i odpowiednie protoonkogeny by zrozumieć mechanizm powstawania nowotworów. Dotychczas jednak tego substratu nie wykryto.

Udało się stwierdzić, jaką funkcję pełni kilka protoonkogenów. Jeden z onkogenów jest bardzo podobny do protoonkogeny kodującego czynnik uwalniany przez płytki krwi w momencie powstania zranienia. Czynnik łączy się z receptorem na powierzchni komórki, co stymuluje jej podziały. Można sobie wyobrazić, że nieco zmienione białko lub normalne białko produkowane w nadmiernej ilości mogłoby powodować niekontrolowany podział komórek. Inny onkogen podobny jest do protoonkogeny kodującego białko będące receptorem nabłonkowego czynnika wzrostowego. Czynnik wzrostowy, po połączeniu się z receptorem zlokalizowanym w błonie komórkowej, stymuluje podziały komórek nabłonka. Zmieniony receptor, który na przykład stymuluje podziały niezależnie od obecności czynnika wzrostowego mogłoby powodować niekontrolowany podział komórek nabłonka. Znane są funkcje jeszcze dwóch innych protoonkogenów — są one związane z regulacją cyklu komórkowego u drożdży.

Nie wszystkie produkty onkogenów i protoonkogenów są zlokalizowane w błonie, znane są także białka cytoplazmatyczne oraz jądrowe. W tej chwili wydaje się rozsądna hipoteza, że wszystkie onkogeny są związane z regulacją podziałów komórkowych, niektóre działają tylko w określonych tkankach, tak jak gen produkujący nabłonkowy receptor czy czynnik uwalniany przez płytki krwi, inne być może pełnią funkcje w podziałach wszystkich komórek. Podziały regulowane są przez współdziałanie wielu genów, których produkty są obecne w wielu miejscach w komórce. Prawdopodobnie pierwszym receptorem sygnału do podziału komórki są receptory błonowe. Wiele z nich ma aktywność kinaz białkowych. Po połączeniu z odpowiednim czynnikiem

wzrostowym receptor powoduje fosforylację jakiegoś białka, które bądź bezpośrednio, bądź pośrednio wpływa na transkrypcję kolejnych genów. Dotychczas nie ma wielu dowodów na prawdziwość tej hipotezy, ale np. czynnik uwalniany przez płytki krwi powoduje syntezę produktu protoonkogenu *myc*, jest to białko zlokalizowane w jądrze komórkowym mogące prawdopodobnie wpływać na transkrypcję kolejnych genów.

Wydaje się, że zaburzenie tego łańcucha oddziaływań pomiędzy receptorami błonowymi i jądrem komórkowym może prowadzić do niekontrolowanych podziałów. Ostatnio stwierdzono, że obecność jednego onkogenu wystarcza do transformacji tzw. ustalonych linii komórkowych, natomiast do transformacji komórek, które od niedawna hodowane są poza organizmem potrzebna jest obecność dwóch onkogenów. Komórki wyizolowane z organizmu zdolne są do ograniczonej liczby podziałów (około 50), potem większość z nich ginie, a nieliczne, które przeżyją, są już nieśmiertelne — mogą w hodowli dzielić się dowolną ilość razy. Do transformacji takich komórek (ustalonych linii komórkowych) potrzebny jest jeden onkogen. Natomiast jeden z onkogenów potrzebnych do transformacji nowowyizolowanych komórek warunkuje ich nieśmiertelność i wydaje się, że produkty takich onkogenów są zlokalizowane w jądrze komórkowym, drugi onkogen powoduje zmiany w błonie komórkowej dające brak inhibicji kontaktowej, i produkt takiego onkogenu zlokalizowany jest w cytoplazmie. Wydaje się więc, że potrzebna jest więcej niż jedna zmiana w normalnej komórce, by zmieniła się ona w komórkę nowotworową.

Hipoteza, że rak wywołwany jest przez zmiany genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego nie jest jeszcze udowodniona, jednak wielu uczonych uważa, że wszystkie protoonkogeny okażą się być związane z regulacją cyklu komórkowego i że w najbliższych latach będzie wyjaśniony mechanizm działania wszystkich znanych onkogenów. Jest to pierwszy niezbędny krok do opracowania metod leczenia raka i zapobiegania*).

*) Warto jeszcze przeczytać: Bishop J. M. — *Oncogenes*. *Sci Amer.* 246 (3): 68-78, 1982; Weinberg R. A. — *A molecular basis of cancer*. 249 (5): 102-117, 1983; Robertson M. — *Clues to the genetic basis of cancer*. *New Scientist*, 9 June 1983: 688-691.

PIOTR POLACZEK

Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, Warszawa

REGULACJA SYNTEZY DNA PLAZMIDÓW

WSTĘP

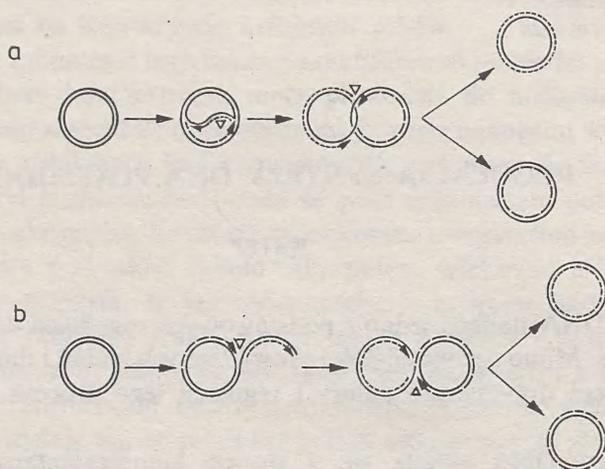
Synteza DNA stanowi jedno z podstawowych zagadnień dzisiejszej biologii molekularnej. Mimo ogromnej ilości prowadzonych badań i doniosłych odkryć, na wiele pytań dotyczących natury i regulacji tego procesu wciąż brak jest odpowiedzi.

Cząsteczka DNA składa się z dwóch komplementarnych łańcuchów polinukleotydowych, które skręcone wokół siebie tworzą regularną, podwójną spiralę. Poszczególne nukleotydy połączone są między sobą wiązaniami wodorowymi. Jeśli nici zostaną rozdzielone, to każda z nich może służyć jako matryca do syntezy identycznych kopii nowych łańcuchów DNA. Replikacja DNA jest procesem semikonserwatywnym. Każdy z nowo powstałych łańcuchów zawiera jedną nić rodzicielską.

Wyróżnia się dwa zasadnicze modele replikacji kolistych cząsteczek DNA (takie struktury tworzą m.in. plazmidy bakteryjne). Pierwszy z nich (rys. 1a) został zaobserwowany przez Cairnsa. Dwa rozdzielające się koła tworzą strukturę przypominającą literę theta. Na nici „wiodącej” (ang. leading strand) syntetyzowany jest nowy łańcuch w sposób ciągły, zawsze w kierunku $5' \rightarrow 3'$. Polimeraza DNA katalizuje reakcję dołączania kolejnych 5'-trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów do końca 3'-OH. Na nici „opóźnionej” (ang. lagging strand) synteza odbywa się w sposób nieciągły. Powstają krótkie odcinki komplementarne, łączone następnie przez enzym ligazę w jeden długi łańcuch. Drugi mechanizm (rys. 1b) przedstawia model obracającego się pierścienia (ang. rolling circle mode). Synteza rozpoczyna się od nacięcia nici „wiodącej” w ściśle określonym miejscu. Do końca 3' dobudowana zostaje nowa nić w sposób ciągły, natomiast drugi koniec zostaje przemieszczony i na nim przebiega synteza nieciągła. Zasadnicza różnica w obu typach replikacji polega na tym, że w modelu Cairnsa nowosyntetyzowane nici nie są związane kowalencyjnie z matrycą. W modelu obracającego się pierścienia synteza nowej nici rozpoczyna się od utworzenia wiązania kowalencyjnego z nicią rodzicielską, tworząc łańcuch DNA przekraczający długość pojedynczego genomu.

Obecnie wiele grup badawczych skupia swe zainteresowanie wokół za-

gadnień dotyczących regulacji procesu syntezy DNA oraz udziału i roli enzymów katalizujących poszczególne reakcje. Wszelkie manipulacje genetyczne podczas badania replikacji bakterii są z reguły letalne dla komórki. Plazmidy



Rys. 1. Replikacja kolistych cząsteczek DNA. a — model Cairnsa (theta), b — model obracającego się pierścienia. ▲ — końce 3' nowo syntetyzowanych nici DNA, ----- nić „wiodąca”, — nić „opóźniona”. ∇ — widelki replikacyjne

replikują się niezależnie od chromosomu bakteryjnego i nie są konieczne bakterii do życia. Z tego względu wykorzystuje się je jako systemy modelowe do badań na poziomie molekularnym. Regulację kontroli syntezy DNA przedstawię na najlepiej poznanym plazmidzie — ColE1.

PLAZMIDY

Idealnymi modelami do badania syntezy DNA są pozachromosomowe elementy genetyczne — plazmidy. Są to kolisty, dwuniciowe cząsteczki DNA występujące w komórkach bakteryjnych w jednej lub w wielu kopiach. Ilość kopii plazmidu stanowi jedno z kryteriów podziału na typy plazmidów. Istnieją plazmidy o ścisłej kontroli replikacji (ang. stringent control) oraz rozluźnionej (ang. relaxed control). Przypuszcza się, że plazmidy typu „ścisłego”, występujące w komórkach bakteryjnych w niewielkiej ilości kopii (od 1 do 3), są rozdzielane do komórek potomnych wraz z chromosomem. W przypadku plazmidów typu rozluźnionego mechanizm rozdziału może być zupełnie przypadkowy, a trwałe dziedziczenie warunkowałaby ich duża liczba kopii (od 10 do 100). Wśród plazmidów wyróżnia się tzw. grupy niezgodności (ang. incompatibility). Plazmidy z tej samej grupy nie mogą tworzyć trwałego układu w jednej komórce. Jeden z plazmidów będzie

zawsze eliminowany w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Plazmidy należące do różnych grup mogą współistnieć w jednej komórce.

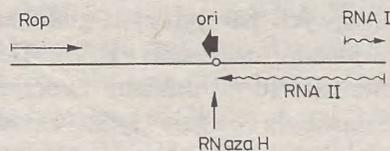
Regulacja syntezy DNA jest najlepiej poznana w przypadku plazmidu ColE1 i jego pochodnych, występujących w komórkach bakterii *Escherichia coli*.

REGULACJA SYNTEZY DNA PLAZMIDÓW TYPU COLE1

Plazmid ColE1 ma wielkość 4,2 megadaltonów i występuje w komórce bakteryjnej w 15 kopiach. Charakteryzuje się „rozluźnionym” typem kontroli replikacji, co wskazuje na niezależność syntezy DNA plazmidowego od DNA chromosomalnego. W komórkach rosnących w temperaturze 33°C czas replikacji plazmidu ColE1 wynosi około 2 minut [1].

Synteza DNA plazmidów typu ColE1 rozpoczyna się w ściśle określonym miejscu (ang. origin point) i przebiega jednokierunkowo. Replikację nowego łańcucha DNA poprzedza synteza starterowego RNA (ang. RNA primer). Jest to transkrypt długości 550 nukleotydów. Tworzy on hybryd z komplementarnym odcinkiem DNA, stanowiąc substrat dla RNazy H. Enzym ten odcina i usuwa fragment hybrydu tworząc starter. Brak aktywności RNazy H powoduje powstawanie dłuższych fragmentów hybrydowych, które nie mogą służyć jako startery. RNA starterowe syntetyzowane jest przy udziale polimerazy RNA. Bezpośrednio do niego dołączane są dezoksynukleotydy, a reakcję tę katalizuje polimeraza I DNA. Po zsyntetyzowaniu krótkiego odcinka nowego odcinka DNA rolę polimerazy I przejmuje polimeraza III DNA.

Badania japońskiego uczonego Tomizawy wykazały, że tworzenie stabilnego hybrydu starterowego RNA (RNAII) z DNA jest krytycznym etapem inicjacji replikacji plazmidu ColE1. Co więcej, okazało się, że reakcja ta regulowana jest przez krótki transkrypt RNA (108 nukleotydów), nazwany RNA I. Transkrypt ten jest syntetyzowany w tym samym regionie DNA, co RNA II, ale w przeciwnym kierunku. Synteza RNA I kończy się w okolicy rozpoczęcia syntezy RNA II (rys. 2).



Rys. 2. Schemat regionu regulacyjnego syntezy DNA plazmidów typu ColE1. Linie faliste przedstawiają transkrypty RNA I i RNA II. Rop — represor RNA starterowego (ang. repressor of primer), ori — miejsce inicjacji replikacji (ang. origin)

RNA I, jako negatywny element regulacji syntezy DNA plazmidowego jest inhibitorem formowania stabilnego hybrydu DNA-RNA II w rejonie origin. Brak powstawania takiej struktury jest równoznaczny z brakiem

substratu dla RNazy H i w konsekwencji zatrzymaniem syntezy DNA plazmidowego. Sposób, w jaki dochodzi do interakcji RNA I-RNA II nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony i jest przedmiotem wielu spekulacji.

Analiza sekwencji nukleotydów obu transkryptów wskazuje na możliwość tworzenia się drugorzędowych struktur typu „listka koniczyny”. Wykryto wiele mutantów punktowych, w których zmiana pojedynczych nukleotydów w sekwencji RNA I, prowadzących do zmiany struktury drugorzędowej tego transkryptu, powoduje znaczne zwiększenie liczby kopii plazmidu. RNA I w tym przypadku przestaje pełnić rolę aktywnego inhibitora. Należy jednak pamiętać, że RNA I i RNA II są syntetyzowane w przeciwnych kierunkach z komplementarnych nici tej samej cząsteczki DNA. Tym samym, każda mutacja w RNA I powoduje komplementarną mutację w RNA II. Stwarza to często trudności interpretacyjne: czy zwiększona synteza DNA plazmidowego jest efektem zmiany struktury negatywnego elementu, jakim jest RNA I, czy też spowodowana jest zmianą struktury RNA II.

W ciągu ostatnich kilku lat wyizolowano wiele mutantów plazmidowych o zwiększonej liczbie kopii. W większości mutacje te mapują się w obrębie niesparowanych pętli II i III (rys. 3). Badania tego typu prowadzono w różnych laboratoriach [2, 3], stosując różne metody selekcji. Zwraca uwagę fakt izolacji dość ograniczonej liczby rodzajów mutantów. Wiele z nich mapuje się dokładnie w tych samych miejscach. Przymuszczalnie liczba mutacji powodujących utratę kontroli replikacji jest ograniczona. Należy zwrócić uwagę, że niektóre mutacje mogą prowadzić do niekontrolowanej syntezy RNA I i całkowitego zatrzymania replikacji plazmidu. Podobny efekt mogą wywołać mutacje w obrębie samego promotora RNA I. Podjęte próby ze stosowaniem temperaturo-wrażliwych mutacji promotorowych [4] nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Skonstruowano mutanty o zwiększonej liczbie kopii, nie zaobserwowano jednak obniżenia syntezy RNA I. Przymusza się, że efekt zwiększenia liczby kopii spowodowany jest zmianą drugorzędowej struktury RNA II. Rolę drugorzędowej struktury RNA II w tworzeniu aktywnego startera replikacji wykazał Tomizawa w doświadczeniach *in vitro* [5]. Syntezując fragmenty RNA II wykorzystał on możliwość włączania inozyny, zasady będącej analogiem guaniny. Pary zasad cytozyna-inozyna są mniej stabilne od właściwych par cytozyna-guanina. Zgodnie z oczekiwaniami drugorzędowa struktura cząsteczki RNA II, zawierająca inozynę, była mało stabilna. Prowadziło to do inhibicji tworzenia aktywnego startera, nawet wtedy, gdy podstawieniu ulegały tylko zasady odległe od miejsca startu replikacji o około 400 nukleotydów (czyli w pobliżu miejsca rozpoczęcia transkrypcji RNA I).

Jak już wspomniałem, dwa plazmidy należące do tej samej grupy niezgodności nie mogą tworzyć trwałego układu w komórce, gdyż jeden z nich będzie eliminowany w trakcie podziału komórkowego. Okazało się, że mechanizm niezgodności polega na wzajemnych oddziaływaniach elementów regulacji syntezy DNA. Dwa plazmidy o odmiennych systemach regulacyjnych mogą

Wyniki tego rodzaju eksperymentów wykazały, że zmiany w strukturze drugorzędowej RNA I, w szczególności w obrębie niesparowanych zasad, wywołują zmiany aktywności inhibitora i jego oddziaływanie na własne oraz dzikie RNA starterowe. Efektem zwiększenia dawki genu RNA I (ang. gene dosage effect) jest obniżenie syntezy DNA plazmidu. Udowodniono to, konstruując plazmidy zawierające kilka kopii RNA I [6]. Wprowadzenie jednej, dodatkowej kopii powodowało zmniejszenie ilości plazmidu o połowę. Stanowiło to potwierdzenie badań prowadzonych *in vitro*.

Poza mutacjami w regionie RNA I-RNA II wykryto również mutanty delecyjne o podwyższonej liczbie kopii plazmidu. Stwierdzono, że usunięcie fragmentu genomu plazmidu zawierającego gen kodujący białko złożone z 63 aminokwasów, powoduje wzrost liczby kopii plazmidu. Białko to nazwano Rop (ang. repressor of primer). Sugerowano, że białko Rop moduluje syntezę prekursorów RNA starterowego, wpływając na liczbę kopii plazmidu. Jednak ostatnie badania wykazują, że białko to wzmaga inhibitorowy efekt RNA I, ułatwia tworzenie się hybrydu RNA I-RNA II i tym samym zapobiega tworzeniu się aktywnego startera replikacji [9]. Nazwę Rop zmieniono na Rom (ang. RNA one inhibition modulator). Tak więc, plazmidy typu ColE1 mają dwa, niezależnie syntezowane, negatywne elementy regulacji replikacji.

UWAGI KOŃCOWE

Regulacja kontroli syntezy DNA jest najprostsza i najlepiej poznana w układach plazmidowych. Plazmid ColE1 jest jedynym, w którym zidentyfikowano starterowe RNA (ang. primer RNA). Podstawowe elementy regulacji występujące w plazmidach typu ColE1 (transkrypty RNA) wykryto również w plazmidach należących do innych grup [7]. Na przykład plazmidy z grupy FII, do której należą R1, R6-5 czy R100 również syntetyzują krótki transkrypt typu RNA I (produkt genu *copA*), który hybryduje z mRNA genu kodującego białko RepA1. Białko to jest niezbędne do replikacji. Wytworzony hybryd zmienia drugorzędową strukturę mRNA, przez co uniemożliwiona jest jego translacja. System ten wykazuje pewne podobieństwa do regulacji plazmidów typu ColE1, choć negatywny element działa tu na poziomie translacji. Również w innych plazmidach wykazano rolę krótkich transkryptów RNA w regulacji syntezy DNA. W układach słabo poznanych nie wyklucza się możliwości znalezienia podobnych regulatorów.

Badania replikacji plazmidów dostarczają ogromnej ilości informacji o mechanizmach procesów regulacji syntezy DNA. W przyszłości może to ułatwić wyjaśnienie podobnych zagadnień w bardziej skomplikowanych układach. U bakterii *Escherichia coli* stwierdzono w badaniach *in vitro* istnienie dwóch miejsc, w których rozpoczyna się synteza transkryptów, pełniących prawdopodobnie rolę starterowego RNA [8]. Aktywności promotorów tych

transkryptów nie udało się potwierdzić *in vivo*. Rozważa się możliwość ewentualnego udziału tych transkryptów w regulacji syntezy DNA. Wykazano ich oporność na atak różnych typów RNaz, co wskazuje na przewagę struktur drugorzędowych. Badania wzajemnych oddziaływań takich struktur mogą doprowadzić do wyjaśnienia ich roli w regulacji syntezy DNA.

LITERATURA

- [1] Sherrat D. J., Helinski D. R. — *Replication of colicinogenic factor E1 in Escherichia coli. Properties of newly replicated supercoils.* Eur. J. Biochem. 37: 95-99, 1973.
- [2] Lacatena R. M., Cesareni G. — *The infraction between RNA I and the primer precursor in the regulation of ColE1 replication.* J. Molec. Biol. 170: 635-650, 1983.
- [3] Tomizawa J., Itoh T. — *Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6096-6100, 1981.
- [4] Wong E. M., Muesing M. A., Polisky B. — *Temperature-sensitive copy number mutants of ColE1 are located in an untranslated region of the plasmid gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3570-3574, 1982.
- [5] Tomizawa J., Itoh T. — *The importance of RNA secondary structure in ColE1 primer formation.* Cell 31: 575-583, 1982.
- [6] Moser D. R., Campbell J. L. — *Characterisation of a trans-complementable pMB1 copy number mutant: effect of RNA I gene dosage on plasmid copy number and incompatibility.* J. Bacteriol. 154: 809-818, 1983.
- [7] Scott J. R. — *Regulation of plasmid replication.* Microbiol. Rev. 1: 1-23, 1984.
- [8] Lothar H., Messer W. — *Promoters in the E. coli replication origin.* Nature 294: 376-378, 1981.
- [9] Tomizawa J., Som T. — *Control of ColE1 plasmid replication: Enhancement of binding of RNA I to primer transcript by the Rom protein.* Cell 38: 871-878, 1984.

WITOLD JACHYMCZYK

Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, Warszawa

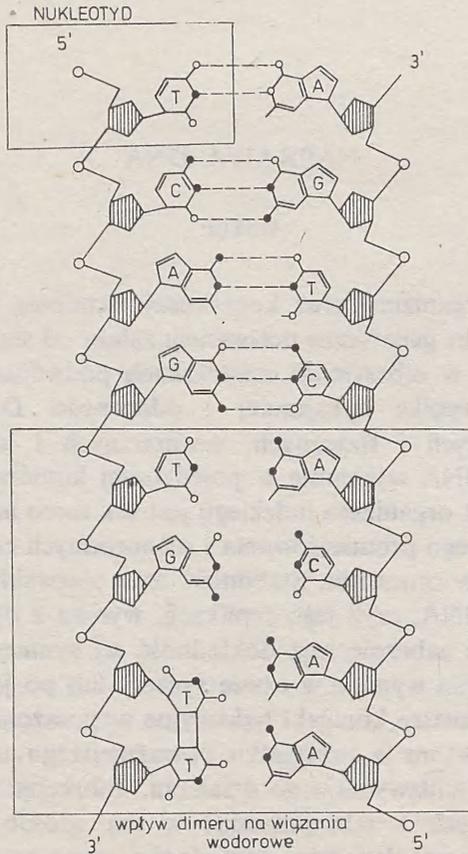
NAPRAWA DNA

WSTĘP

Życie każdego organizmu oraz kontynuacja istnienia organizmów przekazujących swoje cechy genetyczne potomstwu zależy od stabilności informacji genetycznej zawartej w olbrzymich cząsteczkach podwójnego heliksu DNA. Stabilność ta nie wynika bynajmniej z odporności DNA na działanie czynników chemicznych i fizycznych, zewnętrznych i wewnętrznych. Bez względu na to czy DNA występuje w pojedynczej komórce bakterii czy też w milionach komórek organizmu ludzkiego jest tak samo narażony i wrażliwy na działanie szkodliwego promieniowania i różnorodnych czynników chemicznych występujących w otoczeniu. Stabilność oraz niezwykła precyzja syntezy nowych cząsteczek DNA, czyli jego replikacji, wynika z obecności specyficznych enzymów które zabezpieczają dokładność tej syntezy oraz nieustannie naprawiają uszkodzenia wynikłe w czasie syntezy lub po jej zakończeniu [1]. Ponadto nawet najprostsze komórki bakteryjne wyposażone są w dodatkowe systemy naprawcze, które w przypadku poważniejszego uszkodzenia DNA, przygotowane są do nadzwyczajnego działania, indukując gwałtowny wzrost enzymów reperacyjnych i zabezpieczając w ten sposób szansę przeżycia organizmu, często nawet kosztem dokładności naprawy łańcuchów DNA [2, 3].

Podatność DNA na uszkodzenia jak również zdolność do reparacji własnych cząsteczek wynikają ze specyficznej budowy DNA. Cząsteczki DNA zbudowane są z dwóch bardzo długich łańcuchów połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi i wzajemnie skręconych w strukturę podwójnego heliksu. Każdy łańcuch ma szkielet, zbudowany z cząsteczek cukru — dezozybozy — połączonych ze sobą wiązaniami estrowymi poprzez reszty kwasu fosforowego. Do cząsteczek dezozybozy dołączone są wiązaniami N-glikozydowymi zasady purynowe i pirymidynowe, prostopadle do osi szkieletu. Zasady te, dzięki obecności wolnych grup aminowych i ketonowych tworzą ze sobą wiązania wodorowe, dzięki którym utrzymuje się struktura podwójnego heliksu. W strukturze dwuniciowej zasady znajdują się wewnątrz cząsteczki, a jako związki aromatyczne o płaskiej budowie mogą ściśle do siebie przylegać. Zasady połączone z cząsteczkami cukru i kwasu fosforowego

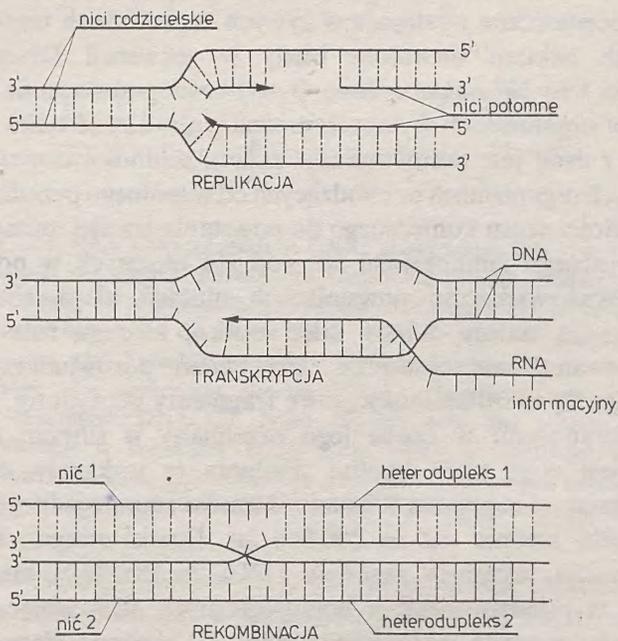
noszą nazwę nukleotydów i są cegiełkami budulcowymi DNA. W DNA występują cztery rodzaje zasad: dwie zasady purynowe — adenina (A) i guanina (G), oraz dwie zasady pirymidynowe — cytozyna (C) i tymina (T). Wiązania wodorowe, dzięki odpowiedniemu ułożeniu grup aminowych i keto-



Rys. 1. Budowa cząsteczki DNA. Cząsteczka DNA składa się z dwóch łańcuchów nukleotydowych zbudowanych z cząsteczek cukru dezoksyrybozy (pierścienie zakreskowane), reszt kwasu fosforowego (kółka) i czterech zasad: purynowych adeniny (A) i guaniny (G) oraz pirymidynowych tyminy (T) i cytozyny (C). Cukry i reszty kwasu fosforowego znajdują się na zewnątrz cząsteczki (szkielet) a zasady wewnątrz cząsteczki. Oba łańcuchy połączone są wiązaniami wodorowymi między komplementarnymi parami zasad (linie przerywane). Informacja genetyczna jest zakodowana w sekwencji zasad wzdłuż pojedynczego łańcucha. Łańcuchy są zorientowane w stosunku do siebie w przeciwnych kierunkach. Kolejność zasad odczytuje się od końca 5' do 3'. Rysunek przedstawia łańcuchy ułożone w płaszczyźnie, w rzeczywistości cząsteczka DNA zwinięta jest w podwójny heliks w którym zasady ułożone są w płaszczyźnie prostopadłej do osi heliksu. Na dole rysunku zaznaczono dimer pirymidynowy powstający pod wpływem światła ultrafioletowego. Podwójne wiązania między atomami 5 i 6 sąsiadujących pierścieni pirymidynowych ulegają zerwaniu tworząc pierścień cyklobutanowy, który łącząc zasady powoduje zerwanie wiązań wodorowych z komplementarnymi zasadami drugiego łańcucha. Szkielet fosfocukrowy zmienia kształt tak, że wiązania wodorowe zasad sąsiadujących z dimerem także ulegają zerwaniu

nowych, mogą powstawać tylko w sposób ściśle określony (komplementarny): A tworzy wiązania wodorowe tylko z T a G z C, co powoduje, że puryny łączą się tylko z pirymidynami, a więc naprzeciwko cząsteczki zasady o większej objętości znajduje się mniejsza, a dwuniciowa cząsteczka DNA na całej długości zachowuje tę samą średnicę równą 20 Å, przy czym obie nici DNA są zorientowane w przeciwnych kierunkach. Wynika stąd komplementarna zależność między sekwencjami zasad na całej długości obydwu splecionych łańcuchów: jeśli na przykład w jednym występuje sekwencja ACTGA, to drugi musi mieć sekwencję TCAGT i być skierowany w stosunku do pierwszego w przeciwnym kierunku (rys. 1).

Komplementarność zasad jest podstawą replikacji DNA, jego ekspresji w postaci RNA i białek oraz rekombinacji genetycznej. W czasie replikacji każda nić służy jako matryca, na której powstaje nić pochodna. W ekspresji



Rys. 2. Podstawowe funkcje DNA — replikacja, transkrypcja i rekombinacja genetyczna. W replikacji i transkrypcji dzięki prawidłowemu parowaniu zasad zachodzi dokładne kopiowanie dwóch łańcuchów potomnych DNA lub jednego łańcucha RNA informacyjnego. W procesie rekombinacji parowanie zasad zapewnia dokładne wzajemne ułożenie homologicznych łańcuchów DNA względem siebie

informacja genetyczna zakodowana w sekwencji zasad pojedynczej nici każdego genu jest przekazywana komplementarnej sekwencji łańcucha RNA i następnie odczytywana w formie kolejności dołączania poszczególnych aminokwasów do białek, przy czym każdy trójzasadowy „kodon” określa jeden z aminokwasów

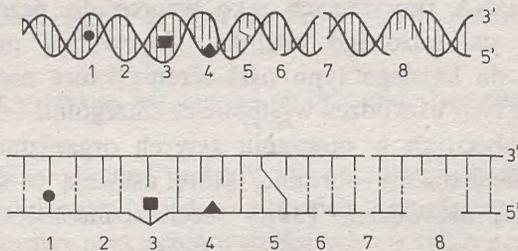
składających się na łańcuch peptydowy białka. Podczas genetycznej rekombinacji łańcuchy DNA ulegają przecięciu i regiony homologiczne łączą się ze sobą, dając w efekcie nowe kombinacje genów [4, 5] (rys. 2). Włączenie więc w łańcuch niewłaściwej lub uszkodzonej zasady, bądź też pojawienie się w nim uszkodzenia powodującego zmianę struktury podwójnego heliksu, niewłaściwe parowanie zasad lub zmianę fazy odczytu będzie miało wpływ na wszystkie te trzy funkcje DNA i może być przyczyną śmierci komórki lub, w organizmach wielokomórkowych, może inicjować procesy prowadzące do powstawania raka [1, 3, 6].

SEKWENCJE ZASAD W CZĄSTECZKACH DNA UTRZYMYWANE SĄ W ORGANIZMACH Z DOKŁADNOŚCIĄ WPROST NIEZWYKŁĄ

Mutacje spontaniczne występują w żywych organizmach niezwykle rzadko. W komórkach bakterii utrwalone błędy w sekwencji DNA trafiają się średnio w ilości 1 na 10^9 nukleotydów. O szybkości powstawania zmian w sekwencji DNA w organizmach wyższych można wnioskować tylko w sposób pośredni. Jedną z dróg jest porównywanie składu aminokwasowego wybranego białka w różnych organizmach pochodzących od wspólnego przodka, co pozwala na wyliczenie ilości czasu koniecznego do powstania trwałej mutacji polegającej na wymianie jednego aminokwasu spośród stu obecnych w porównywanym białku. Ponieważ większość powstających mutacji ulega eliminacji przez naturalną selekcję, należy dobrać takie białko, którego rola w procesach życiowych jest możliwie niewielka. Do badań porównawczych wybrano fibrynopeptydy. Są to 20-aminokwasowe fragmenty peptydowe, które ulegają wycięciu z fibrynogenu w czasie jego przemiany w fibrynę i rozkładowi. Ich funkcja jest więc mało istotna. Badania te wykazały, że w średniej wielkości białku zbudowanym z 400 aminokwasów zmiana jednego aminokwasu na inny zachodzi średnio raz na 200 000 lat. Dzięki osiągnięciom ostatnich lat w poznawaniu sekwencji zasad w DNA można było także porównać podobieństwa w składzie zasad w homologicznych, niekodujących regionach genomów wielu różnych gatunków ssaków. Uzyskane dane potwierdziły wyniki uzyskane wcześniej przy badaniu fibrynopeptydów. Biorąc pod uwagę czas życia jednej generacji wydaje się, że błędy w sekwencji DNA organizmów wyższych występują równie rzadko jak w DNA bakteryjnym. Systemy reperacji DNA wykształciły się więc bardzo wcześnie w procesie ewolucyjnym, a główne drogi naprawy DNA są niezwykle podobne do siebie zarówno w komórkach *Escherichia coli* jak i w komórkach ssaków nie wyłączając człowieka. Wydaje się również, że ten sam rodzaj enzymów naprawczych, który wyewoluował w prymitywnych organizmach w celu ich ochrony przed mutacjami i śmiercią, znajduje zastosowanie w zapobieganiu zjawiskom specyficznym tylko dla organizmów złożonych, jak przemiana komórek normalnych w nowotworowe.

DNA POZBAWIONY MECHANIZMÓW SAMONAPRAWY ULEGĄBY PRZEKSZTAŁCENIOM Z OGROMNĄ SZYBKOŚCIĄ

Cząsteczki DNA nawet nie mające kontaktu ze szkodliwym wpływem otoczenia, bardzo szybko ulegają spontanicznej hydrolizie w reakcjach z cząsteczkami wody, czemu sprzyjają fluktuacje termiczne [5, 6]. Wiadomo na przykład, że w każdej komórce ludzkiej DNA traci co najmniej 5 000 zasad purynowych lub pirymidynowych w ciągu doby. Drugim powodem powstawania podobnej liczby uszkodzeń w DNA jest niespecyficzna metylacja zasad przez zawsze obecną w komórce S-adenozylometioninę, która może metylować zasady w DNA bez udziału enzymów [7, 8]. Kolejną przyczyną



Rys. 3. Przykłady uszkodzeń występujących w DNA. Uszkodzenia DNA są różnego rodzaju. Zasada może zmienić lub utracić zdolność do tworzenia wiązań wodorowych na skutek alkilowania, hydroksylacji lub w wyniku innych reakcji chemicznych (1). Może ulec wypadnięciu z DNA (2). Może dołączyć się do niej związek o dużej objętości powodując miejscowe wybrzuszenie łańcucha (3). Sąsiadujące zasady pirymidynowe mogą utworzyć dimer (4). Dwa łańcuchy mogą ulec połączeniu poprzez związek chemiczny reagujący jednocześnie z zasadami obu łańcuchów DNA (5). Jedna (6) lub obie nici jednocześnie (7) mogą ulec zerwaniu. Wreszcie w cząsteczce DNA może brakować dłuższego segmentu jednej z nici (8). Uszkodzenia te bądź uniemożliwiają prawidłowe parowanie zasad w podwójnym heliksie, bądź uniemożliwiają rozłączenie się nici, bądź też przerywają ich ciągłość

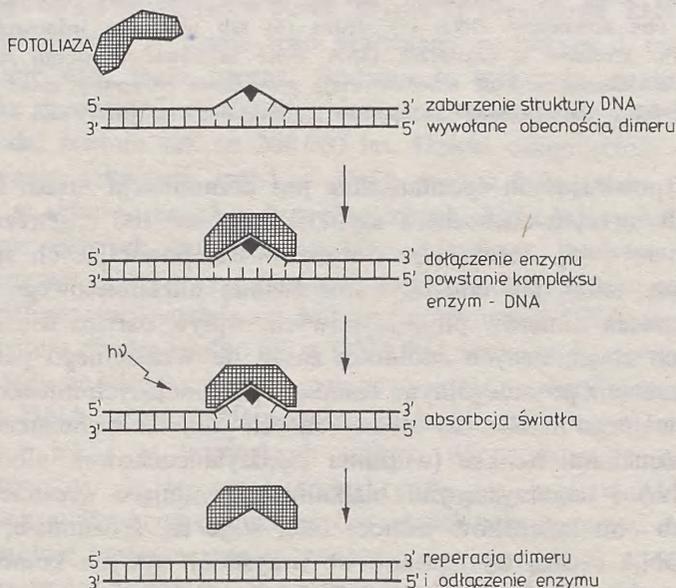
uszkodzeń powstających spontanicznie jest dezaminacja zasad. Dezaminacja cytozyny do uracylu zachodzi z szybkością około 100 cząsteczek na jeden genom na dobę [6]. Jeżeli więc do uszkodzeń powstających spontanicznie dojdą jeszcze takie, jak oddziaływanie światła ultrafioletowego prowadzące do powstawania dimerów pirymidynowych, wpływ bardzo wielu czynników chemicznych zmieniających zdolności zasad do wzajemnego parowania lub przez połączenia z poszczególnymi zasadami powodujących miejscowe wybrzuszenia podwójnego heliksu czy też tworzących połączenia chemiczne pomiędzy dwoma łańcuchami heliksu (wiązania międzyłańcuchowe), albo połączenia między DNA i towarzyszącymi białkami, powodujące wreszcie przerwanie jednego lub obu łańcuchów jednocześnie, staje się zrozumiałe, że systemy naprawy DNA muszą występować we wszystkich żywych komórkach. Najbardziej typowe rodzaje uszkodzeń występujące w cząsteczce DNA przedstawione są na rysunku 3.

MECHANIZMY NAPRAWY DNA

Spośród wielu dotychczas poznanych mechanizmów naprawy DNA, mechanizm wycinania uszkodzonych elementów ze struktury DNA jest mechanizmem najważniejszym, o najbardziej ogólnym znaczeniu dla życia komórki. Występuje on powszechnie, zarówno w organizmach najprostszych, jak bakterie a nawet niektóre wirusy, jak i w najbardziej złożonych, łącznie z organizmem człowieka. Wycinaniu mogą ulegać bądź same zasady, bądź krótkie odcinki DNA obejmujące nie tylko uszkodzone miejsca lecz i sąsiadujące nieuszkodzone nukleotydy. Mechanizm ten, a właściwie mechanizmy charakteryzują się dużym stopniem skomplikowania i wymagają oprócz obecności specyficznych enzymów także obecności komplementarnych, nieuszkodzonych nici DNA potrzebnych jako wzorce do przeprowadzenia bezbłędnej naprawy uszkodzonego odcinka. Zapewniają natomiast zdolność dostosowania się do każdego typu uszkodzenia które mogłyby pojawić się w DNA. Niektóre typy uszkodzeń występujące szczególnie często, pod wpływem czynników stale obecnych w otoczeniu żywych organizmów są reperowane przez specjalne mechanizmy obronne, które usuwają w sposób specyficzny tylko jeden rodzaj uszkodzeń. Takim mechanizmem jest fotoreaktywacja.

FOTOREAKTYWACJA — REPERACJA NIE WYMAGAJĄCA OBECNOŚCI KOMPLEMENTARNEJ NICI DNA

Fotoreaktywacja jest procesem enzymatycznym powodującym rozczepienie dimerów pirymidynowych powstających w DNA pod działaniem promieni ultrafioletowych obecnych np. w świetle słonecznym [9, 10]. Proces ten



Rys. 4. Schemat procesu fotoreaktywacji dimerów pirymidynowych

został stwierdzony w komórkach bakterii, glonów, roślin wyższych, zwierząt oraz w komórkach leukocytów ludzkich. Mechanizm fotoreaktywacji przedstawiony jest na rysunku 4.

W pierwszym etapie naprawy enzym fotoreaktywujący (fotoliaza) dołącza się do DNA w miejscu występowania dimeru, rozpoznając zmianę struktury DNA spowodowaną jego obecnością. Następnie absorbuje kwant światła widzialnego o długości fali 300-400 nm, wykorzystując jego energię do rozczepiania cyklobutanowego pierścienia łączącego dwie zasady pirymidynowe. Następuje odtworzenie pierwotnej struktury DNA i oddysocjowanie enzymu.

Fotoliaza została wydzielona w stanie czystym z komórek *Escherichia coli* i z leukocytów ludzkich. Działa specyficznie tylko na DNA, nie reagując zupełnie z RNA mimo jego podobieństwa strukturalnego i podobnej częstotliwości powstawania w nim dimerów pirymidynowych [5].

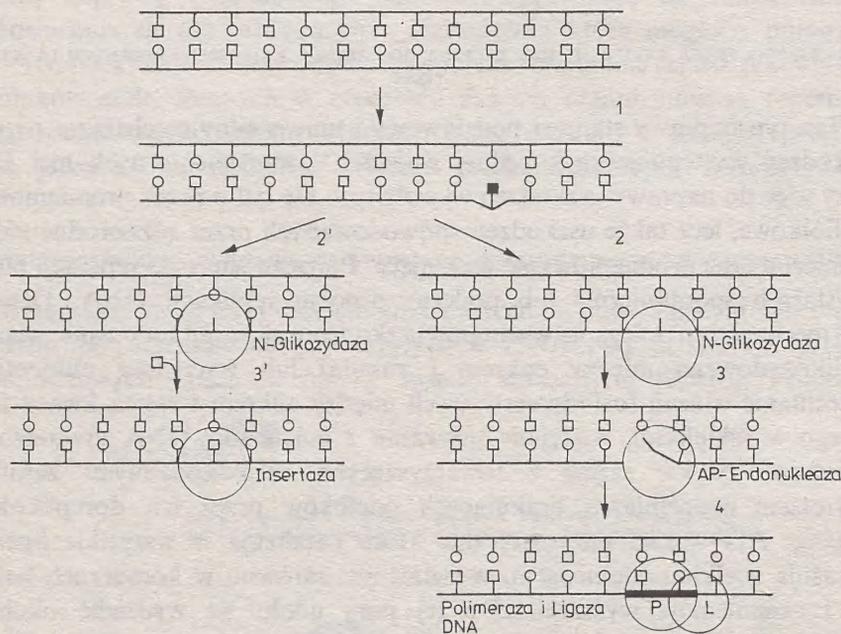
NAPRAWA DNA PRZEZ WYCINANIE JEST ZALEŻNA OD OBECNOŚCI KOMPLEMENTARNYCH ŁAŃCUCHÓW DNA

Ten typ naprawy stanowi podstawowy i uniwersalny mechanizm naprawy uszkodzeń występujących w jednej z dwóch komplementarnych nici DNA. Służy więc do naprawy uszkodzeń wywołanych nie tylko przez promieniowanie nadfioletowe, lecz także uszkodzeń spowodowanych przez różnorodne związki chemiczne oraz promieniowanie jonizujące. Ponadto służy do reperacji błędów powstałych spontanicznie lub podczas procesu replikacji DNA. Działanie tego mechanizmu polega na wycinaniu uszkodzonych zasad (odcinanie wiązania N-glikozydowego między cukrem i zasadą) lub wycinaniu nukleotydów (przecinanie wiązań fosfodwuestrowych między cukrem i resztą kwasu fosforowego w szkielecie), następnie usuwaniu z łańcuchów DNA uszkodzonych odcinków, zwykle razem z towarzyszącymi nieuszkodzonymi zasadami, a wreszcie uzupełnianiu brakujących odcinków przez ich doreplikowanie i ligację. Aktywności enzymatyczne, które katalizują te wszystkie operacje, wykazują wielkie podobieństwo w działaniu, zarówno w komórkach bakterii jak i organizmów wyższych. Do tej pory udało się wydzielić około 15 enzymów zaangażowanych bezpośrednio w ten typ naprawy DNA [7]. Bez wątpienia stanowi to zaledwie część enzymów uczestniczących w procesie naprawy nie licząc białek wspomagających. O liczbie białek zaangażowanych w procesy naprawy może świadczyć liczba nieallelicznych mutantów wykazujących zaburzenia w naprawie DNA. Na przykład u drożdży, a więc w stosunkowo prostym organizmie eukariotycznym jest ich około stu.

Naprawa DNA przez wycinanie uszkodzonych zasad

Ten rodzaj naprawy występuje najczęściej i jest obecny we wszystkich żywych organizmach. Nawet bakteriofagi, jak np. T4, mają enzymy katalizujące naprawę uszkodzeń swego DNA właśnie w ten sposób [15]. W pierwszym

etapie naprawy zespół specyficznych enzymów — N-glikozydaz, z których każda rozróżnia prawdopodobnie tylko jeden rodzaj uszkodzenia, katalizuje hydrolityczne usunięcie uszkodzonej zasady z DNA, pozostawiając wolne miejsce w łańcuchu (miejsce apurynowe lub apirymidynowe). Właściwości fizyczne i chemiczne różnych poznanych dotąd DNA-glikozylaz są bardzo do siebie zbliżone. Enzymy te mają stosunkowo niewielki ciężar cząsteczkowy, od 18 000 do 31 000 daltonów, nie wymagają obecności kofaktorów jak np. jonów dwuwartościowych metali a ich główną rolą jest hydroliza wiązania łączącego zasadę z dezoksyrybozą. Wykazują aktywność przede wszystkim w stosunku do dwuniciowego DNA (z wyjątkiem DNA-glikozylazy uracylu) i na ogół występują w komórkach w bardzo małych ilościach (również z wyjątkiem DNA-glikozylazy uracylu) [7, 8].



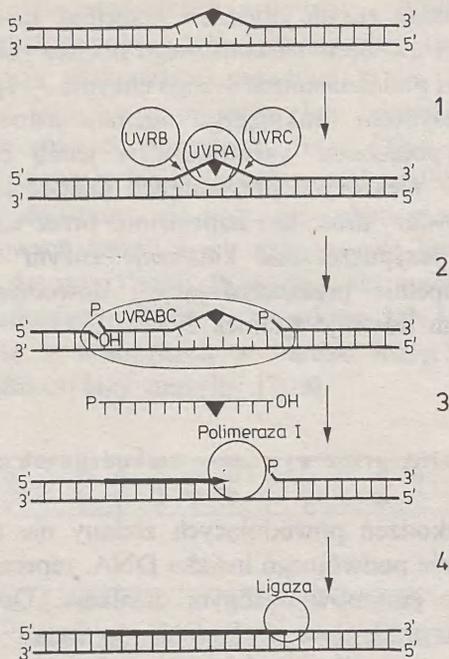
Rys. 5. Schemat procesu naprawy przez wycinanie uszkodzonych zasad. (1) Uszkodzenie zasady powoduje zerwanie wiązań wodorowych. (2,2') Glikozydaza DNA wycina uszkodzoną zasadę przez hydrolizę wiązań N-glikozydowego między zasadą i cząsteczką cukru pozostawiając w łańcuchu wolne miejsce. (3) AP-endonukleaza przecina łańcuch fosfocukrowy w miejscu pozbawionym zasady. (4) Egzonukleaza odcina sąsiednie nukleotydy, rozszerzając przecięcie. Polymeraza DNA (P) wypełnia powstałą lukę przez dosyntetyzowanie brakującego odcinka DNA a ligaza (L) łączy wszystko w jedną całość. (3') Do miejsca pozbawionego zasady prawdopodobnie może dołączyć się specyficzny enzym insertaza i wstawić brakującą zasadę

Miejsca pozbawione zasad rozpoznawane są przez inne enzymy — tzw. AP-endonukleazy, które przecinają łańcuch w tym miejscu. Jednakże niektóre DNA-glikozylazy, jak np. N-glikozylazy z *Micrococcus luteus* i faga T_4 rozpoznające dimery pirymidynowe mają również i tę drugą aktywność,

mogą więc odcinać jedną zasadę dimeru i przecinać łańcuch DNA [11-14]. Rozszerzenie nacięcia i usunięcie uszkodzonego miejsca razem z sąsiadującymi nukleotydami zachodzi pod działaniem innego enzymu — egzonukleazy. Wtedy może już nastąpić resynteza brakującego odcinka jednej nici przy udziale polimerazy DNA i połączenie wszystkiego w jedną całość przy udziale ligazy DNA [1, 7]. W niektórych przypadkach miejsce apurynowe powstałe po działaniu N-glikozydazy może być naprawione przez wstawienie brakującej zasady. Reakcję tę przypuszczalnie katalizuje enzym nazwany insertazą, jednakże nie ma zupełnie przekonujących dowodów jej istnienia [7]. Omówiony mechanizm ilustruje rysunek 5.

Naprawa DNA przez wycinanie uszkodzonych odcinków

W przypadku uszkodzeń powodujących zmiany nie tylko w parowaniu zasad lecz i w strukturze podwójnego heliksu DNA, reperacja przez wycinanie zachodzi przy udziale enzymów o innym działaniu. Do takich uszkodzeń zalicza się dimery pirymidynowe, dołączenie do zasad dużych cząsteczek, jak np. benzopirenów (o silnym działaniu rakotwórczym), które dzięki swym rozmiarom powodują miejscowe odkształcenie podwójnego heliksu, czy powstawanie połączeń chemicznych między dwoma łańcuchami DNA lub między DNA i białkiem (wiązania międzyłańcuchowe). W odróżnieniu od mechanizmu omówionego poprzednio, wycinanie tych uszkodzeń oraz nukleotydów sąsiadujących z uszkodzonym miejscem zachodzi w jednorazowym procesie sterowanym przez specyficzny kompleks enzymatyczny. Został on wydzielony i oczyszczony tylko z komórek bakterii *E. coli* [14], jednak dane pośrednie wskazują, że podobne enzymy występują także w organizmach wyższych [7, 16]. Trudności związane z oczyszczeniem i poznaniem mechanizmu działania tego enzymu wynikały stąd, że składa się on z 3 oddzielnych, dużych białek o masach cząsteczkowych 114 000, 84 000 i 74 000 daltonów, które łączą się ze sobą tylko w miejscu działania, i z których żadne oddzielnie nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Białka te są produktami genów nazwanych UVRA, UVRB i UVRC. Mechanizm działania tego enzymu jest następujący: miejsce uszkodzone w DNA rozpoznawane jest przez białko UVRA, które dołącza się do uszkodzenia jako pierwsze. Dwa pozostałe białka rozpoznają kompleks UVRA-DNA i dołączają się kolejno. Powstały w ten sposób aktywny enzym, przy udziale ATP i jonów magnezu, nacina uszkodzony odcinek łańcucha z obu stron uszkodzenia jednocześnie, usuwając odcinek DNA o długości 12 do 13 nukleotydów. Powstała przerwa może być natychmiast uzupełniana przez polimerazę DNA bez konieczności jej dalszego rozszerzania. Ostatnim etapem naprawy jest połączenie dosyntetyzowanej części z resztą łańcucha DNA przez ligazę DNA [11, 14] (rys. 6).



Rys. 6. Schemat naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów. Mechanizm ten służy do wycinania dimerów pirymidynowych oraz innych uszkodzeń powodujących zmiany w kształcie łańcuchów podwójnego heliksu. (1) Miejsce uszkodzone w DNA rozpoznawane jest przez specyficzny enzym, produkt genu *UvrA*, który tworzy kompleks z DNA. Do kompleksu dołączają się dwa dalsze enzymy kodowane przez geny *UvrB* i *UvrC*. (2) Połączone enzymy nacinają uszkodzone miejsce z obu stron łańcucha DNA. Od strony końca 5' nacięcie powstaje między 8 a 9 nukleotydem pozostawiając wolny koniec 3'-OH a od strony końca 3' nacięcie powstaje między 4 i 5 lub 5 i 6 nukleotydem pozostawiając w DNA wolny koniec 5'-P. (3) Enzymy odłączają się a do powstałej luki dołącza się polimeraza DNA wypełniając ją przez dosyntetyzowanie brakującego odcinka. (4) Ligaza DNA kończy proces naprawy zespalając nowy odcinek z pozostałą częścią nici DNA w jedną całość

JEDNOCZESNA NAPRAWA OBU NICI DNA

Omówione dotychczas mechanizmy naprawcze są zdolne do działania tylko wtedy, gdy naprzeciwko miejsca uszkodzonego w DNA znajduje się nieuszkodzony odcinek nici. Jednakże wiele czynników, np. promieniowanie jonizujące może spowodować jednoczesne przerwanie obu nici DNA. Inne uszkodzenia, np. wiązania międzyłańcuchowe, wycięte z jednej nici pozostają nadal przy drugiej, uniemożliwiając syntezę naprawczą. Również uszkodzenia występujące tylko w pojedynczych niciach DNA, na przykład dimery pirymidynowe mogą stać się przyczyną uszkodzeń w obu niciach jednocześnie, jeśli komórki nie zdołają ich naprawić przed replikacją DNA. Wtedy naprzeciw miejsca uszkodzonego powstaje przerwa, gdyż synteza nowej nici ulega zatrzy-

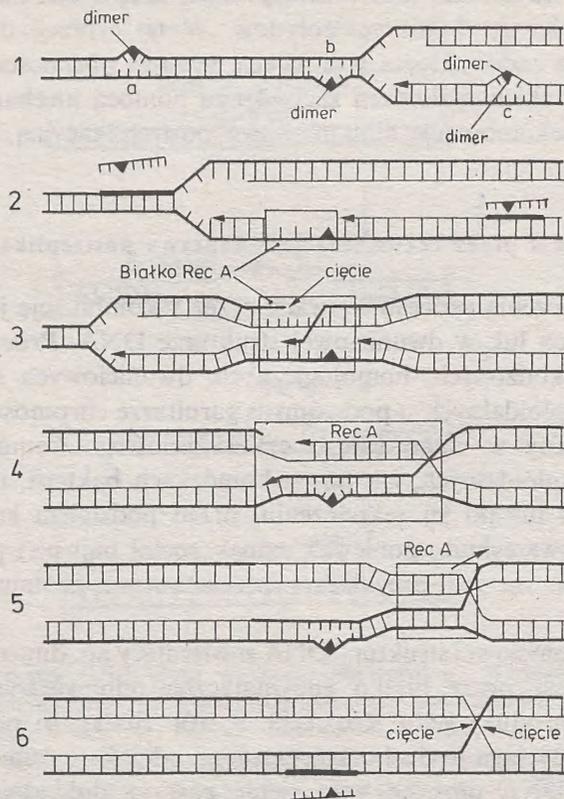
maniu w miejscu uszkodzenia i może być wznowiona dopiero w miejscu inicjacji nowego fragmentu, pozostawiając dużą lukę która może obejmować odcinek o długości do 1 000 nukleotydów. W tej sytuacji dimer nie może być wycięty, gdyż endonukleaza wycinająca wymaga obecności dwuniciowego DNA. Naprawa takich uszkodzeń zachodzi za pomocą mechanizmu zwanego naprawą przez rekombinację albo naprawą postreplikacyjną.

Reperacja przez rekombinację — naprawa postreplikacyjna

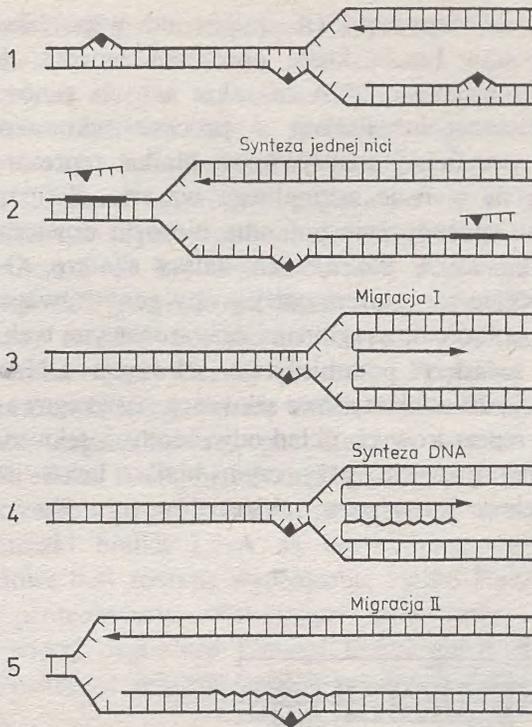
Sygnalem włączenia procesu reperacji przez rekombinację jest wystąpienie przerw lub dużych luk w dwuniciowej strukturze DNA. Proces ten wymaga obecności nieuszkodzonych, homologicznych, dwuniciowych struktur DNA. W komórkach diploidalnych o podwójnym garniturze chromosomów warunek ten jest zachowany w ciągu całego cyklu życiowego komórki, natomiast w komórkach haploidalnych, jak np. w komórkach bakterii, tylko w okresie replikacji DNA i tuż po jej zakończeniu, przed podziałem komórki. Proces ten występuje powszechnie, ponieważ jednak został najlepiej poznany w komórkach *E. coli*, na ich przykładzie przedstawione zostaną kolejne jego etapy (rys. 7).

Odcinek jednoniciowej struktury DNA zawierający np. dimer pirymidynowy rozpoznawany jest przez białko enzymatyczne odpowiedzialne za proces rekombinacji — produkt genu *Rec A* [3, 9, 10]. Białko to przyłącza się do tego miejsca i przyciąga je do homologicznego odcinka dwuniciowego DNA. Gdy cząsteczki DNA ułożone koło siebie zostaną dokładnie dopasowane, dwuniciowy DNA zostaje przecięty, a białko *RecA* przemieszcza wolne końce nici DNA wzajemnie między sobą w taki sposób, że miejsce zawierające dimer zostaje dołączone do nieuszkodzonego odcinka łańcucha. Naprawa przez wycinanie staje się teraz możliwa. Po oddysocjowaniu białka *RecA* następuje naprawa uszkodzonego miejsca i rozdzielenie zrekombinowanych nici. W podobny sposób przebiega naprawa jednoczesnego przerywania obu nici DNA lub naprawa wiązań międzyłańcuchowych.

Naprawa postreplikacyjna może jednak zachodzić i w inny sposób, przez omijanie uszkodzeń. Gdy widełki replikacyjne napotkają uszkodzenie na jednej nici rodzicielskiego DNA, synteza DNA na tej nici zostaje zatrzymana. Jednocześnie będzie postępowała dalej na nici drugiej, nieuszkodzonej. Nowopowstały odcinek, będąc dokładną kopią matrycy uszkodzonej, może posłużyć jako nowa matryca. Zachodzi zjawisko migracji matrycy, polimeraza DNA przemieszcza się na ten nowy odcinek i synteza DNA zachodzi aż do osiągnięcia jego końca. Wtedy dzięki powtórnej migracji, polimeraza DNA wraca na starą matrycę, lecz już poza miejscem uszkodzonym, które może być teraz naprawione bez żadnych przeszkód [10, 17, 18]. (rys. 8). Występowanie obu typów naprawy postreplikacyjnej jest dobrze udokumentowane doświadczalnie chociaż mechanizm migracji nie jest jeszcze poznany.



Rys. 7. Schemat naprawy postreplikacyjnej. (1) Dimer (b) przeszkadza w replikacji DNA, podczas której nici rodzicielskie (linie grube) ulegają rozwinięciu w obrębie widelców replikacyjnych a dwie nici potomne są syntetyzowane (linie cienkie) z wykorzystaniem nici rodzicielskich jako matrycy. (2) Dimer (b) uniemożliwia parowanie zasad zatrzymując syntezę DNA wzdłuż jednej nici przez zablokowanie ruchu polimerazy DNA. Dalsza synteza DNA na tej nici może być wznowiona dopiero w pewnej odległości od dimeru pozostawiając lukę postreplikacyjną której wielkość może przekraczać 1 000 nukleotydów. Synteza DNA na drugiej nici przebiega w tym miejscu bez zakłóceń. Dimery (a) i (c) nie przeszkadzają w replikacji i mogą być usunięte na drodze wycinania. (3) Białko RecA dołącza się do luki i zbliża odcinek jednoniciowy do dwuniciowej nici siostrzanej. Po dopasowaniu homologicznych odcinków DNA, enzym nacina dwuniciową strukturę a białko RecA przemieszcza wolny koniec łańcucha rodzicielskiego do wnętrza luki osłaniając dimer odcinkiem DNA o komplementarnej sekwencji zasad. (4) Rekombinacja postępuje dalej. Następuje wymiana nici między łańcuchami. Brakujące odcinki ulegają uzupełnieniu przez polimerazę DNA i połączone przez ligazę. (5) Białko RecA odłączając się od DNA odstawia dimer który może być teraz naprawiony na drodze wycinania nukleotydów. (6) Ostateczne przecięcie skrzyżowanych nici DNA rozdziela zrekombinowane odcinki. Ligacja pozostałych przerw kończy proces naprawy

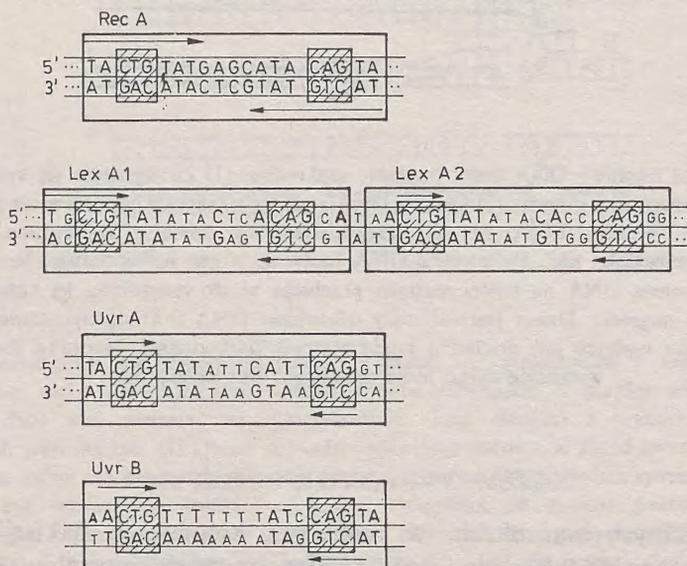


Rys. 8. Schemat naprawy DNA przez omijanie uszkodzeń. (1) Zatrzymanie się syntezy DNA spowodowane obecnością dimeru. (2) Synteza DNA na matrycy nieuszkodzonej może postępować nadal. (3) Jeśli synteza DNA na nici uszkodzonej nie zostanie wznowiona, następuje migracja nowopowstałej nici. Polimeraza DNA łączy się z nią wykorzystując ją jako nową matrycę. (4) Synteza DNA na nowej matrycy przebiega aż do osiągnięcia jej końca. (5) Następuje kolejna migracja. Dimer jest osłonięty odcinkiem DNA o komplementarnej sekwencji zasad gdyż nowa matryca jest dokładną kopią matrycy uszkodzonej. Naprawa dimeru przez wycinanie może teraz przebiegać bez przeszkód

INDUKOWANA NAPRAWA DNA. NAPRAWA SOS

W normalnych warunkach, w rosnących komórkach bakterii *E. coli* znajduje się bardzo niewielka ilość każdego z wielu rodzajów enzymów potrzebnych do naprawy uszkodzeń występujących w DNA sporadycznie. Jeżeli jednak komórki znajdują się w warunkach silnie uszkadzających DNA, np. zostaną naświetlone promieniami UV, lub w warunkach hamujących replikację DNA, obserwuje się gwałtowny wzrost zdolności komórek do naprawy DNA, połączony ze wzrostem częstości występowania mutacji i zahamowaniem podziału komórkowego. Zjawisko to zostało nazwane indukcją systemu SOS, gdyż występuje w przypadku zagrożenia życia komórki. Wykryto je w połowie lat siedemdziesiątych a obecnie poznano zasadę jego regulacji i działania [2, 3, 19].

Indukcja systemu naprawy SOS zależy od współdziałania produktów dwóch genów: białka LexA, które powoduje represję genów UVR odpowiedzialnych za naprawę DNA, a także innych genów i białka RecA, które obok omówionej już funkcji w procesie rekombinacji genetycznej, może w sposób specyficzny inaktywować białko represorowe LexA. Gdy komórki znajdują się w fazie normalnego wzrostu, do naprawy uszkodzeń powstających tylko sporadycznie potrzeba niewielu cząsteczek enzymów naprawczych i białko LexA blokuje ich dalszą syntezę. O tym, że białko LexA jest rzeczywiście represorem całej grupy genów związanych z naprawą DNA, które przez połączenie z regionami operatorowymi tych genów powoduje ich inaktywację świadczy podobieństwo sekwencji DNA tych regionów. Wszystkie posiadają 20-nukleotydowe sekwencje, uszeregowane w charakterystyczny dla miejsc represorowych układ odwróconych sekwencji repetytywnych o bardzo zbliżonej budowie, przy czym białko LexA ma aż dwie takie sekwencje rozdzielone jedną parą nukleotydów (rys. 9).



Rys. 9. Regiony operatorowe czterech genów kontrolowanych przez białko represorowe LexA. Regiony te znajdują się w pobliżu początku każdego genu, posiadają podobne sekwencje o długości 20 par zasad i stanowią miejsce dołączenia represora. Pary zasad operatorów LexA, UvrA i UvrB identyczne z parami zasad operatora RecA są oznaczone większymi literami, pary zasad które się różnią oznaczone są mniejszymi literami. Wszystkie regiony zawierają odwrócone powtarzające się sekwencje (palindromy) zaznaczone strzałkami — typowe dla regionów operatorowych. Sekwencje CTG i CAG rozdzielone 10 parami zasad są wspólne dla wszystkich regionów (zaznaczone zakreślowanymi kwadratami). Gen LexA ma aż dwa takie regiony rozdzielone tylko jedną parą zasad

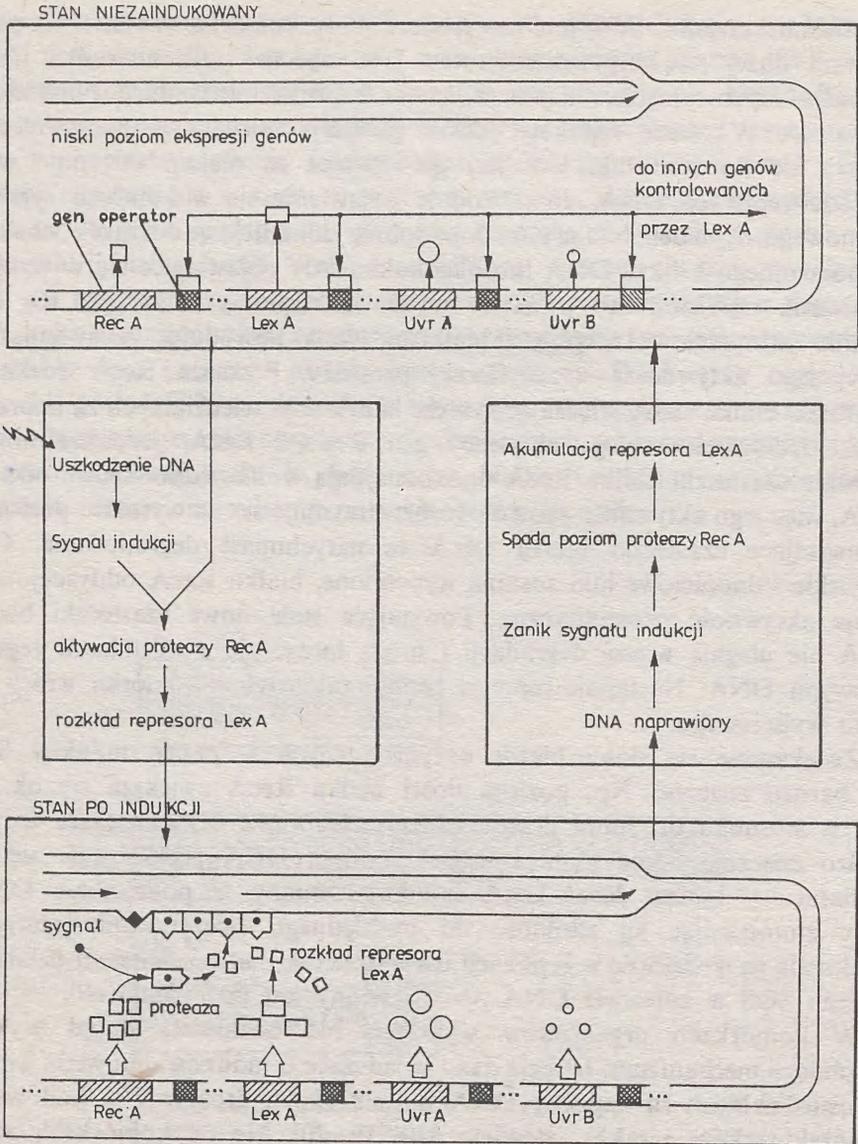
Działanie systemu SOS jest następujące. Gdy komórka znajdzie się pod wpływem dużej dawki promieniowania UV, obecna stale niewielka ilość enzymów reperacyjnych nie jest w stanie naprawić wszystkich powstałych uszkodzeń. W czasie replikacji DNA powstają więc luki. Białko RecA dołącza się do tych luk, lecz jest go również za mało. Następuje więc inhibicja replikacji DNA, co powoduje pojawienie się w komórce sygnału alarmowego. Sygnałem tym są prawdopodobnie jednoniciowe odcinki w strukturze podwójnego heliksu DNA lub oligonukleotydy pojawiające się w wyniku zaburzenia replikacji lub powstałe w czasie naprawy DNA [2, 16, 19]. Odcinki jednoniciowe reagują z białkiem RecA powodując pojawienie się nowej jego aktywności — specyficznej proteazy. Proteaza RecA rozkłada cząsteczki białka LexA włączając syntezę białek odpowiedzialnych za naprawę DNA. Jednocześnie ulega aktywacji gen RecA i LexA, jednakże nowopowstałe cząsteczki białka RecA nadal znajdują wolne jednoniciowe odcinki DNA, więc jego aktywność proteolityczna utrzymuje się na wysokim poziomie i powstające cząsteczki białka LexA są natychmiast degradowane. Gdy wszystkie jednoniciowe luki zostaną wypełnione, białko RecA oddysocjowuje tracąc aktywność proteolityczną. Powstające stale nowe cząsteczki białka LexA nie ulegają więcej degradacji i mogą łączyć się z odcinkami regulatorowymi DNA. Następuje represja genów zależnych i komórka wraca do stanu wyjściowego.

Zwiększenie się ilości białek enzymatycznych w czasie indukcji SOS jest bardzo znaczne. Np. poziom ilości białka RecA zwiększa się ok. 50 razy w stosunku do stanu przed indukcją. Naprawa SOS zwiększa jednak bardzo znacznie liczbę mutacji w bakteryjnym DNA [2]. Wydaje się, że regulatorowy system RecA-LexA indukuje zmiany w polimerazie DNA, które zmniejszając jej zdolność do bezbłędnego odczytywania matrycy, zwiększają jej wydajność w replikacji uszkodzonych matryc. Schemat działania systemu SOS w naprawie DNA przedstawiony jest na rysunku 10.

W komórkach organizmów wyższych nie udało się dotąd wykryć podobnego mechanizmu. Istnieją dane świadczące o indukowaniu wielu genów odpowiedzialnych za naprawę DNA w komórkach drożdży i w hodowlach komórek ssaków a także człowieka [10, 19, 20]. Np. w komórkach zwierzęcych, pod wpływem promieni UV stwierdzono aktywację specyficznej proteazy, która może mieć podobne działanie aktywujące jak białko RecA [20], zaobserwowano replikację zintegrowanych wirusów SV 40, amplifikację sekwencji DNA, aktywację systemów reperacyjnych i inicjatywę procesów nowotworowych [2, 3, 5, 19], jednakże koordynacja tych zjawisk z powstawaniem uszkodzeń w DNA jest nieznana.

SYSTEM NAPRAWY ADAPTACYJNEJ

Ostatnio wykryto nowy, bardzo specyficzny system naprawy uszkodzeń DNA powodowanych przez metylację zasad. Proces metylowania zasad



Rys. 10. Schemat regulacji systemu naprawy SOS. Przy braku uszkodzeń w DNA, w stanie niezaindukowanym, białko represorowe LexA dołącza się do miejsc operatorowych genów LexA, RecA, UvrA, UvrB i niektórych innych genów utrzymując syntezę tych białek na niskim poziomie. Uszkodzenie DNA powodujące powstanie luk postreplikacyjnych aktywuje system SOS. Białko RecA dołącza się do jednoniciowych odcinków DNA w obrębie luk, jego aktywność proteolityczna ulega aktywacji i represor LexA jest rozkładany. W nieobecności represora geny zależne od białka LexA aktywują się i szybko wzrasta synteza kodowanych przez nie białek. Wzrasta również ilość białka represorowego LexA lecz jest ono natychmiast rozkładane przez białko RecA zaktywowane przez dołączenie do jednoniciowego DNA w obrębie luk. Gdy naprawa DNA dobiegnie końca, białko RecA odłączając się od DNA traci aktywność proteolityczną: stale powstające nowe cząsteczki represora LexA nie ulegają więcej rozkładowi i łączą się z miejscami operatorowymi genów. Synteza białek naprawczych obniża się i komórka wraca do stanu niezaindukowanego.

sterowany enzymatycznie jest procesem fizjologicznym służącym do modyfikacji DNA w komórce, nie powoduje więc uszkodzeń. Metylacja nieenzymatyczna, zachodząca pod wpływem wielu związków chemicznych, powoduje metylowanie zasad w sposób zupełnie przypadkowy co wywołuje zmiany w ich zdolności do wzajemnego parowania. Większość tak zmienionych zasad zostaje usunięta przez N-glikozylazy i wycięcie powstałych miejsc apurynowych czy apirimidynowych. Jeżeli jednak metylowaniu ulegnie atom tlenu w cząsteczce guaniny w pozycji O⁶, grupa metylowa może umieścić się w tzw. dużym rowku podwójnego heliksu i enzymy naprawcze jej nie rozpoznają. Wtedy włączany jest system powodujący demetylację tej zasady [21]. Mechanizm jego działania jest następujący.

Demetylacja sterowana jest przez enzym przenoszący grupę metylową z O⁶-guaniny na resztę cysteiny. Zmetylowany enzym staje się nieaktywny i ulega rozkładowi. W warunkach normalnych ilość tego enzymu w komórce jest bardzo mała, potraktowanie jednak komórek N-metylo,N'-nitro-nitrosoguanidyną, czynnikiem metylującym o silnym działaniu mutagennym, wywołuje szybką syntezę tego enzymu. Komórki stają się odporne na działanie tego związku nawet w ilościach przekraczających sto razy dawkę letalną, podaną komórkom niezaadaptowanym. Jednak nawet przystosowane komórki nie wykazują zwiększonej oporności na promieniowanie UV, co świadczy o tym, że ten system obronny działa niezależnie od systemu SOS. [8. 3, 7, 21].

PROCESY CHOROBY ZWIĄZANE Z USZKODZENIEM NAPRAWY DNA. STARZENIE SIĘ ORGANIZMU

Ustalenie, że czynniki mutagenne, powodujące występowanie uszkodzeń w DNA są z reguły karcynogenami zwiększyło ogromnie zainteresowanie się badaniem mechanizmów naprawczych, zarówno w komórkach bakterii jak i organizmów wyższych. Badanie tych mechanizmów w organizmie ludzkim zostało ułatwione dzięki ustaleniu przyczyn występowania rzadkich wrodzonych schorzeń, w których stwierdzono zaburzenia w naprawie DNA. Charakteryzują się one wrażliwością na promieniowanie UV lub na inne czynniki uszkadzające DNA, występowaniem aberacji chromosomowych i bardzo wysokim stopniem zapadalności na raka. Najlepiej poznane schorzenia tego rodzaju zebrane są w tabeli 1 [5, 6].

Wśród wymienionych schorzeń najwięcej danych zebrano o *Xeroderma pigmentosum*. Przyczyną tej choroby jest niezdolność organizmu do wycinania dimerów pirymidynowych. Defekt ten powoduje dużą częstotliwość powstawania mutacji w komórkach somatycznych co z kolei prowadzi do powstawania nowotworów. Ponadto o związku naprawy DNA z procesem powstawania nowotworów świadczą następujące obserwacje: a) większość nowotworów powstaje z jednej, anormalnej komórki prekursorowej; b) przypadki zacho-

Tabela 1

Schorzenia występujące u ludzi z wrodzonymi wadami w naprawie DNA

Nazwa choroby	Wrażliwość na czynniki uszkodzające DNA	Zapadalność na typ nowotworu
<i>Xeroderma pigmentosum</i>	promieniowanie UV, czynniki alkilujące	rak skóry, czerniak
<i>Ataxia telangiectasia</i> <i>Anemia Fanconi</i>	promieniowanie X i γ czynniki powodujące powstawanie wiązań międzyłańcuchowych w DNA	chłoniak białaczka
Syndrom Blooma	promieniowanie UV	białaczka

rowań na raka wzrastają szybko wraz z wiekiem. Starzenie się organizmu związane jest z ogólnym zwolnieniem wszystkich funkcji komórkowych. Niektóre hipotezy tłumaczą to zwolnienie akumulacją błędów w DNA powstałych z nienaprawionych uszkodzeń, co powoduje powstawanie coraz większych ilości defektywnych białek. Na poparcie podawane są dane z wyników badania izolowanych linii komórkowych, w których stwierdzono, że wierność polimerazy DNA maleje w miarę wzrostu ilości generacji komórek hodowanych na pożywkach. Zmniejszenie się wierności replikacji DNA i wydajności procesów jego naprawy będzie zwiększać zawodność innych procesów metabolicznych, a przez sprzężenie zwrotne będzie powodować coraz większą zawodność procesów naprawy.

LITERATURA

- [1] Hanawalt P. C., Cooper P. K., Ganesan A. K., Smith C. A. — *DNA repair in bacteria and mammalian cells*. An. Rev. Biochem. 48: 783-836, 1979.
- [2] Kenyon C. J. — *The bacterial response to DNA damage*. Trends Biochem. Sci. 8: 84-87, 1983.
- [3] Howard-Flanders P. — *Inducible Repair of DNA*. Sci. Amer. 245: 56-64, 1981.
- [4] *Biologia Molekularna*. Praca zbiora pod red. Z. Lassoty. PWN. Warszawa, 1980.
- [5] Kornberg A. — *DNA replication*. W. H. Freeman and Co., San Francisco-New York, 1980.
- [6] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. — *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., New York, 1983.
- [7] Lindahl T. — *DNA Repair Enzymes*. An. Rev. Biochem. 51: 61-87, 1982.
- [8] Janion C. — *Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA-glikozylazy, DNA-transmetylaza o-metyloguaniny*. Post. Bioch. 3/4, 1983. (w druku).
- [9] Pietrzykowska I. — *Mechanizmy mutagenезy indukowanej a procesy reperacji DNA*. Post. Bioch. 24: 27-58, 1978.
- [10] Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox C. F. — *DNA Repair Mechanisms*. Academic Press, New York-London, 1978.
- [11] Haseltine W. A. — *Ultraviolet Light Repair and Mutagenesis revisited*. Cell 33: 13-17, 1983.
- [12] Gordon L. K., Haseltine W. A. — *Comparison of the Cleavage of Pyrimidine Dimers*

- by the Bacteriophage T_4 and *Micrococcus luteus* UV Specific Endonuclease. J. Biol. Chem. 255: 12047-12050, 1980.
- [13] Gordon L. K., Haseltine W. A. — *Early Steps of Excision Repair of Cyclobutane Pyrimidine Dimers by the Micrococcus luteus Endonuclease: a three Step Incision Model.* J. Biol. Chem. 256: 6608-6616, 1981.
- [14] Sancar A., Rupp W. D. — *A novel repair enzyme UVRABC excision nuclease of E. coli cuts a DNA strand on both sites of the damaged region.* Cell 33: 249-260, 1983.
- [15] Radany E. H., Friedberg E. C. — *A Pyrimidine Dimer-DNA Glycosylase Activity Associated With the Gene V product of Bacteriophage T_4 .* Nature 286: 182-186, 1980.
- [16] Kornberg A. — *Supplement 1982 to DNA Replication.* W. H. Freeman and Co., San Francisco-New York, 1982.
- [17] Setlow R. B. — *DNA Repair Pathways. W: DNA Repair and Mutagenesis in Eucaryotes.* W. M. Generoso, M. D. Shelby, F. J. De Serres (red.), Plenum Press, New York-London. str. 45-54, 1980.
- [18] Doniger J. — *DNA Replication in Ultraviolet Light Irradiated Chinese Hamster Cells: The nature of replicon inhibition and post-replication repair.* J. Mol. Biol. 120: 433-446, 1978.
- [19] Little J. W., Mount D. W. — *The SOS Regulatory System of Escherichia coli.* Cell 29: 11-22, 1982.
- [20] Miskin R., Ben Ishai R. — *Induction of plasminogen activator by UV light in normal and Xeroderma pigmentosum Fibroblasts.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6236-6240, 1981.
- [21] Cairns J. — *Efficiency of the adaptive response of Escherichia coli to alkylating agents* Nature 286: 176-178, 1980.

BRIGIDA BERSIN-BERSE

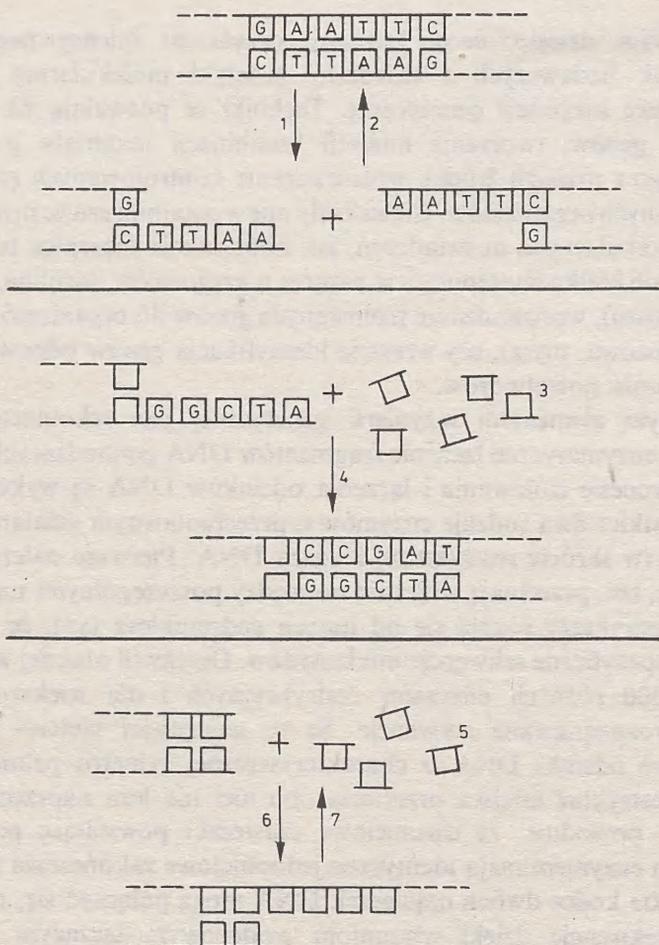
Zakład Genetyki
UW, Warszawa

REKOMBINACJA DNA *IN VITRO*

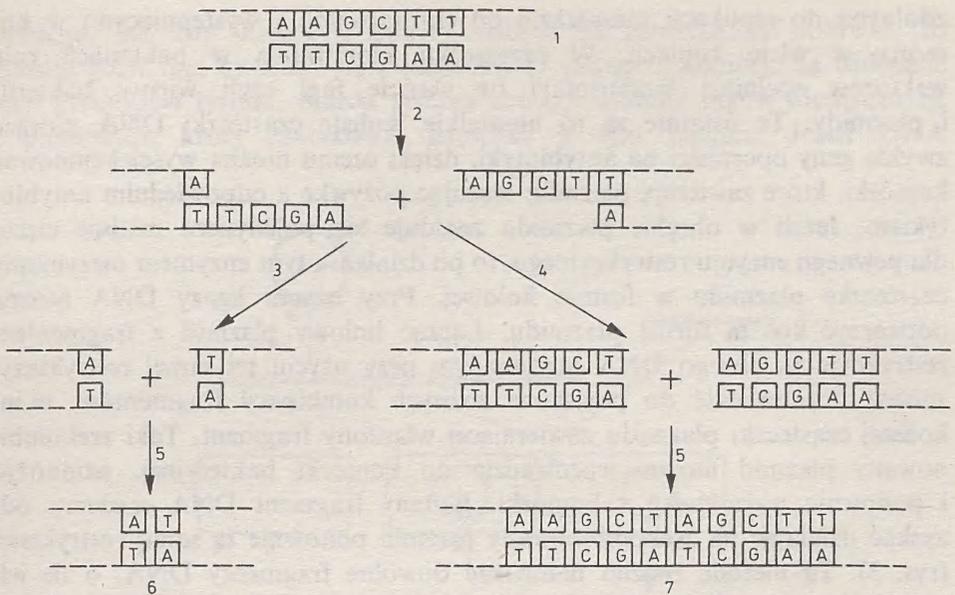
W ostatnim dziesięcioleciu jesteśmy świadkami intensywnego rozwoju wielu technik badawczych z dziedziny genetyki molekularnej, noszących wspólną nazwę inżynierii genetycznej. Techniki te pozwalają na izolowanie określonych genów, tworzenie nowych kombinacji materiału genetycznego pochodzącego z różnych źródeł, wprowadzanie kontrolowanych zmian do genomów badanych organizmów. Umożliwiły one w ostatnim czasie przeprowadzenie tak spektakularnych doświadczeń, jak konstrukcja szczepów bakteryjnych produkujących białka występujące w naturze u kręgowców (insulina, interferon, hormon wzrostu), wprowadzanie izolowanych genów do organizmów wyższych (muszka owocowa, mysz), czy wreszcie identyfikacja genów odpowiedzialnych za powstawanie nowotworów.

Kluczowym elementem inżynierii genetycznej jest rekombinacja DNA *in vitro*, tzn. enzymatyczne łączenie fragmentów DNA pochodzących z różnych źródeł. W procesie izolowania i łączenia odcinków DNA są wykorzystywane przede wszystkim dwa rodzaje enzymów o przeciwstawnym działaniu: enzymy restrykcyjne (w skrócie restryktazy) i ligaza DNA. Pierwsze należą do grupy endonukleaz, tzn. przecinają wiązania pomiędzy poszczególnymi nukleotydami w DNA. Restryktazy różnią się od innych endonukleaz tym, że rozpoznają i przecinają specyficzne sekwencje nukleotydów. Do chwili obecnej wyodrębniono ponad 300 różnych enzymów restrykcyjnych i dla większości z nich oznaczono rozpoznawane sekwencje. Są to najczęściej sześć- lub czteronukleotydomowe odcinki DNA o charakterystycznej symetrii palindromicznej. Dla wielu restryktaz miejsca przecięcia obu nici nie leżą naprzeciwko siebie (rys. 1), co powoduje, że dwuniciowe cząsteczki powstające po trawieniu DNA danym enzymem mają identyczne jednoniciowe zakończenia (tzw. lepkie końce). Lepkie końce dwóch cząsteczek DNA mogą połączyć się, odtwarzając wyjściową sekwencję dzięki wiązaniom wodorowym łączącym nukleotydy obu nici. Z kolei przecięte przez restryktazę wiązania kowalencyjne między dwoma sąsiadującymi nukleotydami można odtworzyć przy użyciu ligazy DNA. W ten sposób mogą powstać nowe kombinacje odcinków DNA. Na pograniczu

tych odcinków zostaną dokładnie odtworzone sekwencje rozpoznawane przez użyty enzym restrykcyjny. Należy zaznaczyć, że niektóre enzymy restrykcyjne przecinają obie nici DNA dokładnie naprzeciwko siebie, produkując fragmenty zakończone dwuniciowo. Te tzw. tępe końce również można połączyć za pomocą ligazy, chociaż z mniejszą wydajnością. Aby podwyższyć wydajność łączenia cząsteczek DNA zakończonych „tępo”, można posługując się terminalną transferazą dobudować do nich komplementarne jednoniciowe zakończenia (rys. 1). W doświadczeniach, gdzie obecność lepkich końców jest niepożądana, można je obciąć specjalną nukleazą działającą na jednoniciowy DNA, lub „wypełnić” dobudowując brakujące nukleotydy (za pomocą polimerazy DNA). W ten sposób można utworzyć tępe końce i połączyć fragmenty DNA otrzymane przy użyciu dwóch różnych enzymów restrykcyjnych. Tego typu operacje umożliwiają także wprowadzanie zdefiniowanych



Rys. 1. Działanie enzymów stosowanych w rekombinacji DNA *in vitro*. 1 — enzym restrykcyjny, 2 — ligaza DNA, 3 — wolne nukleotydy, 4 — polimeraza DNA, 5 — wolne nukleotydy, 6 — terminalna transferaza, 7 — nukleaza działająca na jednoniciowy DNA



Rys. 2. Wprowadzanie zmian w sekwencji DNA. 1 — pierwotna sekwencja nukleotydów, 2 — enzym restrykcyjny, 3 — nukleaza — obcinanie lepkich końców, 4 — polimeraza DNA — wypełnianie lepkich końców, 5 — ligaza DNA, 6 — delecja 4 nukleotydów, 7 — addycja 4 nukleotydów

zmian do badanej cząsteczki DNA. Rysunek 2 pokazuje, jak przez odcinanie lepkich końców, a następnie działanie ligazy można uzyskać delecję, a przez wypełnianie końców — addycję kilku nukleotydów.

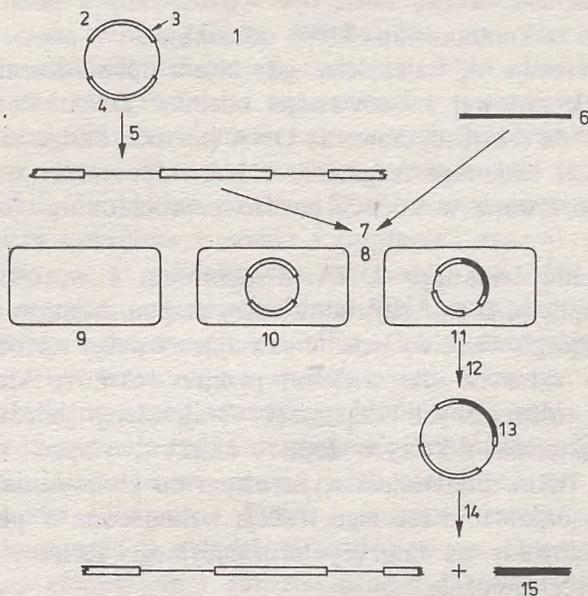
Posługując się opisanymi wyżej enzymami można bardzo dobrze charakteryzować i przekonstruowywać małe genomy, np. wirusów. Natomiast bezpośrednia analiza restrykcyjna bardziej złożonych organizmów, jak bakterie, a tym bardziej organizmy eukariotyczne (tj. mające jądro komórkowe), nie dostarczyłaby wielu informacji ze względu na dużą ilość materiału genetycznego. W związku z tym stało się konieczne wyodrębnianie pojedynczych genów i namnażanie ich w odpowiednich komórkach-gospodarzach. Procedury te są określane mianem klonowania genów. W charakterze gospodarzy do klonowania występują najczęściej komórki bakterii (głównie *Escherichia coli* — organizm najlepiej scharakteryzowany genetycznie), także komórki drożdży a czasem wyższych roślin i zwierząt. Aby wprowadzany DNA nie uległ degradacji, ale mógł się namnażać i być przekazany komórkom potomnym, musi on przyłączyć się do jakiegoś replikonu, tzn. cząsteczki DNA zdolnej do samodzielnej replikacji. Jedną z możliwości jest włączenie wprowadzonego DNA do chromosomu gospodarza, ale w tym przypadku występują duże trudności z odzyskaniem wprowadzonych odcinków DNA. Wygodne jest więc połączenie badanych fragmentów z małymi cząsteczkami DNA (tzw. wektorami)

zdołnymi do replikacji niezależnie od chromosomu i występującymi w komórce w wielu kopiach. W przypadku klonowania w bakteriach rolę wektorów spełniają bakteriofagi (w skrócie fagi czyli wirusy bakterii) i plazmidy. Te ostatnie są to niewielkie, koliste cząsteczki DNA niosące zwykle geny oporności na antybiotyki, dzięki czemu można wyselekcjonować komórki, które zawierają plazmid, stosując pożywkę z odpowiednim antybiotykiem. Jeżeli w obrębie plazmidu znajduje się pojedyncze miejsce cięcia dla pewnego enzymu restrykcyjnego, to po działaniu tym enzymem otrzymamy cząsteczkę plazmidu w formie liniowej. Przy użyciu ligazy DNA można odtworzyć kolistą formę plazmidu. Łącząc liniowy plazmid z fragmentem restrykcyjnym obcego DNA otrzymanym przy użyciu tej samej restryktazy, można doprowadzić do powstania różnych kombinacji fragmentów, m.in. kolistej cząsteczki plazmidu zawierającej włączony fragment. Taki zrekombinowany plazmid można wprowadzić do komórki bakteryjnej, namnożyć i ponownie wyizolować z komórki. Badany fragment DNA możemy odzyskać działając na zrekombinowany plazmid ponownie tą samą restryktazą (rys. 3). Tą metodą można namnażać dowolne fragmenty DNA, o ile ich obecność nie jest dla komórki bakteryjnej szkodliwa. Oczywiście wykorzystane w tej procedurze miejsce cięcia restryktazą nie powinno znajdować się w rejonie plazmidu odpowiedzialnym za jego replikację, ani w obrębie genu odporności służącego do selekcji, gdyż w takim wypadku wstawienie obcego DNA zaburzyłoby replikację cząsteczki, bądź uniemożliwiłoby wyróżnienie komórek, które otrzymały plazmid. Natomiast często stosuje się wektory plazmidowe niosące dwa geny oporności, a wstawianie obcego fragmentu DNA następuje w obrębie jednego z nich. Umożliwia to odróżnienie komórek z plazmidem zrekombinowanym od komórek zawierających wyjściowy wektor.

Pobieranie DNA ze środowiska przez komórki bakteryjne i trwałe włączanie go do genomu nazywa się transformacją. Zjawisko to opisał po raz pierwszy Griffith w klasycznym doświadczeniu nad transformacją niewirulentnego szczepu *Streptococcus* w szczep wirulentny. W późniejszych latach opisano transformację wielu innych gatunków bakterii. Natomiast *Escherichia coli* w warunkach naturalnych nie ma zdolności do transformacji, ale działając na błonę komórkową jonami metali i podwyższoną temperaturą można „zmusić” komórkę do pobrania DNA. Wprowadzony do komórki materiał genetyczny może zostać wbudowany do chromosomu bakteryjnego lub — w przypadku plazmidu — ulegać niezależnej replikacji.

Zaletą wektorów fagowych jest możliwość bardzo efektywnego wprowadzania zrekombinowanego DNA do komórek bakterii innym sposobem niż transformacja. DNA faga może być bowiem *in vitro* pakowany w otoczki białkowe. Zostaje w ten sposób odtworzona struktura wirionów — infektywnych cząsteczek wirusowych, którymi zakaża się komórki. Po wnikięciu do komórki następuje normalny cykl lityczny i uwalnia się potomstwo zrekombinowanego faga. Jeżeli bakterie po infekcji wysiejemy na płytce

Petrieego, tak aby utworzyły zwarty kożuch na powierzchni pożywki, to miejsca gdzie fagi uwolniły się i zaatakowały następne komórki są widoczne jako przejrzyste łysinki. Każda łysinka zawiera miliony fagów identycznych z pierwszym, który zaatakował komórkę w tym miejscu. Jeżeli DNA



Rys. 3. Namnażanie fragmentów DNA w bakteriach. 1 — wektor plazmidowy niosący dwa geny oporności na antybiotyki, 2 — gen oporności na ampicylinę, 3 — miejsce cięcia restryktazą X, 4 — gen oporności na tetracyklinę, 5 — enzym restrykcyjny X, 6 — fragment obcego DNA otrzymany za pomocą restryktazy X, 7 — ligaza DNA, 8 — transformacja komórek *Escherichia coli*, 9 — komórki nietransformowane — wrażliwe na oba antybiotyki, 10 — transformanty plazmidem niezrekombinowanym — oporne na oba antybiotyki, 11 — transformanty plazmidem zrekombinowanym — wstawienie fragmentu obcego DNA unieczynnia gen oporności na ampicylinę — komórki są oporne na tetracyklinę i wrażliwe na ampicylinę, 12 — hodowla bakterii na dużą skalę — izolacja plazmidu, 13 — zrekombinowany plazmid, 14 — enzym restrykcyjny X, 15 — namnożony fragment obcego DNA

użyty do pakowania w otoczki pochodził z rekombinacji *in vitro* między wektorem fagowym a fragmentami obcego DNA, to potomne łysinki zawierają fagi ze zrekombinowanym DNA. Drogą selekcji odpowiednich mutantów, a także przez rekombinację *in vitro* otrzymano wiele wektorów będących pochodnymi faga lambda. Miejsca restrykcyjne w tych wektorach są tak rozmieszczone, że wstawienie obcego fragmentu DNA nie narusza zasadniczych funkcji wirusowych (infekcja i namnażanie w komórce), natomiast w wielu przypadkach zmienia fenotyp faga, np. wygląd łysinek czy zdolność do wzrostu na określonym szczepie bakterii. W ten sposób można odróżnić fagi zrekombinowane od niezrekombinowanych. Wiele z tych wektorów

umożliwia klonowanie bardzo dużych (do kilkudziesięciu tysięcy par zasad) fragmentów DNA, tzn. większych niż w wektorach plazmidowych.

Inną grupą wektorów są pochodne bakteriofaga M13. W jego wirionach zawarty jest jednoniciowy DNA. Po wnikięciu do komórki odtwarzana jest druga nić, a w końcowej fazie infekcji produkowane są znów fagi jednoniciowe. Forma dwuniciowa może być wyizolowana z komórki i użyta do rekombinacji, a zrekombinowany DNA odzyskuje się w postaci jednoniciowej. Tę procedurę stosuje się najczęściej, gdy celem doświadczenia jest ustalenie sekwencji nukleotydowej klonowanego odcinka DNA. Ponieważ szeroko stosowana metoda sekwencjonowania DNA (metoda Sangera) wymaga posiadania jednej nici badanego fragmentu DNA, klonowanie w fagu M13 jest powszechnie stosowane w miejsce bardzo pracochłonnego rozdzielania nici *in vitro*.

Po połączeniu badanego DNA z wektorem i wprowadzeniu go do komórek następnym, często najtrudniejszym etapem klonowania jest selekcja klonu zawierającego właściwy gen. Omawiając powyżej metody rekombinacji DNA *in vitro* założono dla większej przejrzystości, że klonowany DNA stanowi zbiór identycznych cząsteczek. Najczęściej jednak dysponujemy mieszaniną cząsteczek, z których dopiero należy „wyłapać” odcinek niosący właściwy gen. Takim materiałem wyjściowym do klonowania może być cały genom danego organizmu lub jego frakcja wzbogacona w pewne sekwencje, DNA zsyntetyzowany na matrycy informacyjnego RNA i wreszcie DNA zsyntetyzowany chemicznie.

Wyszukiwanie określonego genu wśród wielu fragmentów naturalnego genomu jest określane po angielsku terminem „shotgun experiment”. Można to przetłumaczyć jako doświadczenie typu „strzał śrutem”. Nazwa bierze się stąd, że operuje się bardzo dużą liczbą fragmentów DNA lub klonów komórek zawierających te fragmenty i głównym problemem staje się selekcja właściwego klonu. DNA badanego organizmu fragmentuje się enzymem restrykcyjnym i łączy się za pomocą ligazy DNA z odpowiednim wektorem. Powstaje wtedy zbiór zrekombinowanych cząsteczek DNA zawierających włączone fragmenty genomu danego organizmu (tzw. bank albo biblioteka genów). Z kolei pulę zrekombinowanych cząsteczek DNA wprowadza się do bakterii uzyskując zbiór kolonii bakteryjnych (lub łysinek na „murawie” bakterii), z których każda zawiera pojedynczy fragment genomu danego organizmu. W laboratoriach zajmujących się genetyką molekularną skonstruowano już banki genów wszystkich ważniejszych obiektów badań genetycznych, w tym *Escherichia coli*, drożdży, muszki owocowej, *Drosophila melanogaster*, a także człowieka. Naukowcy, których interesuje wyizolowanie konkretnego genu mogą więc zwrócić się do odpowiedniego laboratorium i otrzymać próbkę banku (zwykle w postaci kolonii bakteryjnych). Zależnie od wielkości badanego genomu i od wielkości fragmentów DNA wstawionych do wektora, liczba klonów, które trzeba przeszukać, aby znaleźć określony gen, waha się od kilku do kilkudziesięciu tysięcy. Przeszukiwanie to odbywa

się najczęściej na podstawie: 1) fizycznej obecności tego genu w komórce (lub lysince), co można wykryć metodą hybrydyzacji kwasów nukleinowych, lub 2) zmiany fenotypu komórek gospodarza w wyniku ekspresji danego genu.

Zastosowanie pierwszej metody jest możliwe w przypadku, jeżeli posiadamy próbkę kwasu nukleinowego, np. RNA, który jest komplementarny do poszukiwanego genu. Taką próbką mógłby być np. rybosomalny RNA, który łatwo jest oddzielić od innych rodzajów RNA. Próbkę znakuje się radioaktywnym izotopem fosforu i przeprowadza się hybrydyzację z DNA zawartym w poszczególnych koloniach bakteryjnych (lub lysinkach fagowych). Znakowany kwas nukleinowy użyty w takim doświadczeniu nazywa się sondą molekularną. Jeżeli dany klon zawiera DNA homologiczny do sondy, to ten DNA utworzy kompleks z sondą i „wyłapie” radioaktywny materiał. Kolonia stanie się wtedy radioaktywna, co można stwierdzić metodą autoradiografii. Nie trzeba przy tym izolować DNA z każdego klonu, gdyż są opracowane metody hybrydyzacji kolonijnej (lub lysinkowej) *in situ*, które pozwalają na przetestowanie w ten sposób tysięcy klonów.

Druga metoda identyfikacji właściwego klonu nie wymaga dysponowania sondą molekularną, natomiast zakłada ekspresję klonowanego DNA w komórkach gospodarza. Jest to prawie pewne, jeżeli biorcą jest ten sam organizm, z którego pochodzi klonowany DNA i znacznie mniej prawdopodobne w przypadku klonowania w układzie heterologicznym. Dotyczy to zwłaszcza doświadczeń nad klonowaniem eukariotycznego DNA w bakteriach, gdyż istnieją spore różnice w budowie i regulacji działania genów między *Prokaryota* a *Eukaryota*. Niemniej udało się w ten sposób wyselekcjonować wiele genów niższych *Eukaryota* (głównie drożdży) kodujących enzymy kontrolujące podstawowy metabolizm komórki. Jako biorcy w takich doświadczeniach służyły mutanty auksotroficzne *Escherichia coli* pozbawione określonych enzymów biosyntetycznych i w związku z tym niezdolne do wzrostu na pożywce pozbawionej odpowiedniego składnika pokarmowego. Po wprowadzeniu banku genów do bakterii-mutanta i wysianiu komórek na pożywkę selektywną uzyskiwano klony prototroficzne, czyli takie, które nie wymagały danego składnika do wzrostu. Po wyizolowaniu zrekombinowanego plazmidu z prototroficznych bakterii i ponownej transformacji komórek mutanta uzyskiwano znów zniesienie efektu mutacji pokarmowej, co stanowiło dowód, że za efekt ten odpowiedzialny jest fragment DNA sklonowany w plazmidzie. Nie jest to jeszcze dowód, że plazmid niesie gen struktury kodujący odpowiednie białko enzymatyczne, którego brak jest w bakterii-gospodarzu. Doświadczenia, które to mogą potwierdzić, są dość skomplikowane i wymagają dokładnego zbadania natury produktu kodowanego przez sklonowany odcinek DNA metodami enzymologicznymi, immunologicznymi i in.

Opisaną procedurę można także zastosować, jeżeli gospodarzem są komórki drożdży. Znalaziono plazmid drożdżowy, który posłużył do konstrukcji

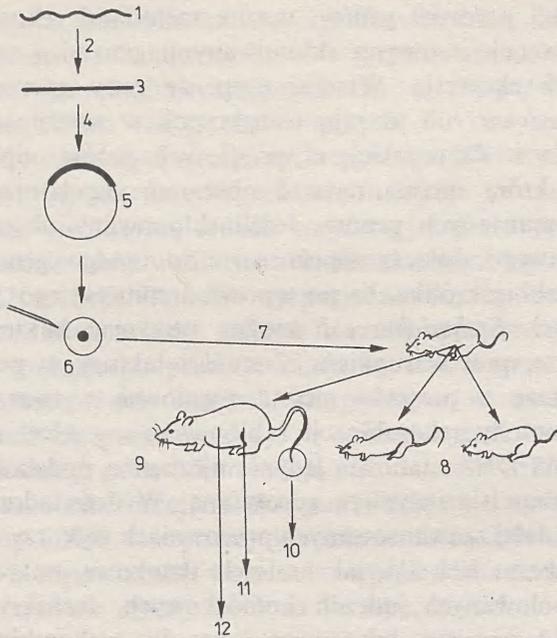
szeregu wektorów i sklonowano wiele genów drożdży, które nie ulegają ekspresji w bakteriach. Udało się nawet wyizolować w ten sposób jeden z genów kontrolujących biosyntezę adeniny u *Drosophila melanogaster* (muszki owocowej). Gen ten po wprowadzeniu do komórek mutantu adeninowego drożdży niwelował skutki mutacji i umożliwił wzrost kolonii na pożywce pozbawionej adeniny. Wynik ten zasługuje na uwagę ze względu na dużą odległość ewolucyjną muszki owocowej i drożdży.

W innej metodzie klonowania jako materiał wyjściowy służy specyficzny informacyjny RNA (mRNA). W wyspecjalizowanych tkankach wyższych organizmów przeważającą część mRNA stanowi specyficzny transkrypt określonego genu kodującego produkt białkowy charakterystyczny dla danej tkanki. Np. w komórkach wysepek Langerhansa w trzustce dominującą klasę stanowi mRNA preproinsuliny, w retikulocytach — mRNA globiny. Odtworzenie sekwencji genu odpowiadającego danemu mRNA jest możliwe dzięki zastosowaniu odwrotnej transkryptazy, enzymu katalizującego syntezę DNA na matrycy RNA. Otrzymany komplementarny DNA (cDNA) można zrekombinować z odpowiednim wektorem, wprowadzić do komórek bakterii i namnożyć. Oczywiście należy mieć na uwadze, że sklonowany cDNA nie zawsze jest identyczny z oryginalnym genem. Wiadomo że wiele genów eukariotycznych ma strukturę mozaikową: sekwencje kodujące białko są przedzielone odcinkami niekodującymi (tzw. intronami), których brak w dojrzałym mRNA. Sklonowany cDNA będąc dokładną kopią mRNA nie zawiera intronów. Badanie cDNA nie dostarcza więc pełnej informacji o strukturze genu, natomiast może posłużyć do charakteryzowania mRNA metodami, które są łatwiejsze w odniesieniu do DNA (np. sekwencjonowanie). Poza tym sklonowany cDNA może być użyty jako sonda molekularna do wyizolowania z genomu oryginalnego genu zawierającego introny i sekwencje regulatorowe.

W przypadku, gdy znana jest sekwencja aminokwasowa białka kodowanego przez dany gen, można przy użyciu tabeli kodu genetycznego napisać sekwencję genu. W końcu lat siedemdziesiątych opracowano wydajne metody syntezy odcinków DNA o żądanej sekwencji. Tak więc znając sekwencję białka można zsyntetyzować i sklonować odpowiadający mu gen. Ponieważ kod genetyczny jest niejednoznaczny (jednemu aminokwasowi odpowiada więcej niż jedna trójka nukleotydów), więc sekwencja sklonowanego genu nie będzie tą, która występuje w naturalnym genomie. Metoda ta nie jest więc wykorzystywana do badania właściwości określonych genów, ale do otrzymania komórek bakterii lub drożdży produkujących pewne białka, które chcemy otrzymać w dużych ilościach, a których preparatyka z oryginalnego organizmu jest trudna lub mało wydajna. Aby sklonowany syntetyczny gen (bądź cDNA) ulegał wydajnej ekspresji, stosuje się wektory, w których w pobliżu miejsca wstawienia fragmentu obcego DNA znajdują się sekwencje-sygnały startu transkrypcji i translacji rozpoznawane przez aparat enzymatyczny w komórce danego gospodarza. Znając sekwencje odpowiedzialne za

regulację ekspresji pewnych genów, można metodami rekombinacji *in vitro* połączyć te sekwencje z innymi sklonowanymi genami i uzyskać zdolność kontroli nad ich ekspresją. Wiadomo np. że geny operonu laktozowego u bakterii *Escherichia coli* ulegają transkrypcji w zależności od obecności laktozy w komórce. Za regulację ekspresji tych genów odpowiedzialny jest odcinek DNA, który można nazwać obszarem regulatorowym, położony w sąsiedztwie omawianych genów. Jeżeli sklonowany obszar regulatorowy operonu laktozowego dołączy się *in vitro* do innego genu, np. do genu kodującego β -globinę królika, to po wprowadzeniu takiego „przerobionego” genu do komórek *Escherichia coli* można otrzymać bakterie produkujące β -globinę króliczą, pod warunkiem obecności laktozy w podłożu. Dodając i usuwając laktozę z pożywki można regulować wytwarzanie β -globiny.

Omówione metody rekombinacji i klonowania genów, a także metody sekwencjonowania DNA stanowią jedynie niezbędną podstawę pracy laboratorium zajmującego się inżynierią genetyczną. W doświadczeniach wykonywanych w najbardziej zaawansowanych pracowniach wykorzystuje się skomplikowane i nowoczesne techniki, jak hodowle tkankowe, mikromanipulacje na komórkach i izolowanych jądrach komórkowych, transkrypcja, translacja i replikacja DNA *in vitro*. Jako gospodarze dla zrekombinowanego DNA często służą nie tylko mikroorganizmy, ale także komórki wyższych organizmów w hodowlach tkankowych. Wiele laboratoriów opanowało techniki zwane ukierunkowaną mutagenezą, które polegają na tym, że do sekwencji wyizolowanego genu wprowadza się *in vitro* określone zmiany, a następnie zmieniony gen wprowadza się z powrotem do komórki i obserwuje jego ekspresję. W ten sposób można, np. ustalić znaczenie określonych sekwencji DNA dla prawidłowego przebiegu transkrypcji i translacji, a także zmodyfikować produkt białkowy kodowany przez dany gen. Największy rozgłos zdobyły sobie doświadczenia, w których obcy DNA wprowadzano do embrionalnych komórek zwierzęcych (*Drosophila*, szczur, mysz), z których rozwijały się dorosłe osobniki mające w swym genomie wbudowane fragmenty obcego DNA (tzw. osobniki transgeniczne). W niektórych przypadkach transgeniczne zwierzęta miały zmieniony fenotyp w wyniku działania wbudowanych genów i nabyte w ten sposób cechy przekazywały potomstwu. Jedno z takich doświadczeń polegało na wprowadzeniu sklonowanego genu szczura, kodującego hormon wzrostu, do zapłodnionych jaj myszy (rys. 4). Jaja wszczepiono następnie samicom mysim i otrzymano dorosłe potomstwo. Od potomnych myszy pobierano próbki DNA (wykonywano preparat DNA z kawałka ogona) i metodami hybrydyzacji ustalono, że w genomie niektórych z nich jest obecny gen hormonu wzrostu pochodzący ze szczura. Jednocześnie myszy te miały kilkaset razy podwyższony poziom hormonu wzrostu w krwi i były prawie dwa razy większe od osobników z tego samego miotu, które nie miały szczurzego genu. Te dane, a także wyniki analizy RNA z transgenicznych myszy dowodzą, że zmieniony fenotyp jest bezpośrednim następstwem działania wbudowanego szczurzego genu.



Rys. 4. Schemat doświadczenia prowadzącego do konstrukcji transgenicznych myszy-gigantów. 1 — mRNA z przysadki mózowej szczura, 2 — odwrotna transkryptaza, 3 — cDNA — gen hormonu wzrostu, 4 — rekombinacja *in vitro* z plazmidem i namnożenie w bakteriach, 5 — plazmid z włączonym genem hormonu wzrostu szczura, 6 — wprowadzanie DNA do zapłodnionych jaj myszy (mikroinjekcja) — mechanizm włączania DNA do genomu myszy jest nieznan, 7 — wszczepienie jaj samicom — mamkom, 8 — myszy normalne (wprowadzony DNA nie został włączony do genomu), 9 — mysz-gigant, 10 — w DNA otrzymanym z kawałka ogona wykryto obecność szczurzego genu, 11 — analiza mRNA z wątroby dowiodła, że szczury gen ulega prawidłowej transkrypcji, 12 — poziom hormonu wzrostu w osoczu jest bardzo wysoki

Autorzy pracy wskazują na możliwe praktyczne zastosowania tej techniki. Można by posłużyć się nią do otrzymania szybko rosnących zwierząt hodowlanych, a także uzyskać zwierzęta produkujące w nadmiarze pewne cenne białka. Nie zapominając o tych perspektywach należy podkreślić ogromne możliwości poznawcze związane z manipulacjami genetycznymi dokonywanymi na całych organizmach. Dotychczas inżyniera genetyczna pozwoliła na zbadanie struktury i mechanizmów ekspresji wielu pojedynczych genów. Obecnie otwiera się nowy rozdział w badaniach nad regulacją genetyczną u wyższych organizmów. Konstruowanie transgenicznych osobników umożliwia śledzenie regulacji działania genów w czasie rozwoju osobniczego, a także może rzucić nowe światło na mechanizmy różnicowania narządów i tkanek.

MAGDALENA FIKUS

Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, Warszawa

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE METOD REKOMBINACJI DNA *IN VITRO*

1. WSTĘP

Metody rekombinacji DNA *in vitro* wprowadzone do codziennej praktyki naukowych laboratoriów badawczych, a w następnym etapie do pracowni związanych z przemysłem i przez niego finansowanych, stały się sprawnym narzędziem umożliwiającym osiąganie korzyści praktycznych. Wyodrębniając niejako sztucznie dział stosowania osiągnięć nauki od postępu prac podstawowych nie należy zapominać, że cel ten nie mógł być osiągnięty przed nagromadzeniem odpowiedniej liczby danych o strukturze i regulacji ekspresji genów i genomów organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Uzyskana wiedza pozwoliła na:

- konstrukcje wektorów do rekombinacji,
- opracowanie różnorodnych metod wprowadzania zrekombinowanego DNA do wybranych komórek biorców,
- prowadzenie prób regulacji ekspresji genów wprowadzonych do innych niż macierzyste komórki.

Nie wszystkie z tych zadań znalazły już pozytywne i optymalne rozwiązanie.

Rozpatrując możliwości praktycznego zastosowania metod rekombinacji DNA *in vitro* można wyróżnić następujące kierunki badań:

1. Konstrukcje szczepów mikroorganizmów o nowych, pożytecznych cechach genetycznych związanych z ekspresją nowych genów oraz zwiększeniem lub zmniejszeniem ekspresji uprzednio istniejących w tych organizmach genów. Cel ten może być osiągnięty dzięki:

- modyfikacji samych genów,
- wprowadzeniu lub modyfikacji sekwencji regulacyjnych,
- zastosowaniu różnego typu wektorów episomalnych,
- integracji badanego genu do wybranej i określonej pozycji w chromosomie biorcy,
- dobraniu właściwego biorcy zrekombinowanego DNA.

Ostatecznym wynikiem takich doświadczeń jest wytwarzanie przez mikroorganizm dużej ilości pożądanego produktu genu — białka. Wskazane jest,

aby białko to mogło być następnie stosunkowo prostymi metodami wydzielane i oczyszczane. Kierunek ten może zaowocować po skonstruowaniu szczepów mikroorganizmów wytwarzających, np. białka eukariotyczne (por. rozdz. 2A), nadprodukujących enzymy biorące udział w procesach fermentacji, czy czynniki biologicznie aktywne (witaminy, antybiotyki, leki sterydowe).

2. Konstrukcje linii komórek organizmów wyższych zmodyfikowanych genetycznie, wytwarzających żądane produkty białkowe. Ten tok postępowania staje się tokiem z wyboru w przypadku, gdy końcowe modyfikacje produktu białkowego, np. specyficzne glikozylacje, mogą być dokonywane tylko przez zespoły enzymatyczne komórek organizmów wyższych.

3. Modyfikacje genetyczne komórek somatycznych, w szczególności tkanek wyspecjalizowanych w syntezie określonych białek, w tych przypadkach, gdy geny własne tkanki uległy szkodliwym mutacjom, zaburzającym normalne funkcjonowanie tkanki. Pierwsze próby tego rodzaju przeprowadzono z komórkami szpiku kostnego myszy, wytwarzającymi m.in. beta globinę. Doświadczenie to stanowiło model postępowania, przewidywanej w przyszłości „rekombinacyjnej chirurgii” komórek krwiotwórczych osobników mających nieprawidłowe geny kodujące białka krwi.

4. Modyfikacje genetyczne całych organizmów dokonywane na komórkach rozrodczych zwierząt, lub komórkach kallusów roślin, pozwalając na trwałą, przekazywalną potomstwu, zmianę genotypu danego osobnika.

5. Poznanie struktury genów prawidłowych i typu mutacji zaburzających ich ekspresję w przypadkach chorób genetycznych zwierząt i ludzi, co stanowi podstawę do diagnostyki tych chorób, a także punkt wyjścia do perspektywicznej terapii genowej (por. p. 3 i 4).

6. Zastosowanie mutagenyzy ukierunkowanej, czyli kontrolowanej zmiany zapisu kodu genetycznego w obrębie genu, prowadzącej do pożądanej zmiany produktu genu (np. do podwyższenia aktywności biologicznej, modyfikacji aktywności, zwiększenia trwałości produktu genu w ustroju docelowym). Doświadczenia z zakresu mutagenyzy ukierunkowanej nie wyszły jeszcze w zasadzie poza fazę opracowywania optymalnych warunków kontrolowanej modyfikacji dowolnie dobranych sekwencji kwasów nukleinowych. W wielu programach badawczych obserwować można kolejne rozszerzanie i integrację wyliczonych tu tematów.

2. UZYSKIWANIE POŻYTECZNYCH SUBSTANCJI METODAMI REKOMBINACJI DNA IN VITRO

Obecnie najwięcej przykładów praktycznego zastosowania metod rekombinacji DNA *in vitro* przytoczyć można z dziedziny konstrukcji mikroorganizmów wytwarzających pożądane produkty białkowe. Różne z tych procesów

znajdują się w różnych fazach opracowań produkcyjnych. Omówię tu ogólnie kilka przykładów celem wskazania ogromnego wachlarza możliwości, ograniczonej właściwie jedynie zakresem fantazji ludzkiej, lub — bardziej przyziemnie — ekonomicznym rachunkiem wskazującym na celowość opracowania nowych sposobów produkcji wybranej substancji. Metody rekombinacji stają się metodami z wyboru w tych przypadkach, gdy nie udaje się wydzielić pożądanego produktu w wystarczającej ilości ze źródeł naturalnych, dotyczy to np. interferonów, czynników wzrostu, hormonu wzrostu.

Pierwszym produktem rynkowym pochodzącym ze zrekombinowanych komórek była ludzka insulina, uzyskana z bakterii *Escherichia coli* niosących gen ludzkiej insuliny. Insulina ta została dopuszczona do sprzedaży w RFN, Holandii, W. Brytanii i USA w 1983 roku. Jest ona produkowana przez koncern amerykański Eli Lilly, na podstawie technologii opracowanej w biotechnologicznej firmie Genentech. W 1984 roku na rynek amerykański wchodzi preparat hormonu wzrostu człowieka (zasady technologii j.w., firmy Genentech i Kabi, Szwecja). Prawdopodobnie, w ciągu najbliższych miesięcy dopuszczona będzie do rozpowszechnienia szczepionka przeciw chorobie pyska i racic bydła i ostrej biegunki cieląt. Również w bieżącym roku rozpoczną się kliniczne próby na szczepionką przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (firma Biogen w Europie, Green Cross Corp. w Japonii). Na wirusowe zapalenie wątroby choruje ok. 200 mln ludzi na świecie, obecnie stosowana nie w masowej skali szczepionka kosztuje 100 dolarów na osobę. Koszt nowej szczepionki firma Biogen ocenia na około 20 dolarów. Szczepionkę Biogenu wytwarzają drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, zawierające zrekombinowany gen antygeny powierzchniowego B (HBsAg). Biogen przygotowuje także diagnostyczny odczynnik do wykrywania nosicielstwa wirusowego zapalenia wątroby, którym jest uzyskany z *E. coli* produkt genu kodującego antygen rdzeniowy (HBcAg). Może to być również potencjalna szczepionka przeciw omawianej chorobie. W wielu laboratoriach prowadzi się również prace nad otrzymaniem szczepionki poliwalencyjnej w oparciu o stosowaną od lat szczepionkę przeciw ospie. Są to konstrukcje, w których DNA wirusa krowianki zrekombinowany jest z genami antygenów innych chorób zakaźnych.

W fazie opracowań laboratoryjnych znajdują się szczepionki przeciw różyczce, malarii, wścieklicznie, opryszczce i inne. Również w fazie klonowania znajdują się geny: tkankowych aktywatorów plazminogenu (przewidywane zastosowanie — likwidacja zakrzepów przy zawałach serca i płuc), czynnika VIII (leczenie hemofilii), erytropoetyny, ludzkiego hormonu wydzielanego przez nerki i kontrolującego dojrzewanie erytrocytów (przewidywane zastosowanie — leczenie anemii na tle chronicznej niewydolności nerek i artretyzmu).

Anegdotalny może być przykład nieoczekiwanego wyniku doświadczeń wykonanych w biotechnologicznej firmie Amgen. Po sklonowaniu fragmentu plazmidu pochodzącego z *Pseudomonas putida* w *E. coli* [1], w pożywce

pojawił się wydzielany przez *E. coli* barwnik indygo, powszechnie używany do barwienia tkanin, w szczególności przy produkcji dżinsów. W zrekombinowanych komórkach połączyły się dwa wielogenowe układy metaboliczne: enzym z *E. coli*, tryptofanaza, przekształca tryptofan w indol, enzym z *P. putida*, dioksygenaza naftalenowa, przekształca indol w indygo.

2A. INTERFERON, BADANIA PODSTAWOWE I ZASTOSOWANIA PRAKTYCZNE

Interferon opisany będzie jako konkretny przykład pełnego cyklu badawczego, od badań podstawowych do zastosowania praktycznego.

Interferon jest białkiem syntetyzowanym przez niektóre komórki kręgowców (leukocyty, fibroblasty) po zetknięciu się tych komórek z induktorem. Indukują syntezę interferonu bardzo różnorodne substancje, a także żywe organizmy: niskocząsteczkowe związki chemiczne, np. pochodne akrydyny i niektóre antybiotyki, syntetyczne polimery, w tym dwuniciowe kompleksy polirybonukleotydów, wirusy, bakterie, pierwotniaki, ekstrakty z roślin i grzybów. Interferon wywiera wieloraki wpływ na komórki otaczające komórkę indukowaną. Stwierdzono, że wykazuje on aktywność przeciwwirusową, antyproliferacyjną (komórki nowotworowe i normalne), immunomodulacyjną, modyfikuje różnorodne właściwości i funkcje komórek, w tym związane z różnicowaniem. Pojawienie się interferonu w organizmie zmienia właściwości błon wrażliwych komórek, to znaczy tych, które mają swoiste receptory interferonu; zmianom ulega również zdolność wiązania ligandów przez receptory komórek, np. wiązanie estrogeny, tyreotropiny, konkwaliny A. Wewnątrz komórki dochodzi do kaskadowej aktywacji różnych genów, do zmian w szybkości syntezy białek i kwasów nukleinowych. Po usunięciu interferonu ze środowiska zmiany te są odwracalne. Ze względu na pleiotropowy charakter działania interferonu, a także na nadzieje jakie budził jako potencjalny lek przeciwwirusowy i przeciwnowotworowy z jednej strony, a trudności w uzyskaniu mierzalnych ilości czystego interferonu do dalszych badań i prób z drugiej strony¹, metody rekombinacji DNA *in vitro* stały się drogą z wyboru prowadzącą do wydzielenia genu interferonu i sklonowania go w mikroorganizmach celem uzyskania ogólnie dostępnej metody produkcji czystego interferonu. [2].

Pierwszą próbą kolonowania genu interferonu podjął w 1977 roku Charles Weissmann z Uniwersytetu w Zurichu. Program ten już w 1978 roku

¹ Głównym producentem interferonu metodą klasyczną, z indukowanych leukocytów ludzkich, był do 1978 r. Kari Cantell z Hematologicznego Centrum Fińskiego Czerwonego Krzyża w Helsinkach. W jego zakładzie po dziecięciu latach pracy nad uzyskaniem wydajnej metody produkcji, otrzymywano rocznie ok. $2,5 \times 10^{11}$ umownych jednostek interferonu, preparując go z leukocytów zebranych od 90 tys. dawców krwi. W owym czasie oceniano, że na jedną terapię przeciwwirusową konieczne jest 10^6 - 10^7 umownych jednostek, a na jedną przeciwnowotworową — 10^9 . Preparat otrzymywany przez Cantella zawierał od 0,5 do 1% interferonu w przeliczeniu na czyste białko.

zaczęła finansować firma biotechnologiczna Biogen, w której Weissmann został członkiem rady naukowej i udziałowcem. Weissmann obawiając się, że gen interferonu może być genem podzielonym postanowił zastosować metodę odwrotnej transkrypcji; wychodząc z mRNA syntetyzować *in vitro* cDNA interferonu. Oceniał również, że mRNA interferonu stanowić może 10^{-4} - 10^{-3} część komórkowego poli(A)mRNA (okazało się później, że jest to ok. 0,1%, a gen nie jest podzielony). Stąd też zadanie podjęte przez grupę z Zurichu stanowiło niewątpliwie najtrudniejszą próbę z ówczesnych projektów stosowania rekombinacji DNA *in vitro*. Przebadano 10 tys. klonów bakteryjnych, uzyskując po wieloetapowej procedurze selekcji klon *E. coli* z plazmidem pBR 322 i dołączonym cDNA zawierającym pełną sekwencję genu interferonu (plazmid Hif-2hH), znanego dziś jako gen interferonu alfa 1. Z 1 litra hodowli bakterii uzyskano 10^5 jednostek interferonu [3]. Użyty jako sonda hybrydazyjny plazmid Hif-2hH pozwolił na lokalizację conajmniej 16 sekwencji homologicznych (genów lub pseudogenów) do interferonu alfa 1 (zbadano 240 tys. fagów z banku genomu ludzkiego). Jednocześnie podjęte z powodzeniem prace (w Japonii — T. Taniguchi i w Belgii — W. Fiers) nad klonowaniem genu interferonu fibroblastów (interferon beta) pozwoliły na określenie homologii genów interferonów rodzin alfa i beta. W obrębie rodziny interferonu beta istnieje co najmniej 5 sekwencji homologicznych, ale nie jest pewne czy tylko jedna, czy więcej ulega ekspresji.

Wydajność syntezy interferonu w *E. coli* podwyższono już w tym samym 1980 roku jednocześnie w dwu laboratoriach (C. Weissmanna w Szwajcarii oraz S. Pestki w USA, projekt finansowany przez firmę biotechnologiczną Genentech i Hoffman LaRoche) do 2×10^8 jednostek z litra hodowli, dzięki dołączeniu sklonowanej uprzednio jednostki kodującej interferon alfa do promotora lac lub promotora beta — laktamazy [4]. Syntetyzowany chemicznie promotor i operator *trp* a także sekwencję Shine-Delgarno (82 p. zasad) dołączono do genu interferonu alfa 1 i uzyskano wówczas jeszcze 5-10-krotne zwiększenie ekspresji genu w stosunku do ekspresji regulowanej przez promotor lac [5]. Nieco później wykazano, że gen interferonu beta dołączony do promotora P_L faga lambda (możliwość regulacji ekspresji w zależności od temperatury) ulega tak wydajnej ekspresji, że transformowane nim komórki *E. coli* produkują beta interferon w ilości 4% całkowitego białka komórkowego, co stanowi 4×10^9 jednostek z litra hodowli. Niestety jednocześnie drastycznie ulega zahamowaniu wzrost bakterii [6].

Opracowanie metody zabijania bakterii w fermentorze bez inaktywacji interferonu umożliwiło zwiększenie skali syntezy interferonu przez bakterie do przemysłowej. Początkowo hodowle prowadzono w 3000-, a następnie w 30 000-litrowych fermentorach. Z kolei opracowanie metody oczyszczania interferonu na dużą skalę umożliwiło krystalizację tego białka, zbadanie jego cech fizykochemicznych i oznaczenie aktywności biologicznej w stosunku do komórek ludzkich jako 2×10^8 jednostek na mg białka.

Realizacja programu klonowania genu interferonu przez Weissmanna i in-

nych doprowadziła do odkrycia rodzin genów interferonu: leukocyтарnego (alfa), fibroblastycznego (beta) i wreszcie immunologicznego (gamma). Co więcej, okazało się, że interferony różnią się aktywnością biologiczną ocenianą w stosunku do różnych wirusów, komórek nowotworowych, różnych linii komórek ssaków i człowieka [7].

Metody rekombinacji genetycznej *in vitro* umożliwiły także konstrukcje *in vitro* genów hybrydowych, np. wewnątrz rodziny genów interferonu alfa (alfa 1 i alfa 2), które różniły się aktywnością od genów rodzicielskich. Interferony alfa 1 i 2 charakteryzują się mniejszą aktywnością w komórkach mysich niż ludzkich, podczas gdy hybrydowe białko zawierające koniec NH₂ interferonu alfa 2 i koniec COOH interferonu alfa 1 jest aktywniejsze w stosunku do komórek mysich niż ludzkich. Dostępność sklonowanych genów pozwoliła również na przeprowadzenie doświadczeń wyróżniających fragmenty polipeptydu, odpowiedzialne za oddziaływanie z receptorami komórkowymi (zresztą istnienie receptorów udowodniono dopiero po uzyskaniu „rekombinacyjnego” interferonu), a także za właściwości antygenowe interferonów (za te ostatnie odpowiada COOH koniec polipeptydu).

Firma amerykańska Cetus, która zainwestowała w produkcję interferonu ok. 20 mln dol. wspólnie z Shell Oil Co., finansującym próby kliniczne, wyprodukowała zmodyfikowany interferon. Trudności w stosowaniu terapeutycznym interferonu beta związane są z nietrwałością jego wodnych preparatów. Wydawało się, że istnieje wpływ reszt cysteinowych na zachowanie aktywności biologicznej interferonu beta. Zawiera on trzy reszty cysteiny. Dwie z nich tworzą wewnątrzcząsteczkowy mostek dwusiarczkowy. Przypuszcza się, że trzecia może tworzyć w roztworze takie mostki międzycząsteczkowe, co zmniejsza aktywność preparatu. Stosując metody ukierunkowanej mutagenyzy w stosunku do zrekombinowanego genu interferonu beta zastąpiono trzecią resztę cysteiny resztą serynową. Uzyskany, zmodyfikowany w stosunku do naturalnego, interferon beta wykazywał specyficzną aktywność $1-3 \times 10^8$ jednostek na mg białka i w odróżnieniu od naturalnego był trwały w roztworach wodnych. Doświadczenie to jest pierwszym praktycznym zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy w celu uzyskania produktu o korzystniejszych, niż naturalnego, cechach użytkowych [8].

Grupa badaczy angielskich [9, 10], w oparciu o sekwencje nukleotydowe oznaczone dla genów interferonu alfa 1 i alfa 2 i dedukowane z nich sekwencje aminokwasów w białkach, zsyntetyzowała chemicznie geny interferonów. Warunki syntezy, a także ekspresji tych genów w komórkach prokariotycznych zmusiły w tym przypadku do zaprojektowania sekwencji nukleotydów różnej od naturalnej, ale kodującej białka identyczne z naturalnymi. Skorzystano tutaj ze zjawiska degeneracji kodu genetycznego. Syntetyzowane geny (alfa 1 — 514 nukleotydów i alfa 2 — 511 nukleotydów) wraz z dołączonymi prokariotycznymi sekwencjami sygnałowymi i regulatorowymi klonowano w *E. coli*, *M. methylotrophus* (bakterie hodowane na tanich źródłach węgla, nieinfekcyjne dla ludzi) i *S. cerevisiae*, uzyskując produkty

białkowe genów identyczne z naturalnymi interferonami alfa 1 i alfa 2. Jak już wspomniano, raz sklonowane w bakteriach geny interferonów były następnie przenoszone na inne wektory celem uzyskania większej ekspresji, a także do innych biorców. W ten sposób można np. eliminować niektóre uciążliwe stadia oczyszczania końcowego produktu białkowego od substancji pyrogennych, lub umożliwić jego prawidłową posttranslacyjną modyfikację.

Z produkcyjnego punktu widzenia obiecujące wydają się próby transformowania *S. cerevisiae* genami interferonów alfa. Dołączony do drożdżowych sekwencji sygnałowych, pochodzących z genu kinazy fosfoglicerynianu, gen interferonu alfa 2 ulega w drożdżach ekspresji z wydajnością $1,5 \times 10^9$ jednostek na litr hodowli. Interferon stanowi tutaj 1-2% całkowitego białka komórki [11]. Zupełnie nowy system, który w produkcji może stać się konkurencyjny w stosunku do już omówionych, zaproponowano dla genu interferonu beta. Dołączono go do promotora genu polihedryny, białka syntetyzowanego w dużych ilościach przez owadziego wirusa, *Autografia californica*. Wirus ten jest również stosowany jako bioinsektycyd. Gospodarzem zrekombinowanego DNA były komórki jajników owada z rodzaju szarańczaków, hodowane *in vitro*. Komórki te wydzielały do środowiska glikozylowany ludzki interferon beta. Wydajność jego syntezy prowadzonej na skalę laboratoryjną (5×10^6 jednostek z miliona komórek) przewyższała stukrotnie wydajność uzyskiwaną w dotychczas stosowanych systemach eukariotycznych.

W przypadku genów interferonu niewyjaśniony pozostaje mechanizm indukcji tych genów, który można badać tylko w komórkach identycznych, lub bliskich komórkom pierwotnych dawców genów, stąd też dokonywano prób wprowadzania genów interferonu do komórek ssaków.

Mysie i królicze fibroblasty transdukowano genem interferonu beta wydzielonym z chromosomu ludzkiego wraz z otaczającymi go sekwencjami niekodującymi i dołączonym do wektora składającego się z fragmentów plazmidu bakteryjnego pBR 322, DNA wirusa SV 40 i bakteryjnego markera selekcyjnego *neo*. Gen interferonu integrował z chromosomem komórki biorcy [12]. Badania tego typu pozwoliły również na wysunięcie sugestii co do znaczenia niektórych sekwencji chromosomalnych leżących poza regionem kodującym, np. roli sekwencji położonych przed genem interferonu w indukcji tego genu [13].

Geny interferonu można również wprowadzać do fibroblastów mysich w procesie transfekcji w obecności jonów Ca^{++} . Dochodzi wówczas do tandemowej integracji genów interferonu do chromosomu oraz do prawidłowej transkrypcji i ekspresji genu po indukcji. Inny wektor skonstruowany jako pochodna DNA wirusa SV 40, po dołączeniu do niego genu interferonu beta posłużył do transfekcji komórek małpy. W tym przypadku, jak również w przypadku wektora pochodzącego z DNA wirusa brodawczka bydła i fibroblastów mysich jako biorców, geny interferonu pozostały związane z wektorem i w formie episomalnej dziedziczyły się w badanych liniach

komórkowych. I w tych przypadkach podlegały one indukcji i ulegały prawidłowej ekspresji.

Podjęcie prac badawczych nad klonowaniem genów interferonu spotkało się z dużym zainteresowaniem przemysłu farmaceutycznego. Ocenia się, że w USA z tych źródeł wpłynęły najwyższe dotychczas sumy przeznaczone na rozwój metod produkcji pojedynczej substancji (4 mld dol.). Interferony produkowane są obecnie, na różną skalę, przez firmy biotechnologiczne: Biogen (Szwajcaria), Genentech-Hoffman-LaRoche (USA), Cetus (USA), Atter Llosante (Hiszpania), Celltech, (W. Brytania), Rhône-Poulenc (Francja), Yamasa Choya (Japonia), Kyowa Hakko (Japonia), Boehringer (RFN), Wellcome Foundation (W. Brytania) i inne. Firma Biogen podpisała kontrakt na wspólne badania i próby kliniczne z Chińską Republiką Ludową.

Wszystkie preparaty interferonów pochodzących z badań rekombinowanych przechodzą kolejne fazy prób klinicznych. Najbardziej zaawansowane są badania kliniczne interferonów rodziny alfa wytwarzanych w formie LaRoche. Rozpoczęły się one w 1981 roku, a w 1984 roku włączono do tych badań interferon gamma. Wszystkie testowane preparaty są jednorodne jako białka. Stosowane są domięśniowo, dożylnie, podskórnie i do jam ciała w stężeniu 3×10^6 jednostek w mililitrze. Dla porównania, preparaty interferonu leukocytarnego otrzymywanego z ludzkiej krwi obwodowej są heterogenne (8-11 podtypów interferonów alfa), a zawartość substancji aktywnej wynosi 0,01% [14].

Dzięki uzyskaniu już stosunkowo dużych ilości interferonu metodami rekombinacji stały się możliwe systematyczne oceny klinicznej przydatności interferonów w leczeniu chorób wirusowych i nowotworowych [14, 15]. Na ostateczne wnioski jest jeszcze za wcześnie, ale już dziś można stwierdzić, że leczenie interferonem przynosi zachęcające wyniki w przypadkach zapalenia rogówki i spojówki oka wywołanego przez wirusa *Herpes simplex*, w profilaktyce epidemicznego zapalenia rogówki i spojówki (adenowirus typu 8). Istnieją doniesienia o skuteczności terapii interferonowej w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby, w ciężkich przypadkach zakażeń wirusami *Herpes simplex* i *Varicella zoster* oraz w wirusowych zapaleniach mózgu. Skuteczność stosowania interferonów w chorobach nowotworowych musi być nadal badana. Jeszcze nie opracowane schematy leczenia różnych chorób, będą niewątpliwie różne. Przeciwnowotworowe działanie interferonu jest niezbyt silne, często okresowe, odwracalne i konieczne jest długotrwałe podawanie preparatu. Warunkiem skuteczności jest m.in. obecność w ustroju komórek wrażliwych, mających receptory interferonu. Ustalić trzeba optymalne dawki leku, drogę i czas jego podawania. Podatne na działanie interferonów są brodawczaki krtani i pęcherza moczowego, białaczka włochato-komórkowa, niektóre czerniaki oraz raki nerek. Oporne na leczenie są raki płuc, jelit, żołądka, narządów płciowych. Wskazania do leczniczego stosowania interferonów mogą być rozszerzone również na wiele chorób immunologicznych.

Omówiony szczegółowo przykład szerokiego zastosowania różnorodnych

metod rekombinacji DNA *in vitro* w celu opracowania warunków produkcji trudno uzyskiwanego innymi metodami białka o aktywności biologicznej i potencjalnej przydatności klinicznej, dokumentuje w moim przekonaniu tezę o niepodzielności nauki na badania podstawowe i stosowane. Liczne firmy biotechnologiczne popierały badania interferonu, ponieważ nie uruchomiłyby fermentorów produkujących go na skalę przemysłową, gdyby nie istniały dane dotyczące różnorodnych efektów wywoływanych w różnych systemach komórkowych przez interferon, dane o strukturze genów i samych interferonów, o metodach i mechanizmach indukcji genów interferonu, a także indukcji innych genów pod wpływem interferonu. Optymalizacja warunków syntezy interferonu wymaga wypróbowania różnych wariantów układów komórka-rekombinowany DNA, różnych sposobów wprowadzania do komórek zrekombinowanego DNA, szerokiego spektrum wektorów oraz zbadania form trwałego utrzymania się zrekombinowanego DNA w komórce.

3. DIAGNOSTYKA CHORÓB GENETYCZNYCH CZŁOWIEKA, PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ

Co najmniej 3000 rozpoznanych chorób człowieka zidentyfikowano jako patologie związane z uszkodzeniem genu (choroby jednogenowe — 25%), lub kilku genów (choroby wielogenowe — 44%). Podejrzewa się, że przyczyną wielu innych schorzeń, często nierzadkich (cukrzyca), jest tło genetyczne na razie jednak nieznanne są mutacje genów odpowiedzialne za takie czy inne objawy patologiczne. Tak więc przed naukami medycznymi w zakresie chorób genetycznych pozostały do rozwiązania dwie grupy problemów: postawienie diagnozy „molekularnej”, rozpoznanie przyczyny choroby, a także znalezienie sposobów leczenia przyczynowego (terapia genu).

Okolo 300 chorób genetycznych jest obecnie rozpoznanych od strony biochemicznej, okolo 100 z nich można wykryć w okresie płodowym. Taką diagnozę postawić można w tych przypadkach, gdy zdefiniowana, charakterystycznie upośledzona w danej chorobie reakcja biochemiczna, przebiega w komórkach nabłonka płodu. Przez nakłucie pobiera się płyn owodniowy od kobiety ciężarnej (ok. 14-15 tydzień ciąży). W płynie tym znajdują się pojedyncze komórki nabłonkowe płodu, które można hodować i mnożyć *in vitro* i jednocześnie badać odpowiednią reakcję enzymatyczną. Podobnej oceny można dokonać bez konieczności przebicia do pęcherza płodowego, pobierając komórki kosmówki genetycznie identyczne z komórkami płodu (10-12 tydzień ciąży).

Do niedawna wydawało się, że jeśli można mówić o diagnostyce choroby genetycznej na poziomie analizy genu i jego mutacji, to gen taki musi być uprzednio zidentyfikowany i zlokalizowany. Metody rekombinacji umożli-

wiąjące wydzielenie pojedynczych genów ludzkich i następnie użycie ich jako sond molekularnych do badania DNA genomowego, lub pochodzącego z określonych chromosomów, pozwoliły na lokalizację wielu genów i przypisanie ich poszczególnym chromosomem, a także ich określonym fragmentom. I tak, np. geny interferonów alfa i beta znajdują się w chromosomie 9, interferonu gamma — w 13, znana jest lokalizacja wielu protonkogenów i onkogenów, geny alfa globin leżą w chromosomie 16, globin beta — w 11, gen insuliny — w 11. Lokalizacja genów normalnych, a także zbadanie struktury całych regionów genomu, łącznie z ustaleniem sekwencji nukleotydów genów i regionów otaczających, umożliwiły znajdowanie różnic między takimi sekwencjami w normie i stanie patologicznym. Różnice te mogą odbijać się, m.in. na obrazie trawienia zdefiniowanego fragmentu genomu przez niektóre enzymy restrykcyjne (polimorfizm restrykcyjny). Dzięki temu zjawisku pojawiła się możliwość diagnostyki prenatalnej kilku odmian talasemii (powstającej w wyniku nieprawidłowej struktury regionów genomu kodujących globiny alfa i beta), a także ostatnio, niewykrywalnej dotychczas przed urodzeniem, fenykolektonurii [16]. Oprócz wykorzystania zjawiska polimorfizmu restrykcyjnego pojawiła się również diagnostyczna metoda, oparta na metodzie Southerna, hybrydyzacji syntetycznych oligonukleotydów, komplementarnych do krótkiego odcinka genu różniącego osobnika chorego od zdrowego. Hybrydyzację prowadzi się w takich warunkach, że do powstania radioaktywnego kompleksu oligonukleotydu z genem dochodzi jedynie przy pełnej komplementarności sekwencji; nawet punktowa mutacja, zmiana jednego nukleotydu w zapisie genetycznym, uniemożliwia powstanie kompleksu. Metoda ta, zastosowana w przypadku anemii sierpowatej pozwala na rozróżnienie osobników: chorego, nosiciela cechy i zdrowego.

Istnieją również sondy genowe, dzięki którym można zdefiniować choroby związane z brakiem hormonu wzrostu, niektóre kolagenozy, syndrom Lesch-Nyhana. Postawienie takiej diagnozy może być wskazaniem do usunięcia ciąży, może to pomóc w szybkim leczeniu objawowym chorób genetycznych, rozpoczynanym już w okresie płodowym.

Zjawisko polimorfizmu restrykcyjnego doprowadziło do sensacyjnego, choć tylko częściowego rozwiązania problemu genetycznego podłoża choroby zwanej płasawicą Huntingtona. Beznadziejnego kiedyś, ponieważ do dziś nie jest znany gen, którego uszkodzenie leży u podłoża choroby. Atakuje ona układ nerwowo-motoryczny, pierwsze objawy występują zazwyczaj ok. 40 roku życia i pogłębiają się przez następne 20 lat, prowadząc do śmierci chorego. Choroba dziedziczona jest jako cecha dominująca, a więc dziecko, którego jeden z rodziców jest chory, ma 50% szans być zdrowe. Analiza restrykcyjna DNA pobranego od 570 ludzi [17], zamieszkujących izolowaną od świata wioskę w Wenezueli (pierwszy przypadek płasawicy odnotowano tam w 1880 r.), w której kilkuset mieszkańców jest chorych, a ponad 1000 dzieci potencjalnie może zachorować w przyszłości, ujawniła region polimorfizmu genomowego zlokalizowany w chromosomie 4, korelujący z wy-

stąpieniem objawów płasawicy. Region ten potencjalnie kodować może około 100 białek, ocenia się, że za kilka lat zostanie zidentyfikowany uszkodzony gen. Podobną metodę próbuje się obecnie zastosować do poszukiwania uszkodzonych genów w mukowiscydozie, dystrofii mięśniowej, chorobie Parkinsona i depresji maniakalnej.

Genetyczna diagnostyka prenatalna na podstawie metod rekombinacji DNA *in vitro* prowadzona już jest w kilku ośrodkach klinicznych w USA. Metody rekombinacji doprowadziły do szybkiego postępu w dziedzinie diagnostyki chorób genetycznych. Dość odległą w czasie wydaje się jednak perspektywa terapii genowej, na razie można ją sobie wyobrazić jedynie w odniesieniu do chorób jednogenowych. Terapia taka mogłaby dotyczyć naprawy uszkodzonego genu w komórkach somatycznych chorego, bez zmiany jego genotypu, lub też naprawy genu we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego, co oznaczałoby zmianę genotypu. Do obu tych wersji istnieją już zwierzęce, modelowe układy doświadczalne. Polegają one na wprowadzaniu zrekombinowanego DNA do komórek ssaków metodami transdukcji, transfekcji lub mikrowstrzyknięć. We wszystkich badanych przypadkach wprowadzony do komórki gen może integrować z genomem lub pozostawać w formie episomalnej, zawsze występuje w wielu kopiach, a miejsce integracji, które może poważnie wpływać na poziom ekspresji genu nie jest eksperymentalnie kontrolowane. Kandydatami do tego typu terapii byłyby jak narazie choroby, w których regulacja ekspresji genu nie jest czynnikiem kluczowym i decydującym o ich pojawieniu się. Wykluczałoby to stosowanie terapii w chorobach krwi związanych z poziomem ekspresji genów globin.

Alternatywną metodą wprowadzania genów będzie być może nowy system wektorów oparty na odpowiednio przekonstruowanych, replikacyjnie defektywnych, retrowirusach. Udało się np. wprowadzić za pośrednictwem takiego wektora gen fosforybozylotransferazy guanylowej (FRTG) do hodowanych *in vitro* komórek pobranych od chorego na syndrom Lesch-Nyhana (w chorobie tej brak jest wspomnianego enzymu). Gen FRTG dołączony do promotorowej sekwencji LTR wirusa ulegał w komórkach prawidłowej ekspresji. Jeżeli omówione uprzednio metody wprowadzania genów prowadzą do transformacji jednej na 100 komórek, to wektor retrowirusowy wchodzi do każdej komórki. Jednakże system ten wymaga dalszych wnikliwych badań nim zostanie zastosowany w praktyce klinicznej, ze względu na to, że naturalnie występujące retrowirusy są wirusami onkogennymi, a sekwencje LTR uczestniczą w niektórych przypadkach w aktywacji protoonkogenów komórkowych.

Modelem terapii genowej dokonywanej przed pierwszymi podziałami zapłodnionej komórki jajowej są próby konstrukcji zwierząt transgeniczných: *Drosophila* i myszy po wstrzyknięciu do takiej komórki genu hormonu wzrostu szczura [18], człowieka [19], kurzej transferyny [20] oraz genem lekkiego łańcucha immunoglobulin klasy kappa [21]. Jedynie w dwu ostatnich przypadkach obserwowana była, w potomstwie zwierząt transgeniczných, czę-

ściowa specyficzność tkankowa ekspresji obcych genów (transferyny w wątrobie, a immunoglobuliny w śledzionie) związana prawdopodobnie z jednoczesnym wprowadzeniem z klonowanym genem specyficznych sekwencji regulacyjnych: promotora i sekwencji wzmacniającej (ang. enhancer).

4. PERSPEKTYWY STOSOWANIA METOD REKOMBINACJI DNA *IN VITRO* DO CELÓW PRAKTYCZNYCH W ROLNICTWIE

Przytoczone tu przykłady praktycznych zastosowań biotechnologicznych, opartych o rozwój metod rekombinacji DNA *in vitro* opisywały doświadczenia prowadzone w modelowych układach mikroorganizmów i zwierząt. Techniki rekombinacji wkraczają dopiero do świata roślin, tym niemniej ostatnie lata przyniosły duży postęp i w tej dziedzinie, pozwalając na oczekiwanie bliskich skutków praktycznych.

Trudności, które tutaj spotkały biologów molekularnych były olbrzymie. Biochemia i genetyka roślin jest mniej rozwinięta niż zwierząt, a tym bardziej mikroorganizmów. Cykl rozwojowy roślin jest bardziej skomplikowany, a różnicowanie ekspresji genów w zależności od rodzaju tkanki i etapu życia osobnika złożone. Wiedza o genotypach i genach warunkujących istotne cechy życiowe jest mało zaawansowana. Brakuje modelowych układów wprowadzania obcych genów do komórek roślinnych. Wyraźny postęp w tej dziedzinie umożliwiło opracowanie metod uzyskiwania protoplastów roślinnych, wydajnych i niezawodnych metod hodowli komórek roślinnych *in vitro* i na koniec, w przypadku niektórych roślin (tytoń, petunia, marchew, bawełna), opanowanie technik regeneracji całych roślin z pojedynczych komórek hodowli. Drugim przełomem stało się wyjaśnienie mechanizmów powstawania nowotworowej choroby roślin dwuliściennych zwanej chorobą gallusową (ang. crown gall). Jeszcze w 1907 roku amerykańscy badacze stwierdzili, że czynnikiem zakaźnym w chorobie gallusowej są glebowe bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Zakażają one rośliny zranione na granicy korzenia i łodygi. W tym rejonie pojawia się szybko rosnące zgrubienie, narośl. Po kilku dniach wśród komórek narośli nie znajduje się już bakterii. 40 lat później udało się przenieść komórki gallusowe do syntetycznej pożywki i w warunkach sterylnych hodować je dalej. Czynnikiem powodujący chorobę towarzyszył dalej hodowli, mimo że nie było już w niej bakterii. Taka hodowla różniła się tym od hodowli komórek zdrowych, że nie trzeba było dodać do pożywki hormonów roślinnych — auksyn i cytokinin. W 1960 roku stwierdzono, że komórki narośli hodowane *in vitro* syntetyzują związki chemiczne, pochodne aminokwasów, oktopinę i nopalinę, nie występujące w zdrowych tkankach. Rodzaj takiej pochodnej zależy od szczepu *A. tumefaciens*, który pierwotnie zakażył roślinę. To odkrycie pozwoliło wyrazić przypuszczenie, że bakterie wprowadziły do komórki roślinnej geny warunkujące syntezę oktopiny bądź

nopaliny. W 1974 roku uczeni belgijscy udowodnili, że *A. tumefaciens* ma plazmid Ti (ang. tumor inducing), który przekazuje komórkom roślinnym. Fragment tego plazmidu ulega integracji z chromosomem, jest to fragment kodujący kilka białek. Nie wszystkie wchodzące w jego skład geny zostały do dziś poznane, na pewno są to między innymi geny warunkujące syntezę oktopiny lub nopaliny oraz geny powodujące transformację nowotworową komórek gospodarza [22].

Należy przypuszczać, że od wielu tysięcy lat bakterie glebowe wykonywały w roślinach zabiegi, które od paru lat nazywamy rekombinacją DNA *in vitro*. Za pośrednictwem plazmidowego wektora wprowadzany był bakteryjny DNA do chromosomów komórek organizmów wyższych. Niezależny od fitohormonów, nowotworowy wzrost komórek transformowanych plazmidem Ti można formalnie porównać z dawkowaniem przez komórki nowotworowe cytokinin i auksyn w określonej proporcji. Mutacje zachodzące w różnych regionach plazmidu Ti „wyłączają” efekty typu cytokinin lub auksyn, a więc o nowotworowym charakterze komórek decyduje na pewno kilka genów. Ekspresja tych genów uniemożliwia regenerację całych roślin z komórek gallusowych.

Aby opisany układ mógł stać się systemem kontrolowanych modyfikacji genetycznych roślin należało: 1) tak przekonstrować plazmid Ti, aby był nadal wprowadzany przez *A. tumefaciens* do zakażonych komórek roślinnych, ale nie powodował w nich wzrostu typu nowotworowego; 2) do tego wektora, a raczej do jego sekwencji Ti mającej cechy transpozonu, dołączyć obcy gen i udowodnić, że gen ten ulega ekspresji w transformowanych komórkach roślinnych; 3) z transformowanych plazmidem Ti komórek regenerować roślinę, upewniając się, czy obcy gen pojawił się w nasionach i czy uzyskano genetycznie zmodyfikowaną roślinę. Program taki jest bardzo bliski wykonania. Istnieją już plazmidy Ti z inaktywowanym regionem odpowiedzialnym za transformację nowotworową. Do sekwencji integrowanej dołączono obce geny, na razie geny oporności na antybiotyki, pochodzące z *E. coli*, ale połączone z sekwencjami sygnałowymi syntetazy nopaliny, która jest białkiem synetyzowanym przez *A. tumefaciens*. Transformowane takim plazmidem protoplasty roślinne (petunia, tytoń) uzyskują oporność na selekcyjny antybiotyk. Geny z *E. coli* ulegają w nich transkrypcji do prawidłowego mRNA. Jednakże w protoplastach nie udało się wykazać obecności odpowiednich enzymów kodowanych przez geny *E. coli* [23]. W przypadku transformacji protoplastów tytoniu genem oporności na kanamycynę udało się regeneracja z nich całych roślin. W dostępnym mi źródle literaturowym z końca 1983 roku stwierdzono, że rośliny te jeszcze nie wytworzyły nasion. Dalszy ciąg doświadczeń nie jest mi znany.

Niezależnie od tego czy w opisanym przypadku udało się wykazać, trwałą genetyczną modyfikację tytoniu czy nie, jest oczywiste, że udane doświadczenie zostanie dokonane w najbliższym czasie, ponieważ jego elementy są już gotowe i metody w zasadzie opracowane. Pozostaje już tylko (?)

wybrać odpowiednie geny do transformacji, geny które człowiek uzna za pożyteczne i powtórzyć te same zabiegi jak w przypadku wprowadzania genu oporności na kanamycynę. Mogą to być geny podwyższające plon, zmieniające syntetyzowane przez roślinę substancje (białka), geny warunkujące syntezę nowych substancji, geny oporności na suszę, mróz, herbicydy, choroby wirusowe i inne. Istotne staje się również opracowanie warunków regeneracji roślin z pojedynczych komórek, co wciąż jeszcze udaje się z niewielu gatunkami.

Otwarty pozostaje problem manipulacji genetycznych w obrębie roślin jednoliściennych, do których należą m.in. wszystkie zboża, które nie ulegają zakażeniom przez *A. tumefaciens*. W tej dziedzinie upatruje się możliwości w wykorzystaniu ruchomych elementów genetycznych jako wektorów, ale jest to na razie technika pozostająca we wstępnej fazie prób laboratoryjnych. Podobne nadzieje budzą próby rozszerzenia spektrum bakterii symbiotycznych z różnymi roślinami oraz ich modyfikacje genetyczne, między innymi dotyczy to systemu asymilacji azotu atmosferycznego.

5. ZAKOŃCZENIE

Wybór opisanych przykładów zastosowania rekombinacji DNA *in vitro* do celów praktycznych został dokonany arbitralnie, nie omówiono tak ważnych dziedzin, jak modyfikacje mikroorganizmów wykorzystywanych w procesach: fermentacji, utylizacji biomasy (celuloza, ligniny), uzyskiwania nowych źródeł energii, hutowania metali ze złóż i ich odzysku ze ścieków przemysłowych, wydobywania ropy naftowej i innych. We wszystkich tych dziedzinach zrekombinowany DNA stosowany jest coraz częściej. Warto pamiętać, że stosowanie metody rekombinacji *in vitro* stało się rutynowe we współczesnych laboratoriach biochemicznych, a przenoszenie fragmentów genomów i genów między niektórymi gatunkami mikroorganizmów zabiegami trywialnymi. Jednakże nie są one trywialne zawsze, nawet w świecie mikroorganizmów, o czym przekonali się badacze usiłujący wymiennie klonować geny *E. coli* i *Bacillus subtilis* lub *E. coli* i *S. cerevisiae*. O napotkanych trudnościach decydował charakter swoistych elementów regulatorowych genomów różnych gatunków, a nie struktura samych genów. Jeszcze trudniejsze stały się próby klonowania genów eukariotycznych zarówno w prokariotach jak i w eukariotach. Geny eukariotyczne mają złożoną budowę, procesy transkrypcji i translacji przebiegają różnie i są różnie regulowane w tych dwu światach istot żywych, a całość jeszcze komplikuje się z powodu różnicowania komórek i tkanek. Nie do końca poznane są ciągi wielogenowych procesów metabolicznych, rola wielorządowych struktur spoczynkowych i czynnych aparatu genetycznego. Stąd, np. niejasna jest zależność aktywności genu od jego pozycji w chromosomie, a tej na razie, w procesie klonowania nie umiemy kontrolować.

Te wszystkie trudności i ograniczenia sprawiają, że o ile już obecnie szybko rośnie liczba przykładów zastosowania technik rekombinacji DNA *in vitro* w konstruowaniu użytecznych mikroorganizmów, o tyle na kontrolowaną ingerencję badawczą w genotyp wyższych organizmów celem ulepszenia ich cech użytkowych trzeba będzie jeszcze poczekać. Postępy badawcze ostatnich lat pozwalają jednak mieć nadzieję, że jest to perspektywa realna i nie-
zbyt odległa.

LITERATURA

- [1] Ensley B. D., Ratzkin B. J., Osslund T. D., Simon M. J., Wackett L. P., Gibson D. T. — *Expression of naphthalene oxidation genes in Escherichia coli results in the biosynthesis of indigo*. Science 222: 167-169, 1983.
- [2] Weismann C. — *The cloning of interferon and other mistakes*. W: *Interferon*. I. Gressler (red.), Academic Press, London-Orlando-San Diego-San Francisco-N. York-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo-São Paulõ, t. 3: 101-134, 1981.
- [3] Nagata S., Taira H., Hall A., Johnsrud L., Streuli M., Escödi J., Boll W., Cantell K., Weissmann C. — *Synthesis in Escherichia coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity*. Nature 284: 316-320, 1980.
- [4] Goeddel D. V., Yelverton E., Ullrich A., Heyneker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J. M., Gross M., Familletti P. C., Pestka S. — *Human leukocyte interferon produced by Escherichia coli is biologically active*. Nature 287: 411-417, 1980.
- [5] Windass J. D., Newton C. R., Demayer-Guignard J., Moore V. E., Markham A. F., Edge H. D. — *The construction of a synthetic interferon gene*. Nucl. Acids Res. 10: 6639-6658, 1982.
- [6] Remaut E., Stanssens P., Fiers W. — *Inducible high level synthesis of mature human fibroblast interferon in Escherichia coli*. Nucl. Acids Res. 11: 4677-4688- 1983.
- [7] Fish E. N., Banerjee K., Stebbing N. — *Human leukocyte interferon subtypes have different antiproliferative and antiviral activities on human cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 537-546, 1983.
- [8] Editorial — *Cetus-Shell venture launches clinical trials of 2-cysteine interferon*. McGraw-Hill's Biotechnology Newswatch, 3, Nr 11: 1-2, 1983.
- [9] Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. — *Total synthesis of a human leukocyte interferon gene*. Nature 292: 756-762, 1981.
- [10] Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Moore V. E., Faulkner N. J., Camble R., Peter N. N., Trueman P., Schuch W., Hennam J., Atkinson T. C., Newton C. R., Makham A. F. — *Chemical synthesis of a human interferon alpha 2 gene and its expression in Escherichia coli*. Nucl. Acids Res. 11: 6419-6436, 1983.
- [11] Tuite M. J., Roberts N. A., King R. M., Burke D. C., Kingsman S. M., Kingsman A. J. — *Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in S. cerevisiae*. EMBO J. 1: 603-608, 1982.
- [12] Canaani D., Berg P. — *Regulated expression of human interferon beta gene after transduction into cultured mouse and rabbit cells*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79: 5166-5170, 1982.
- [13] Zinn K., DiMaio D., Maniatis T. — *Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta interferon gene*. Cell 34: 865-879, 1983.

- [14] Inglot A. D. — *Interferon w terapii chorób wirusowych, nowotworowych i immunologicznych.*
- [15] Merrigan T. C. — *Present Appraisal of and future hopes for the clinical utilization of human interferones.* W: *Interferon.* I. Gressler (red.), Academic Press, London-Orlando-Sand Diego-San Francisco-N. York-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo-São Paulõ, t. 3: 135-154, 1981.
- [16] Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guttler F., Chandra T., Rolson F. J. H. — *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria.* *Nature* 306: 151-156, 1983.
- [17] Gusellow J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tauzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Yong A. B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J. B. — *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.* *Nature* 306: 234-238, 1983.
- [18] Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammler R. E., Crumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C., Evans R. M. — *Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion gene.* *Nature* 300: 611-615, 1982.
- [19] Palmiter R. D., Norstedt G., Gelinas R. E., Hammer R. E., Brinster R. L. — *Methallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice.* *Science* 222: 809-814, 1983.
- [20] McKnigh G. S., Hammer R. E., Kuenzel E. A., Brinster R. L. — *Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice.* *Cell* 34: 335-341, 1983.
- [21] Brinster R. L., Ritchie K. A., Hammer R. E., O'Brien R. L., Arp B., Storb V. — *Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice.* *Nature* 306: 332-336, 1983.
- [22] Caplan A., Herrera-Estrella L., Inze D., Van Haute E., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. — *Introduction of genetic material into plant cells.* *Science* 222: 815-821, 1983.
- [23] Fraley R. T., Sephen G. R., Horsch R. B., Sauders P. R., Flick J. S., Adams S. P., Bittner M. L., Brand L. A., Fink C. L., Fry J. S., Galluppi G. R., Goldberg S. B., Hoffmann N. L., Woo S. C. — *Expression of bacterial genes in plant cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807, 1983.

ZBIGNIEW LORKIEWICZ

Instytut Mikrobiologii UMCS

Lublin

ZASTOSOWANIE INŻYNIERII GENETYCZNEJ W HODOWLI ROŚLIN

Głównym celem hodowli roślin jest zwiększenie wydajności zbiorów roślin uprawnych, poprawa ich wartości odżywczej, tolerancji klimatycznej i oporności na zakażenia. Jeszcze bardziej ambitnym celem byłoby uniezależnienie uprawy roślin od kosztownych nawozów [7]. Perspektywa realizacji tych zamierzeń staje się coraz bardziej realna w związku z gwałtownym rozwojem technik inżynierii genetycznej, które coraz szerzej są stosowane w genetyce i hodowli roślin. Ilość białka roślinnego a pośrednio i zwierzęcego zależy w dużej mierze od żyzności gleby. Z kolei żyzność gleby jest zależna od ilości oraz formy związków azotowych dostępnych roślinom. Duże nadzieje pokładano w rozwoju produkcji roślinnej przez intensywniejsze stosowanie nawozów azotowych. Widoczne są pozytywne rezultaty tego w krajach rozwiniętych, o wysokiej kulturze rolnej. Nie dało to jednak pożądanego efektów w skali światowej, ponieważ produkcja nawozów chemicznych pochłania duże ilości energii. Poza tym produkcja nawozów wymaga rozwiniętego przemysłu, znacznych nakładów inwestycyjnych i przede wszystkim transportu. Wiele krajów nie jest zatem przygotowanych do rozpoczęcia i utrzymania produkcji nawozów azotowych na odpowiednim poziomie. Z drugiej strony wytwarzanie i stosowanie nawozów sztucznych stanowi zagrożenie dla środowiska. Zakłady wytwarzające nawozy azotowe silnie zanieczyszczają otoczenie [12]. Innym zagadnieniem są straty nawozów wprowadzanych do gleby, tylko część soli amonowych rozproszonych w glebie przechodzi do roślin. Ponad połowa jest utleniana do azotynów i azotanów, które są wypłukiwane do jezior i rzek, zanieczyszczając je. Powoduje to eutrofizację wód, a duże stężenie azotynów i azotanów w wodzie pitnej jest szkodliwe dla człowieka [1]. Problemy demograficzne i rolnicze, zanieczyszczenie środowiska i konieczność oszczędzania energii spowodowały, że uwaga wielu badaczy skoncentrowała się na możliwości rozwiązania problemu braku białka w inny sposób.

Jest zapewne zjawiskiem paradoksalnym, że ludzkość od dawna odczuwa skutki niedoboru związków azotowych (białka), podczas gdy w powietrzu znajdują się zapasy azotu. Azot atmosferyczny nie jest bezpośrednio wykorzystywany przez organizmy wyższe, jedynie niektóre drobnoustroje są zdolne

do wiązania azotu atmosferycznego. Mimo intensywnego rozwoju produkcji nawozów azotowych drobnoustroje wiążą nadal więcej azotu od ilości azotu wprowadzanego do gleby w postaci nawozów [10].

Na terenach, gdzie nie stosuje się nawozów mineralnych drobnoustroje zaopatrują rośliny w azot, stale uzupełniając zapasy w glebie tego niezbędnego składnika dla życia roślin. Jest znanych wiele grup drobnoustrojów zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego. Są to glebowe bakterie wolnożyjące (np. *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter*, *Clostridium pasteurianum*), bakterie żyjące w asocjacji czyli luźnym związku z roślinami (np. *Azospirillum*), a także bakterie *Rhizobium* tworzące wyspecjalizowane układy symbiotyczne z roślinami motylkowatymi. Dużą rolę w wiązaniu azotu odgrywają również sinice.

Symbioza *Rhizobium*-roślina motylkowata jest interesującym procesem zarówno z punktu widzenia rolnictwa, jak również dla tych, którzy badają podstawowe procesy wiązania N_2 . Pewne rośliny motylkowate mogą być zakażane przez specyficzne gatunki *Rhizobium*, które tworząc brodawki korzeniowe są zdolne do wiązania N_2 , eliminując tym samym konieczność stosowania nawozów azotowych [5]. Ilości azotu wprowadzonego do gleby w układzie symbiotycznym *Rhizobium*-rośliny motylkowate są duże i w przypadku lucerny, współżyjącej z bakteriami brodawkowymi, dochodzą do 300 kg N_2 /ha/rok. Dla porównania warto podać, że w Polsce stosujemy mineralne nawozy azotowe w ilości odpowiadającej 80 kg/ha/rok.

Dzięki lepszemu poznaniu mechanizmu wiązania N_2 oraz zastosowaniu nowoczesnych metod genetyki i biologii molekularnej możliwe jest otrzymanie szczepów bakterii intensywniej wiążących N_2 . Uzyskany w ten sposób wzrost plonów roślin motylkowatych zwiększyłby nie tylko ilość białkowej karmy dla zwierząt, mogłoby to mieć również bezpośrednie znaczenie dla człowieka, jeśli uwzględnimy doniesienia o opracowanych metodach preparowania z lucerny oraz innych roślin motylkowatych białka odpowiedniego do spożycia przez człowieka.

Zwiększenie biologicznego wiązania azotu miałoby zatem doniosłe znaczenie gospodarcze. Nasuwa się jednak pytanie czy intensywne zużywanie azotu atmosferycznego nie zaburzy równowagi w przyrodzie? Czy nie dojdzie do nieodwracalnych zmian w składzie powietrza atmosferycznego? Obawy te są chyba jednak nieuzasadnione. Powietrze atmosferyczne nad każdym km^2 powierzchni Ziemi zawiera 7 500 000 ton N_2 . Czyli obecnie do produkcji nawozów azotowych zużywamy rocznie na kuli ziemskiej azot z powierzchni $10 km^2$.

Region nif kontrolujący wiązanie azotu został szczegółowo zanalizowany w jednej z bakterii glebowych *Klebsiella*, wiążących azot w stanie wolnym (bez udziału rośliny). Zawiera on 8 operonów obejmujących 17 genów [8]. Nie została jednak dotychczas wyjaśniona genetyczna kontrola symbiotycznego wiązania N_2 . Zjawisko to składa się z 2 głównych etapów: brodawkowania i wiązania N_2 . Brodawkowanie — wstępny etap symbiozy roślin motylkowa-

tych z *Rhizobium* — obejmuje kilka złożonych, kolejno zachodzących procesów: a) rozpoznanie odpowiednich roślin przez bakterie, b) penetrację *Rhizobium* do tkanki korzeniowej, c) tworzenie brodawek.

Brodawka korzeniowa jest efektem oddziaływania dwóch genomów — roślinnego i bakteryjnego. Bakterie brodawkowe przenikają do tkanki korzeniowej rośliny motylkowatej. Następnie zmieniają się morfologicznie przechodząc w bakteroidy, w których region *nif* ulega derepresji, po czym zaczynają syntetyzować nitrogenazę katalizującą redukcję azotu. W tym samym czasie zachodzą istotne zmiany w roślinie, wyrażające się m.in. proliferacją komórek korzenia, prowadzącą do wytworzenia brodawki.

Ważnym produktem rośliny brodawkującej jest leghemoglobina, która chroni nitrogenazę przed inaktywacją tlenem. Jakkolwiek leghemoglobina jest konieczna jednak nie jest wystarczająca dla rozpoczęcia wiązania N_2 w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych. Mniej więcej w 10 dni po zakażeniu pojawiają się w brodawkach specyficzne białka noduliny, nie wykrywane normalnie w korzeniu rośliny. Jest ich około 20. Biorą one udział w wiązaniu azotu. Jednak funkcje poszczególnych nodulin nie zostały jeszcze wyjaśnione, z wyjątkiem noduliny-35, która jest oksydazą moczanową (urykaza II). W brodawkach fasoli wykazano obecność syntetazy glutaminowej, swoistej dla brodawek [14].

Verma i wspópr. [14] wyizolowali z brodawek korzeniowych soi informacyjny RNA (mRNA) dla nodulin. Po skopiowaniu przez enzym, odwrotną transkryptazę mRNA, uzyskali 4 geny dla nodulin soi. Stwierdzili, że geny te nie są sprzężone z regionem kodującym leghemoglobinę. Region leghemoglobiny składa się z kilku genów strukturalnych, które są rozdzielone dwoma roślinnymi genami nieleghemoglobinowymi. Leghemoglobina jest ilościowo przeważającym białkiem w procesie symbiotycznego wiązania azotu. W brodawkach soi zawartość mRNA leghemoglobinowego sięga 20% wszystkich brodawkowych mRNA.

Podstawy molekularne tworzenia brodawek na roślinach motylkowatych nie zostały dotychczas wyjaśnione. W licznych pracach wykazano, że geny kontrolujące proces brodawkowania *Rhizobium* i region *nif* występują poza chromosomem, w plazmidach. Plazmidy są kolistymi cząsteczkami DNA, występującymi w cytoplazmie bakterii, mogą zawierać geny kontrolujące różne cechy. Plazmidy *Rhizobium* odpowiedzialne za procesy symbiotyczne są bardzo duże (200-400 Mdal) i trudne do badania. Posługując się technikami rekombinacji *in vitro*, w ostatnich latach wyklonowano (wyosobniono) region odpowiedzialny za brodawkowanie i wiązanie azotu z różnych gatunków *Rhizobium* [9] i przeniesiono go po włączeniu do małych plazmidów wektorowych do innych gospodarzy bakteryjnych. W naszym laboratorium wyklonowaliśmy gen *Roa* z *Rhizobium trifolii*, kontrolujący przyłączanie się bakterii do włóśników korzeniowych koniczyny [11].

Badania regionu odpowiedzialnego za wiązanie azotu w *Klebsiella pneumoniae* są daleko bardziej zaawansowane [8]; poznano nie tylko wszystkie

geny strukturalne białek uczestniczących w wiązaniu azotu lecz także bardzo złożony proces regulacji przyswajania azotu. W ostatnich latach coraz częściej stawia się pytanie, czy nie dałoby się przenieść regionu nif do rośliny i zbierać obfite plony zbóż bez stosowania nawozów azotowych. Miałyby to bardzo istotne znaczenie ekonomiczne. Czy istnieją takie możliwości?

Ostatnio duże nadzieje wiąże się z intensywnie badaną bakterią *Agrobacterium tumefaciens*, która jest patogenna dla wielu roślin dwuliściennych i niektórych nagozalążkowych. Zakażenie roślin przez tę bakterię wiąże się z wytworzeniem na pędach roślin guzów nowotworowych (tumorów). Okazało się jednak, że wszystkie szczepy *A. tumefaciens* powodują formowanie się guzów nowotworowych. Tylko hodowle bakterii zawierających duży plazmid Ti (tumor inducing) są zdolne do wytwarzania guzów. Natomiast ten sam szczep po wyeliminowaniu plazmidu Ti nie tworzy tumorów. Plazmid Ti ma wielkość 200 kb. Opracowano mapę genetyczną tego plazmidu, korzystając z wielu mutantów wyizolowanych różnymi metodami. Oprócz genów kontrolujących formowanie guzów zawiera on geny kodujące specyficzne substancje — opiny, geny wirulencji jak i geny odpowiedzialne za przenoszenie plazmidu. Stwierdzono, że transformacja nowotworowa roślin jest związana z włączeniem fragmentu plazmidowego DNA (tzw. fragment T) *Agrobacterium tumefaciens* do jądrowego DNA rośliny [13]. Włączony fragment plazmidu Ti *A. tumefaciens*, stanowiący tylko 1/10 jego długości, może być efektywnie replikowany w genomie rośliny przez wiele lat. Geny bakteryjne zintegrowane w roślinie wytwarzają też swoiste białka bakteryjne.

Jak jest wbudowywany T DNA do DNA chromosomu rośliny? Na końcach T DNA stwierdzono występowanie powtarzających się sekwencji 25 par zasad. Również w DNA roślinnym na obu końcach miejsca insercji T DNA znajdują się podobne sekwencje. Zatem mechanizm przenoszenia T DNA przypominałby przenoszenie transpozonów [15]. Obecnie prace podążają w kierunku skonstruowania plazmidu bakteryjnego, który zawierałby fragment T plazmidu Ti *A. tumefaciens* pozbawiony genów powodujących transformację nowotworową rośliny, a wyposażony w geny korzystne dla rośliny, np. region odpowiedzialny za wiązanie azotu. Plazmid taki mógłby wnikać do tkanek roślinnych, włączać się do genomu rośliny i kierować syntezą białek niezbędnych w wiązaniu azotu. Ostatnio skonstruowano wektor zbudowany z sekwencji promotorowych syntazy nopalinowej (nopalina jest opiną). Do tegoż wektora wprowadzono kodujące sekwencje genu syntezy oktopiny — innej opiny, albo gen acetylotransferazy chloramfenikolowej. Te geny wyraziły się w komórkach roślinnych po ich przeniesieniu przy pomocy plazmidu Ti *A. tumefaciens* [6]. T DNA jest jedynym znanym fragmentem DNA, który może przenosić się z komórek prokariotycznych do eukariotycznych, replikować się tam i syntetyzować własne białka.

Od ponad 10 lat toczą się dyskusje nad kierunkami badań zmierzających do intensyfikacji biologicznego wiązania azotu.

Jakie manipulacje genetyczne można tutaj zastosować?

1. Zwiększenie liczby kopii regionu nif w *Rhizobium*, przez wprowadzenie zespołu genów nif z bakterii wiążących N_2 *in vitro*.
2. Otrzymanie mutantów bakterii wiążących azot, w których region nif nie ulegałby zablokowaniu w obecności jonów amonowych. Mutanty takie przyswajałyby azot w obecności związanego N_2 .
3. Rozszerzenie zakresu symbiotycznego wiązania N_2 na inne rośliny. Około 170 gatunków roślin niemotylkowatych, należących do 15 rodzajów wiąże N_2 przy udziale promieniowców. Proces ten był na ogół niedoceniany. Jednakże ostatnie badania wskazują, że w przypadku *Casaurina* ilość N_2 przyswojonego sięga 300 kg/ha [3]. Do niedawna panowało przekonanie, że *Rhizobium* może wiązać N_2 tylko na drodze symbiozy z roślinami motylkowatymi. Zaskoczeniem było zatem wykrycie nodulacji i wiązania N_2 przez *Rhizobium* na roślinie *Parasponia cannabina*, należącej do roślin wiązowatych. Z jednej strony próbuje się przy zastosowaniu somatycznej hybrydyzacji otrzymywać nowe typy roślin o pożądanym cechach dla rolnictwa ze zdolnością do tworzenia układu symbiotycznego wiązania azotu z *Rhizobium*, z drugiej strony próbuje się przełamać bariery specyficzności u bakterii brodawkowych.

Najbardziej fascynująca byłaby jednak próba wprowadzenia regionu nif lub jego istotnych części do genomu roślin zbożowych, łącznie z informacją konieczną do wyrażenia się wprowadzonych genów. W ten sposób roślina stałaby się niezależna od dostarczonego azotu.

Oprócz plazmidu Ti oraz jego pochodnych, próbuje się zastosować jako wektory do przenoszenia obcego DNA do roślin niektóre roślinne DNA wirusy oraz liposomy. Z kilkuset rozpoznanych grup wirusów roślinnych jedynie wirusy gemini i caulimo mają genom zbudowany z DNA. Te ostatnie wirusy, do których należy wirus mozaiki kalafiora, mają stosunkowo wąski zakres gospodarza (*Cruciferae*) w odróżnieniu od wirusów gemini, które zakażają również rośliny jednoliścienne. Wirus mozaiki kalafiora ma dwupasmowy DNA długości 8020 par zasad o znanej sekwencji. Stosując różne metody modyfikuje się wirus mozaiki kalafiora, aby mógł on służyć jako wektor DNA [7].

Poza plazmidem Ti oraz wirusem mozaiki kalafiora w inżynierii genowej u roślin mogą znaleźć zastosowanie jako wektory liposomy. Są to pęcherzyki fosfolipidowe. DNA enkapsulowane liposomami po zetknięciu się z roślinnym protoplastem przekazuje doń kwas nukleinowy. Stosując tę metodę transformowano DNA plazmidu Ti do roślinnych protoplastów. Transformowane komórki syntetyzowały oktopinę i zawierały plazmid Ti [4]. Fuzja liposomów z protoplastami roślinnymi jest stymulowana przez polikationy (np. poli-L-ornitynę), glikol polietylenowy i pewne kationy, jak Ca^{++} , Zn^{++} lub Cu^{++} .

Po transformacji pojedynczych komórek roślinnych lub protoplastów przy pomocy wektora, noszącego obcy DNA, regeneruje się całe rośliny.

Byłoby ważne, aby zmienione rośliny przenosiły obce geny przez nasiona.

Jak można wprowadzić wektorowy DNA do komórki roślinnej?

1. Przez fuzję sferoplastów bakteryjnych *Agrobacterium*, noszących wektorowy plazmid z regionem nif z roślinnymi protoplastami.
2. Przez transformację protoplastów roślinnych z częściowo regenerowaną ścianą komórkową przez normalne bakterie wiążące azot.
3. Przez transformację protoplastów roślinnych wolnym Ti DNA lub DNA enkapsulowanym w liposomach.

Wprowadzenie kilkunastu genów nif do genomu rośliny nie wystarczy, aby roślina zaczęła wiązać N_2 . Po pierwsze te geny muszą utrzymywać się stabilnie w genomie rośliny, muszą podlegać regulacji, w której bierze udział przynajmniej 5 genów roślinnych, musi zachodzić transkrypcja i translacja. Nawet jeśli to się uzyska wiele innych czynników może zniweczyć wysiłki ponieważ, np.:

1. Produkty genów strukturalnych regionu nif muszą być chronione przed tlenem.
2. Biologiczne wiązanie N_2 pochłania duże ilości energii. Czy roślina będzie w stanie ją dostarczyć?
3. Gwałtownie wzrasta zapotrzebowanie na P, Mo, Fe. Czy system pobierania i transportu tych jonów podoła temu dodatkowemu zadaniu?

Przeprowadzono ankietę wśród naukowców, zajmujących się tym zagadnieniem z pytaniem czy uważają, że region nif zostanie przeniesiony do rośliny i kiedy? Według większości badaczy w ciągu 10 lat będą skonstruowane rośliny z regionem nif. W związku z dużym znaczeniem gospodarczym tych zagadnień oraz sporą szansą uzyskania pozytywnych wyników, w wielu krajach bardzo wzrosły nakłady na te badania. Utworzono w ostatnich latach kilka nowych Centrów Badania Wiązania Azotu. Z drugiej jednak strony wielu ludzi stawia pytanie, czy te ogromne nakłady pieniężne dadzą pożądane efekty? Czy gdyby część nakładów na badania podstawowe wiązania N_2 przeznaczyć na bardziej aplikacyjne cele czy nie dałoby to lepszych efektów? Są argumenty przemawiające za takim stanowiskiem.

W Międzynarodowym Ośrodku badawczym w Dakarze w Senegalu pracuje grupa mikrobiologów pod kierownictwem francuskiego badacza Dommerguesa. Zainteresowała ich roślina motylkowata *Sesbania rostrata*, rosnąca w klimacie tropikalnym oraz szczepy *Rhizobium* wiążące azot na drodze symbiozy z *Sesbania*. Ten system symbiotycznego wiązania N_2 jest bardziej efektywny, bije rekordy w tej dziedzinie osiągając 200 kg N_2 /ha w ciągu 50 dni. Jaka jest tego przyczyna? Zapewne sprzyjające warunki klimatyczne, lecz głównie fakt, że brodawki występują nie tylko na korzeniach ale również na łodydze *Sesbania*. W odróżnieniu od dotychczas poznanych szybko rosnących *Rhizobium*, bakterie izolowane z *Sesbania rostrata* wiążą N_2 *in vitro*. Próbowano wykorzystać tę roślinę jako zielony

nawóz do celów praktycznych. Na doświadczalnych polach uzyskano wzrost produkcji ryżu z 2 t z ha do 6 t z ha. Badania te zostały potwierdzone w doświadczeniach na dużą skalę. Można było zwiększyć zbiory ryżu do 4-6 t z ha bez używania nawozów azotowych. Ryż jest podstawą wyżywienia 3 mld ludzi trzeciego świata. Wyniki badań Dommerguesa mogą mieć zatem istotne znaczenie dla poprawy stanu wyżywienia krajów rozwijających się.

Przy zastosowaniu nowych metod molekularnych można będzie otrzymać zmienione, bardziej użyteczne odmiany roślin. W badaniach tych odmian trzeba będzie jednak zastosować konwencjonalne metody stosowane w hodowli roślin. Czyli czas potrzebny dla otrzymania pożądaných odmian przy zastosowaniu metod inżynierii genetycznej można będzie jedynie nieco skrócić, ponieważ nie będą potrzebne krzyżówki wsteczne dla wyeliminowania niepożądanych genów, dziedziczonych w normalnych krzyżówkach.

Istnieją możliwości wprowadzenia odpowiednich genów kontrolujących odporność na choroby zakaźne czy herbicydy, warunkujące produkcję nowych związków, czy zmodyfikowanych produktów jak białka roślinne o zwiększonej zawartości lizyny. Trudno jest przewidzieć czy będzie możliwe otrzymanie roślin niezależnych od dostawy azotu związanego i dających plony porównywalne do upraw nawożonych [2]. Znaczne postępy w tej dziedzinie, osiągnięte w ostatnich latach, wskazują jednak, że ten niezmiernie trudny cel może być osiągnięty w niezbyt odległej przyszłości.

LITERATURA

- [1] Arrhenius E. — *Nitrogen a special issue*. Ambio (Stockholm) 6: 95-182, 1977.
- [2] Beringer J. E. — *The application of molecular genetics in agriculture*. W: *Advances in nitrogen fixation research*. str. 3-6. C. Veeger i W. E. Newton (red.), Nijhoff i Junk. The Hague, 1984.
- [3] Dommergues Y. R., Diem H. G., Gauthier D. L., Dreyfus B. L., Cornet F. — *Nitrogen fixing trees in the tropic: potentialities and limitations*. W: *Advances in nitrogen fixation research*. str. 7-13. C. Veeger i W. E. Newton (red.), Nijhoff i Junk. The Hague, 1984.
- [4] Fraley R., Papahadjopoulos D. — *Liposomes: the development of a new carrier system for introducing nucleic acids into plant and animal cells*. W: *Current topics in microbiology and immunology. Gene cloning in organisms other than E. coli*. str. 171-191. P. H. Hofschneider i W. Goebel (red.), Springer, Berlin, 1982.
- [5] Hardy R. W. F. — *Increasing crop productivity: agronomic and economic considerations on the role of biological nitrogen fixation*. W: *Report of the public meeting on genetic engineering for nitrogen fixation*. str. 77-106. A. Hollaender (red.), National Science Foundation, Washington, 1977.
- [6] Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. — *Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector*. Nature 303: 209-213, 1983.
- [7] Hohn T., Richards K., Lebeurier G. — *Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector*. W: *Current Topics in Microbiology and Immunology*.

- Gene cloning in organisms other than E. coli.* str. 194-236. P. H. Hofschneider i W. Goebel (red.), Springer, Berlin, 1982.
- [8] Kennedy C., Cannon F., Cannon M., Dixon R., Hill S., Jensen J., Kumar S., MacLean P., Merrick M., Robson R., Postgate J. — *Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation.* W: *Current Perspectives in nitrogen fixation.* str. 148-156. A. H. Gibson, W. E. Newton (red.), Australian Acad. of Science, Canberra, 1981.
- [9] Long S. R., Buikema W. J., Ausubel F. M. — *Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants.* Nature 298: 485-488, 1982.
- [10] Lorkiewicz Z., Skorupska A. — *Biologiczne wiązanie azotu.* Post. Mikrobiol. 21: 7-31, 1982.
- [11] Lorkiewicz Z., Skorupska A., Deryło M., Głowacka M., Goszczyński D. — *Cloning of Rhizobium trifolii genes.* W: *Advances in nitrogen fixation Research.* str. 6-90. C. Veeger i W. E. Newton (red.), Nijhoff i Junk, The Hague, 1984.
- [12] Postgate J. R. — *Prospects of the exploitation of biological nitrogen fixation.* Phil. Trans. R. Soc. Lond. B209: 421-425, 1980.
- [13] Schell J., Van Montagu M. — *On the transfer and expression of prokaryotic DNA in plant cells transformed by A. tumefaciens.* W: *Integration and excission of DNA molecules.* str. 127-134. P. Hofschneider i P. Starlinger (red.), Springer Verlag, Berlin, 1978.
- [14] Verma D. P. S., Lee J., Fuller F., Bergmann H. — *Leghemoglobin and nodulin genes: two major groups of host genes, involved in symbiotic nitrogen fixation.* W: *Advances in nitrogen fixation Research.* str. 557-564. C. Veeger i W. E. Newton (red.), Nijhoff i Junk, The Hague, 1984.
- [15] Zambryski P., Holsters M., Kruger K., Depicker A., Schell J., Van Montagu M., Goodman H. M. — *Tumor DNA structure in plant cells transformed by A. tumefaciens.*

JAN CYBIS

Instytut Biochemii i Biofizyki

PAN, Warszawa

TRANSFORMACJA U GRZYBÓW

WPROWADZENIE

Grzyby stanowią ważną zarówno ze względów gospodarczych, jak i czysto poznawczych, grupę organizmów. Nawet jeżeli nie jesteśmy miłośnikami grzybobrania, trudno byłoby wyobrazić sobie normalne życie bez takich produktów jak pieczywo czy napoje, których wytwarzanie wymaga udziału drożdży. Lista wyrobów i półproduktów przemysłu spożywczego, uzyskiwanych dzięki aktywności fermentacyjnej grzybów jest długa. Na przykład kwas cytrynowy, uzyskiwany głównie z kropidlaka, *Aspergillus niger*, stanowi światowy rynek wartości 360 milionów dolarów. Dla pełniejszej oceny znaczenia ekonomicznego grzybów należałoby uwzględnić oczywiście też antybiotyki i inne produkty farmaceutyczne. Wreszcie nie można pominąć znaczenia szkodliwych efektów wszechobecności grzybów; chęć uniknięcia strat też była i nadal pozostaje motywem ich lepszego poznawania. Można tutaj wspomnieć, że aflatoksyny, tworzące się wskutek obecności kropidlaków, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* w paszach, są przyczyną ponad 5% strat w fermach drobiarskich.

Z tych i innych względów grzyby cieszyły się zainteresowaniem biologów od wielu lat, a od mniej więcej pół wieku zajęli się nimi genetycy. Biologiczne właściwości grzybów, takie jak haploidalność, krótki cykl życiowy, zdolność do wzrostu na ściśle zdefiniowanym chemicznie podłożu oraz możliwość krzyżowania szczepów w procesie płciowym uczyniły z kilku gatunków popularne organizmy modelowe. Na drożdżach, *Saccharomyces cerevisiae*, pleśni, *Neurospora crassa* i kropidlaku, *Aspergillus nidulans*, poznawano wiele prawidłowości procesów dziedziczenia, mutagenezy, oraz sterowania metabolizmem przez geny. Selekcja mutantów u tych grzybów i ich mapowanie doprowadziły do skonstruowania szczegółowych map chromosomowych. Mapy te, oparte na skali mejotycznych jednostek mapowych są obecnie korelowane z mapami fizycznych odległości w tysiącach par nukleotydów DNA (kz). Niewielkie rozmiary genomów grzybów łączą się z trudnościami, na jakie napotymano, próbując uwidocznic ich jeszcze mniejsze chromosomy. Obecnie, dla badań na poziomie molekularnym, jest to zaletą, że genom drożdży, wielkości 9×10^9 daltonów albo 14000 kz jest tylko 3,5 razy większy od genomu

pałeczki jelitowej, *Escherichia coli*. *Neurospora crassa* i *Aspergillus nidulans* mają genomy tylko około dwukrotnie większe niż drożdże (nieco ponad 20 000 kz).

Możliwość analizy, a także rekonstrukcji genomów grzybów metodami odmiennymi od klasycznej genetyki, powstała stosunkowo niedawno — w drugiej połowie lat siedemdziesiątych. Chodzi tutaj głównie o transformację komórek grzybów za pomocą homologicznego bądź heterologicznego DNA, który staje się trwałym składnikiem genomu biorcy. Stopień rozwinięcia i możliwości zastosowania wariantów tej metody nie są jednakowe dla kilku gatunków grzybów, u których można uzyskać transformanty. Zdecydowanie największy wybór oferuje drożdż, *Saccharomyces cerevisiae*, który jest najlepiej poznany na poziomie molekularnym nie tylko wśród grzybów, ale też wśród wszystkich organizmów jądrowych — eukariotów. Znacznie mniejsze możliwości istnieją dla *Neurospora crassa*, a od 1983 roku — jeszcze skromniejsze, także dla *Aspergillus nidulans*. Trzeba podkreślić, że transformacja grzybów jest procesem sztucznym, wymuszonym za pomocą czysto empirycznie znalezionych warunków. Nie mają one naturalnego stanu kompetencji do pobierania wolnego DNA, jak niektóre bakterie. Obecny okres jest dla transformacji grzybowej o tyle interesujący, że opracowano procedury transformacji nie wymagające usuwania ściany komórkowej. Wraz z nowymi metodami selekcji w kierunku oporności, mogą one doprowadzić do opracowania ogólnie stosowalnych sposobów postępowania w transformacji grzybów.

TRANSFORMACJA DROŻDŻY

Transformowanie drożdży [1] stało się możliwe dzięki wyizolowaniu na plazmidzie bakteryjnym, czyli sklonowaniu, jądrowego genu drożdżowego LEU2 [2]. Pozwala to na 1000-krotne zwiększenie w preparacie DNA, używanym do transformacji, liczby kopii tego genu, którego funkcja służy do umożliwienia selekcji transformantów. Drugim ważnym elementem dla powodzenia transformacji drożdży było zaadaptowanie procedury fuzji protoplastów drożdżowych [3], w której komórki inkubuje się z CaCl_2 oraz glikolem polietylenowym (PEG). Ta ostatnia substancja dostępna jest w formie bardziej lub mniej spolimeryzowanej. Do fuzji protoplastów i transformacji stosuje się frakcje PEG o masie cząsteczkowej między 3000 a 8000, najczęściej około 4000. Jest to substancja odwadniająca, powodująca wytrącanie się białek i kwasów nukleinowych oraz zlepianie się błon.

DNA zastosowany w pierwszych doświadczeniach transformacji drożdży był niezdolny do samodzielnego replikowania się w komórkach. W wyselekcjonowanych transformantach stwierdzono wbudowanie się genu LEU2 wraz z bakteryjnym plazmidem ColE1 do chromosomów, i to nie tylko w miejscu homologii sekwencji, tzn. locus chromosomowym leu 2. Wydajność transformacji — czyli liczba transformantów powstająca przy zastosowaniu 1 mikrograma DNA — wyniosła tylko 1-10. Częstość transformacji — frakcja

regenerujących protoplastów, które stają się transformantami — była zaledwie 0,00001%. Parametry te zmuszają do wysiewu na płytkę selektywną znacznej liczby (10^8 - 10^9) komórek, co stwarza ryzyko wzrostu rewertantów. Dla zapobieżenia temu niekorzystnemu zjawisku konstruuje się nie rewertujące mutacje w genomie biorcy — bądź to podwójne, bądź delecje w danym genie.

WEKTORY DROŹDZOWE

Niedługo po wykazaniu transformacji integracyjnej u drożdży ukazały się prace nad smoreplikującymi się plazmidami (replikonami) — wektorami drożdżowymi [4]. Było to ważnym krokiem naprzód, gdyż pozwalało na użycie komórek drożdży do klonowania własnych jak i obcych genów, dzięki ich pozostawianiu w formie wolnych plazmidów, nie wbudowanych do chromosomów. Do konstrukcji tych wektorów wykorzystano istotną dla replikacji część 2- μ m plazmidu drożdży *S. cerevisiae*, plazmid bakteryjny, najczęściej wektor pBR322 oraz jeden ze sklonowanych uprzednio jądrowych genów drożdżowych, jak LEU2, HIS3 albo URA3 [2, 5, 6]. Część bakteryjna wektora umożliwia jego namnażanie i wydajną preparatykę z *E. coli*. Jest to nieodzowne, gdyż z komórek drożdżowych trudno wyizolować plazmid w dostatecznej ilości. Wadą wektorów zawierających replikon 2- μ m plazmidu jest ryzyko ich rekombinacji z endogennym plazmidem 2- μ m. Ten ostatni występuje w komórkach większości szczepów drożdżowych, oznaczanych w związku z tym jako CIR⁺, choć nie nadaje im wyróżnialnych cech fenotypowych w stosunku do pozbawionych plazmidu szczepów CIR⁰. Rekombinacja z endogennym plazmidem może spowodować nieprzewidziane zmiany w sekwencjach plazmidu transformującego.

Następnym osiągnięciem w konstrukcji wektorów drożdżowych było użycie zamiast replikonu plazmidu 2- μ m, sekwencji ARS1 (ang. Autonomously Replicating Segment). Znalaziono ją obok chromosomowego genu TRP1 [7]. Sekwencja ARS1 umożliwia samodzielną replikację, gdyż jest prawdopodobnie chromosomowym miejscem jej inicjacji. Wektory zawierające ARS1 mają pewien mankament, a mianowicie wykazują niestabilność mitotyczną. Gubią się one bardzo szybko, szybciej niż wektory z plazmidu 2- μ m, przy wzroście na podłożu nieselektywnym [8].

Segregacja mitotyczna wektorów drożdżowych jest wadą, której pozbawione są wektory następnej generacji, zawierające obok ARS1 także fragment centromerowy DNA z chromosomu III [9]. Utrzymują się one w komórce podobnie, jak chromosomy — pojedynczo. Plazmidy oparte na 2- μ m DNA występują najczęściej w liczbie 50-100, a zawierające tylko ARS1 mają niewielką choć zmienną liczbę egzemplarzy.

Jeszcze jednym typem wektora, zaadaptowanym do użycia w drożdżach, są tak zwane kosmidy [10]. Plazmidy te mają wbudowany fragment DNA

bakteriofaga lambda, tzw. rejon lepkich końców *cos*, pozwalający m.in. na tworzenie kolistej formy DNA bakteriofaga. Wektor taki rozcina się wybranym enzymem restrykcyjnym i ponownie łączy enzymatycznie (liguje) *in vitro* z dużymi fragmentami DNA dawcy. Dzięki sekwencjom *cos*, wielkocząsteczkowy produkt ligacji może być *in vitro* upakowywany do główek bakteriofaga lambda. Zachodzi to pod wpływem dodanego preparatu układu pakującego lambda. Własności główek i układu pakującego powodują, że spośród różnych cząsteczek DNA wybierane są hybrydy flankowane przez sekwencje *cos*, w których wstawka dopełnia całość do około 50 kz, czyli do wielkości genomu lambda. Ponieważ sekwencje *cos* i pozostała część wektora są krótkie, wstawka musi być bardzo duża, 30-45 kz, i to właśnie jest podstawową zaletą kosmidów. Bank genowy na kosmidach, dzięki znacznym rozmiarom wstawek, składa się z dużo mniejszej liczby klonów, niż bank genowy na zwykłym plazmidzie. Wypełnione główki łączy się *in vitro* z nóżkami, i takimi cząstkami wirusa transdukuje komórki *E. Coli*. Tak uwolniony DNA replikuje się jak każdy plazmid, a ponieważ kosmidy drożdżowe mają też replikon 2 μ m i odpowiedni gen do selekcji, można po wyizolowaniu z *E. coli* takim bankiem na kosmidach transformować drożdże.

KLONOWANIE GENÓW W DROŹDZACH

Bogactwo stojących do dyspozycji plazmidów wektorowych, możliwość ich doboru ze względu na określone cechy i stosunkowa łatwość transformacji drożdży przyczyniły się do częstego użycia układu klonowania w drożdżach. Spodziewano się, że w przeciwieństwie do układu klonowania genów w *E. coli* drożdże mogą zaoferować szereg korzystnych warunków. Ponieważ są organizmem eukariotycznym, szansa na ekspresję innych genów eukariotycznych w drożdżach, w tym genów z organizmów wyższych, winna być większa. Są tutaj trzy główne grupy problemów. Po pierwsze, czy aparat transkrypcji-translacji komórki drożdżowej rozpozna odpowiednie sygnały startowe na obcym DNA (i RNA). Po drugie, czy nastąpi obróbka powstałego mRNA, przede wszystkim usuwanie intronów. Po trzecie wreszcie, czy powstały polipeptyd ulegnie modyfikacjom potranslacyjnym i czy będzie eksportowany, jeżeli jest białkiem sekrecyjnym.

Jeżeli chodzi o zapewnienie wydajnej transkrypcji obcego DNA, to problem ten rozwiązuje się obecnie przez klonowanie w wektorach mających wydajny promotor drożdżowy. Uzyskano dzięki temu ekspresję genu interferonu człowieka [11], genu na antygen *hepatitis* i innych. Transkrypcja genu β -globiny królika, który wprowadzono do drożdży na wektorze pJDB219, nie wyposażonym jeszcze w ów specjalny promotor, inicjowana jest w kilku miejscach na DNA pochodzącym z królika. Lokalizują się one 20-40 par zasad w kierunku 3' od miejsca inicjacji właściwego dla komórki królika.

Transkrypty owe kończą się mniej więcej pośrodku dużego intronu, zawierają wobec tego też całą sekwencję małego intronu obecnego od strony 5' w genie β -globiny [12]. Nie następuje więc usuwanie intronów. Chociaż, jak stwierdzono, niektóre geny drożdżowe mają introny, ekspresja genów z wyższych eukariotów ograniczona będzie prawdopodobnie w drożdżach do grupy nie zawierającej intronów. Dla jej ułatwienia konstruuje się wektory z regulowanymi promotorami, których aktywność indukować można przez odpowiedni skład podłoża. Może być tutaj przykładem promotor kwaśnej fosfatazy *phoE* [13].

Brak ekspresji obcego DNA w drożdżach jest większym problemem, kiedy transformujemy odpowiedni szczep drożdży bankiem genów¹ organizmu dawcy i chcielibyśmy dzięki ekspresji i funkcji konkretnego genu, sklonować go. Inną sytuację mamy, kiedy już sklonowany gen przenosimy *in vitro* na wektor drożdżowy i chcielibyśmy tylko wykorzystać drożdże do wytwarzania pożądanego produktu genowego. Wtedy można wykorzystać całą wiedzę o sygnałach transkrypcji i translacji, usunąć introny bądź uzyskać dla pożądanego efektu kopię cDNA², w ostatecznym przypadku wprowadzić do drożdża gen syntetyczny [14]. Jak się wydaje, aparat wydzielniczy drożdży zdolny będzie do eksportu białek sekrecyjnych innych organizmów. Aby wydzielone poza błonę plazmatyczną białka mogły dyfundować przez ścianę komórkową, niezbędne będą dalsze usprawnienia.

Problem funkcji genu w obcym dla niego środowisku żywej komórki jest bardzo złożony i wiele jeszcze zjawisk czeka tutaj na wyjaśnienie. Pełna ekspresja genu, tzn. włącznie z syntezą białka, nie przesądza jeszcze o podjęciu funkcji, w sensie zaspokojenia potrzeb komórki. Gen β -galaktozydazy z drożdża, *Kluyveromyces lactis*, ma ekspresję w odpowiednim, pozbawionym tego enzymu mutancie drożdża, *S. cerevisiae*. Transformanty drożdży wykazują poziom β -galaktozydazy wynoszący ok. jednej siódmej poziomu charakterystycznego dla *Kluyveromyces lactis*, jednakże nie są one zdolne do wzrostu na pożywce laktozowej [15].

Możliwości przygotowywania drożdżowych szczepów biorców bez endogenego plazmidu 2- μ m powstały ostatnio dzięki metodzie jego usuwania. Plazmid ten stwarza ryzyko zmian sekwencji w klonowanym DNA oraz gubienia w trakcie podziałów komórkowych zrekombinowanych *in vitro* plazmidów. Kiedy transformuje się szczep *leu2* do prototrofii leucynowej za pomocą plazmidu pJDB219 lub pMP78, ze znaczną częstością powstają komórki CIR⁰. Allel genu LEU2 obecny na wymienionych plazmidach oznaczono jako *leu2-d*, gdyż jest defektywny — ma mniej niż 5% ekspresji normalnego genu chromosomowego [16]. Presja na pożywce selektywnej

¹) Bank genów: pula różnych fragmentów DNA danego organizmu, każdy wbudowany do cząsteczki plazmidu, która pokrywa np. z prawdopodobieństwem 99%, całość genomu.

²) Kopia cDNA: uzyskany *in vitro* przez syntezę na matrycy mRNA, za pomocą odwrotnej transkryptazy, odpowiadający genowi fragment DNA, który nie zawiera już intronów.

powoduje, że w komórkach zwiększa się do 35 lub więcej, zależnie od szczepu, liczba plazmidów z genem *leu2-d*. Wypierają one — powodują gubienie — endogennych plazmidów 2- μ m. Obie populacje plazmidów opartych na replikonie plazmidu 2- μ m wydają się mieć w komórce wspólny pułap i konkurować o limitujące czynniki rozpuszczalne, kodowane przez genom komórkowy lub/i przez genom plazmidowy.

Dostępny jest również od niedawna test barwny, pozwalający na odróżnienie komórek, które pobrały plazmid, czyli transformantów drożdżowych od pozostałych komórek, przy wysiewie nieselektywnym. Poziom ekspresji genu bakteryjnej β -laktamazy (enzymu rozkładającego penicylinę) w drożdżu podniesiono 100-krotnie wbudowując obok niego do plazmidu wektorowego wydajny promotor drożdżowy ADHI. Ta ilość β -laktamazy wystarcza do rozkładu penicyliny i odbarwiania błękitnego tła skrobi zabarwionej jodem. W doświadczeniach tych okazało się, że nieselektywnie wysiane transformanty stanowią aż 4% wszystkich regenerujących z protoplastów kolonii [17].

PROCEDURA TRANSFORMACJI

Sama procedura transformacji uległa w ciągu sześciu lat od jej wprowadzenia niewielkim zmianom. Komórki zbiera się w fazie wzrostu wykładniczego, choć nie dla każdego szczepu jest to warunkiem powodzenia i transformacja może się udać z komórkami wczesnej fazy stacjonarnej. Następnie przemywa się buforem i inkubuje 10 min z czynnikiem sulfhydrylowym, jak merkaptoetanol bądź dwutiotreitol. Ostatnio tę inkubację, która ułatwiać miała późniejsze trawienie ściany komórkowej, pomija się jako zbędną. Inkubacja z enzymem trawiennym odbywa się w środowisku z sorbitolem jako osmotikum, w stężeniu 1,0 lub 0,8 M. Trawienie w 30°C nie powinno trwać dłużej niż 1,5 godziny, co reguluje się empirycznie zmieniając ilość użytego enzymu. Spadek absorpcji, przy 600 nm, do 10-20% początkowej absorpcji rozcieńczanych wodą próbek wskazuje na dostateczne strawienie. Enzymy trawienne mogą być różnego rodzaju: ze ślimaka winniczka, *Helix pomatia* — tzw. Glusulaza albo Helikaza, z bakterii *Arthrobacter luteus* — tzw. Zymoliaza [18], bądź z bakterii *Oerskovia xanthineolytica* — enzym Lytikaza [19]. Ponieważ po strawieniu (niecałkowitym!) ściany komórkowej dodaje się do protoplastów DNA, konieczne jest usunięcie wszelkich nukleaz. Dlatego, szczególnie przy użyciu enzymu ślimaka winniczka, komórki muszą być kilkakrotnie delikatnie przemywane. Preparaty Zymoliazy, a zwłaszcza Lytikazy, są mniej zanieczyszczone nukleazami, nie zachodzi więc potrzeba tylu przemywań, które zawsze stwarzają ryzyko pęknięcia komórek. Przemyte protoplasty zawieszają się w sorbitolu z chlorkiem wapnia i dodaje DNA. Dla zwiększenia wydajności można też dodać DNA nietransformującego plazmidu jako DNA nośnikowy [20]. Po kilkunastu minutach inkubacji w temperaturze pokojowej dodaje się roztwór PEG i pozostawia znowu na

15 min. Po odmyciu PEG protoplasty inkubuje się 20-30 minut w bogatej pożywce płynnej dla zapoczątkowania regeneracji. Alternatywnie bezpośrednio po odmyciu PEG zawieszają materiał w roztopionej, cieplej jeszcze pożywce regeneracyjnej z 3% agarą i wylewają całość na płytki. Wyższa niż w normalnych podłożach zawartość agaru podnosi zdolność protoplastów do regeneracji.

Dla zadowalających wyników w metodzie protoplastowej, co najmniej kilka procent komórek poddanych trawieniu powinno pozostać zdolnych do utworzenia kolonii na podłożu zawierającym osmotikum. Przy umiejętnym postępowaniu wartość ta waha się w granicach 10-35 procent regeneracji, wtedy też wydajność transformacji dobrym wektorem jest rzędu 10^4 na μg DNA.

TRANSFORMACJA *NEUROSPORA CRASSA*

Przeprowadzenie transformacji pleśni *N. crassa* stało się możliwe wówczas kiedy, analogicznie jak w przypadku drożdży, został sklonowany pierwszy gen z tego organizmu [21]. Wcześniejszych prób transformacji *N. crassa* za pomocą liniowego, chromosomowego DNA [22] z wielu względów nie można bowiem uznać za początek badań w tej dziedzinie. Transformowanych całkowitym chromosomowym DNA szczepów będących aukstotrofami inozytolowymi nie protoplastyzowano, ale korzystano z dodatkowych mutacji morfologicznych biorcy do selekcji prototrofów niezależnych od inozytolu. Procedura owa okazała się jednak zawodna.

Gen katabolicznej hydroliazy kwasu 5-dehydrochinowego z *N. crassa*, qa-2, wyizolowany został dzięki komplementacji mutacji aroD w *E. coli* [21]. Enzym kodowany przez qa-2 zdolny jest bowiem przeprowadzać tę samą reakcję w biosyntezie aminokwasów aromatycznych zarówno w *N. crassa*, jak i w *E. coli*. Warto wspomnieć, że spośród genów kodujących enzymy sklonowanych z *N. crassa*, cztery na pięć zidentyfikowano przez komplementację *E. coli* [21, 23, 24, T. Legerton — informacja ustna]. Nie ma natomiast przykładów na komplementację mutacji drożdżowych.

Grzyby nitkowate, do jakich należą *N. crassa* oraz *A. nidulans*, ze względu na swój sposób wzrostu, stwarzają przy transformacji mniej korzystną sytuację niż drożdże. Dla otrzymywania na pierwszym etapie czystych klonów transformantów należałoby transformować populację komórek (protoplastów) jednojądrowych, co u grzybów nitkowatych jest trudne. Natomiast przy wysiewaniu liczba kolonii, jakie mogą indywidualnie rosnąć na jednej płytce, jest kilkakrotnie mniejsza niż u drożdży mimo stosowania specjalnych podłoży, wywołujących zwarty i powolniejszy wzrost.

TRANSFORMACJA INTEGRACYJNA

Kiedy transformowano protoplasty *N. crassa* za pomocą DNA plazmidu pVK88 zawierającego gen qa-2, wydajność wyniosła 5-30 transformantów na μg DNA [25]. W doświadczeniach tych wydajność dla całkowitego chromosomowego, liniowego DNA była około 0,1 transformanta na μg DNA, a więc 300-krotnie mniejsza. Drogą krzyżówek zanalizowano w tych pierwszych doświadczeniach rodzaj integracji, jakiej uległ wprowadzony DNA. Na 14 kolonii w 6 nastąpiło zastąpienie allelu zmutowanego genu qa-2 szczepu biorcy przez gen wprowadzony na plazmidzie. U 2 kolonii nastąpiła insercja w pobliżu locus qa-2, natomiast u pozostałych 6 zaszło wstawienie w miejscu odległym od locus qa-2. Mniej więcej połowa transformantów z insercją, czy to obok, czy daleko od locus qa-2, zawiera też sekwencje wektorowe. Wzajemne proporcje tych trzech klas transformantów integracyjnych mogą prawdopodobnie zmieniać się w zależności od relacji między konkretnym transformującym DNA i chromosomowym DNA biorcy.

Rejon chromosomu *N. crassa*, zawierający gen qa-2, koduje trzy enzymy katabolizmu kwasu chinowego oraz ich specyficzne białko regulatorowe. W kilku niezależnych próbach klonowania uzyskano różnej wielkości fragmenty chromosomu wokół genu qa-2. Jeżeli różne plazmidy transformujące szczep *N. crassa* N12 uporządkujemy zgodnie z wielkością wstawki qa-2 i zestawimy obok wydajności transformacji, uzyskiwanej z ich użyciem, zauważymy korelację dodatnią. Jak się okazało, na ogół większa wstawka chromosomowego DNA pozwala na większą wydajność transformacji. Jest to zgodne z integracyjnym charakterem transformantów i z najprostszym, jaki można postulować, czynnikiem limitującym przy integracji — długością homologicznych odcinków DNA [26].

TRANSFORMANTY PORONNE

Cechą charakterystyczną transformacji *N. crassa*, a zapewne w ogóle wielu przypadków transformacji integracyjnej, jest występowanie transformantów poronnych. Można je określić jako wszystkie te, które okazują się niezdolne do kontynuacji wzrostu po przeszczepieniu na selektywne skosy agarowe. Sugerowano, że transformanty poronne zawierają plazmid, który nie uległ integracji, a jednak nie może się wystarczająco szybko replikować i zostaje nadmiernie rozcieńczony podczas wzrostu. Jednakże powstają one też wskutek działania liniowego chromosomowego DNA [26]. Klasa transformantów poronnych, które obok transformantów stabilnych, uzyskano w szczepie *N. crassa* arg12 pod wpływem genu argB [27] z *A. nidulans* [28], była niejednorodna. Moment zatrzymywania się ich wzrostu następował z różną zwłoką w stosunku do ich pojawienia się, tzn. od osiągnięcia wielkości

kolonii dostrzegalnej gołym okiem. Jedna z kolonii rosła bez przeszkód, ale zatraciła zdolność konidiowania. Jest prawdopodobne, że transformanty poronne to takie szczepy, w których transformujący DNA wbudował się w „niewłaściwe” miejsca. Niektóre takie insercje mogą rozrywać czynne geny, w różnym stopniu zaburzając funkcję genomu biorcy. Przy dobrej wydajności transformacji, 90 lub więcej procent pojawiających się kolonii, to transformanty poronne.

PRÓBY SKONSTRUOWANIA SAMOREPLIKUJĄCEGO SIĘ PLAZMIDU *N. CRASSA*

Konstruowanie plazmidu, który replikował by się samodzielnie nie tylko w *E. coli*, ale i w *N. crassa*, czyli hybrydowego wektora-promu genowego, nie zakończyło się jak dotąd jednoznacznym sukcesem. Dla DNA z *N. crassa* zastosowano skuteczną dla wielu eukariotycznych DNA metodę izolowania w drożdżach sekwencji typu ARS [29]. Wykorzystuje się w niej fakt, że plazmid YIp5, przenoszący gen drożdżowy URA3 nie jest zdolny transformować szczepu biorcy *ura3-52*, mimo że potencjalnie może dostarczyć funkcję genu URA3. Plazmid ów nie zawiera żadnego replikonu drożdżowego, a jego możliwości integracji do chromosomu są znikome, prawdopodobnie wskutek tego, że fragment URA3 jest niewielki, a allel *ura3-52* to mała delecja. Możliwość transformowania drożdży tym plazmidem powstaje dopiero wtedy, kiedy zostanie zligowany *in vitro* z fragmentem DNA, który będzie pełnił rolę ARS, samodzielnego replikonu. Ligacja w obecności fragmentów DNA, *N. crassa* pozwoliła na selekcję takich plazmidów, w wyniku transformacji szczepu *ura3-52*. Kiedy gen *qa-2* został wstawiony do takiego plazmidu zawierającego oprócz URA3 sekwencje pBR322 oraz ARS z *N. crassa*, można było transformować standardowy szczep-biorcę *N. crassa* N12. Otrzymane w tej transformacji szczepy nie wykazywały jednak obecności samodzielnego replikującego się plazmidu z *qa-2* [26].

Niedawno ukłazały się dwie prace, donoszące o konstrukcji hybrydowych plazmidów wektorowych, namnażających się samodzielnie w *N. crassa*. W jednej z nich wykorzystano naturalne plazmidy szczepu *Neurospora intermedia* P405-Labelle, występujące w mitochondriach [30]. Skonstruowano wektor pALS-1. W jego skład wchodzi: 4,1 kZ plazmidu z mitochondriów Labelle, plazmid bakteryjny pBR325 oraz gen *qa-2*. Transformował on biorcę *N. crassa* do prototrofii pod względem aminokwasów aromatycznych (fenyloalanina, tryptofan i tyrozyna) z wydajnością 5-10 razy większą niż kontrolny plazmid bez sekwencji Labelle. Odzyskiwane z transformantów *N. crassa* plazmidy były zróżnicowane. Oprócz wyjściowej formy pALS-1, wielkości 13,1 kZ, była też pochodna delecyjna, wielkości 9 kZ, nazwana pALS-2. Lokalizacja plazmidów w komórkach transformantów była inna niż w szczepie Labelle, to znaczy nie tylko w mitochondriach. W istocie znaczna

ich większość była obecna w jądrze lub/i cytoplazmie. Ponieważ plazmid pochodny, pALS-2, zatracił wszystkie lub prawie wszystkie sekwencje Labelle, a mimo to był zdolny do transformowania *N. crassa* i autonomicznej egzystencji w transformantach, nie jest jasne, jaki fragment DNA dostarcza w tym przypadku funkcji replikonu.

Na pytanie to jest jeszcze trudniej odpowiedzieć w świetle wyników, podawanych w drugiej ze wspomnianych prac [31]. Skonstruowano plazmid hybrydowy pDV1001, wielkości 11,8 kZ, złożony z pBR322, do którego wstawiono 3,1 kZ fragment z genem qa-2 oraz geny oporności na kanamycynę i chloramfenikol. Plazmid ten zdolny jest transformować *N. crassa* N12 z wydajnością 100 transformantów na μg , przy częstotliwości 0,005%. W transformantach wykazano niezintegrowane do chromosomu plazmidy m.in. za pomocą hybrydyzacji metodą Southerna³, jak i retransformacji do *E. coli*. Przy selekcji do oporności na chloramfenikol w szczepie aroD *E. coli*, wszystkie transformanty okazały się być aroD⁺. Z pewną częstotliwością zachodziła integracja pDV1001 do chromosomów, gdyż plazmid lokalizuje się w jądrze, przy czym stwierdzono te typy integracji, które obserwowano już dla pVK88. Zachowanie się pDV1001 jest inne, niż zachowanie się plazmidów drożdżowych zawierających ARS1. U drożdży dodatek ARS1 daje zwiększoną wydajność transformacji w stosunku do plazmidów, które mogą tylko integrować. Plazmid pDV1001 natomiast daje średnio mniejsze wydajności niż plazmidy, które uważa się, że tylko integrują. Autorzy wysuwają sugestię, że utrzymywanie się autonomicznie replikujących się plazmidów w wielojądrowych komórkach grzyba nitkowatego może być bardziej utrudnione, nawet na podłożu selektywnym, niż w komórkach drożdżowych [31]. Wydaje się, że na ostateczne wnioski jest jeszcze w tej sprawie przedwcześnie.

PROCEDURA TRANSFORMACJI *N. CRASSA* N12

Tak jak i procedura z protoplastami drożdżowymi, procedura transformacji *N. crassa* przeszła pewne modyfikacje. Obecnie protoplastyzuje się skielkowane konidia, kiedy pierwotnie izolowano protoplasty z grzybni, stosując ten sam enzym — Glusulazę. Konidia zbiera się do pożywki płynnej i poddaje kielkowaniu przez 4 godziny w 25°C. Następnie odwirowuje się je, zawiesza w sorbitolu i dodaje Glusulazę. Inkubacja w 30°C przez około godzinę powinna dać 80-90% komórek zależnych od osmotikum. Protoplasty przemywa się sorbitolem, zawiesza w sorbitolu zbuforowanym zawierającym chlorek wapnia, dodaje nieco sulfotlenku dwumetylowego (DMSO) oraz nieco PEG. Jednocześnie kilka mikrolitrów plazmidowego DNA preinkubuje się na lodzie z dodatkiem heparyny. Do DNA-heparyny dodaje się następnie zawiesinę

³) Hybrydyzacja metodą Southerna: wykrywanie i określanie wielkości sekwencji DNA komplementarnych w stosunku do syntezowanej *in vitro* radioaktywnej sondy molekularnej.

protoplastów i kontynuuje inkubację na lodzie przez pół godziny. Kolejnym krokiem jest dodanie większej ilości PEG i inkubacja w temperaturze pokojowej. Próbkę takiej zawiesiny łączy się z roztopioną pożywką regeneracyjną i wylewa na płytki. Pożywka regeneracyjna zawiera jako źródło węgla sorbozę z dodatkiem fruktozy i glukozy, zamiast normalnie obecnej samej sacharozy. Daje to bardziej zwarty, kolonijny typ wzrostu *N. crassa*. Kolonie widoczne są po 2 dobach inkubacji w 30°C, wtedy też należy liczyć wszystkie transformanty, bo transformanty poronne mogą później stać się trudno dostrzegalne. Powyższa procedura przy selekcji w kierunku prototrofii pod względem aminokwasów aromatycznych pozwala na osiąganie wydajności $1-5 \times 10^3$ transformantów na μg DNA. Trzeba podkreślić, że wiele elementów tej procedury znaleziono czysto empirycznie i nie zawsze jest całkiem jasne dlaczego są pomocne. Chlorek wapnia pomaga wraz z PEG w precypitacji DNA, a DMSO zapewne korzystnie zmienia błony. Heparyna prawdopodobnie ochrania DNA przed nukleazami, gdyż się one na niej adsorbują. Większe stężenie PEG niezbędne jest do fuzji protoplastów, być może także wewnętrznej fuzji wypustek błony plazmatycznej, i internalizacji zaadsorbowanego DNA. Jeżeli dysponujemy sondą molekularną do hybrydyzacji, możemy wśród transformantów wyszukiwać pożądane kolonie. Metodę tzw. hybrydyzacji kolonijnej *in situ*, bez wypreparowywania DNA, szybko dopracowano także dla *N. crassa* [32].

TRANSFORMACJA *ASPERGILLUS NIDULANS*

Spośród kilku sklonowanych dotąd genów *A. nidulans* kodujących enzymy, trzy zostały udokumentowane w postaci pełnych publikacji. Jeden z nich izolowano przez komplementację drożdży [27], drugi drogą komplementacji *E. coli* [33] a trzeci przez hybrydyzację z sondą molekularną [34]. Tylko jeden ze wspomnianych genów *A. nidulans*, *amdS* [34], wykorzystano dotąd do stworzenia układu transformacyjnego plazmid-szczep biorca [35]. Pierwszy opisany układ transformacyjny *A. nidulans* oparty jest jednak na „obcym” genie, *pyr4* z *N. crassa* [24], który, jak się okazało, zdolny jest komplementować mutację *pyrG89* z *A. nidulans* [36].

Protoplasty szczepu *pyrG89* uzyskano pod działaniem enzymu z *Trichoderma viride* (Novozyme 234). Do stabilizacji osmotycznej używano 0,6 M KCl. Odsączoną i przemytą zawiesinę protoplastów w KCl/CaCl₂ dzielono na 0,2-ml porcje. Do każdej umieszczonej na lodzie porcji dodawano 20 μl DNA i 50 μl PEG-6000/CaCl₂/Tris. Po 30 min. dodawano 2,5 ml PEG-6000 i pozostawiano całość na 15 min w temperaturze pokojowej. Na koniec protoplasty odwirowywano, zawieszano w KCl i wysiewano w połączeniu z 5-10 ml roztopionej pożywki selektywnej (bez urydyny) do regeneracji transformantów [36]. Podobne było postępowanie w drugiej pracy [35]. Do protoplastyzacji użyto Novozyme 234 w połączeniu z helikazą. Jako

osmotikum służyły 1,0 M sorbitol lub 1,0 M socharoza. Zastosowano PEG-4000. Selekcja transformantów odbywała się tutaj w szczepie biorcy z delecją w genie acetamidazy amdS320 i z mutacjami regulatorowymi amdA7 i amdI 18, powodującymi podwyższoną ekspresję acetamidazy. Transformujący gen amdS⁺ wprowadzono na plazmidzie p3SR2 lub na jednym z dwu plazmidów pochodnych — p3SR2rr lub p3SR2mo. Selekcjonowano na odzyskanie zdolności do wzrostu na acetamidzie jako jedynym źródle azotu. Do selektywnej pożywki regeneracyjnej dodawano 14 mM CsCl aby uniemożliwić śladowy wzrost komórek amdS⁻.

Wydajności transformacji *A. nidulans* wyniosły około 0,7 transformanta na µg DNA dla szczepu pyr G89 (prawdopodobnie same transformanty stabilne), oraz 25 tr na µg DNA w drugiej serii doświadczeń ze szczepem amdS320. W tym ostatnim przypadku w podanej liczbie było 72% transformantów poronnych. W obu układach transformanty są najprawdopodobniej wyłącznie typu integracyjnego: są stabilne mitotycznie na podłożu nieselektywnym, natomiast mejotycznie (w krzyżówkach) są dosyć niestabilne. Znaczny procent potomstwa z krzyżówek transformantów z szczepem dzikim wykazuje fenotyp mutanta, a poza tym obserwuje się dużą redukcję żywotności askospor. Stopień niestabilności w mejozie, jak to stwierdzono dla szczepów amdS⁺, zależy od miejsca integracji plazmidu. Transformanty uzyskane za pomocą plazmid p3SR2, dającego integrację w *locus* amdS, są stabilniejsze w mejozie niż transformanty pochodne p3SR2rr. Ten drugi plazmid zawiera sekwencje jądrowego genu 25S rRNA z *A. nidulans* i w tym właśnie chromosomowym *locus* integruje. Na integracyjny charakter transformantów wskazują też wyniki hybrydyzacji metodą Southern, która wykazała sekwencje zintegrowanego, ale nie wolnego plazmidowego DNA w preparatach DNA transformantów. Plazmidy pochodne p3SR2 nie dawały w szczepie amdS320 większych wydajności transformacji, mimo że p3SR2rr nadawał zdolność do integracji genu amdS⁺ w nowym *locus*, a p3SR2mo też zmieniał własności integracyjne. Ten ostatni plazmid zawiera fragment mitochondrialnego DNA *A. nidulans* funkcjonujący jako ARS w drożdżach, który w omawianej sytuacji nie umożliwił jednak plazmidowi go zawierającemu samodzielnej replikacji. Nie można jednak wykluczyć czasowej egzystencji transformujących plazmidów w stanie „wolnym” wobec następującej obserwacji: po 5-6 dniach inkubacji w niektórych transformantach poronnych od środka kolonii odbija sektor silnego wzrostu transformanta stabilnego [35].

Transformacja *A. nidulans*, jak to wskazuje mała jej wydajność, jest jeszcze na wczesnym etapie opracowywania. Niewątpliwie korzystny jest fakt pracy nad nią w dwu różnych układach z różnymi genami, przyspieszy to jej doskonalenie. Warto dodać, że tak, jak stwierdzono przez transformację funkcję genu *N. crassa* w *A. nidulans* [36], analogicznie wykazano ostatnio funkcję wspomnianego już genu *argB* *A. nidulans* [27] transformując nim *N. crassa* [28]. Szczep *arg12* *N. crassa*, auktotrof argininowy pozbawiony aktywności mitochondrialnego enzymu — karbamoiltransferazy ornitynowej,

transformował się do prototrofii. Użyty w tej transformacji plazmid składa się z 6,2 kb fragmentu DNA chromosomowego z plazmidu pBB116 [27] oraz pBR322. Wydajność tej transformacji także była mała — 8 tr na μg , mimo stosowania ulepszonej procedury *N. crassa*. Wśród transformantów tylko 8% było stabilnych, pozostałe zmarniały po kilku dniach. W krzyżówkach z dzikim szczepem *N. crassa* różny procent potomstwa transformantów (16-60%) wykazywał fenotyp mutantu. Na integracyjny charakter tych transformantów, prócz stabilności mitotycznej i wyników krzyżówek, wskazały wyniki hybrydyzacji metodą Southerna. Gen *argB* nie ma wykrywalnej w tej hybrydyzacji homologii z genem *arg12* bądź z innym fragmentem genomu *N. crassa*. W tej sytuacji sonda z sekwencji *argB* uwidaczniała tylko ślady wielokrotnej integracji DNA *A. nidulans* do genomu *N. crassa*. Różne transformanty miały niejednakową ilość obcego DNA w swoich genomach. Istnieje ewentualność, że przynajmniej w niektórych transformantach wolny plazmid utrzymywał się dłużej, co mogło umożliwiać wielokrotne integracje np. na sposób obserwowany już w drożdżach [37].

Transformanty z genem *argB* mają niski poziom kodowanego przez ten gen enzymu. Rosnąc na podłożu selektywnym znajdują się prawdopodobnie pod presją na zwiększenie ilości produktu *argB*. Dlatego być może izoluje się transformanty, w których obcy DNA uległ amplifikacji.

TRANSFORMACJA GRZYBÓW BEZ PROTOPLASTYZACJI

W 1983 roku ogłoszono wyniki, które otwierają nowe możliwości w transformacji grzybów. Wykazano, że można uzyskać transformanty drożdży bez usuwania ściany komórkowej. Czynnikiem, który wywoływał stan kompetencji (tzn. zdolności do pobierania DNA) były jednowartościowe kationy metali, zwłaszcza lit i cez, jednak obecność PEG była także w odpowiednim momencie absolutnie konieczna [38]. W innej pracy uzyskano transformację całych komórek tak drożdży, jak i *E. coli*, i wskazuje się, że najważniejszym czynnikiem jest tutaj właśnie PEG [39]. Procedura transformacji „litowej” na tyle ułatwia pracę, że mimo mniejszej wydajności, znalazła już powszechne zastosowanie. Komórki drożdży zbiera się jeszcze w fazie wykładniczej i przemywa wodą. Przemywa się je ponownie 0,1 M octanem litu i zawiesza w nim na godzinę inkubacji w 30°C. Po zagęszczeniu i rozporcjowaniu komórek dodaje się do nich DNA. Po pół godzinie dodaje się PEG i inkubuje dalej godzinę, nie zmieniając temperatury. Następnie po 5-min szoku cieplnym w 42°C komórki przemywa się wodą i wysiewa na płytki selektywne.

Wydajność transformacji litowej waha się od kilku do kilkuset transformantów na μg DNA. Sugestia, że plazmidy zbudowane na replikonie ARS transformują dobrze, a na plazmidzie 2- μm transformują źle [38] nie jest zgodna z obserwacjami autora niniejszego artykułu. Wydajność zależy w bliżej

nie znany sposób tak od plazmidu, jak i od szczepu biorcy. W transformacji tej, tak jak i w protoplastowej transformacji drożdży [20], obserwuje się wzrost wydajności wraz ze wzrostem stężenia plazmidowego DNA w czasie transformacji. Wzrost stężenia można przy tym osiągnąć za pomocą nie-transformującego, nośnikowego DNA np. pBR322. Podczas gdy dla transformacji protoplastowej ustalono w tej sytuacji stężenie DNA na poziomie 15 µg/ml, w transformacji litowej jeszcze powyżej 40 µg/ml jest przyrost wydajności, i przy 160 µg/ml jest ona jeszcze około 6 razy większa. Procedura transformacji litowej wydaje się tak mało specyficzna gatunkowo, że może zostać niedługo rozszerzona i na inne grzyby. Czynnikiem ograniczającym jest jednak trudność z doбором szczepów biorców, którymi dotąd mogą być tylko niektóre mutanty auksotroficzne niektórych gatunków grzybów. Dlatego trwają poszukiwania markerów oporności na substancje, będące inhibitorami dla grzybów.

Wiele bakteryjnych genów oporności wykazuje ekspresję w drożdżu, a niektóre z odpowiadających inhibitorów są jednocześnie czynne w stosunku do komórek drożdżowych [40, 41], *N. crassa* i wielu innych grzybów. Do tych substancji należą antybiotyki — choramfenikol oraz zbliżony do kanamycyny aminoglikozyd G418. Problemem są tutaj spontaniczne mutanty opornościowe, powstające np. u *N. crassa* ze znaczną częstością [26]. Zmniejszając zawartość wapnia i magnezu i podnosząc pH pożywki do 7,0 zwiększono wrażliwość *N. crassa* na G418. Dzięki temu przy 300 µg/ml G418 nie pojawiały się już spontaniczne mutanty odporne (T. Legerton — informacja ustna).

PODSUMOWANIE

Omówiono prace na temat transformacji drożdży, *Neurospora crassa* i *Aspergillus nidulans*, które rzuciły już wiele światła na możliwości rekonstrukcji genomów u grzybów. Uzasadniono pogląd, że niedługo mogą one doprowadzić do umiejętności wprowadzania dowolnych genów do, jak i wyławiania pożądaných genów z genomów grzybów.

LITERATURA

- [1] Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. — *Transformation in yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933, 1978.
- [2] Hicks J., Fink G. R. — *Identification of chromosomal location of yeast DNA from hybrid plasmid pYeleu10*. Nature 269: 265-267, 1977.
- [3] Van Solingen P., Van der Plaats J. B. — *Fusion of yeast spheroplasts*. J. Bacteriol. 130: 946-947, 1977.
- [4] Beggs J. D. — *Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid*. Nature 275: 104-109, 1978.

- [5] Struhl K., Cameron J. R., Davis R. W. — *Functional genetic expression of eukaryotic DNA in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1471-1475, 1976.
- [6] Bach M. L., Lacroute F., Botstein D. — *Evidence for transcriptional regulation of OMP-decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 386-390, 1979.
- [7] Tschumper G., Carbon J. — *Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene*. Gene 10: 157-166, 1980.
- [8] Futcher A. B., Cox B. S. — *Copy number and the stability of 2- μ circle-based artificial plasmids of Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 157: 283-290, 1984.
- [9] Clarke L., Carbon J. — *Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular minichromosomes*. Nature 287: 504-509, 1980.
- [10] Hohn B., Hinnen A. — *Cloning with cosmids in E. coli and yeast*. W: Genetic Engineering — Principles and Methods. Setlow J. K., Hollaender A. (red.), T. 2: 169-184. Plenum Press, New York-London, 1980.
- [11] Hitzeman R. A., Hagie F. E., Levine H. L., Goeddel D. V., Ammerer G., Hall B. D. — *Expression of a human gene for interferon in yeast*. Nature 293: 717-722, 1981.
- [12] Beggs J. D., Van der Berg J., Van Ooyen A., Weissmann C. — *Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in Saccharomyces cerevisiae*. Nature 283: 835-840, 1980.
- [13] Hinnen A., Meyhack B. — *Towards a yeast expression system*. W: FEMS Symposium No. 13. Overproduction of Microbial Products. Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z. (red.), str. 381-393, Academic Press, London-New York, 1982.
- [14] Stępień P. P., Brousseau R., Wu R., Narang S., Thomas D. Y. — *Synthesis of a human proinsulin gene. VI. Expression of the synthetic proinsulin gene in yeast*. Gene 24: 289-297, 1983.
- [15] Dickson R. C. — *Expression of a foreign eukaryotic gene in Saccharomyces cerevisiae*. Streszczenie Nr 160, Materiały Konferencji n.t. The Molecular Biology of Yeast, Cold Spring Harbor, 1979.
- [16] Erhart E., Hollenberg C. P. — *The presence of a defective LEU2 gene on 2 μ DNA recombinant plasmids of Saccharomyces cerevisiae is responsible for curing and high copy number*. J. Bacteriol. 156: 625-635, 1983.
- [17] Reipen G., Erhart E., Breunig K. D., Hollenberg C. P. — *Nonselective transformation of Saccharomyces cerevisiae*. Cur. Genet. 6: 189-193, 1982.
- [18] Kitamura K., Kaneko T., Yamamoto Y. — *Lysis of viable yeast cells by enzymes from Arthrobacter luteus*. Arch. Biochem. Biophys. 145: 402-404, 1971.
- [19] Scott J. H., Schekman R. — *Lyticase: endoglycanase and protease activities that act together in yeast cell lysis*. J. Bacteriol. 142: 414-423, 1980.
- [20] Nasmyth K. A., Reed S. I. — *Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2119-2123, 1980.
- [21] Vapnek D., Hautala J. A., Jacobson J. W., Giles N. H., Kushner S. R. — *Expression in Escherichia coli K-12 of the structural gene for catabolic dehydroquinase of Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3508-3512, 1977.
- [22] Mishra N. C., Tatum E. L. — *Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3875-3879, 1973.
- [23] Keesey J. K., DeMoss J. A. — *Cloning of the trp-1 gene from Neurospora crassa by complementation of a trpC mutation in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 152: 954-958, 1982.
- [24] Buxton F. P., Radford A. — *Cloning the structural gene for orotidine 5'-phosphate decarboxylase of Neurospora crassa by expression in Escherichia coli*. Molec. Gen. Genet. 190: 403-405, 1983.
- [25] Case M. E., Schweizer M., Kushner S. R., Giles N. H. — *Efficient transformation*

- of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5259-5263, 1979.
- [26] Case M. E. — Transformation of *Neurospora crassa* utilizing recombinant plasmid DNA. W: *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*. Hollaender A., DeMoss R. D., Kaplan S., Konisky J., Savage D., Wolfe R. S. (red.), str. 87-100, Plenum Publishing Corporation, 1982.
- [27] Berse B., Dmochowska A., Skrzypek M., Węgleński P., Bates M. A., Weiss R. L. — Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. Gene 25: 109-117, 1983.
- [28] Weiss R. L., Puetz D., Cybis J. — Expression of *Aspergillus* genes in *Neurospora*. W: *Gene Manipulations in Fungi*. Bennett J., Lasure L. (red.), Academic Press. (w przygotowaniu).
- [29] Stinchcomb D. T., Thomas M., Kelly J., Selker E., Davis R. W. — Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4559-4563, 1980.
- [30] Stohl L. L., Lambowitz A. — Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1058-1062, 1983.
- [31] Hughes K., Case M. E., Geever R., Vapnek D., Giles N. H. — Chimeric plasmid that replicates autonomously in both *Escherichia coli* and *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1053-1057, 1983.
- [32] Stohl L. L., Lambowitz A. M. — A colony-filter-hybridization procedure for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Analyt. Biochem. 134: 82-85, 1983.
- [33] Kinghorn J. R., Hawkins A. R. — Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the biosynthetic dehydroquinase function of the *arom* cluster gene from the eucaryote, *Aspergillus nidulans*. Molec. Gen. Genet. 186: 145-152, 1982.
- [34] Hynes M. J., Corrick C. M., King J. A. — Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. Molec. Cell. Biol. 3: 1430-1439, 1983.
- [35] Tilburn J., Scazzocchio C., Taylor G. G., Zabicky-Zissman J. H., Lockington R. A., Davies R. W. — Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene 26: 205-221, 1983.
- [36] Ballance D. J., Buxton F. P., Turner G. — Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 284-289, 1983.
- [37] Orr-Weaver T. L., Szostak J. W. — Multiple, tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Cell. Biol. 3: 747-749, 1983.
- [38] Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. — Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153: 163-168, 1983.
- [39] Klebe R. J., Harris J. V., Sharp Z. D., Douglas M. G. — A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. Gene 25: 333-341, 1983.
- [40] Jimenez A., Davis J. — Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. Nature 287: 869-871, 1980.
- [41] Webster T. D., Dickson R. C. — Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. Gene 26: 243-252, 1983.

JERZY SZWEYKOWSKI

Instytut Biologii

UAM, Poznań

EWOLUCJA MOLEKULARNA

Intensywny rozwój genetyki molekularnej w ostatnich latach a zwłaszcza opanowanie metod szybkiego sekwencjonowania kwasów nukleinowych doprowadziło do zaskakujących niejednokrotnie odkryć, zmieniających dosyć zasadniczo nasze wyobrażenia o strukturze genów i organizacji genomu. Odkrywane zjawiska muszą w oczywisty sposób rzutować na procesy ewolucyjne i dlatego badacze zainteresowani tą tematyką śledzą bardzo uważnie rozwój wspomnianych badań. Jak to jednak często bywa, nowe wyniki nie dają się wbudować w prosty sposób do współczesnych poglądów na ewolucję; często bowiem trudno sobie nawet zdać sprawę jak dalece odkrywane fakty obowiązują powszechnie i jakie konsekwencje z nich płyną. Dlatego napisanie syntetycznego artykułu na temat ewolucji molekularnej, uwzględniającego w całej rozciągłości najnowsze zdobycze nauki nie jest jeszcze możliwe. Zdecydowałem się więc na pokazanie pewnych możliwości ewolucyjnych jakie mogą tkwić w odkrywanych zjawiskach. Natomiast na pełną ocenę rzeczywistego udziału ich w procesach ewolucyjnych trzeba będzie jeszcze poczekać.

Termin ewolucja używany jest dosyć powszechnie w dwóch zasadniczo różnych znaczeniach. Mówiąc np. o ewolucji darwinowskiej czy o ewolucji neutralistycznej mamy na myśli pewien mechanizm powodujący zmiany struktury genetycznej organizmów. Gdy natomiast mówimy o ewolucji np. człowieka czy konia, myślimy w tym wypadku o rozwoju rodowym czyli filogenezie. Filogeneza jest oczywiście wynikiem procesu ewolucji, czyli wynikiem działania wyżej wspomnianego mechanizmu. Nieodróżnianie filogenezy od procesu (mechanizmu) ewolucji byłoby więc myleniem przyczyny ze skutkiem. Ponadto mechanizm ewolucji jest obecnie taki sam jaki był w początkowych okresach życia na Ziemi, podczas gdy filogeneza jest z natury rzeczy zjawiskiem historycznym [48, 49].

Ponieważ termin „ewolucja molekularna” używany jest w obu powyższych znaczeniach, należy przedyskutować oba te aspekty. Trzeba także pamiętać,

że proces ewolucji odbywa się na wszystkich poziomach organizacji materii żywej, głównie zaś na molekularnym i populacyjnym. W znacznym uproszczeniu wygląda to tak, że na poziomie molekularnym powstaje zmienność, która ulega waloryzacji na poziomie populacyjnym poprzez jej ekspresję w organizmie (por. np. [49]). Wynika z tego, że mówiąc o ewolucji molekularnej w sensie mechanizmu procesu ewolucyjnego możemy przedyskutować jedynie mechanizmy powstawania zmienności. Natomiast myśląc o ewolucji molekularnej w sensie filogenezy będziemy mówili o przemianach ewolucyjnych obserwowanych w cząsteczkach takich związków jak kwasy nukleinowe i białka, a także o tym, co dziś coraz częściej nazywa się ewolucją genów.

POWSTAWANIE ZMIENNOŚCI NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

Podstawowym, i od dawna znanym mechanizmem tworzącym zmienność są mutacje genowe. Wiemy dziś, że polegają one przede wszystkim na zmianie sekwencji nukleotydów w cząsteczkach DNA. Zmiana taka może się dokonywać albo przez zamianę („podstawienie”) jednego nukleotydu przez inny, albo przez usunięcie pewnego fragmentu cząsteczki (delecja), lub wreszcie przez wstawienie (insercję) sekwencji, której w cząsteczce oryginalnej nie było. Skutki takich zmian mogą być bardzo różne: od niezauważalnych (np. podstawienie nukleotydu nie zmieniającego znaczenia kodonu — wówczas produkowane białko ma taką samą budowę jak białko oryginalne przed mutacją) aż do takich, które zmieniają zasadniczo właściwości organizmu prowadząc nierzadko do jego śmierci albo do znacznych zmian morfologicznych (np. tak zwane mutacje homeotyczne zmieniające, np. liczbę skrzydeł u muchy owocowej z jednej do dwóch par). Od dawna wiemy także o tym, że rekombinacja zwiększa efektywność mutacji (które są zjawiskiem stosunkowo rzadkim — częstość mutowania większości genów mieści się w przedziale 10^{-5} - 10^{-9})¹ przez przenoszenie zmutowanych genów (tj. takich, które mają zmienioną sekwencję nukleotydów) z jednego genotypu do drugiego, dzięki czemu taki „nowy” zmutowany gen może być niejako „wypróbowany” w różnych genotypach.

Obok tego podstawowego mechanizmu genetyka molekularna odkryła niedawno zupełnie nowe, których istnienia biologowie nawet nie przeczuwali. Jednym z takich odkryć było stwierdzenie, że ogromna większość genów organizmów eukariotycznych zróżnicowana jest na odcinki zawierające informację określającą sekwencje aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym

¹ Częstość mutacji wyraża się zwykle jako prawdopodobieństwo wystąpienia określonej zmiany w danym genie w gametach jednego pokolenia (u organizmów wielokomórkowych i diploidalnych), względnie w komórce (u organizmów jednokomórkowych, głównie bakterii).

oraz na odcinki, które w procesie translacji nie biorą udziału. Te ostatnie, zwane intronami usuwane są z cząsteczki mRNA w procesie jego dojrzewania, tak iż taka cząsteczka gotowa do rozpoczęcia translacji składa się jedynie z odcinków pierwszego typu — egzonów (nie licząc niekodujących sekwencji na obu końcach dojrzałej cząsteczki mRNA). Łączenie, czyli zestawianie egzonów jest procesem precyzyjnym a informacja zapewniająca jego prawidłowy przebieg znajduje się najprawdopodobniej w intronach. Istnieje pogląd, że egzony, które można traktować jako pewne jednostki strukturalne w obrębie genów, odpowiadają obszarom cząsteczek białka zwanych domenami [17]. Domeny mają charakter funkcjonalny, to znaczy, że spełniają one w cząsteczce białka określone zadania. Otóż Gilbert [17] wystąpił z hipotezą, że w procesie ewolucji zachodziło łączenie się egzonów w różnych kombinacjach, dzięki czemu powstawały białka o odmiennym rozmieszczeniu domen i często o nowych funkcjach. Taki proces, który możnaby nazwać tasowaniem egzonów (tak tłumaczą angielskie wyrażenie "Exon-shuffling"), prowadzi do powstania nowych białek znacznie szybciej niż byłoby to możliwe na drodze gromadzenia pojedynczych mutacji. Podkreślić tu jednak należy z całym naciskiem, że chodzi tu o tworzenie nowych kombinacji gotowych struktur — egzonów, które swą strukturę uzyskały na drodze gromadzenia zmian mutacyjnych. Tasowanie egzonów dowodzi więc, że powstawanie zmienności ma naturę hierarchiczną — występują nie tylko elementarne procesy mutacyjne ale także zestawienie gotowych struktur w nowe kombinacje.

Przedstawiona tu hipoteza Gilberta, choć czasem krytykowana, została w kilku przynajmniej przypadkach efektownie potwierdzona. Odpowiedniość egzonów i domen białkowych w łańcuchu β -hemoglobiny wykazały badania Gō [18] oraz Blake'a [5]. Stosując specjalną metodę interpretacji obrazów rentgenowskich tego białka u konia, Gō [18] wykazała istnienie w nim czterech domen. Jednakże gen kodujący łańcuch β u konia wykazuje tylko trzy egzony. Centralny egzon odpowiadał tu dwóm różnym domenom białka. Gō postawiła więc hipotezę, że ten centralny egzon powstał ze zlania się dwóch odrębnych egzonów, które musiały istnieć w genach kodujących łańcuch β u odległych przodków konia. Hipoteza ta została potwierdzona przez Blake'a [5], który zbadawszy strukturę genu kodującego tzw. leghemoglobinę (białko obecne w brodawkach korzeniowych soi zbliżone budową do hemoglobiny) stwierdził, że ma on cztery egzony prawie dokładnie takie, jakie postulowała Gō. I choć leghemoglobina nie jest prawie napewno formą wyjściową hemoglobiny kręgowców, można przypuszczać, że została ona przeniesiona do roślin z jakiegoś prymitywnego organizmu zwierzęcego² i dotychczas zachowała swą pierwotną strukturę.

Ostatnio opublikowano wyniki [37] oznaczania sekwencji aminokwasów w białku produkowanym przez jeden z genów wirusa mięsaka kociego

² O możliwościach przenoszenia genów — a za ich pośrednictwem białek — między organizmami niespokrewnionymi będzie mowa dalej.

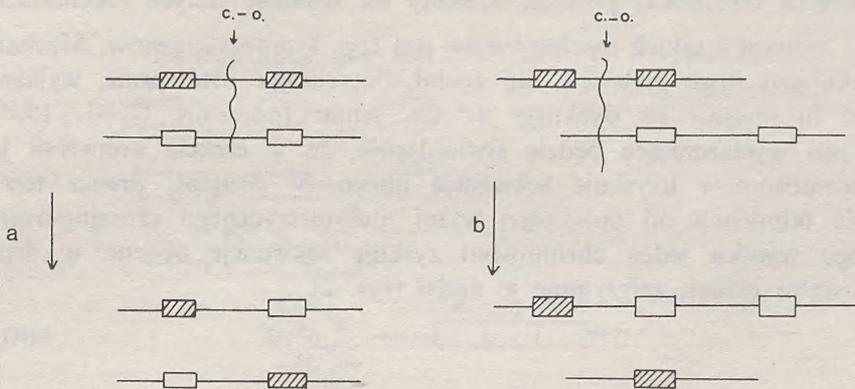
(GR-FeSV). Białko to składa się wyraźnie z dwóch części: pierwsza ma duże podobieństwo do aktyny, białka szkieletowego rozpowszechnionego u przedstawicieli eukariota, druga natomiast przypomina swą budową enzym kinazę tyrozynową. Połączenie w jedną cząsteczkę dwóch odrębnych białek — strukturalnego i enzymatycznego — może świadczyć o tym, że tasowanie egzonów rzeczywiście zachodzi w czasie ewolucji. Procesy przypominające tasowanie egzonów obserwuje się także w trakcie tworzenia białek specyficznych dla poszczególnych narządów czy tkanek organizmów. Np. gen kodujący białko hormonu kalcytoniny tworzy co najmniej dwie różne postaci tego związku działające w różnych organach (trzustka, tkanka nerwowa) [42]. Podobne zjawiska występują także w czasie produkcji przeciwciał [22].

Następną osobliwość genomów u eukariota stanowią tzw. rodziny wielogenowe (ang. multigene families). Wiedzano już od dość dawna, że w genomie organizmów eukariotycznych obok sekwencji jednostkowych (unikalnych) obecnych tylko w jednej kopii na genom haploidalny, występują także sekwencje powtarzalne. Stopień powtarzalności tych sekwencji jest bardzo różny: od kilku (np. w przypadku genów kodujących globiny poszczególnych hemoglobin) poprzez kilkadziesiąt-kilkaset (np. geny kodujące rybosomalne i transferowe kwasy rybonukleinowe) aż do wielu tysięcy razy (np. tzw. sekwencja Alu I występuje w genomie człowieka ok. 300 000-500 000 razy). Powtarzalne sekwencje różnią się także wyraźnie pod względem rozmieszczenia w obrębie genomu. Zwykle są one pogrupowane, przy czym grupy takie mogą znajdować się w jednym chromosomie (np. geny kodujące 18S rRNA u *Xenopus laevis* tworzą jedną, kilkasetczłonową grupę), podczas gdy podobne geny u człowieka tworzą oddzielne grupy w pięciu różnych chromosomach. Natomiast wspomniane sekwencje Alu I występują pojedynczo we wszystkich chromosomach człowieka i ich rozmieszczenie można uznać za równomierne: odległość między nimi wynosi ok. 2500 bp (par zasad) [20]. Powtarzalne sekwencje grają na ogół ważną rolę w produkcji związków (głównie różnych rodzajów RNA) potrzebnych w komórkach w dużej liczbie cząsteczek. Rola nie wszystkich została jednak dotychczas poznana: nie wiadomo np. jaką funkcję pełnią wspomniane już wielokrotnie sekwencje Alu I.

Z ewolucyjnego punktu widzenia rodziny wielogenowe są zjawiskiem bardzo interesującym. Z jednej bowiem strony uderzające podobieństwo (nierzadko identyczność) sekwencji powtarzających się wielokrotnie postuluje istnienie mechanizmów utrzymujących to podobieństwo. Z drugiej zaś strony problem ich historii — pojawienie się na terenie genomu i ewentualny rozwój rodowy domagają się także wyjaśnienia. Odkładając problemy filogenetyczne na później (p. ewolucja genów), zajmiemy się obecnie mechanizmami utrzymującymi elementy rodzin wielogenowych w stanie niezmiennym.

Na terenie powtarzalnych sekwencji zachodzą oczywiście mutacje, które doprowadziłyby do szybkiego zróżnicowania poszczególnych elementów rodziny wielogenowej. Selekcja stabilizująca (a więc odrzucająca mutacje szkodliwe, to jest takie, które upośledzają pełnienie podstawowych funkcji przez

produkty genów) jest tutaj, jak się wydaje nieskuteczna: trudno sobie wyobrazić, aby selekcja zdolna była do „wyłapania” pojedynczych zmienionych sekwencji z wielu (czasem setek tysięcy) niezmienionych, a więc dostarczających normalnie działającego produktu. Uświadomić sobie bowiem należy, że selekcja działa na organizm jako całość odrzucając te, które



Rys. 1. Schemat pokazujący dwie możliwości crossing-over w przypadku duplikacji tandemowej. a — prawidłowa konjugacja chromosomów, liczba odcinków pozostaje bez zmian (2+2); b — konjugacja nieprawidłowa (niesymetryczny crossing-over), wynikiem są dwa chromosomy o różnej liczbie odcinków: 3+1; c-o. — miejsce wymiany (crossing-over)

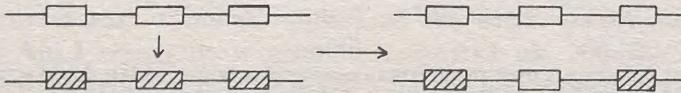
funkcjonują gorzej od innych. Wydaje się mało prawdopodobne, aby np. zmieniony produkt jednego genu rRNA (z kilkuset działających prawidłowo) obniżył tak zdolność życiową organizmu, aby ten został wyeliminowany przez selekcję. W takiej sytuacji trzeba szukać innych przyczyn tej uderzającej jednolitości elementów rodzin wielogenowych. Nie należy z tego jednak wnosić, że będą to mechanizmy, w których selekcja nie odgrywa żadnej roli.

Problem utrzymywania homologii w obrębie rodzin wielogenowych jest do dziś otwarty — dyskutuje się go pod hasłem „zgodnej ewolucji” (ang. concerted lub coincidental evolution). Jak się wydaje, mogą tu działać trzy różne różne mechanizmy.

1. Tzw. niesymetryczny crossing-over. Mechanizm ten znany już od czasów genetyki klasycznej, jest najlepiej zbadany i przez wielu autorów uważany za najważniejszy (rys. 1). Podkreślić należy, że omawiany proces powoduje zwiększenie liczby jednakowych odcinków w jednym chromosomie a zmniejszenie ich w drugim. Przypuszcza się, że powtarzający się przez dłuższy czas podobny proces może doprowadzić do powstania dużych nawet grup podobnych sekwencji w chromosomach organizmów eukariotycznych [1]. Opisany proces może zachodzić jednakże tylko wtedy, gdy mamy do

czynienia z sekwencjami (genami) sprzężonymi w jednym chromosomie. Można także wyobrazić sobie (choć potrzebne są wówczas dodatkowe założenia) podobny mechanizm ujednoczenia grup sekwencji umieszczonych w różnych chromosomach (jak np. geny 18S rRNA u człowieka) [1]. Istnienie jednak sekwencji o wysokim stopniu homologii rozproszonych w różnych chromosomach (jak np. wspomniane sekwencje Alu I w chromosomach człowieka) powstać musiały na zasadzie innych mechanizmów.

2. Jednym z takich mechanizmów jest tzw. konwersja genów. Mechanizm molekularny tego zjawiska nie został dotychczas ostatecznie, wyjaśniony i nie tu miejsce na dyskusję na ten temat (por. np. [2, 3, 15, 16]). Dla nas wystarczające będzie stwierdzenie, że w efekcie konwersji jeden z chromosomów uzyskuje sekwencje obecne w drugim; proces ten jest o tyle odmienny od opisanego wyżej niesymetrycznego crossing-over, że w jego wyniku jeden chromosom zyskuje sekwencje obecne w drugim, ten ostatni jednak zatrzymuje je nadal (rys. 2).

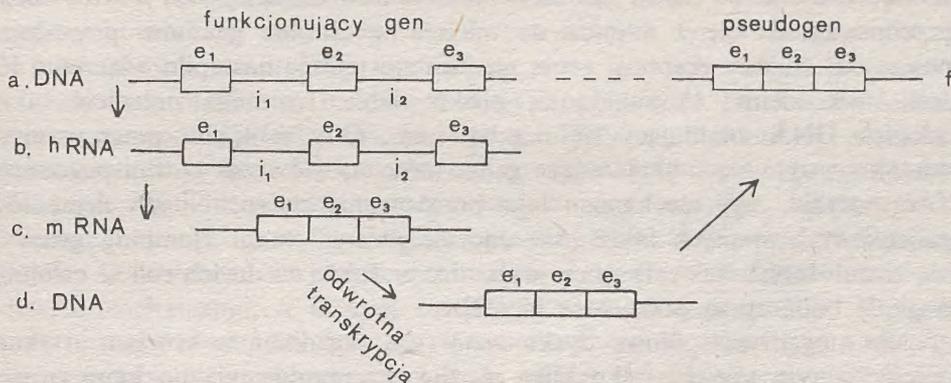


Rys. 2. Schemat pokazujący konwersję genów. Strzałka (lewa część rysunku) oznacza kierunek przekazania informacji

Istnieją dane [23, 30, 40], że konwersja może być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za podobieństwo sekwencji nie tylko w różnych chromosomach, ale także w obrębie jednej grupy silnie sprzężonych genów.

3. Ostatnio odkryto jeden z najbardziej niezwykłych mechanizmów mogących wpływać na ujednoczenie sekwencji, zwłaszcza rozproszonych w różnych chromosomach. Jest to proces przypominający namnażanie się retrowirusów (por. np. [8]). Chodzi tu w zasadzie o to, że możliwe jest budowanie cząsteczek DNA na podstawie informacji zawartej w RNA i włączanie tych nowo zsyntetyzowanych fragmentów DNA do genomu (chromosomu). Ponieważ jest to proces bardzo interesujący i będzie nam potrzebny w trakcie dyskusji na temat ewolucji genów, przyjrzymy się nieco bliżej powstawaniu tzw. pseudogenów. Są to odcinki DNA znajdujące się zwykle w sąsiedztwie funkcjonujących genów i przypominające je pod względem sekwencji nukleotydów, ale najwyraźniej nie mające zdolności do transkrypcji. Niektóre pseudogeny mają pewną bardzo interesującą własność: pozbawione są one mianowicie intronów, choć ich funkcjonujące odpowiedniki mają z reguły strukturę mozaikową. To naprowadziło genetyków na myśl, że te pseudogeny konstruowane są na podstawie dojrzałych cząsteczek

mRNA, z których jak wiadomo introny zostały wycięte. W procesie tym bierze udział specjalny enzym zwany odwrotną transkryptazą, umożliwiającą syntezę DNA na podstawie informacji zawartej w RNA. Tak powstały odcinek DNA może następnie zostać włączony do normalnego genomu stając się pseudogenem (rys. 3) [33, 39]³.



Rys. 3. Schemat przedstawiający jedną z hipotez powstawania pseudogenów. Funkcjonujący gen mozaikowy w cząsteczce DNA, będącej częścią chromosomu (a) ulega najpierw kompletnej transkrypcji na terenie jądra (b). Transkrypt ten poddany jest następnie procesowi dojrzewania, w czasie którego wycinane są m.in. sekwencje intronów (i₁, i₂) a pozostają jedynie połączone w jeden blok egzony (e₁, e₂, e₃) (c). Taki dojrzwały mRNA łączy się zwykle z rybosomami i ulega translacji. Czasem jednak ulega odwrotnej transkrypcji tworząc znowu cząsteczkę DNA. Ponieważ została ona utworzona na matrycy mRNA brak w niej sekwencji intronowych (d). Taki fragment DNA może zostać następnie włączony w genom (chromosom) tworząc pseudogen (f)

Obecnie trudno jest jeszcze powiedzieć, który z trzech opisanych wyżej procesów (można zresztą wyobrazić sobie jeszcze inne — [1, 22]) jest odpowiedzialny za wysoki stopień homologii rodzin wielogenowych. Można jednak wyrazić przypuszczenie, że są to procesy uzupełniające się i że występują razem.

Niewątpliwie najbardziej niespodziewanym odkryciem ostatnich lat było stwierdzenie, że istnieją sekwencje, które mogą przemieszczać się w obrębie genomu⁴. Są to sekwencje o bardziej różnej długości (od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy par zasad) a także o bardzo różnym charakterze.

³ Dotyczy to jedynie części pseudogenów [31].

⁴ Ruchome elementy genetyczne zostały odkryte metodami genetyki klasycznej przez McClintock [36] u kukurydzy. Wyniki te przyjęto jednak z niedowierzaniem i dopiero rozwój nowoczesnych technik genetyki molekularnej (o czym wspomniano na wstępie) spowodował podjęcie badań nad tymi niezwykłymi elementami składowymi genomu.

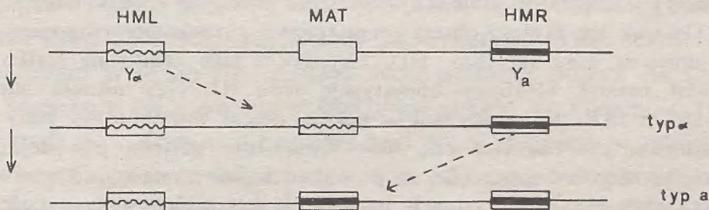
Coraz trudniej też odgraniczyć je od znanych już od stosunkowo dawna episomów, plazmidów a nawet bakteriofagów. Klasyfikacja tych elementów nie jest zresztą dla nas tu rzeczą najważniejszą i zainteresowanych odsyłam do podręczników genetyki molekularnej. Dla naszych celów wystarczy powiedzieć, że najmniejsze z omawianych elementów, tzw. sekwencje IS są po prostu stosunkowo krótkimi odcinkami DNA opatrzonymi po obu stronach tzw. powtórkami, tj. odcinkami o podobnym lub nawet identycznym składzie nukleotydów (choć często są one wzajemnie odwrócone). Mają one zdolność przemieszczania się z miejsca na miejsce w obrębie genomu, powodując najczęściej zmiany ekspresji genu, na którego terenie nastąpiło włączenie IS. Jeśli dwa odcinki IS znajdują się blisko siebie, to mogą przenieść także odcinek DNA znajdujący się między nimi. Gdy w takim przenoszonym odcinku znajdują się funkcjonujące geny, mówimy wówczas o transpozonach. Transpozycja, czyli mechanizm tego przenoszenia się ruchomych elementów genetycznych zwanych także „skaczącymi genami” (ang. “jumping genes”), nie został dotychczas całkowicie wyjaśniony. Także co do ich roli w ewolucji poglądy badaczy są podzielone [6, 22].

Nie mogąc szczegółowo dyskutować tych zagadnień w krótkim artykule pokażę w tym miejscu tylko kilka możliwości regulowania poziomu zmienności poprzez elementy ruchome. Z oceną znaczenia tych zjawisk dla ewolucji trzeba poczekać na nagromadzenie się większej liczby obserwacji.

1. Elementy ruchome mogą powodować znaczne podwyższenie tempa mutacji i to bardzo różnych genów. Zwiększając w ten sposób zmienność przyczyniają się do podniesienia możliwości adaptacyjnych populacji najróżnorodniejszych organizmów (nie wyłączając prokariotycznych sinic i bakterii, por. niżej pkt 4). Bezpośredni wpływ transpozycji na zdolności przystosowawcze kultur bakterii został zresztą wykazany doświadczalnie [7]. Mutageniczne działanie transpozycji może być bardzo różnorodne: może polegać tylko na czasowym inaktywowaniu genu lub na czasowej zmianie ekspresji, ale także na powodowaniu nieodwracalnych zmian w chromosomach (delecje, duplikacje, pęknięcie chromosomów prowadzące do powstania innych aberracji chromosomowych). Klasycznym przykładem ruchomego elementu jest, np. gen Dt u kukurydzy. Powoduje on zmianę ekspresji genu określającego barwę warstwy aleuronowej w ziarniaku. Jak wykazała McClintock [36] gen ten mapuje się w różnych miejscach różnych chromosomów. Wspomniane już mutacje homeotyczne typu bithorax powodowane są także, jak to wykazano niedawno [4], przez wstawianie ruchomego elementu długości 7.3 kb⁵ o stałym i charakterystycznym składzie, nazwanego przez autorów „Gypsy” czyli cygan. Nie jest to zresztą jedyny ruchomy element znajdujący się w kompelskie bithorax, ale jest on najczęstszy.

⁵ kb — jednostka długości cząsteczki DNA. 1 kb = 1000 par zasad. Jednostką podstawową jest 1 bp — jedna para zasad. Mówiąc o parach zasad mamy tu na myśli parę zasad komplementarnych.

2. Elementy ruchome mogą powodować powstanie specyficznych' polimorfizmów zwiększających przynajmniej w niektórych przypadkach zdolności adaptacyjne populacji. Opiszę pokrótce dwa typy takich mechanizmów. Pierwszy dotyczy tzw. typów konjugacyjnych u drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*. Te jednokomórkowe grzyby należące do workowców mogą rozmnażać się płciowo przez zlewanie się (konjugację) haploidalnych komórek, wśród których istnieją tzw. typy konjugacyjne α i a . Normalna konjugacja prowadząca do powstania worka z zarodnikami może się odbywać jedynie między komórkami należącymi do dwóch różnych typów konjugacyjnych. Wśród różnych ras drożdży wyróżniamy m.in. dwa ich rodzaje. Pierwszym są rasy heterotalliczne, u których typy konjugacyjne są trwałe: kultura wyprowadzona z jednej komórki, np. a , składa się z komórek wyłącznie tego typu. Rasy homotalliczne natomiast charakteryzują się zmianą typów konjugacyjnych w obrębie jednego klonu: wyprowadzając kulturę (klon) z jednej komórki, np. α , otrzymamy klon składający się zarówno z komórek α jak i komórek a . To przejście typu α w a , i odwrotnie, dokonuje się na drodze mechanizmu, w którym zasadniczą rolę gra transpozycja. W uproszczeniu wygląda to tak (rys. 4): w trzecim chromosomie drożdży znajduje się locus Mat, który decyduje o tym do jakiego typu konjugacyjnego będzie

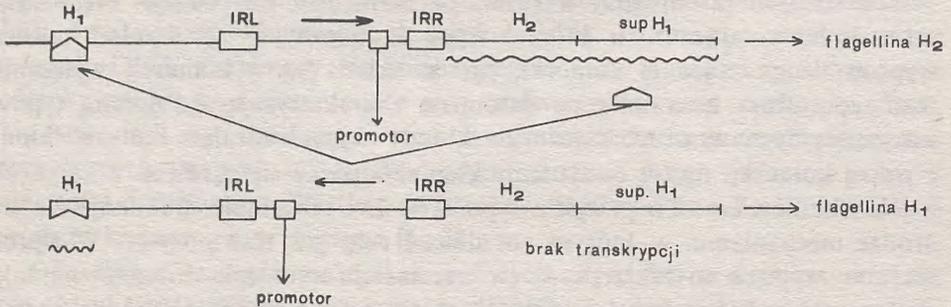


Rys. 4. Schemat pokazujący zasadę interkonwersji typów konjugacyjnych u drożdży. Linie przerywane zakończone strzałkami wskazują kierunek transpozycji. Oznaczenia — patrz tekst

należała komórka. Stwierdzono, że gdy na terenie tego locus znajduje się sekwencja Y_a , komórka należy do typu a ; gdy natomiast w locus Mat znajduje się sekwencja Y_α komórka jest typu α . Sekwencje Y_a i Y_α nie są homologiczne: mają różne długości (odpowiednio 642 i 747bp) i różne sekwencje nukleotydów. Z obu stron locus Mat znajdują się dwa odcinki nazwane HML i HMR zawierające obie te sekwencje: HML zawiera sekwencję Y_α natomiast locus HMR sekwencję Y_a . Obie te sekwencje nie ulegają ekspresji tak długo, jak długo znajdują się na terenie loci HML i HMR. Określenie typu konjugacyjnego komórki odbywa się przez przeniesienie odpowiedniej sekwencji (Y_a lub Y_α) z locus HMR, względnie, HML do locus Mat, przy czym przeniesienie to ma cechy typowej transpozycji. Podobny mechanizm zabezpieczający możliwość rozmnażania płciowego nawet w ramach jednego klonu odkryto także i u drożdży pombe (*Schizosaccha-*

romyces pombe), należących do tzw. drożdży rozszczepkowych (nie pączkujących), które uchodzą za dosyć stare filogenetycznie. Można więc przypuszczać, że mechanizm taki jest u drożdży rozpowszechniony.

Drugi przykład polimorfizmu polegającego na alternatywnej ekspresji różnych (nie allelicznych) genów dotyczy zmiany białka budującego rzęski u bakterii z rodzaju *Salmonella*. Rzęski tych bakterii mogą być zbudowane z dwóch różnych białek: albo flagelliny 1 albo z flagelliny 2. Podobnie jak w przypadku typów konjugacyjnych u drożdży, oba typy komórek



Rys. 5. Schemat mechanizmu alternatywnej ekspresji genów H1 i H2 produkujących odpowiednio białka flagelliny 1 i 2. Odcinek ulegający odwróceniu mieści się między blokami oznaczonymi IRL i IRR. Odcinek ten zawiera obszar promotorowy warunkujący rozpoczęcie transkrypcji genu H2 i supresora genu H1 (sup. H1). Pierwszy z nich produkuje białko flagelliny 2, drugi natomiast związek blokujący transkrypcję genu H1. Gdy odcinek zawarty między powtórkami IRL i IRR skierowany jest w prawo, obszar promotorowy łączy się z genem H2 i produkowana jest flagellina H2. Odwrócenie tego odcinka powoduje „odłączenie” obszaru promotorowego od genu H2, co powoduje ustanie transkrypcji zarówno genu H2 jak i supresora genu H1. W tej sytuacji gen H1 nie jest zablokowany i może produkować flagellinę H1

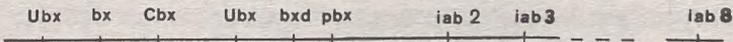
pojawiają się w kulturach klonowych, a więc wyprowadzonych z jednej komórki na drodze rozmnażania wegetatywnego. Mechanizm tego przechodzenia jednego typu komórek w drugi wygląda nieco inaczej, ale i tu zasadniczą rolę gra element ruchomy (rys. 5). W odróżnieniu jednak od drożdży, sekwencja zawarta między tzw. odwróconymi powtórkami (IRL i IRR, rys. 5) ulega jedynie odwróceniu. Zależnie od tego czy skierowana jest w jedną czy w drugą stronę produkowana jest albo flagellina 1 albo flagellina 2. Zdolność do alternatywnej produkcji dwóch różnych białek budujących rzęski powoduje, że populacje *Salmonella* są polimorficzne. Polimorfizm zwiększa zwykle możliwości adaptacyjne populacji. Nie wiemy dotychczas, czy opisany polimorfizm białkowy u *Salmonella* ma charakter przystosowawczy, ale można sobie wyobrazić, że ułatwia on infekcję. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że podobny mechanizm alternatywnej produkcji dwóch par polipeptydów zmieniających preferencje faga do atakowania bakterii opisano u faga Mu: w jednym przypadku atakuje on

Escherichia coli w drugim zaś gatunki *Citrobacter* i *Shigella* [45]. Tak więc możliwość alternatywnej produkcji dwóch zespołów białek powodująca polimorfizm faga Mu rozszerza jego możliwości adaptacyjne.

Podkreślić tu należy, że opisany polimorfizm jest zasadniczo odmienny od opisywanego przez genetyków populacyjnych polimorfizmu genetycznego. O ile ten ostatni pociąga za sobą zawsze istnienie tzw. obciążenia genetycznego (co prowadzi do eliminacji pewnej liczby osobników z populacji), to opisany u *Salmonella* i faga Mu, takiego obciążenia nie pociąga. Jest więc w pewnym sensie korzystniejszy dla populacji.

3. Ruchome sekwencje mogą pełnić rolę elementów różnych systemów regulatorowych. Do takiego wniosku upoważniają wyniki różnych badań, z których omówimy tu trzy.

Kompleks bithorax u *Drosophila melanogaster* wspomniany na początku, jest z wielu względów interesujący. W skład tego kompleksu wchodzi cały szereg genów zmieniających charakter poszczególnych segmentów tułowia i odwłoka owada. Zwraca uwagę fakt, że kolejność poszczególnych genów w chromosomie odpowiada dosyć dokładnie kolejności segmentów ciała owada. I tak typowa mutacja bithorax dotyczy całego trzeciego segmentu tułowia zamieniając go w drugi (rys. 6). Ultrabithorax zamienia trzeci segment tułowia i pierwszy segment odwłoka w drugi segment tułowia. Mutacja bithoraxoid przekształca pierwszy segment odwłoka w trzeci segment tułowia. Grupa genów iab2 do iab8 przekształca odpowiednio drugi segment odwłoka w pierwszy, trzeci w drugi itd. Zawsze więc mutacja polega na przesunięciu charakteru segmentu ciała owada w kierunku głowy. Że kolejność tych genów nie jest przypadkowa, dowodzą badania nad przenoszeniem segmentu obejmującego gen postbithorax z właściwego mu położenia w okolice znajdujące się między prawym egzonom genu ultrabithorax i contrabithorax. Gen pbx znajdujący się na właściwym sobie miejscu przekształca proksymalną (tj. skierowaną w kierunku głowy) część trzeciego segmentu tułowia w segment drugi. Po zmianie miejsca w chromosomie działa on na segment drugi przekształcając go w trzeci.



Rys. 6. Przybliżona mapa genów kompleksu bithorax u *Drosophila melanogaster*. Ubx — ultrabithorax, bx — bithorax, Cbx — contrabithorax, bxd — bithoraxoid, pbx — postbithorax, iab 2, 3 i 8 — poszczególne geny infra-abdominal (warunkujące prawidłowy rozwój segmentów odwłoka). Dwa loci Ubx odpowiadają dwóm egzonom tego genu (są one oddzielone bardzo długim intronem zawierającym loci bx i Cbx)

Badania przeprowadzone za pomocą testu komplementacji dowiodły, że wszystkie geny omawianego kompleksu grupują się w trzy funkcjonalne jednostki, a badania molekularne pokazały, że transkrypcja obejmuje często

szereg loci, np. cały odcinek między lewym i prawym locus Ubx produkuje jedną tylko cząsteczkę mRNA. Wszystkie te fakty świadczą o wysokim stopniu integracji całego kompleksu. Zaznaczyć ponadto należy, że produkty działania genów tego kompleksu (o ile poznano) pojawiają się już w komórkach blastodermi (a więc w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych), a następnie jedynie w komórkach węzłów nerwowych tylnej części ciała dorosłego owada (imago). Tym tłumaczy się fakt, że jakakolwiek zmiana działania tych genów ma tak duże efekty fenotypowe. Nie ma także wątpliwości, że działanie tych genów podlega silnej i precyzyjnej regulacji. Ponieważ jak widzieliśmy większość mutacji opisywanego kompleksu ma charakter insercji sekwencji „Gypsy” i innych, oraz ma charakter związanych z transpozycją drobnych delecji i aberracji chromosomowych można przypuścić, że transpozycja zachodząca tak często w tym miejscu może wpływać na procesy regulacyjne działania genów.

W powyżej dyskutowanym przypadku można jedynie domyślać się regulatorowej roli ruchomych elementów. Mamy jednak i wyniki wskazujące na to bardziej bezpośrednio. Jednym z nich są obserwacje Koroczki [29] nad wpływem transpozycji bloku heterochromatycznego na opóźnienie ekspresji jednej z esteraz, związanej z hormonem juvenilnym. Autor opracował model, który pokazuje możliwość zasadniczej zmiany właściwości organizmu na skutek zmiany synchronizacji pojawu różnych elementów szlaków metabolicznych.

Jeszcze bardziej interesujące wydają się być wyniki badań grupy genetyków molekularnych z kalifornijskiego instytutu politechnicznego (Caltech) [11]. Badacze ci zajęli się przypadkami, w których następuje jednoczesna aktywacja kilku lub nawet kilkunastu genów produkujących białka nieobecne dotychczas w komórce. Przykładem mogą być białka szoku termicznego u *Drosophila melanogaster* lub białka pojawiające się w komórkach drożdży, gdy organizmy te cierpią na niedostatek pewnych aminokwasów. Gdy mucha owocowa poddana zostanie działaniu temperatury $+37^{\circ}\text{C}$, wówczas ulega ona tzw. szokowi termicznemu. Objawia się to, m.in. przez zaprzestanie produkcji prawie wszystkich białek znajdujących się normalnie w komórkach, a na to miejsce pojawia się 9 innych białek, których w warunkach przeciętnych w komórkach nie ma. Natomiast w przypadku drożdży, brak aminokwasów powoduje aktywację jednocześnie czterech różnych genów produkujących białka biorące udział w syntezie histydyny i tryptofanu. W obu przypadkach geny o których mowa znajdują się przynajmniej częściowo w różnych chromosomach, nie są więc sprzężone. W ten sposób jednoczesnej aktywacji wielu genów nie można objaśnić znanym u bakterii mechanizmem operonu. Jak wiadomo, warunkiem funkcjonowania takiego systemu jest umieszczenie wszystkich genów operonu w bezpośrednim sąsiedztwie.

Wspomniani autorzy zauważyli we wszystkich zbadanych przypadkach (a było ich więcej niż wymieniłem), że w niekodujących częściach genów od końca 5' znajdują się krótkie sekwencje nukleotydów o dużej homologii, sięgającej od sześćdziesięciu kilku do stu procent. Podobieństwo sekwencji

ogranicza się do danego systemu genów, w różnych systemach mogą to być sekwencje zupełnie różne. I tak, tzw. idealną sekwencją (ang. consensus sequence) w przypadku czterech genów drożdży jest A^ΔGTGACTC, a w przypadku genów produkujących białka szoku termicznego CTNGAATNTTCTA-GA^Δ. Udowodniono, że wymienione sekwencje są konieczne do indukcji poszczególnych genów, choć nie są one konieczne do samego procesu transkrypcji. Znaczący to, że usunięcie takiej sekwencji pozbawia komórkę możliwości reagowania na bodziec (temperaturę w przypadku muchy owocowej, głód aminokwasów w przypadku drożdży), ale przyłączenie do takiego genu, tzw. sekwencji wzmacniającej (ang. enhancer sequence)⁷ powoduje trwałą jego ekspresję.

Na tej podstawie postawiono hipotezę, że wyżej opisane sekwencje są elementami mechanizmu indukującego ekspresję genów. Autorzy referowanej pracy zwracają uwagę, że sekwencje te, które umieszczone są zwykle blisko promotora transkrypcji, mogą grać rolę receptorów. Receptor ten miałby przyjmować cząsteczkę aktywatora produkowanego przez inny gen. Połączenie sekwencji receptorowej z aktywatorem byłoby warunkiem ekspresji genu. Aby jednak ten system mógł funkcjonować musi istnieć jeszcze jakieś urządzenie (gen?) zwane czujnikiem (sensor), które jest wrażliwe na bodziec i pod wpływem tego bodźca natychmiast uruchamia gen aktywatora (rys. 7). Podkreślić należy, że w ten sposób działalność wielu genów może być niejako sterowana przez produkt jednego tylko genu.

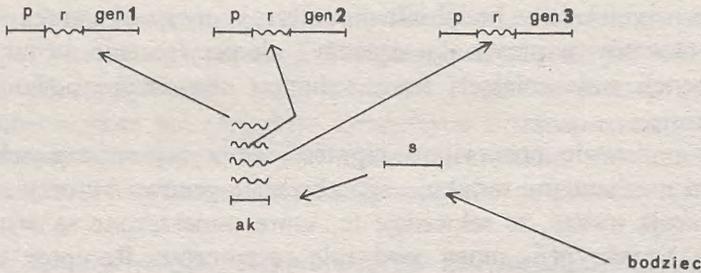
Davidson [11] zwraca uwagę, że te homologiczne sekwencje umożliwiające jednoczesną aktywację szeregu różnych genów, mogą być przenoszone z miejsca na miejsce w procesie transpozycji. Przeniesienie takiej receptorowej sekwencji do dowolnego genu poddaje go automatycznie kontroli genu produkującego aktywator. W jednym przypadku udało się tego dokonać doświadczalnie: przeniesienie sekwencji receptorowej związanej z genami produkującymi białka szoku termicznego do genu produkującego enzym kinazę tymidynową u herpetowirusa spowodowało, że produkcja tego enzymu rozpoczynała się dopiero po zadziałaniu wysokiej temperatury.

4. Przenoszenie genów w obrębie komórki i między komórkami (a także organizmami). Dotychczas dyskutowane zjawiska transpozycji dotyczyły przenoszenia sekwencji w obrębie genomu jądrowego (oczywiście u eukariota). Wiele wskazuje na to, że zjawiska przenoszenia genów odgrywają pewną (choć obecnie jeszcze trudną do oceny) rolę w transporcie genów z organelli komórkowych do jądra a także między organizmami.

⁶ Idealna sekwencja (tak tłumaczą angielskie wyrażenie "consensus sequence"), to sekwencja powstała przez porównanie wielu rzeczywistych sekwencji i umieszczenie na poszczególnych pozycjach tych zasad, które występują w danej pozycji najczęściej. Symbol Δ oznacza, że adenina i tymina spotykane są w danej pozycji równie często. Symbol N oznacza, że dana pozycja może być zajęta przez dowolny nukleotyd.

⁷ Sekwencje wzmacniające mają charakter modyfikatorów nasilających ekspresję genów.

Według rozpowszechnionego obecnie poglądu (por. np. [35]), mitochondria i chloroplasty pochodzą od prokariotycznych symbiontów prymitywnych komórek eukariotycznych. Genetyka molekularna dostarczyła licznych argumentów przemawiających za takim właśnie ujęciem. Nieco szerzej powiemy na ten temat przy okazji dyskusji molekularnej filogenezy. Uderzającym



Rys. 7. Schemat objaśniający mechanizm aktywacji szeregu różnych genów przez produkt jednego genu, wg hipotezy Davidsona [11]. Istotą tego mechanizmu jest istnienie homologicznych sekwencji receptorowych w obszarach promotorowych genów podlegających regulacji. p — promotor, r — sekwencja receptorowa, ak — gen produkujący aktywator, s — czujnik

zjawiskiem jeśli chodzi o mitochondria i chloroplasty jest to, że część białek (a także kwasów nukleinowych) produkowanych jest na podstawie informacji zawartej w DNA organelli. Reszta białek produkowana jest jednak przez geny znajdujące się na terenie jądra, a następnie transportowana jest z cytoplazmy do odpowiednich organelli. Otóż postulowano [51], że geny kodujące białka znajdowały się na początku w organellach a dopiero w trakcie długiego okresu filogenezy komórki eukariotycznej przeniesione zostały na teren jądra. Hipoteza ta została dopiero ostatnio potwierdzona przez udowodnienie przeniesienia pewnego genu z mitochondriów do jądra u tzw. „małych” drożdży (petite) [32]. Elementem przenoszącym okazały się transpozony.

Najbardziej niezwykle jest jednak przenoszenie genów z jednego organizmu do drugiego z pominięciem drogi rozmnażania płciowego. Od dawna było wiadomo, że bakterie chorobotwórcze nabywają oporność na środki stosowane przez medycynę. Problemem stało się to jednak po zastosowaniu antybiotyków. Bakterie nabywają bowiem taką oporność na zasadzie selekcji opornych mutantów, a więc na drodze adaptacji darwinowskiej. Zagadką pozostawał jednak fakt, jakim sposobem bakterie mogą uzyskiwać oporność na szereg antybiotyków (a także na inne środki stosowane w medycynie, jak np. sulfonamidy) od razu, niejako „od jednego zamachu”. Poszczególne mutacje są przecież zjawiskiem rzadkim, rzędu 10^{-5} - 10^{-9} (por. wyżej). Prawdopodobieństwo jednoczesnego wystąpienia kilka mutacji jest więc prak-

tyczne zerowe. Także szybkie przenoszenie się oporności do różnych punktów globu było przez dłuższy czas zagadkowe.

Okazało się, że czynnikiem odpowiedzialnym za oba wyżej wymienione zjawiska są, tzw. plazmidy. Są to, jak już wiadomo, odcinki DNA znajdujące się na ogół poza genomem bakteryjnym ale mające zdolność czasowego włączania się do tego genoforu. Plazmidy te mają zdolność przenoszenia się z komórki do komórki i mogą zawierać najróżnorodniejsze geny, m.in. całe „zestawy” genów opornościowych. Zbadanie struktury takich plazmidów wykazało, że poszczególne geny mają na obu swych końcach charakterystyczne sekwencje świadczące o tym, że zostały przeniesione do plazmidu za pomocą transpozonu. Wygląda to więc tak, że transpozony zawierające jeden lub kilka genów opornościowych mogą wchodzić w skład plazmidu i jako zintegrowana grupa przenosić się z komórki do komórki.

Ta hipoteza została ostatnio potwierdzona w efektywny sposób. Mianowicie badacze amerykańscy Hughes i Datta [21] wykorzystali unikalną kolekcję bakterii z pierwszej połowy naszego stulecia (a więc jeszcze z okresu gdy nie znano antybiotyków) założoną przez jednego z lekarzy. Pobierał on mianowicie próbki bakterii chorobotwórczych w latach 1917-1954 i zatapiał je w naczyniach, które od momentu zamknięcia nie były w ogóle otwierane. Zbadanie w ostatnich latach tych bakterii wykazało, że zawierały one tyleż plazmidów co bakterie współczesne i o podobnych właściwościach jeśli chodzi o ich zdolności do przenoszenia się z komórki do komórki. Jednak wyjątkowo tylko znajdowano w obrębie tych plazmidów geny oporności na antybiotyki — odwrotnie jak to jest obecnie. Tak więc zdolność do przekazywania informacji genetycznej za pośrednictwem plazmidów istniała u bakterii prawdopodobnie od najdawniejszych czasów. Nagromadzenie się w plazmidach genów opornościowych natomiast musiało się dokonać w czasie trzech-czterech dziesiątków lat, co jak na procesy ewolucji jest tempem zawrotnym.

Istnienie możliwości przenoszenia informacji genetycznej z komórki do komórki (a więc jakby z osobnika do osobnika) zmienia zupełnie nasze poglądy na charakter grup komórek bakteryjnych występujących w naturze. Wydaje się, że wbrew dotychczasowym poglądom bakterie mogą (przynajmniej w niektórych przypadkach) tworzyć populacje podobnego typu jak organizmy rozmnażające się płciowo. Podkreślenia wymaga tu fakt, że przenoszenie genów u bakterii nie ogranicza się do komórek konspecyficznych, ale możliwe jest także w stosunku do bakterii należących do odrębnych gatunków a nawet rodzajów.

Czy możliwy jest transport informacji genetycznej między osobnikami organizmów eukariotycznych z pominięciem „normalnej” drogi rozmnażania płciowego? Na to pytanie nie ma jeszcze pewnej odpowiedzi. Istnieją jednak fakty zdające się wskazywać na istnienie takich możliwości. Trudno np. w inny sposób wytłumaczyć obecność leghemoglobiny u roślin motylkowych (np. u soi), związku, który ma zupełnie podobną budowę do białka hemoglobiny kręgowców. Podobnie, jak wytłumaczyć, że np. u myszy około 0.1% całego

genomu to sekwencje przypominające retrowirusy, a podobne (o ile nie identyczne) sekwencje występują w genomach innych kręgowców nie wyłączając człowieka. Nie znamy plazmidów u organizmów eukariotycznych (może z wyjątkiem drożdży), ale ostatni przykład świadczy, że wektorem przenoszącym informację genetyczną u eukariota mogą być wirusy zwierzęce i roślinne, jakich znamy przecież wiele.

MECHANIZMY ZWIELOKROTNIANIA ILOŚCI DNA W TRAKCIE EWOLUCJI

Truizmem jest stwierdzenie, że organizmy stawały się w trakcie ewolucji (rozwoju rodowego) coraz bardziej skomplikowane i to zarówno strukturalnie jak i funkcjonalnie. Przełożywszy to na język genetyki, musimy powiedzieć, że organizmy w trakcie ewolucji zwiększały swe zapotrzebowanie na informację, a to z kolei wymagało odpowiedniego powiększenia aparatu genetycznego, co w pierwszym rzędzie dotyczy ilości DNA. Istotnie istnieje (choć dosyć luźna) korelacja między stopniem komplikacji organizmu a zawartością jego DNA. Kręgowce np. mają około milion razy więcej DNA niż prostsze wirusy [34]. Istnieje obszerna literatura na ten temat, napisano nawet poważną monografię [38], która wywarła znaczący wpływ na nasze poglądy na mechanizm ewolucji.

Istnieją dwa zasadnicze sposoby zwiększenia ilości DNA w komórce. Pierwszym jest podwojenie (a następnie zwielokrotnienie) odcinków jednej cząsteczki. Powstają tzw. duplikacje tandemowe, co oznacza, że podwojone odcinki znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie. Jeśli podwojone odcinki zawierają cały gen, wówczas powstają dwa identyczne geny leżące tuż obok siebie. Poprzez dalsze duplikacje a następnie niesymetryczny crossing-over (rys. 1) mogą powstać całe grupy sprzężonych genów, jak to widzieliśmy w przypadku rodzin wielogenowych. Takie zwielokrotnienie jednakowych sekwencji grało, jak zobaczymy, bardzo ważną rolę w ewolucji, stało się bowiem punktem wyjścia do powstania nowych genów. Drugi sposób zwiększenia ilości DNA to poliploidyzacja polegająca na zwielokrotnieniu całych genomów. Ślady takich dawnych poliploidyzacji znajdujemy np. u kręgowców [38], nie mówiąc już o roślinach, gdzie zjawisko to grało zawsze dużą rolę w ewolucji [46].

Podsumowując to co powiedziano o powstawaniu zmienności na poziomie molekularnym można stwierdzić, że badania ostatnich lat zmieniły dosyć zasadniczo nasze poglądy na ten temat. Obok „klasycznych” mutacji punktowych będących najbardziej elementarnym mechanizmem generującym zmienność, istnieje w komórkach wiele innych mechanizmów, z których znaczenia prawdopodobnie nie zdajemy sobie jeszcze w pełni sprawy. Wydaje się, że najbardziej ważkie są odkrycia takich mechanizmów jak transpozycja, która powoduje, że genom przestaje być luźnym zbiorem genów a zaczyna jawić się nam jako coś, co dysponuje wysokim stopniem integracji. Głoszone

są nawet poglądy [6], że sam genom ulega ewolucji w tym sensie, że staje się coraz bardziej scalony, i u organizmów wyższych (np. u kręgowców) przypomina skomplikowany system komputerowy zdolny do analizy sytuacji w jakiej organizm się znajduje oraz do „wybrania” optymalnej strategii ewolucyjnej. Pogląd powyższy może wydawać się nam obecnie zbyt skrajny, szczególnie w konfrontacji z neodarwinowskim mechanizmem ewolucji, do którego zdążyliśmy się przyzwyczać. Przytaczam go jednak przede wszystkim dlatego, aby pokazać, jak daleko sięgają konsekwencje nowszych badań genetyki molekularnej.

FILOGENEZA NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

Jak stwierdziłem na początku, większość prac dotyczących tzw. „ewolucji molekularnej” sprowadza się do opisu zmian, jakim uległy związki chemiczne, głównie białka i kwasy nukleinowe. Na podstawie porównań ich budowy rekonstruuje się rozwój rodowy organizmów. Ewolucja molekularna w tym sensie jest niczym innym jak odmianą systematyki filogenetycznej.

Nie ma wątpliwości, że organizm ewoluuje jako całość. Trzeba więc uświadomić sobie, że można mówić o ewolucji, np. globin czy cytochromu c jedynie w tym sensie, w jakim używamy takich zwrotów jak „ewolucja kończyn kręgowców” czy „ewolucja walca osiowego roślin telomowych”. Przenoszenie wniosków z takich porównań na całe organizmy czy grupy organizmów może doprowadzić do tak samo błędnych wniosków jakim byłoby, np. wnioskowanie o bliskości filogenetycznej ptaków i nietoperzy tylko na tej podstawie, że ich przednie kończyny przekształcone zostały w organy umożliwiające poruszanie się w powietrzu. Absurdalne byłoby także, np. wnioskowanie o bliskim pokrewieństwie człowieka z...grzechotnikiem tylko na tej podstawie, że istnieje duże podobieństwo sekwencji aminokwasów cytochromu c u tych dwóch organizmów [12] (cyt. za [9]). Innymi słowy ewolucja molekularna uprawiana w tym sensie musi uwzględniać podstawowe reguły obowiązujące systematyków. Żeby jednak oddać sprawiedliwość biologom molekularnym trzeba tu z całą mocą podkreślić, że żadna ze znanych dotychczas metod systematycznych nie pozwala na tak ścisłe ujęcie — w matematycznym sensie tego słowa — podobieństwa między organizmami jak właśnie metody porównywania sekwencji aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych, czy sekwencji nukleotydów w cząsteczkach różnych kwasów nukleinowych. Ponieważ poruszona problematyka łączy się bardzo silnie z problematyką taksonomiczną, nie będę tutaj tych spraw szerzej dyskutował, odsyłając zainteresowanych do literatury [50], (tam też zestawienie ważniejszej literatury). Zaznaczę jedynie fakt, że w ogromnej większości przypadków wnioski filogenetyczne oparte na porównaniach molekularnych zgodne są z tymi, które systematycy wypracowali metodami klasycznymi, to znaczy

opierając się przede wszystkim (często jedynie) na właściwościach budowy zewnętrznej (morfologii) i wewnętrznej (anatomii) organizmów.

W tej części artykułu chciałbym jednak omówić pewne bardziej interesujące wyniki osiągnięte metodami molekularnymi.

Pierwsze zagadnienie, jakie chciałbym omówić, to wpływ wyników stosowania metod molekularnych na systematykę bakterii.

Bakterie należące wraz z sinicami do królestwa *Prokaryota*, grają ogromną rolę zarówno w życiu człowieka jak i w procesach zachodzących w naturze. Nic więc dziwnego, że organizmy te były obiektem najróżnorodniejszych, także taksonomicznych badań. Jednak bardzo drobne ich wymiary (wielkość większości bakterii znajduje się na granicy możliwości rozdzielczych mikroskopu świetlnego), prosta morfologia i wysoka specjalizacja fizjologiczna stanowiły trudną do pokonania przeszkodę na drodze stworzenia naturalnego systemu tych organizmów. Dopiero zastosowanie metod molekularnych pozwoliło na osiągnięcie dużego postępu w tej dziedzinie. Metodami molekularnymi wykryto przede wszystkim ogromne podobieństwo sinic do bakterii — jest ono tak duże, że sinice nazywa się obecnie (głównie w krajach anglosaskich) cjanobakteriami [44]. Ale największą niespodzianką było wykrycie bakterii, które w dosyć zasadniczy sposób różnią się od całej reszty organizmów prokariotycznych. Myślę tu o tzw. archebakteriach, które w pewnym sensie zmniejszają przepaść dzielącą *Prokaryota* od *Eukaryota*. Archebakterie, do których należą znane już od dawna anaerobowe bakterie metanowe oraz kilka innych grup wysoko wyspecjalizowanych bakterii zasiedlających ekologicznie skrajne nisze (wody o temperaturach sięgających często dużo powyżej 100°C, wody silnie zasolone) różnią się od reszty prokariota, m.in. chemizmem ścian komórkowych, budową błony plazmatycznej (lipidy tej błony przypominają raczej lipidy błon komórek eukariotycznych), właściwościami kwasów rybonukleinowych. Ponadto odkryto niedawno, że niektóre geny tych organizmów zawierają introny — rzecz niespotykana u innych przedstawicieli prokariota [41]. W ten sposób metody biologii molekularnej doprowadziły do okrycia grupy organizmów o tak odrębnych właściwościach, że mówi się nawet o nowym królestwie *Archebacteria*, stawianym na równi z *Prokaryota* i *Eukaryota*. Istnieją zresztą badacze [53], którzy sądzą, że grupa ta stanowi resztkę najbardziej prymitywnych organizmów, jakie zachowały się do naszych czasów i początków ich powstania należy szukać w okresie bardzo wczesnego rozwoju życia na Ziemi.

Następne zagadnienie, jakie chciałbym tu poruszyć to problem pochodzenia komórki eukariotycznej. Według rozpowszechnionego dziś poglądu, p. np. [35], komórka taka jest tworem syntetycznym. Powstała mianowicie dzięki inwazji prakomórki przez symbiotyczne bakterie i sinice. Symbionty te zatraciły następnie swoją odrębność organizmalną i przekształciły się w organelle komórki eukariotycznej: bakterie w mitochondria, a sinice w chloroplasty. Hipoteza ta pochodzi jeszcze z ubiegłego stulecia, ale dopiero biologia molekularna przyczyniła się do jej spopularyzowania dzięki wykazaniu, że

właściwości organelli są pod wieloma względami zbieżne z właściwościami komórki prokariotycznej (bakterii i sinic) a różnią się od właściwości jądra i cytoplazmy komórki eukariotycznej. I tak rybosomy prokariotyczne i organellowe (z wyjątkiem mitochondriów kręgowców) mają tzw. stałą sedymentacyjną 70S, podczas gdy rybosomy cytoplazmy komórki eukariotycznej charakteryzują się stałą sedymentacji 80S. Podobnie antybiotyk chloramfenikol hamuje translację w komórkach prokariotycznych, mitochondriach i chloroplastach, nie działa natomiast na ten proces odbywający się na polirybosomach komórek eukariotycznych. Natomiast odwrotna sytuacja istnieje w przypadku cykloheksymidu: związek ten uniemożliwia syntezę białka w komórkach eukariotycznych (oczywiście w cytoplazmie), natomiast nie wpływa na ten sam proces w komórkach prokariotycznych oraz w mitochondriach i chloroplastach. Ostatnio wykazano ponadto, że forma (izozym) izomerazy fosfoglukozowej obecna w chloroplastach szpinaku jest serologicznie bardziej podobna do tego enzymu wyizolowanego z sinicy *Synechococcus* sp., niż do izozymu obecnego w cytoplazmie [52]. Istnieją ponadto podobieństwa między organellami a komórkami prokariotycznymi w budowie kwasów nukleinowych oraz błon [35].

Z ewolucyjnego punktu widzenia bardzo interesujący jest fakt stopniowego uzależnienia się symbiotników od centrum informacyjnego komórki eukariotycznej, czyli jej jądra. Polega to nie tylko na uproszczeniu struktury (np. zanik ścian komórkowych organizmów symbiotycznych) ale przede wszystkim na przeniesieniu części informacyjnej z terenu komórki protosymbionta na teren jądra komórki eukariotycznej. Zwraca bowiem uwagę fakt, że ogromna większość białek obecnych na terenie mitochondriów i chloroplastów kodowana jest przez geny znajdujące się w jądrze. Białka te powstają w cytoplazmie a następnie są transportowane do wnętrza organelli. Istnieje wiele argumentów przemawiających za tym, że przenoszenie genów z organelli (protosymbiontów) na teren jądra miało istotnie miejsce. Jednym z bardziej interesujących argumentów jest zachowanie się ważnego enzymu biorącego udział w fotosyntezie, mianowicie karboksylazy 1,5-dwufosforanu rybulozy u sinic i w chloroplastach roślin. Częsteczka tego enzymu zbudowana jest z 16 podjednostek dzielących się na dwie grupy: osiem dużych podjednostek i osiem małych. U zbadanych dotychczas glonów i roślin lądowych duże podjednostki kodowane są przez geny zawarte w DNA chloroplastów, małe natomiast przez geny umieszczone na terenie jądra. U sinic obie te kategorie podjednostek (tj. duże i małe, te ostatnie jednak czasem w ogóle nie występują) kodowane są przez geny zawarte w nukleoidzie. Istnieje interesujący, zagadkowy glon *Cyanophora paradoxa* (zaliczany do gromady glaukofitów), który ma w każdej komórce dwa utwory uważane do niedawna powszechnie za symbionty sinicowe. Istotnie, utwory te mają jeszcze resztki charakterystycznej dla sinic ściany komórkowej, charakterystyczne tylakoidy oraz barwniki fikobilinowe właściwe sinicom. Genom tych symbiotycznych utworów przypomina jednak zarówno wielkością jak i strukturą raczej cząsteczki DNA z chloroplastów

glonów i lądowych roślin zielonych: jest on m.in. znacznie mniejszy niż nukleoidy sinic. Można więc przypuszczać, że stosunki opisane u *Cyanophora paradoxa* odpowiadają stadiom przejściowym, jakie musiały istnieć między typową symbiozą komórki praeukariontów z sinicami a typową komórką z chloroplastami. U tego organizmu obie kategorie podjednostek wymienionego enzymu, tj. zarówno duże jak i małe produkowane są przez geny mieszczące się na terenie symbionta [19]. Przeniesienie genów kodujących małą podjednostkę z symbionta do jądra musiało więc odbyć się później, tj. już po ustaleniu się symbiozy.

Interesujące stosunki obserwowano także i u grzybów. Gen kodujący jedną z podjednostek enzymu ATPazy, znajduje się u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w mitochondriach, podczas gdy gen kodujący to samo białko u *Neurospora* umieszczony jest na terenie jądra. Co ciekawsze, w genomie mitochondriów *Neurospora* znajduje się нефункционująca sekwencja przypominająca ten gen. Znalezione także sekwencje homologiczne na terenie mitochondriów i chloroplastów u kukurydzy [14]. Wszystko to dowodzi istnienia mechanizmów przenoszących geny w obrębie komórki z organelli do jądra a także pomiędzy organellami. Mechanizmy te nie zostały dotychczas dokładnie poznane, istnieją jednak dane wskazujące, że mogą być one różne. Przypuszcza się, że w pewnych przypadkach geny mogą być przenoszone przez transpozony [25], w innych przypadkach może to być mechanizm przypominając tworzenie pseudogenów. Tak więc biologia molekularna odkryła przed nami fascynujący rozdział przemian ewolucyjnych jakie zachodziły w zaraniu życia na Ziemi i jakie prawdopodobnie mogą zachodzić także i dzisiaj.

Badania molekularne pokazały nam także, że ewolucji ulegają i same geny. Rozwój filogenetyczny genów można rozpatrywać w dwóch różnych aspektach. Można mianowicie porównywać sekwencje nukleotydów w obrębie tego samego genu u różnych organizmów; w ten sposób wykazano, że geny są strukturami zmieniającymi się bardzo wolno, np. geny kodujące mioglobinę i hemoglobinę wykazują tak duże podobieństwo w sekwencji nukleotydów, że wyklucza to możliwość niezależnego ich powstania. Tak więc należy przyjąć, że geny te pochodzą od jednego genu obecnego u dalekich przodków wszystkich kręgowców i zróżnicowanie się ich nastąpiło około 800 milionów lat temu [34]. Mając do dyspozycji dostatecznie dużo znanych sekwencji omawianego genu u różnych organizmów można opracować za pomocą specjalnych metod komputerowych „drzewo genealogiczne” tego genu [10]. Z badań tych można było dowiedzieć się m.in., że po wydzieleniu się dwóch zasadniczych linii rozwojowych „genu mioglobiny” i „genu hemoglobiny” każdy z nich nadal się różnicował. W linii hemoglobiny powstały nie tylko geny kodujące odpowiednie białko u poszczególnych gatunków kręgowców, ale także nastąpiło różnicowanie funkcjonalne, które doprowadziło do powstania odrębnych genów kodujących dwa odrębne łańcuchy budujące cząsteczkę hemoglobiny dorosłego człowieka (α i β), następnie hemoglobiny tworzone i działające jedynie

w okresie życia zarodkowego itp. Drugi aspekt rozwoju filogenetycznego dotyczy właśnie funkcjonalnego i strukturalnego różnicowania się genu w obrębie jednego genomu (organizmu). Powstają w ten sposób, tzw. loci złożone (ang. complex loci) obejmujące sekwencje służące (do alternatywnej przeważnie) produkcji różnych odmian białka hemoglobiny. Np. locus genu produkującego łańcuch β u człowieka obejmuje: embrionalne białko ϵ , dwa różne białka czynne i produkowane w czasie życia płodowego ($\text{G}\gamma$ i $\text{A}\gamma$), dwie odmiany białka hemoglobiny czynnej po urodzeniu (θ i β) oraz jeden (niefunkcjonujący) pseudogen ($\psi\beta 1$).

Mózna więc porównywać nie tylko sekwencje nukleotydów, lecz także strukturę takich „loci złożonych” czy grup genowych (ang. gene clusters). Tu wyniki są także interesujące; np. odcinek genomu królika analogiczny do opisanego wyżej u człowieka locus złożonego z genów β -globinowych zawiera jedną tylko sekwencję kodującą białko działające po urodzeniu, podczas gdy istnieją tam podobne dwie sekwencje kodujące białka życia płodowego i podobny pseudogen. Odpowiedni odcinek genomu myszy różni się od opisanego u człowieka m.in. obecnością dwóch pseudogenów itd.

Z opisanych badań wynika niedwuznacznie, że ewolucja genów przebiega niejako dwutorowo. Z jednej strony ulegają stale zmianom sekwencje głównie na skutek podstawień pojedynczych nukleotydów, z drugiej zaś ulega zwiększeniu liczba kodujących sekwencji w obrębie genomów; to ostatnie poprzez tandemowe duplikacje i następujące po nich różnicowanie strukturalne i funkcjonalne. Podkreślić należy, że niektóre odcinki z powstającej grupy przestają funkcjonować, stając się pseudogenami. Pseudogeny te mają jednak inny charakter od opisanych powyżej, powstających na drodze odwrotnej transkrypcji z cząsteczek mRNA. Cechą najbardziej różniącą te dwa rodzaje pseudogenów jest struktura mozaikowa pseudogenów, powstających w wyniku duplikacji, a brak intronów w drugim przypadku.

Zagadnieniem, które także zajmuje biologów molekularnych zainteresowanych ewolucją jest problem powstania i ewolucji kodu genetycznego. Kod ten jest niewątpliwie jedną z najważniejszych „zdobyczy” świata żywego, umożliwiającą zarówno wierne przekazywanie informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie, jak i zmiany ewolucyjne. Przez wiele lat wydawało się, że znany nam kod ma charakter uniwersalny i wobec tego wszelkie rozważania na temat jego ewolucji miały charakter spekulacji. Stosunkowo niedawno odkryto, że kod używany przy odczytywaniu informacji genetycznej zawartej w mitochondriach różnych organizmów, a zwłaszcza ssaków, różni się w wielu szczegółach od obowiązującego powszechnie na terenie jądra komórkowego [24]. Przypuszcza się więc obecnie, że u pierwotnych organizmów zasiedlających Ziemię używanych było jedynie 15 aminokwasów do budowy białka. W tej sytuacji każdy trójkowy kodon — według większości badaczy kod genetyczny był kodem trójkowym od początku — miał dwie pierwsze zasady znaczące, natomiast trzecia mogła być dowolna. Tak więc każdy aminokwas kodowany był przez 4 różne tryplety; w każdej czwórce takich trypletów dwie

pierwsze zasady były identyczne, a na trzecim miejscu mogła być każda z czterech zasad wchodzących w rachubę. Do odczytywania kodu wystarczało wówczas 16 różnych transferowych kwasów rybonukleinowych (tRNA). Kluczową rolę w specjalizacji kodonów w wprowadzaniu pozostałych pięciu aminokwasów do białek, przypisuje się mutacjom zachodzącym w cząsteczkach tRNA, które powodowały, że antykodony zmieniały znaczenie (do cząsteczki tRNA o niezmienionej strukturze antykodonu przyłączany był nowy aminokwas) i w ten sposób były wprowadzane nowe aminokwasy do białek. W mitochondriach ssaków obserwuje się stosunki przypominające nieco opisywane wyżej stosunki pierwotne. Jednakże nie wiadomo do dziś, czy polega to na zachowaniu istotnie prymitywnych cech w tych mitochondriach, czy też jest to wynikiem uproszczenia. Wg. obecnych danych, prawdopodobniejsza jest raczej ta druga ewentualność.

Na zakończenie chciałbym jeszcze przedyskutować pokrótce dwa problemy, a mianowicie problem tzw. zegara molekularnego oraz teorię ewolucji neutralistycznej. Oba zagadnienia budzą do dziś liczne kontrowersje i są żywo dyskutowane. Z tego powodu ograniczę się jedynie do ogólnego ich przedstawienia.

Otóż zaobserwowano przy porównywaniu struktury pierwotnej białek i kwasów nukleinowych, że liczba pozycji, w których nastąpiło podstawienie nukleotydów (w przypadku badania sekwencji w cząsteczkach kwasów nukleinowych) względnie aminokwasów (w przypadku białek), jest z grubsza proporcjonalna do odległości ich pozycji taksonomicznej: im większa odległość dzieli ich miejsca w systemie, tym na ogół większa liczba różnic w sekwencjach. Gdy odniesiono liczby podstawień do czasu geologicznego, jaki upłynął od powstania porównywanych organizmów — oczywiście było to możliwe jedynie w przypadku grup mających dostatecznie pełną dokumentację paleontologiczną — okazało się, że istnieje wyraźna korelacja między tymi dwiema wielkościami. Wyrażając ten zaskakujący fakt inaczej można powiedzieć, że tempo podstawień jest wielkością stałą. Stąd już krok tylko do zastosowania tej zależności do określania czasu dywergencji dwóch organizmów w tych przypadkach, w których brak jest dokumentacji paleontologicznej, względnie jest ona (jak w większości przypadków) niepełna. W ten sposób liczba podstawień, czyli liczba różnic między sekwencjami porównywanych organizmów może być użyta jako miara czasu, a tempo podstawień do czegoś w rodzaju czasomierza nazwanego zresztą zegarem molekularnym. Jak już wspomniałem, badania tego typu wzbudzają nadal liczne kontrowersje [13, 43, 27, 28]; wskazuje się np. na to, że w trakcie rozwoju filogenetycznego istnieją okresy szybkiej i wolnej ewolucji, co jakoby wyraźnie zaznacza się właśnie na poziomie molekularnym. Wydaje się jednak, że gdy mamy do czynienia z dostatecznie długimi okresami (powyżej 50 milionów lat) zasada zegara molekularnego może być uznana za prawdziwą. W każdym razie używana jest ona dzisiaj dosyć powszechnie do określania wieku badanych taksonów.

W teorii zegara molekularnego tkwi milczące założenie, że większość zmian w pierworzędowej budowie zarówno kwasów nukleinowych jak i białek nie wpływa na zmianę właściwości organizmu, i wobec tego nie podlega selekcji. Mówimy w takich wypadkach o zmianach (mutacjach) selektywnie obojętnych czyli neutralnych. To stwierdzenie stanowi trzon, tzw. neutralistycznej teorii ewolucji, której autorem i głównym protagonistą jest japoński badacz Motoo Kimura. Teoria ta zakłada, że większość mutacji jest dla funkcjonowania organizmu obojętna, neutralna, i że wobec tego nie podlega ona selekcji. Zmiany częstości takich zmutowanych genów, a tym samym zmiany struktury genetycznej populacji (a w wyniku tego zmiana budowy białka i kwasów nukleinowych) są powodowane jedynie czynnikiem losowym. Teoria ta neguje więc wiodącą rolę selekcji w kształtowaniu budowy białek i kwasów nukleinowych. Wspomniana teoria opublikowana została w 1968 roku [26] i od razu wzbudziła ogromne zainteresowanie. Dyskusja, jaka się następnie wywiązała, należała do najbardziej ostrych, żeby nie powiedzieć namiętnych w historii biologii i przypominała spory o ewolucję po opublikowaniu teorii Darwina. Obecnie nasilenie tych dyskusji znacznie zmalało, co nie znaczy, że teoria ewolucji neutralistycznej nie budzi nadal licznych kontrowersji. Z jednej strony bowiem wydaje się nie ulegać wątpliwości, że mogą istnieć zmiany w sekwencji zarówno nukleotydów jak i aminokwasów nie zmieniające właściwości organizmu, a więc neutralne z punktu widzenia selekcji. Takimi zmianami są, np. podstawienia nukleotydów nie zmieniające znaczenia kodonów. Np. kodon UUU oznacza fenyloalaninę, jeśli nastąpi podstawienie cząsteczki uracylu w trzeciej pozycji przez cytozynę powstanie kodon UUC, który nadal powoduje wbudowywanie cząsteczki fenyloalaniny w łańcuch polipeptydowy. Tak więc opisana mutacja ujawnia się jedynie w budowie kwasu nukleinowego, nie zaznacza się natomiast w budowie białka. Jednakże i w takich wypadkach można sobie wyobrazić, że parowanie zmienionego kodonu z antykodonem może być odmienne, co w rezultacie może doprowadzić do zmian w ilości tworzonego białka. I taka więc, wydawałoby się całkowicie neutralna mutacja może mieć wpływ na funkcjonowanie, a więc i na właściwości organizmu.

Podobnie jest w przypadku zmian sekwencji aminokwasów w białku. Stwierdzono np., że wśród mutantów bakterii *Escherichia coli*, wymagających podania dodatkowo do pożywki tryptofanu, zdarzają się tzw. rewersje, czyli powrót do stanu dzikiego (normalna *E. coli* w stanie „dzikim” nie wymaga obecności tryptofanu w podłożu). Kluczową rolę w syntezie tryptofanu odgrywa enzym syntetaza tryptofanowa. Enzym ten wyizolowany z bakterii typu dzikiego ma w pewnym odcinku następujące aminokwasy [47]: -Tyr-Leu-Leu - - - - Gly-Phe-Gly. Mutacja zmieniająca pierwszą glicynę w kwas glutaminowy (-Tyr-Leu-Leu - - - - Glu-Phe-Gly) powoduje zanik funkcji enzymatycznych w białku. Natomiast czynna syntetaza wyizolowana z rewertantów może mieć (obok wyjściowej) także inne sekwencje: -Tyr-Leu-Leu - - - - Ala-Phe-Val, -Tyr-Leu-Leu - - - Val-Phe-Ala, -Tyr-Leu-Arg - - - Val-Phe-Val. Wy-

daje się więc, że takie podstawienia aminokwasów są dla organizmu obojętne, może on funkcjonować w każdym przypadku normalnie. Ale i tutaj można sobie wyobrazić, że enzym o zmienionej budowie (w stosunku do typu dzikiego) nie we wszystkich warunkach będzie funkcjonował normalnie (tj. tak jak enzym u typu dzikiego).

Te i inne fakty spowodowały, że w dyskusji toczącej się na temat ewolucji neutralistycznej próbuje się obecnie, nie tyle zwalczać antagonistyczną teorię, co raczej dąży się do otrzymania odpowiedzi, jak duży jest udział mutacji neutralnych w procesach ewolucyjnych. Można mieć nadzieję, że nowe dane, jakie przynoszą prace na ten temat, wyjaśnią wiele spornych dotychczas kwestii.

W 1959 roku cały świat święcił stuletnią rocznicę ukazania się wiekopomnego dzieła Darwina „O pochodzeniu gatunków”. Z tej okazji odbyły się liczne sympozja i ukazały się liczne dzieła przedstawiające współczesny stan teorii ewolucji. Uderzająca była zgodność wszystkich prawie uczonych na temat mechanizmów ewolucji, roli selekcji naturalnej itp. Wydawało się, że ówczesna, tzw. syntetyczna teoria ewolucji jest dziełem skończonym, nie podlegającym poważniejszej dyskusji. Jak odmiennie sprawa wygląda dziś, 25 lat później, starałem się pokazać w powyższym artykule. Rozwijająca się żywiotowo biologia molekularna odkryła nam nowe horyzonty i zmusiła do zupełnie nowego spojrzenia na wiele zagadnień biologicznych. Nie ominęło to także zagadnień związanych z ewolucją. Zmiany na tym odcinku są tak głębokie, nowe fakty tak liczne, że — jak wspomniałem na początku — nie jest obecnie możliwe wbudowanie ich w jakiś zwarty system. Trzeba więc jeszcze odczekać jakiś czas zanim będzie możliwa synteza tych wszystkich osiągnięć z klasyczną, darwinowską koncepcją ewolucji.

LITERATURA

- [1] Arnheim N. — *Concerted evolution of multigene families*. W: *Evolution of genes and proteins*. Nei M. i Koehn R. K. (red.), Sinauer Ass., str. 38-61, 1983.
- [2] Avers C. J. — *Genetics*. Van Nostrand Co, str. 659, 1980.
- [3] Ayala F. J., Kiger J. A. Jr. — *Modern Genetics*. The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc. str. 844, 1980.
- [4] Bender W., Akam M., Karch F., Beachy P. A., Pfeifer M., Spierer P., Lewis E. B., Hogness D. — *Molecular genetics of the Bithorax complex in Drosophila melanogaster*. Science 211: 23-29, 1983.
- [5] Blake C. C. F. — *Exons and the structure, function and evolution of haemoglobin*. Nature 5817: 616, 1981.
- [6] Campbell A. — *Transposons and their evolutionary significance*. W: *Evolution of genes and proteins*. Nei M., Koehn R. K. (red.), Sinauer Ass., str. 258-279, 1983.
- [7] Chao L., Vargas C., Spear B. B., Box E. C. — *Transposable elements as mutator genes in evolution*. Nature 303: 633-635, 1983.
- [8] Chroboczek J., Zagórski W. — *Wirusologia molekularna*. PWN, Warszawa, str. 372, 1983.

- [9] Cronquist A. — *The taxonomic significance of the structure of plant proteins: a classical Taxonomist's view*. *Brittonia* 28 (1): 1-27, 1976.
- [10] Czelusniak J., Goodman M., Hewett-Emmett D., Weiss M. L., Venta P. J., Tashian R. E. — *Phylogenetic origins and adaptive evolution of avian and mammalian haemoglobin genes*. *Nature* 298: 297-300, 1982.
- [11] Davidson E. H., Jacobs H. T., Britten R. J. — *Very short repeats and coordinate induction of genes*. *Nature* 301: 468-470, 1983.
- [12] Dayhoff M. O. — *Atlas of Protein Sequence and Structure*. 5. Silver Spring, Maryland, Nat. Biomed. Res. Found., 1972.
- [13] Fitch W. M. — *Molecular evolutionary clocks*. W: *Molecular Evolution*. Ayala F. J. (red.), Sinauer Ass., str. 160-178, 1976.
- [14] Fox T. D. — *Mitochondrial genes in the nucleus*. *Nature* 301: 371-372, 1983.
- [15] Gajewski W. — *Genetyka molekularna i klasyczna*. 5 wyd., PWN, Warszawa, str. 471, 1983.
- [16] Gerszenzon S. M. — *Osnovy sowriemiennoj genetyki*. 2 wyd., Kijew, str. 558, 1978.
- [17] Gilbert W. — *Why genes in pieces?* *Nature* 271: 501, 1978.
- [18] Gil ò M. — *Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin*. *Nature* 5810: 90-92, 1981.
- [19] Heinhorst S., Shively J. M. — *Encoding of both subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase by organelle genome of Cyanophora paradoxa*. *Nature* 304: 373-374, 1983.
- [20] Houck C. M., Rinehart F. P., Schmid C. U. — *A ubiquitous family of repetaed DNA sequence in the human genome*. *J. Mol. Biol.* 132: 289-306, 1979.
- [21] Hughes V. M., Datta N. — *Conjugative plasmids in bacteria of the „pre-antibiotic” era*. *Nature* 302: 725-726, 1983.
- [22] Hunkapiller T., Huang H., Hood L., Campbell J. H. — *The impact of modern genetics on evolutionary theory*. W: *Perspectives on Evolution*. Milkman R. (red.), Sinauer Ass., str. 164-189, 1982.
- [23] Jackson J. A., Fink G. R. — *Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast*. *Nature* 292: 306-311, 1981.
- [24] Jukes T. H. — *Evolution of the amino acid code*. W: *Evolution of genes and proteins*. Nei M., Koehn R. K. (red.), Sinauer Ass., str. 191-207, 1983.
- [25] Kemble R. J., Mans R. J., Gabay-Laughnan J. R. — *Sequences homologous to episomal mitochondrial DNAs in the mouse nuclear genome*. *Nature* 304: 744-747, 1983.
- [26] Kimura M. — *Evolutionary rate at the molecular level*. *Nature* 217: 624-626, 1968.
- [27] Kimura M. — *The neutral theory of molecular evolution*. W: *Evolution of genes and proteins*. Nei M., Koehn R. K. (red.), Sinauer Ass., str. 208-233, 1983.
- [28] Kimura M. — *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, str. 366, 1983.
- [29] Koroczkin L. I. — *Ewolucjonnyje znaczenie genetyczeskich podwiznich elementow*. *Gipoteza. Citologija i Genetika* 17 (4): 67-78, 1983.
- [30] Leigh Brown A. J., Ish-Horowicz D. — *Evolution of the 87A and 87C heat-shock loci in Drosophila*. *Nature* 5808: 677-682, 1981.
- [31] Lemischka I., Sharp P. A. — *The sequences of an expressed rat α -tublin gene and a pseudogene with an inserted repetitive element*. *Nature* 300: 330-335, 1982.
- [32] Lewin R. — *Promiscuous DNA leaps all barriers*. *Science* 219: 478-479, 1983.
- [33] Lewin R. — *How mammalian RNA returns to its Genome*. *Science* 219: 1052-1054, 1983.
- [34] Li W. H. — *Evolution of duplicate genes and pseudogenes*. W: *Evolution of genes and proteins*. Nei M., Koehn R. K. (red.), Sinauer Ass., str. 14-37, 1983.
- [35] Margulis L. — *Symbiosis in Cell Evolution*. Freeman and Co., San Francisco, 1981. (tłum. ros.: *Rol simbioza w ewolucji komórki*. Mir, 1983).
- [36] McClintock B. — *Chromosome organization and gene expression*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16: 13-47, 1952.

- [37] Naharro G., Robbins K. C., Reddy E. P. — *Gene product of v-fgr onc: hybrid protein containing a portion of actin and of tyrosin-specific protein kinase*. Science 223: 63-66, 1984.
- [38] Ohno S. — *Evolution by Gene Duplication*. Springer Verlag, Berlin 1970. (tłum. ros.: *Genetyczne mechanizmy progressywnej ewolucji*. Mir, 1973).
- [39] Reaney D. — *Genetic noise in evolution?* Nature 307: 318-319, 1984.
- [40] Robertson M. — *Gene families, hopeful monsters and the selfish genetics of DNA*. Nature 293: 333-334, 1981.
- [41] Rogers J. — *Introns in archaeobacteria*. Nature 304: 685, 1983.
- [42] Rosenfeld M. G., Mermod J.-J., Amara S. G., Swanson L. W., Sawchenko P. E., River J., Vale W. W., Evans R. M. — *Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing*. Nature 304: 129-135, 1983.
- [43] Selander R. K. — *Phylogeny*. W: *Perspectives on Evolution*. Milkman R. (red.), Sinauer Ass., str. 32-59, 1982.
- [44] Shestakov S. V. — *End of blue-green algae*. Nature 307: 300, 1984.
- [45] Simon M., Zieg J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R. — *Phase variation: Evolution of a controlling element*. Science 209: 1370-1374, 1980.
- [46] Stebbins G. L. — *Zmienność i ewolucja roślin*. PWN, Warszawa, str. 470, 1958.
- [47] Stebbins G. L., Lewontin R. C. — *Comparative evolution at the levels of molecules, organisms, and populations*. W: *Darwinian, Neodarwinian and Non-Darwinian Evolution*. Lecam L. M., Neyman J., Scott E. L. (red.), Proc. Berkeley Symp. Math. Stat. and Probab. V., University of Chicago Press, str. 23-42, 1972.
- [48] Szweykowski J. — *Historyzm w naukach biologicznych*. (w druku).
- [49] Szweykowski J. — *Ewolucja a biologia molekularna*. (w druku).
- [50] Szweykowski J. — *Systematyka roślin i zwierząt*. W: *Horyzonty biologii*. Ostrowski K. (red.), Wiedza Powszechna. (w druku).
- [51] Weeden N. F. — *Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast*. J. Molec. Evol. 17: 133-139, 1981.
- [52] Weeden N. F., Higgins R. C., Gottlieb L. D. — *Immunological similarity between a cyanobacterial enzyme and a nuclear DNA-encoded plastid-specific isozyme from spinach*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5953-5955, 1982.
- [53] Woese C. R. — *Archaeobacteria*. Sci. Amer. 244 (6): 98-122, 1981.
- [54] Brown A. L. — *On the origin of the Alu family of repeated sequences*. Nature 312 (5990): 106, 1984.
- [55] Ullu E., Tschudi C. — *Alu sequences are processed 7SL RNA genes*. Nature 312 (5990): 171-172, 1984.
- [56] Struhl G. — *Splitting the bithorax complex of Drosophila*. Nature 308 (5958): 454-457, 1984.

ALEKSANDRA PUTRAMENT

Instytut Biochemii i Biofizyki

PAN, Warszawa

CO MA SEKWENCJONOWANIE DNA DO POCHODZENIA CZŁOWIEKA

Przez pierwszych sto lat po ukazaniu się pracy K. Darwina „O pochodzeniu gatunków” i znalezieniu w Neanderthal pierwszego szkieletu człokoluda, pokrewieństwo między człowiekiem i żyjącymi obecnie małpami człekokształtnymi badano metodami anatomii porównawczej, a ich pochodzenie opierano tylko na materiale z wykopalisk: na analizie szczątków szkieletów, późniejsze zaś etapy ewolucji człowieka — także na badaniu narzędzi, które już *Homo erectus* umiał wytwarzać. Trudności, na jakie napotykają tego typu badania, są oczywiste. Materiał kopalny jest skąpy i fragmentaryczny. O tym, jakie szczątki się zachowały, decydował przypadek. Przypadek też w dużym stopniu decyduje o znajdowaniu tych szczątków. Udało się jednak odtworzyć w ogólnych zarysach ewolucję człowieka oraz orientacyjny stopień pokrewieństwa między człowiekiem współczesnym i współczesnymi małpami człekokształtnymi (rys. 1a).

Mniej więcej przed dwudziestu laty rozpoczęto próby określenia pokrewieństwa między różnymi grupami organizmów, w tym również między człowiekiem i małpami człekokształtnymi na podstawie zupełnie nowych kryteriów często nazywanych zegarem molekularnym. Chodzi tu o wskaźniki immunologiczne (głównie różnice w grupach krwi: nawet znane grupy A, B i O dzielą się bowiem na liczne podgrupy) i białkowe. Białka pełniące tę samą funkcję, ale pochodzące z różnych organizmów często różnią się ruchliwością elektroforetyczną. Jest to wynikiem występowania różnych reszt aminokwasów w tych miejscach cząsteczki, które nie wpływają na właściwości biologiczne białek. Na przykład polipeptyd alfa hemoglobiny człowieka ma w 17 miejscach inne reszty aminokwasów niż polipeptyd alfa hemoglobiny konia. Zakłada się, że im więcej jest tego rodzaju różnic, tym odleglejsze ewolucyjnie są porównywane grupy organizmów. Już różnice w jednej reszcie aminokwasu, zwłaszcza podstawienia typu glutamina-kwas glutaminowy ze względu na różnice w ładunku mogą w dający się zmierzyć sposób zmieniać ruchliwość elektroforetyczną białek.

Porównując wskaźniki immunologiczne i białkowe osobników z tej samej populacji można określić zmienność tych cech, a następnie porównać ją ze zmiennością występującą w różnych populacjach czy gatunkach. Na podstawie tego typu badań wprowadzono poprawkę do „drzewa genealogicznego”

- [37] Naharro G., Robbins K. C., Reddy E. P. — *Gene product of v-fgr onc: hybrid protein containing a portion of actin and of tyrosin-specific protein kinase*. *Science* 223: 63-66, 1984.
- [38] Ohno S. — *Evolution by Gene Duplication*. Springer Verlag, Berlin 1970. (tłum. ros.: *Genetyczne mechanizmy postępowej ewolucji*. Mir, 1973).
- [39] Reaney D. — *Genetic noise in evolution?* *Nature* 307: 318-319, 1984.
- [40] Robertson M. — *Gene families, hopeful monsters and the selfish genetics of DNA*. *Nature* 293: 333-334, 1981.
- [41] Rogers J. — *Introns in archaeobacteria*. *Nature* 304: 685, 1983.
- [42] Rosenfeld M. G., Mermod J.-J., Amara S. G., Swanson L. W., Sawchenko P. E., River J., Vale W. W., Evans R. M. — *Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing*. *Nature* 304: 129-135, 1983.
- [43] Selander R. K. — *Phylogeny*. W: *Perspectives on Evolution*. Milkman R. (red.), Sinauer Ass., str. 32-59, 1982.
- [44] Shestakov S. V. — *End of blue-green algae*. *Nature* 307: 300, 1984.
- [45] Simon M., Zieg J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R. — *Phase variation: Evolution of a controlling element*. *Science* 209: 1370-1374, 1980.
- [46] Stebbins G. L. — *Zmienność i ewolucja roślin*. PWN, Warszawa, str. 470, 1958.
- [47] Stebbins G. L., Lewontin R. C. — *Comparative evolution at the levels of molecules, organisms, and populations*. W: *Darwinian, Neodarwinian and Non-Darwinian Evolution*. Lecam L. M., Neyman J., Scott E. L. (red.), Proc. Berkeley Symp. Math. Stat. and Probab. V., University of Chicago Press, str. 23-42, 1972.
- [48] Szweykowski J. — *Historyzm w naukach biologicznych*. (w druku).
- [49] Szweykowski J. — *Ewolucja a biologia molekularna*. (w druku).
- [50] Szweykowski J. — *Systematyka roślin i zwierząt*. W: *Horyzonty biologii*. Ostrowski K. (red.), Wiedza Powszechna. (w druku).
- [51] Weeden N. F. — *Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast*. *J. Molec. Evol.* 17: 133-139, 1981.
- [52] Weeden N. F., Higgins R. C., Gottlieb L. D. — *Immunological similarity between a cyanobacterial enzyme and a nuclear DNA-encoded plastid-specific isozyme from spinach*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5953-5955, 1982.
- [53] Woese C. R. — *Archaeobacteria*. *Sci. Amer.* 244 (6): 98-122, 1981.
- [54] Brown A. L. — *On the origin of the Alu family of repeated sequences*. *Nature* 312 (5990): 106, 1984.
- [55] Ullu E., Tschudi C. — *Alu sequences are processed 7SL RNA genes*. *Nature* 312 (5990): 171-172, 1984.
- [56] Struhl G. — *Splitting the bithorax complex of Drosophila*. *Nature* 308 (5958): 454-457, 1984.

ALEKSANDRA PUTRAMENT

Instytut Biochemii i Biofizyki

PAN, Warszawa

CO MA SEKWENCJONOWANIE DNA DO POCHODZENIA CZŁOWIEKA

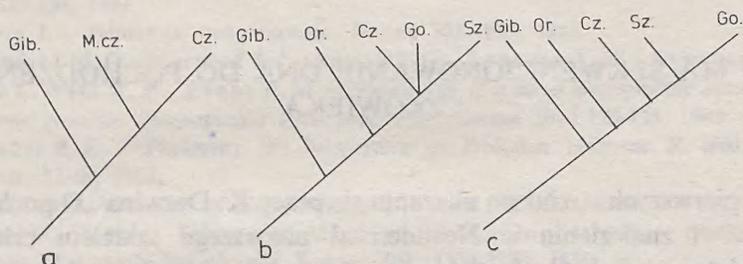
Przez pierwszych sto lat po ukazaniu się pracy K. Darwina „O pochodzeniu gatunków” i znalezieniu w Neanderthal pierwszego szkieletu człekoluda, pokrewieństwo między człowiekiem i żyjącymi obecnie małpami człekokształtnymi badano metodami anatomii porównawczej, a ich pochodzenie opierano tylko na materiale z wykopalisk: na analizie szczątków szkieletów, późniejsze zaś etapy ewolucji człowieka — także na badaniu narzędzi, które już *Homo erectus* umiał wytwarzać. Trudności, na jakie napotykają tego typu badania, są oczywiste. Materiał kopalny jest skąpy i fragmentaryczny. O tym, jakie szczątki się zachowały, decydował przypadek. Przypadek też w dużym stopniu decyduje o znajdowaniu tych szczątków. Udało się jednak odtworzyć w ogólnych zarysach ewolucję człowieka oraz orientacyjny stopień pokrewieństwa między człowiekiem współczesnym i współczesnymi małpami człekokształtnymi (rys. 1a).

Mniej więcej przed dwudziestu laty rozpoczęto próby określenia pokrewieństwa między różnymi grupami organizmów, w tym również między człowiekiem i małpami człekokształtnymi na podstawie zupełnie nowych kryteriów często nazywanych zegarem molekularnym. Chodzi tu o wskaźniki immunologiczne (głównie różnice w grupach krwi: nawet znane grupy A, B i O dzielą się bowiem na liczne podgrupy) i białkowe. Białka pełniące tę samą funkcję, ale pochodzące z różnych organizmów często różnią się ruchliwością elektroforetyczną. Jest to wynikiem występowania różnych reszt aminokwasów w tych miejscach cząsteczki, które nie wpływają na właściwości biologiczne białek. Na przykład polipeptyd alfa hemoglobiny człowieka ma w 17 miejscach inne reszty aminokwasów niż polipeptyd alfa hemoglobiny konia. Zakłada się, że im więcej jest tego rodzaju różnic, tym odleglejsze ewolucyjnie są porównywane grupy organizmów. Już różnice w jednej reszcie aminokwasu, zwłaszcza podstawienia typu glutamina-kwas glutaminowy ze względu na różnice w ładunku mogą w dający się zmierzyć sposób zmieniać ruchliwość elektroforetyczną białek.

Porównując wskaźniki immunologiczne i białkowe osobników z tej samej populacji można określić zmienność tych cech, a następnie porównać ją ze zmiennością występującą w różnych populacjach czy gatunkach. Na podstawie tego typu badań wprowadzono poprawkę do „drzewa genealogicznego”

człowieka i małp człekokształtnych (rys. 1b). Jak się wydaje, dzięki tej poprawce łatwiej jest klasyfikować nowy materiał kopalny [1].

Ostatnio, badania z zastosowaniem zegara molekularnego wzbogaciły się o nową, potężną metodę, mianowicie sekwencjonowanie DNA. Jak wiadomo, kod genetyczny jest wieloznaczny, a więc identyczne sekwencje



Rys. 1. Drzewo genealogiczne człowieka i małp człekokształtnych. a — pokrewieństwo oparte na kryteriach tradycyjnych, głównie na materiale wykopaliskowym; b — pokrewieństwo wynikające ze wskaźników immunologicznych i białkowych (oba schematy wg. [1], uproszczone); c — pokrewieństwo wynikające z analizy mtDNA (wg. [2]), Gib. — gibbon, M.cz. — małpy człekokształtne, Cz. — człowiek, Or. — orangutan, Go. — goryl, Sz. — szympan. Nie uwzględniono stopni pokrewieństwa, ani „postępu ewolucyjnego”.

reszt aminokwasów w białkach mogą być zapisane w genach przez różne tryplety. Porównując więc sekwencje zasad w DNA można wykrywać zarówno różnice powodujące podstawienia aminokwasów w polipeptydzie, jak i tzw. mutacje ciche, tj. podstawienia zasad nie prowadzące do zmian w sekwencji aminokwasów. Ponadto można wykrywać różnice w nie podlegających translacji częściach genów, tj. w sekwencjach DNA odpowiadających końcom 5' i 3' mRNA oraz w intronach. Można wreszcie porównywać sekwencje DNA między genami. Tu również zakłada się, że im więcej jest różnic w sekwencjach zasad, tym odleglejsze ewolucyjnie są badane formy.

Pierwsze kompletne wyniki otrzymano sekwencjonując mitochondrialny DNA (mtDNA, często nazywamy genomem mitochondrialnym). Jak się wydaje, częstość nie eliminowanych przez dobór naturalny mutacji w genomach mitochondrialnych jest 5-10 razy większa niż w genomach jądrowych. Wydaje się więc, że pokrewieństwo oparte na porównywaniu sekwencji zasad w mtDNA można badać tylko między formami, których szlaki ewolucyjne rozdzieliły się nie wcześniej niż przed 20 milionami lat. A więc sekwencjonowanie mtDNA szczególnie nadaje się do dokładnego określania stopnia pokrewieństwa między formami bliskimi, np. między człowiekiem i małpami człekokształtnymi. Oto wyniki bodaj pierwszego badania tego typu [3].

Za pomocą określonego enzymu restrykcyjnego wycięto liczące 896 par zasad homologiczne fragmenty mtDNA człowieka, szympansa, goryla, orangutana i gibbona. Fragmenty te zsekwencjonowano, a następnie przy użyciu

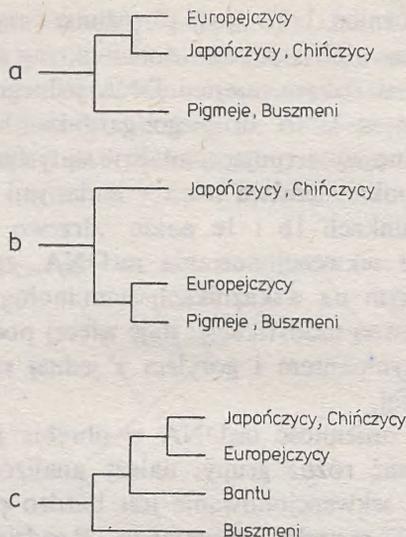
komputera ustalono różnice. Jako „jedną” różnicę liczy się substytucję jednej pary zasad przez inną, lub addycję (dodanie) czy delecję (utrata) jednej pary zasad. Jeśli więc w danym miejscu DNA jednego gatunku jest o dwie pary zasad więcej niż w DNA drugiego gatunku, liczy się to jako dwie różnice. Wyniki poddano wyczerpującej analizie statystycznej. Na tej podstawie oszacowano stopnie pokrewieństwa między badanymi gatunkami.

Jak widać na rysunkach 1b i 1c nasze „drzewo genealogiczne”, opracowane na podstawie sekwencjonowania mtDNA, zgadza się z wcześniej opracowanym i opartym na wskaźnikach immunologicznych i białkowych. Wprowadza jednak pewną modyfikację: daje więcej podstaw do umieszczania *H. sapiens* między szympansem i gorylem z jednej strony, a orangutanem i gibbonem — z drugiej.

Chcąc oszacować zmienność mtDNA w obrębie jednej grupy etnicznej i ewentualnie porównać różne grupy, należy analizować mtDNA z wielu osobników. Ponieważ sekwencjonowanie jest bardzo pracochłonne, Johnson i wsp. [5] zastosowali metodę uproszczoną. Rozdzielali elektroforetycznie mtDNA pocięty różnymi enzymami restrykcyjnymi, jako standard przyjmując znaną już kompletną sekwencję mtDNA człowieka. Zakładali, że jeśli w wyniku mutacji zniknie jedno z miejsc rozpoznawanych przez dany enzym restrykcyjny, to po elektroforezie zamiast dwu pasków odpowiadających krótszym fragmentom mtDNA będzie jeden pasek odpowiadający dłuższemu fragmentowi. Jeśli w wyniku mutacji powstanie nowe miejsce rozpoznawane przez dany enzym restrykcyjny, to zamiast jednego paska odpowiadającego dłuższemu fragmentowi mtDNA, będą dwa krótsze paski.

Jak widać na rysunku 2, pokrewieństwo między grupami etnicznymi człowieka ustalone na podstawie wskaźników białkowych i immunologicznych nie jest sprzeczne z pokrewieństwem ustalonym na podstawie analizy mtDNA i odbiega od opracowanego na podstawie wskaźników antropometrycznych. Nieco kłopotliwe są dane dotyczące Buszmenów. Autorzy rozważają dwie możliwości. Buszmeni mogli oddzielić się od grupy, która dała początek innym formom etnicznym przed 220 tysiącami lat. Taka hipoteza jest sprzeczna z wszystkimi innymi danymi. Bardziej więc prawdopodobna wydaje się druga hipoteza, mianowicie, że w populacji Buszmenów częstość mutacji w mtDNA jest znacznie większa niż w innych grupach etnicznych. Na korzyść tej hipotezy przemawiają inne dane wskazujące, że częstości mutacji mitochondrialnych znacznie się różnią w poszczególnych szczepach tego samego gatunku.

Według Cavalli-Sforza [4] człowiek współczesny pojawił się przed 60-40 tysiącami lat. Wskazują na to zarówno dane pochodzące z wykopalisk, jak i zegar molekularny. W ciągu następnych tysiącleci nasi przodkowie prowadzili wędrowne życie, zbierając żywność i polując. W ten sposób zaludnili Afrykę, Europę i Azję. Przed 50-12 tysiącami lat przedostali się na kontynent amerykański przez cieśninę Beringa, która w epokach lodowcowych była zupełnie zamarznięta. Przystosowanie do życia w nowych strefach klimatycznych



Rys. 2. Pokrewieństwo między niektórymi grupami etnicznymi człowieka. a — oparte na kryteriach antropomorficznych; b — na wskaźnikach immunologicznych i białkowych (oba wg. [4]); c — na analizie mtDNA (wg. [5]). Wszystkie schematy bardzo uproszczono; podano tylko te grupy etniczne, których pokrewieństwo ustalono wszystkimi trzema metodami. Buszmeni, Pigmeje i Bantu — to różne grupy Murzynów zamieszkujących Afrykę południowo-wschodnią. Na rysunkach pokazano jedynie względne pokrewieństwo między grupami etnicznymi. Nie wynika z nich „postęp ewolucyjny” żadnej z grup. Na mieszane pochodzenie mieszkańców Europy wskazuje fakt, że według jednych kryteriów można ich uważać za bliżej spokrewnionych z Chińczykami i Japończykami, zaś według innych — z Pigmejami i Buszmenami

i do nowego pokarmu było ułatwione przez czynniki pozabiologiczne: człowiek bądź co bądź jest inteligentny. Głównym czynnikiem różnicowania się na grupy etniczne była izolacja geograficzna. Różnicowaniu sprzyjały też warunki klimatyczne. Jedną z najbardziej charakterystycznych różnic między grupami etnicznymi ludzi jest pigmentacja skóry. Cavalli-Sforza cytuje następującą hipotezę Loomisa wskazującą na istnienie bezpośredniej zależności między pigmentacją skóry i szerokością geograficzną, w jakiej pierwotni ludzie mieszkali. W tych szerokościach geograficznych, gdzie światło słoneczne nie jest bardzo intensywne, skóra człowieka musi być jasna: pewna ilość promieniowania nadfioletowego musi przeniknąć przez skórę, by z prowitaminy powstawała witamina D. W małych szerokościach geograficznych silna pigmentacja skóry chroni ją przed uszkodzeniami przez promieniowanie nadfioletowe.

Na podstawie wskaźników immunologicznych i białkowych Cavalli-Sforza określa ludzi „białych” jako grupę pośrednią między mieszkańcami Azji i Afryki. Może to wynikać z faktu, że już w czasach historycznych były aż dwa szlaki introgresji genów z populacji azjatyckich i afrykańskich do populacji zamieszkującej Europę. Po pierwsze, jeńcy wojenni stawali się

niewolnikami zwycięzców, którymi często byli Europejczycy. Jeńcy stanowili pokaźny procent ludności w starożytnej Grecji i w Rzymie. Mogli oni zakładać rodziny, a więc ich geny były przenoszone do następnych pokoleń. Po drugie, przez kilkaset lat kontynent europejski był terenem intensywnych wędrówek ludów. Nastąpiło więc przetasowanie się genów pochodzących z różnych populacji.

Warto zwrócić uwagę, że obecnie w literaturze genetycznej dotyczącej człowieka unika się używania terminu „rasa”. Nie jest to lęk przed posądzeniem autorów o rasizm. Po prostu w miarę przybywania wskaźników genetycznych coraz bardziej zacierają się kryteria podziału na rasy. Na przykład, Buszmeni, Pigmeje i plemiona Bantu zamieszkują Afrykę południowo-wschodnią i na podstawie wskaźników antropometrycznych, immunologicznych i białkowych można ich uważać za ludzi blisko spokrewnionych filogenetycznie. Ale przedstawione tu dane dotyczące mtDNA wskazują na odrębność Buszmenów i Bantu. Gdzie więc postawić granicę? I po co używać terminu, który budzi przykre skojarzenia, a naukowo niewiele znaczy.

LITERATURA

- [1] Andrew P. — *Hominoid evolution*. Nature 295: 185-186, 1982.
- [2] Barton N., Jones J. S. — *Mitochondrial DNA: new clues about evolution*. Nature 306: 317-318, 1983.
- [3] Brown W. M., Prager E. M., Wang A., Wilson A. C. — *Mitochondrial DNA sequences in Primates: Tempo and mode of evolution*. J. Molec. Evol. 18: 225-239, 1982.
- [4] Cavalli-Sforza L. L. — *The genetics of human populations*. Sci. Amer. 231, 3: 81-89, 1974.
- [5] Johnson M. J., Wallace D. C., Ferris S. D., Rattazzi M. C., Cavalli-Sforza L. L. — *Radiation of human mitochondria DNA types analysed by restriction endonuclease cleavage patterns*. J. Molec. Evol. 19: 255-271, 1983.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Ежи Жук</i> — Вступительное слово	3
<i>Ян Клысик</i> — Пространственные структуры ДНК	5
<i>Анджей Ежмановски</i> — Структура эукариотических хромосом-транскрипционного активного хроматина	15
<i>Витольд Филипович</i> — Гену разбелёне и складание РНК	41
<i>Магдалена Богута, Александра Путрамент</i> — Специфика Митохондральных гено- мов	67
<i>Анджей Пашевски</i> — Молекулярные основы регуляции экспрессии генов	89
<i>Ева Бартник</i> — Онкогены	113
<i>Пётр Полачек</i> — Регуляция синтеза ДНК плазмидов	117
<i>Витольд Яхумчик</i> — Реперияция ДНК	125
<i>Бригида Берзин-Берзе</i> — Рекомбинация ДНК <i>in vitro</i>	145
<i>Магдалена Фикус</i> — Практическое применение генной инженерии	155
<i>Збигнев Лоркевич</i> — Применение генной инженерии в селекции растений	171
<i>Ян Цибис</i> — Трансформация у грибов	179
<i>Ежи Швейковски</i> — Молекулярная эволюция	195
<i>Александра Путрамент</i> — Что секвенцирование ДНК говорит о происхождении человека	221

CONTENTS

Preface — Jerzy Żuk	3
Jan Klysik — Three-dimensional structure of DNA	5
Andrzej Jerzmanowski — Structure of eukaryotic chromosome-transcriptionally active chromatin	15
Witold Filipowicz — Split genes and RNA splicing	41
Magdalena Boguta, Aleksandra Putrament — Specificity of mitochondrial genome	67
Andrzej Paszewski — Molecular bases of regulation of gene expression	89
Ewa Bartnik — Oncogenes	113
Piotr Polaczek — Control of plasmid DNA replication	117
Witold Jachymczyk — Repair of DNA	125
Brigida Bersin-Berse — DNA recombination <i>in vitro</i>	145
Magdalena Fikus — Practical applications of DNA recombination <i>in vitro</i>	155
Zbigniew Lorkiewicz — Genetic engineering in plant breeding	171
Jan Cybis — Fungal transformation	179
Jerzy Szweykowski — Molecular evolution	195
Aleksandra Putrament — DNA sequencing and the origin of man	221

SPIS TREŚCI

Słowo wstępne — Jerzy Żuk	3
Jan Kłysik — Struktury przestrzenne DNA	5
Andrzej Jerzmanowski — Chromosomy eukariotyczne i struktura aktywnych genów	15
Witold Filipowicz — Geny podzielone i składanie RNA	41
Magdalena Boguta, Aleksandra Putrament — Specyfika genomów mitochondrialnych	67
Andrzej Paszewski — Molekularne podstawy regulacji ekspresji genów	89
Ewa Bartnik — Onkogeny	113
Piotr Polaczek — Regulacja syntezy DNA plazmidów	117
Witold Jachymczyk — Naprawa DNA :	125
Brigida Bersin-Berse — Rekombinacja DNA <i>in vitro</i>	145
Magdalena Fikus — Praktyczne zastosowanie metod rekombinacji DNA <i>in vitro</i>	155
Zbigniew Lorkiewicz — Zastosowanie inżynierii genetycznej w hodowli roślin	171
Jan Cybis — Transformacja u grzybów	179
Jerzy Szweykowski — Ewolucja molekularna	195
Aleksandra Putrament — Co ma sekwencjonowanie DNA do pochodzenia człowieka	221

SPIS TREŚCI ROCZNIKA 1985

<i>Bartnik Ewa</i> — Onkogeny	1	113
<i>Bersin-Berse Brigida</i> — Rekombinacja DNA <i>in vitro</i>	1	145
Biologia ewolucyjna i teoretyczna w Polsce w najbliższym dwudziestolecu (oprac. Komitet Biologii Ewolucyjnej i Teoretycznej PAN)	3	419
<i>Boguta Magdalena, Putrament Aleksandra</i> — Specyfika genomów mitochondrialnych. Kod genetyczny nie jest uniwersalny	1	67
<i>Cybis Jan</i> — Transformacja u grzybów	1	179
<i>Dyrczowa Alina</i> — Specjacja czy polimorfizm troficzny?	2	233
<i>Fikus Magdalena</i> — Praktyczne zastosowanie metod rekombinacji DNA <i>in vitro</i>	1	155
<i>Filipowicz Witold</i> — Geny podzielone i składanie RNA	1	41
<i>Gębczyński Marek</i> — Wysilek reprodukcyjny u kręgowców	2	287
Główne kierunki rozwoju biologii molekularnej do końca XX wieku (oprac. Komitet Biochemii i Biofizyki PAN)	3	411
Główne kierunki rozwoju polskiej antropologii w l. 1985-2000 (oprac. Komitet Antropologii PAN)	3	397
<i>Grieb Paweł</i> — Badania środowiska tlenowego tkanek metodą rozcieńczania wskaźników z użyciem stabilnego izotopu tlenu ¹⁸ O	2	269
<i>Grzelakowska-Sztabert Barbara</i> — Metaboliczne interakcje nowotworu i nosiciela <i>Jachymczyk Witold</i> — Naprawa DNA	2	253
<i>Janion Celina</i> — Molekularne podstawy mutacji	1	125
<i>Janiszewski Janusz</i> — Termoregulacja owadów	4	549
<i>Jerzmanowski Andrzej</i> — Chromosomy eukariotyczne i struktura aktywnych genów	4	609
<i>Kielan-Jaworowska Zofia</i> — George Gaylord Simpson	1	15
Kierunki rozwoju polskiej parazytologii do 2000 roku (oprac. Komitet Parazytologii PAN)	4	511
<i>Klysik Jan</i> — Struktury przestrzenne DNA	3	485
<i>Kozłowski Marek W.</i> — Feromony epideiktyczne	1	5
<i>L.W.</i> — Wspomnienie o Profesorze Włodzimierzu Niemierko	4	593
<i>Lorkiewicz Zbigniew</i> — Zastosowanie inżynierii genetycznej w hodowli roślin	2	231
<i>Michajłow Włodzimierz</i> — Problemy gatunku i specjacji w odniesieniu do euglenid — pasożytów widłonogów	1	171
Nauki biologiczne na III Kongresie Nauki Polskiej — A. Urbanek	4	529
<i>Obidowicz Andrzej</i> — Torfowiska górskie w Europie	4	513
<i>Paszewski Andrzej</i> — Molekularne podstawy regulacji ekspresji genów	2	299
Perspektywy rozwoju zoologii polskiej (oprac. Komitet Zoologii PAN)	1	89
<i>Pokorski Mieczysław</i> — Udział obwodowych i ośrodkowych chemoreceptorów w odpowiedziach oddechowych na zasadnicę metaboliczną	3	493
<i>Polacek Piotr</i> — Regulacja syntezy DNA plazmidów	4	569
Prognoza rozwoju ekologii do roku 2000 i na dalsze lata (oprac. Komitet Ekologii PAN)	1	117
	3	455

Program rozwoju do roku 2000 nauki o ochronie przyrody (oprac. Komitet Ochrony Przyrody PAN)	3	473
<i>Putrament Aleksandra</i> — Co ma sekwencjonowanie DNA do pochodzenia człowieka	1	221
Rozwój badań nad biologią komórki w Polsce w perspektywie XXI wieku (oprac. Komitet Cytobiologii PAN)	3	441
Rozwój botaniki do 2000 roku i w dalszych latach (oprac. Komitet Botaniki PAN)	3	427
Stan badań w mikrobiologii oraz perspektywiczne kierunki rozwoju (oprac. Komitet Mikrobiologii PAN)	3	463
<i>Szweykowski Jerzy</i> — Ewolucja molekularna	1	195
<i>Urbanek Adam</i> — Słowo wstępne [do Nr 3 Kosmosu]	3	395
<i>Wachowicz Barbara</i> — Płytki krwi a przerzuty nowotworowe	4	583
<i>Walasek Grażyna, Zieliński Kazimierz</i> — Badania reakcji warunkowej opartej na antagonizmie obronno-pokarmowym. II. Czynniki wpływające na wytwarzanie i intensywność reakcji obronnej	2	239
<i>Zmysłowski Wojciech, Kasicki Stefan</i> — Model generatora rdzeniowego ruchów lokomocyjnych czworonoga	4	623
<i>Żuk Jerzy</i> — Słowo wstępne [do Nr 1 Kosmosu]	1	3

DYSKUSJA I KRYTYKA

Czy duch spadł z nieba? Dwugłos o książce H. von Ditfurtha „Duch nie spadł z nieba”		
<i>Chmurzyński Jerzy Andrzej</i>	2	321
<i>Nowotny Jarosław</i>	2	310

RECENZJE

<i>Białobok Stefan</i> — <i>Schütt P.</i> : Der Wald stirbt an Stress	4	647
<i>Białobok Stefan, Dolatowski Jakub</i> — <i>Seneta W.</i> : Drzewa i krzewy iglaste	4	648
<i>Kornaś Jan</i> — <i>Miller G. R., Miles J., Heal O. W.</i> : Moorland management — a study of Exmoor	4	651
— <i>National Research Council: Ecological aspects of development in the humid tropics</i>	2	338
— <i>Real L. (red.): Pollination biology</i>	2	339
— <i>Surtsey Research Progress Report IX</i>	4	650
<i>Kowalski Kazimierz</i> — <i>Hopkins D. M., Matthews J. V. Jr., Schweger Ch. E., Young S. B. (red.): Paleoecology of Beringia</i>	2	336
<i>Kunicki-Goldfinger Władysław</i> — <i>Hoffman A.</i> : Wokół ewolucji	2	333
<i>Leśniak Andrzej</i> — <i>Trojan P.</i> : Bioklimatologia ekologiczna	4	656
<i>Mirek Zbigniew</i> — <i>Falkowski M. (red.): Trawy polskie</i>	2	344
<i>Ochyra Ryszard</i> — <i>Crum H. A.</i> : <i>Sphagnopsida, Sphagnaceae</i> . The New York Botanical Garden	4	666
— <i>Schuster R. M. (red.): New Manual of Bryology</i>	4	662
— <i>Stormer P.</i> : Characteristic features of the moss flora of the various parts of Europe	4	667
<i>Pinowski Jan</i> — <i>Wright E. N., Inglis I. R., Feare C. J. (red.): 1980 — Bird problems in agriculture</i>	4	657

<i>Różycki Olgierd</i> — Kusakin O. G.: Morskaja biogeografija	4	659
<i>Siemińska Jadwiga</i> — Ettl H.: Chlorophyta. I. Phytomonadina. Süßwasserflora von Mitteleuropa. B. 9	2	343
<i>Sikorska-Piwowska Zofia</i> — H. Szarski (red.): Anatomia porównawcza kręgowców	4	652
<i>Stawiński Wiesław</i> — Honomichl K., Rislser H., Rupprecht R.: Wissenschaftliches Zeichnen in der Biologie und verwandten Disziplinen	2	342
— Riabinin S., Olearnik M., Riabinin D.: Szkolne wycieczki przyrodnicze dla niewidomych	4	670
<i>Szczepka Maciej Z.</i> — Gawłowska J.: Marian Raciborski, pionier idei ochrony przyrody w Polsce	2	350
<i>Tramer Jerzy</i> — Raup D. M., Stanley S. M.: Podstawy paleontologii	4	660
<i>Witkowski Zbigniew</i> — Berryman A. A.: Population systems. A general introduction	2	335
<i>Wojewoda Władysław</i> — Jülich W.: Die Nichtblätterpilze, Gallertpilze und Bauchpilze. Aphyllphorales, Heterobasidiomycetes, Gastromycetes. Kleine Kryptogamenflora. B. II b/1, Basidiomyceten	4	668
— Kotłaba F.: Zeměpisné rozěireni a ekologie chorošů (Polyporales s.l.) w Československu	2	340
<i>Wolsan Mieczysław</i> — Atlas rozmieszczenia ssaków w Polsce, Pucek Z., Raczynski J. (red.)	4	654

KRONIKA NAUKOWA

<i>Pajor Wiktor J.</i> — Neuropeptyd Y. Nowe białko mózgu ssaków	2	353
--	---	-----

PRACE ZAKŁADÓW I INSTYTUTÓW NAUKOWYCH

<i>Trojan Przemysław</i> — Program naukowy Instytutu Ekologii PAN: Kierunki badań i wyniki	2	355
--	---	-----

ZEBRANIA, ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

<i>Bieniarz Krzysztof, Epler Piotr</i> — Zagadnienia endokrynologii ryb na XII Konferencji Europejskich Endokrynologów Porównawczych, Sheffield 1983	2	381
<i>Kowalski Kazimierz</i> — Międzynarodowe sympozjum dotyczące filogenezy gryzoni, Paryż 1984	2	385
<i>Orlikowska Teresa</i> — Sprawozdanie z konferencji nt. zastosowania kultur tkanek roślinnych w rolnictwie	4	673
<i>Przełęcka Aleksandra</i> — VIII Europejski Kongres Mikroskopii Elektronowej, Budapeszt 1984	2	376
<i>Siciński Jan T.</i> — Na odsiecz licu Ziemi. Konferencja nt. ochrony krajobrazu środkowej Polski	4	680
<i>Trojan Przemysław</i> — Piąta konferencja krajów socjalistycznych uczestniczących w Programie UNESCO „Człowiek i Biosfera”, Sofia 1984	2	375
<i>Wasilewska Lucyna</i> — I Międzynarodowy Kongres Nematologii, Guelph 1984	2	379
<i>Wojtan Krzysztof</i> — Monitoring ekologiczny w Krakowie	4	675

<i>Piotrowicz Maria</i> — Główne kierunki i sposoby przygotowania nauczycieli biologii do organizowania zajęć terenowych	4	686
— Piąta Konferencja Dydaktyków Biologii szkół wyższych nt. „Terminologiczne i klasyfikacyjne problemy dydaktyki biologii”	4	688
<i>Fągański Andrzej</i> — Jubileusz 55-lecia pracy Doc. Jana Wąsowicza w Polskim Towarzystwie Przyrodników im. Kopernika	4	685

MISCELLANEA

Nagrody i wyróżnienia naukowe przyznane na posiedzeniu Sesji Plenarnej Wydziału Nauk Biologicznych PAN	4	691
--	---	-----

INDEKS AUTORÓW

(numer zeszytu, *strona*)

- Bartnik Ewa, 1, 113
Bersin-Berse Brigida, 1, 145
Białobok Stefan, 4, 647, 648
Bieniarz Krzysztof, 2, 381
Boguta Magdalena, 1, 67
- Chmurzyński Jerzy Andrzej, 2, 321
Cybis Jan, 1, 179
- Dolatowski Jakub, 4, 648
Dyrzowa Alina, 2, 233
- Epler Piotr, 2, 381
- Fagasiński Andrzej, 4, 685
Fikus Magdalena, 1, 155
Filipowicz Witold, 1, 41
- Gębczyński Marek, 2, 287
Grieb Paweł, 2, 269
Grzelakowska-Sztabert Barbara, 2, 253
- Jachymczyk Witold, 1, 125
Janion Celina, 4, 549
Janiszewski Andrzej, 4, 609
Jerzmanowski Andrzej, 1, 15
- Kasicki Stefan, 4, 623
Kielan-Jaworowska Zofia, 4, 511
Klysik Jan, 1, 5
Kornaś Jan, 2, 338, 339; 4, 650, 651
Kowalski Kazimierz, 2, 336, 385
Kozłowski Marek, 4, 593
Kunicki-Goldfinger Władysław, 2, 333
- L.W. [Lech Wojtczak], 2, 231
Leśniak Andrzej, 4, 656
Lorkiewicz Zbigniew, 1, 171
- Michajłow Włodzimierz, 4, 529
Mirek Zbigniew, 2, 344
- Nowotny Jarosław, 2, 310
- Obidowicz Andrzej, 2, 299
Ochyra Ryszard, 4, 662, 666, 667
Orlikowska Teresa, 4, 673
- Pajor Wiktor J., 2, 353
Paszewski Andrzej, 1, 89
Pinowski Jan, 4, 657
Piotrowicz Maria, 4, 686, 688
Pokorski Mieczysław, 4, 569
Polaczek Piotr, 1, 117
Przełęcka Aleksandra, 2, 376
Putrament Aleksandra, 1, 67, 221
- Różycki Olgierd, 4, 659
- Siciński Jan, 4, 680
Siemińska Jadwiga, 2, 343
Sikorska-Piwowska Zofia, 4, 652
Stawiński Wiesław, 2, 342; 4, 670
Szczepka Maciej Z., 2, 350
Szweykowski Jerzy, 1, 195
- Trammer Jerzy, 4, 660
Trojan Przemysław, 2, 355, 375
- Urbanek Adam, 3, 395; 4, 513
- Wachowicz Barbara, 4, 583
Walasek Grażyna, 2, 239
Wasilewska Lucyna, 2, 379
Witkowski Zbigniew, 2, 335
Wojewoda Władysław, 2, 340; 4, 668
Wojtan Krzysztof, 4, 675
Wolsan Mieczysław, 4, 654
- Zieliński Kazimierz, 2, 239
Zmysłowski Wojciech, 4, 623
- Żuk Jerzy, 1, 3

Informacja dla Autorów

KOSMOS jest kwartalnikiem adresowanym do szerokiego grona biologów. Publikuje oryginalne artykuły referatowe i przeglądowe informujące o postępach wiedzy w różnych dziedzinach nauk biologicznych. Prowadzi dział dyskusji i krytyki naukowej oraz dział recenzji. Podaje informacje o działalności instytutów i zakładów naukowych oraz omówienia przebiegu ważniejszych zjazdów, sympozjów i konferencji. Zamieszcza krótkie notatki o najnowszych odkryciach i syntetyczne omówienia rozwoju badań w wybranych dziedzinach nauki, opracowane przez specjalistów dla szerszego grona odbiorców.

Autorzy są odpowiedzialni za merytoryczną treść artykułów, poprawność użytej nomenklatury naukowej oraz za ścisłość podawanych informacji. Proszeni są o nadsyłanie tekstów opracowanych starannie pod względem językowym i stylistycznym oraz zgodnie z podanymi niżej wskazówkami technicznymi.

Artykuły i inne materiały nadsyłane do KOSMOSU są recenzowane i redagowane stosownie do wskazówek recenzentów w porozumieniu z Autorami. Redakcja zastrzega sobie prawo skracania tekstów i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy. Autorów obowiązuje korekta autorska; ponoszą oni koszty zmian tekstu w korekcie, wykraczających poza usunięciem błędów drukarskich.

Zamieszczenie w KOSMOSIE prace honoruje się według obowiązujących stawek autorskich. Autorzy artykułów otrzymują bezpłatnie 25 odbitek; zamówienia na płatne, dodatkowe odbitki należy zgłaszać pisemnie łącznie ze wzrotem korekty autorskiej.

Przygotowanie prac do druku

1. Prace należy nadsyłać w 2 egzemplarzach, zarówno tekst jak i załączniki.

2. Maszynopis powinien być sporządzony na białym papierze formatu A4, na maszynie i czcionką normalnej wielkości, przez czarną taśmę, jednostronnie z podwójnym odstępem między wierszami i ok. 4 cm marginesem po lewej stronie, nie więcej niż 60 znaków w jednym wierszu i nie więcej niż 30 wierszy na jednej stronie. Strony należy numerować.

3. Na oddzielnej, nie numerowanej stronie tytułowej należy podać: tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) oraz nazwisko autora, adres zakładu pracy i adres zamieszkania, nr telefonu w miejscu pracy (lub w domu) oraz wskazówki dotyczące przesyłania korespondencji i sposobu przekazania honorarium (także nr konta). Przy artykułach (dział I Kosmosu) i pracach przeznaczonych do działu „Dyskusja i krytyka” należy podać tłumaczenie tytułu na język angielski i rosyjski.

4. Teksty powinny być pisane bez używania wyróżnień jak podkreślanie, spacjowanie lub pisanie dużymi literami (wersalikami). Wszelkie wskazówki dla redakcji dotyczące wyróżnień w tekście należy zaznaczać zwykłym ołówkiem, zaś dotyczące składu (np. odnośnie włamania rysunku lub tabeli) — ołówkiem na marginesie maszynopisu.

5. Załączone do maszynopisu tabele, rysunki, schematy, mapy, wzory itp. powinny być oznaczone na marginesie lub na odwrotnej stronie przez podanie nazwiska autora i początkowych wyrazów tytułu pracy, a także nr jednej jednostki ilustracyjnej.

6. Tabele winny być napisane w układzie zbliżonym do układu zecerskiego, a tekst nie powinien przekraczać linii ograniczających poszczególne kolumny. Treść tabel należy pisać z podwójnym odstępem między wierszami, jak tekst podstawowy. Należy unikać dzielących linii pionowych i poziomych (z wyjątkiem główki). Liczby wielocyfrowe należy pisać dzieląc je od końca na grupy po 3 cyfry (np. 50 000).

7. Rysunki, schematy, mapy, fotografie i inne materiały ilustracyjne muszą nadawać się do reprodukcji lub przerysowania. Oryginały rysunków winny być wykonane tuszem na kalce technicznej lub na białym papierze. Rysunki robocze winny być sporządzone czytelnie,

w sposób umożliwiający bezbłędne wykonanie czystorysów do reprodukcji. Odbitki fotograficzne winny być wykonane w formacie nie mniejszym niż późniejsze reprodukcje w tekście, na białym papierze błyszczącym o odpowiednim kontraście. Map i planów nie należy przeładowywać zbyt obszerną treścią i szczegółowymi oznaczeniami, gdyż może to spowodować nieczytelność reprodukcji.

8. Wszystkie jednostki ilustracyjne winny być ponumerowane ze wskazaniem, w razie potrzeby, góry rysunku. Podpisy powinny być podane na oddzielnej stronie maszynopisu.

9. Literaturę należy podać na końcu maszynopisu w kolejności omawianych w tekście prac. Odnośniki bibliograficzne, w wypadku czasopism, winny zawierać dane w następującej kolejności: liczba porządkowa, nazwisko i pierwsza litera imienia autora, tytuł pracy w pełnym brzmieniu, przyjęty skrót tytułu czasopisma, tom, strony (od-do) i rok. Przy wydawnictwach książkowych należy podawać: liczbę porządkową, nazwisko i pierwszą literę imienia autora, tytuł książki, przy pracach wielotomowych: nr tomu, przy wydawnictwach seryjnych: nazwę serii, a dalej: nazwę wydawnictwa (w skrócie), miejsce i rok wydania.

Powołanie się w tekście na odnośną pozycję literatury następuje przez podanie liczby porządkowej w nawiasie kwadratowym. Przy cytowaniu prac o podstawowym znaczeniu dla omawianego zagadnienia wskazane jest poza tym przytoczenie w tekście również nazwiska autora (autor i współpr.).

W ten sposób przygotowany materiał autorski pozwoli uniknąć błędnego składu lub reprodukcji i wpłynie niewątpliwie na skrócenie cyklu wydawniczego.

Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika

K O S M O S A

Prenumerata krajowa

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej
rocznie zł 520,—, półrocznie zł 260,—

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny
- do dnia 1 czerwca na II półrocze 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.

Prenumerata zagraniczna

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 zleciodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we 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.

Indeks 36260

Kosmos 1, 1—228, Warszawa 1985
