

MICHAŁ PIECHOWSKI

TAKSONOMIA MOLEKULARNA BAKTERII A PODSTAWOWE PROBLEMY BIOLOGII

CZĘŚĆ II. MECHANIZM PRZEKAZU INFORMACJI

Zdaniem Macy'a całą chemię organiczną można wyprowadzić z faktu posiadania przez węgiel wartościowości 4. Podobnie można by powiedzieć, że biologia jest konsekwencją faktu złożenia się na strukturę DNA par adeniny-tyminy i guaniny-cytozyny. Kwas rybonukleinowy (RNA) jest zbudowany z tych samych zasad co DNA z tym, że miejsce tyminy zajmuje uracyl. Udział RNA w syntezie białka jest rzeczą już dawno dowiedzioną (patrz niżej). Stąd powstało w biologii twierdzenie, które jest podstawowe i dziś powszechnie przyjęte, że między trzema grupami drobin olbrzymich — kwasów nukleinowych i białek — istnieje określona zależność. Symboliczny skrót przedstawia ją w sposób następujący:

DNA → RNA → białko

Skrót ten oznacza, że informacja genetyczną zawartą w DNA i określająca powstanie i budowę białka zostaje przekazana do RNA biorącego bezpośredni udział w formowaniu się drobin białka.

Przez informację genetyczną rozumiemy uznanie DNA za materiał genetyczny, który charakterem swojej struktury określa strukturę innych substancji. Jeśli jeden rodzaj drobin służy za wzorzec do formowania się innego rodzaju drobin to powiemy, że informacja służąca do budowy tych drugich jest zawarta w pierwszym rodzaju drobin. W taki sposób DNA określa strukturę RNA czyli przekazuje mu zawartą w sobie informację. Podobnie RNA przekazuje otrzymaną informację do białka, które przybiera taką postać za pośrednictwem RNA, jaka została pierwotnie w drobinie DNA, czyli w genie, określona. Podstawowe twierdzenie biologii w dalszym ciągu określa, że informacja, która przeszła do białka nie może się wrócić poprzez RNA do DNA (Crick 1958).

Informacja zawiera się w DNA w postaci uszeregowania zasad azotowych w łańcuchach DNA. Tak jak w alfabecie Morse'a następujące po sobie kreski i kropki zawierają treść, którą można przetłumaczyć na alfabet łaciński, tak samo kolejne następstwo puryn i pirymidyn w łańcuchu DNA tłumaczy się później na kolejne uszeregowanie aminokwasów w drobinie białka. W DNA mamy dwie puryny

(adenina i guanina) oraz dwie pirymidyny (tymina i cytozyna). Alfabet DNA wobec tego składa się z czterech liter. Natomiast alfabet białka składa się z dwudziestu liter, czyli dwudziestu aminokwasów, tyle bowiem aminokwasów potrzeba do syntezy białek enzymów. Inne aminokwasy, jak hydroksypolina czy fosfoseryna, uważa się za modyfikacje w już utworzonej drobinie białka. Ten zespół dwudziestu niezbędnych do syntezy białka aminokwasów Crick określił jako «The Magic Twenty» (Crick 1958).

1. Szyfr biologiczny

Według definicji szyfr jest to system znaków dowolnie dobranych służących do przedstawienia słów. Przekładając z jednego szyfru na inny musimy ustalić, które kombinacje znaków jednego szyfru są równoważne zespołom znaków drugiego szyfru. Powiadamy więc, że białka jako złożone z 20 aminokwasów są pisane szyfrem 20 znaków. Kwasy nukleinowe natomiast są pisane szyfrem czterech znaków czyli czterech zasad azotowych. Przekazując informację z kwasów nukleinowych do białek musimy uporać się z rozwiązaniem problemu, w jaki sposób ugrupowania zasad azotowych w kwasach nukleinowych wyznaczają położenie aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym.

Gdyby zasad azotowych w kwasach nukleinowych było 20, wtedy mielibyśmy prawo przypuszczać, że jedna zasada odpowiada jednemu aminokwasowi. Tak jednak nie jest. Kwasy nukleinowe zawierają tylko cztery zasady. Dlatego sądzimy, że do ustalenia położenia jednego aminokwasu w białku potrzeba kilku zasad azotowych. Cztery zasady wzięte po jednej mogłyby określić tylko cztery aminokwasy, tak jak cztery litery w alfabecie greckim odpowiadają tylko czterem literom w alfabecie łacińskim.

Stoimy wobec zagadnienia, w jaki sposób szyfr złożony z czterech znaków tłumaczy się na szyfr złożony z dwudziestu znaków. Jeśli weźmiemy po dwie litery na raz z dostępnych czterech, to otrzymamy 16 kombinacji, gdyż 4^2 jest 16. Ponieważ to nie wystarcza bierzemy po trzy litery na raz i teraz otrzymamy wystarczającą ilość kombinacji: 4^3 wynosi 64. Jest to dużo więcej niż potrzeba do określenia 20 aminokwasów.

Jak łatwo zauważyć zagadnienie szyfru biologicznego zostało pierwotnie sformułowane teoretycznie na podstawie zaobserwowanej zależności między kwasami nukleinowymi a białkami. Kwasy nukleinowe są wyznacznikami struktury białek, rozumowano wobec tego, że może uda się zgadnąć, jakie kombinacje elementów kwasów nukleinowych odpowiadają poszczególnym aminokwasom.

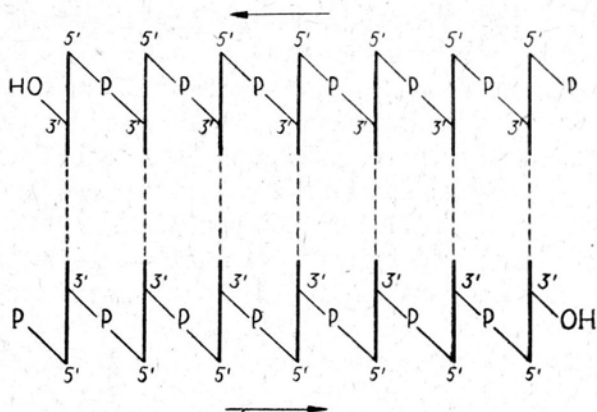
Czyniono teoretyczne założenia, które pozwoliłyby wyrugować spośród 64 kombinacji 44 jako tworzące nonsens. I tak powtórzenie tej samej litery jak AAA czy BBB przyjęto za nonsens, ponieważ jeśli dwa takie same hasła znajdują się obok siebie, to nie wiadomo, z którego miejsca trzeba zacząć czytać mając na uwadze, że to tkwi w kontekście liter, a istnienia przecinków nie zakłada się, ponieważ wszelkie próby doszukania się przerw w łańcuchach DNA spełzyły na niczym. DNA jest

drobiną ciągłą. Usuwając powtórzenia tej samej litery jako nonsens pozbyliśmy się w ten sposób nadmiaru czterech kombinacji liter (AAA, BBB, CCC, DDD). Następne założenie polega na tym, że biorąc kombinacje trzech liter, a więc ABC, BCD itp., usuwamy, jako niepotrzebne, wszystkie cykliczne permutacje danej kombinacji, a więc jeżeli ABC określa jakiś aminokwas, to BCA i CAB są cyklicznymi permutacjami tej samej kombinacji liter (puryn i pirymidyn w drobinie DNA) i nie są wobec tego dozwolone. W ten sposób pozbywamy się 40 kombinacji, jako nie zawierających informacji, i z pozostałymi czterema wyeliminowanymi poprzednio pozostaje dokładnie 20 kombinacji, które tworzą sens i mogą odpowiadać pojedynczym literom białkowego szyfru (Crick et al. 1957).

Takie spekulacje, jakkolwiek pociągające, wymagają poparcia doświadczonego tym bardziej, że autorzy powyższego rozwiązania problemu przekładu z DNA na białko zaproponowali konstrukcję z liter na papierze ułożoną w taki sposób, że tylko te kombinacje, które mają sens mogą być z DNA odczytane, natomiast te, które sensu nie tworzą nie dadzą podstaw do odbioru informacji z nich. Nie przytaczamy tu tej konstrukcji szyfru, gdyż trudno właściwie sobie wyobrazić, w jaki sposób można by ją było przyłożyć do drobin DNA. Szyfr ten otrzymał nazwę szyfru trójkowego wyłączającego, gdyż zakłada, że jedna i tylko jedna kombinacja trzech liter (zasad) odpowiada jednemu aminokwasowi. Nie będziemy się tu zajmowali innymi szyframi wymyślonymi wcześniej (pierwszy został zaproponowany przez Dounce'a w 1952 roku i, niezależnie od niego, inny przez Gamowa w 1954), których zaproponowano kilkanaście (Gamow et al. 1956).

Teoretyczne rozważania usiłujące rozwiązać szyfr biologiczny znalazły ciekawe sformułowania w pracy Golomba, Welcha i Delbrücka (1958). Autorzy ci przyjęli za podstawę szyfr trójkowy wyłączający i ustalili, że można skonstruować 408 tego rodzaju szyfrów. Błędy popełnione w kopiowaniu takiego szyfru albo spowodują brak sensu w danej trójce i wtedy nie odpowiada ona żadnemu istniejącemu aminokwasowi, albo przestawienia sensu i wtedy taka zmieniona trójka odpowiada innemu aminokwasowi. W DNA kopiowanie informacji zachodzi wtedy, kiedy z jednej drobin DNA powstają dwie nowe. W czasie tego procesu czasami zdarzają się błędy (na przykład na miejsce guaniny wejdzie adenina) i wtedy mamy do czynienia z mutacją.

Powstało również pytanie, czy informację zawartą w DNA można czytać w obu kierunkach z zachowaniem sensu? W modelu DNA zaproponowanym przez Watsona i Cricka w 1953 roku wiązania fosforowo-cukrowe idą w jednym łańcuchu i w jednym kierunku (z węgla 3' dezoksyrybozy poprzedzającej na węgiel 5' dezoksyrybozy następnej), a w drugim łańcuchu w kierunku odwrotnym (5'—3'). W tym sensie drobina DNA jest symetryczna, gdyż i na jednym, i na drugim jej końcu będzie wolna grupa hydroksylowa na węglu 3' ostatniej dezoksyrybozy jednego łańcucha i reszta fosforanowa na węglu 5' ostatniej dezoksyrybozy drugiego łańcucha. Nie da się zatem określić *a priori*, z którego końca należy zacząć czytać. Nie wydaje się za to prawdopodobne, aby można było otrzymać tę samą treść czytając raz z lewa na prawo a drugi raz z prawa na lewo, wobec tego ci sami autorzy usiłowali



Rys. 1. Końcowe grupy drobiny DNA. Kreski pionowe przedstawiają cząsteczki dezoksyrybozy powiązane od atomu 3' do 5' resztami kwasu fosforowego. Pary zasad azotowych są wykropkowane.

skonstruować szyfr, który, czytany w jednym kierunku, daje dobrą informację, a czytany w odwrotnym nie. Okazało się, że aby móc zbudować taki szyfr, trzeba się uciec do kombinacji czwórek a nie trójek. Istnieją nawet pewne dane na poparcie takiego podejścia do zagadnienia szyfru, o czym poniżej.

2. Czy szyfr biologiczny jest szyfrem parzystym?

Przypomnijmy wpierrw sobie, że gatunki bakterii charakteryzuje rozmaita zawartość par adeniny-tyminy (AT) i guaniny-cytozyny (GC). Między gatunkami zawierającymi tylko 25% GC (reszta przypada na adeninę z tyminą) istnieją niemal wszystkie pośrednie formy składu DNA poprzez gatunki, które mają równą ilość AT i GC aż do form, które posiadają zdecydowaną przewagę guaniny z cytozyną. Chodziłoby zatem o ustalenie, czy skład DNA wykazuje współzależność ze składem aminokwasowym białek u bakterii. Gdyby bowiem się okazało, że bakterie, które posiadają wysoki procent GC mają również znacznie więcej alaniny lub jakiegokolwiek innego aminokwasu niż bakterie posiadające niski procent GC, to oznaczałoby współzależność między zawartością GC w DNA i alaniny w białku.

Sueoka (1961) przebadiał 12 gatunków mikroorganizmów rozrzuconych na całym obszarze skali zawartości GC i taką współzależność wykazał, między innymi, również dla alaniny. Idąc od gatunków bakterii o niskiej zawartości GC w DNA stopniowo do tych, które mają coraz więcej GC znajdujemy w białku kolejnych gatunków bakterii coraz więcej alaniny, glicyny, argininy i proliny. Znajdujemy natomiast coraz mniej lizyny, asparaginy i kwasu asparaginowego, glutaminy i kwasu glutaminowego, fenyloalaniny, izoleucyny oraz tyrozyny. Jednakże 6 aminokwasów występuje w tej samej ilości w bakteriach o niskiej, pośredniej jak i wysokiej zawartości GC. Brak współzależności z zawartością GC w DNA dla tych aminokwasów służy jako argument, iż szyfr biologiczny jest zbudowany z parzystych kombinacji

zasad purynowych i pirymidynowych, gdyż na skali GC nie rozróżniamy między poszczególnymi zasadami zawartymi w DNA, a tylko między ich parami. Brak współzależności między parami zasad a zawartością aminokwasów wskazuje na parzystą ilość liter w szyfrze DNA.

Powyższe dane doświadczalne rzucają także nowe światło na nasze pojęcia o biologicznym kodzie. Dotąd zakładano, że szyfr ten musi być wyłączający i uniwersalny. Otóż wydaje się, że nie może być wyłączający, to znaczy, aby tylko jedno jedyne ugrupowanie zasad azotowych odpowiadało jednemu aminokwasowi. Oznaczmy dla zobrazowania parę adeniny z tyminą jako —, a parę guaniny z cytozyną jako '. W takiej notacji następstwo par AT i GC będzie wyglądało jak list pisany alfabetem Morse'a. Sueoka, na podstawie omówionych rezultatów, zaproponował notację, którą zobrazujemy w następujący sposób:

— — — — aminokwasy kodowane wyłącznie przez pary AT, to znaczy aminokwasy o bardzo wyraźnej odwrotnej współzależności z zawartością GC w DNA;

' ' ' ' aminokwasy kodowane wyłącznie przez pary GC, to znaczy aminokwasy o bardzo wyraźnej zależności od zawartości GC w DNA;

' ' ' — oraz — — — ' aminokwasy szyfrowane przez przeważającą ilość par GC albo AT zależnie od tego, czy jest ich więcej u gatunków o wyższej zawartości GC lub więcej u gatunków o niższej zawartości GC (więcej AT odpowiednio);

— — ' ' aminokwasy kodowane w równej mierze przez AT i GC.

Sueoka przyjął, że tak powinny być kodowane aminokwasy, dla których ustalono brak powiązania między zawartością danego aminokwasu w białku bakterii a poziomem GC w DNA. Jednak nie wydaje się to słuszne, raczej można się spodziewać, że temu samemu aminokwasowi w bakterii o wysokiej zawartości GC będzie odpowiadało ugrupowanie z przewagą guaniny i cytozyny, podczas gdy w bakterii o niskiej zawartości GC symbol oznaczający ten aminokwas będzie miał więcej adeniny i tyminy niż guaniny i cytozyny. Łatwo to sobie uzmysłowić, jeśli weźmiemy pod uwagę, że zawartość 75% GC oznacza, iż na trzy pary guaniny-cytozyny przypada tylko jedna para adeniny-tyminy (' ' ' — ' ' ' — ' ' ' —) i na odwrót u bakterii, takiej jak *Welchia perfringens* na trzy pary adeniny-tyminy przypada jedna guanina-cytozyna (— — — ' — — — ' — — — ' — — —). Jeśli przeliczy się dane zawarte w omawianej pracy według proponowanego szyfru czwórkowego, to otrzymamy około 40% nadmiaru GC dla bakterii zawierających 75% GC w DNA i 40% nadmiaru AT dla bakterii zawierających 25% GC (*Welchia perfringens*). Aminokwas, który byłby kodowany wyłącznie przez GC skupiłby, na przykład u *Welchia perfringens*, w jednym miejscu cztery pary GC, po których musiałyby nastąpić 12 par AT (' ' ' — — — — — — — — — — ' — — — — ' etc.). W ten sposób chcąc włączyć w białko bakterii wystarczającą ilość aminokwasów, które byłyby kodowane wyłącznie lub razem z AT również przez GC, wyczerpalibyśmy prędko cały zapas GC w bakterii, która ma aż 75% AT. W ten sposób nie wszystkie pary AT zostałyby zużyte na kodowanie, co daje ów nadmiar. Ten «nad-

miar» nie zawierających informacji par zasad, musiałyby być rozsiane równomiernie w drobinie DNA, gdyż jak to wykazał sam Sueoka wcześniej (Sueoka et al. 1959) wewnętrzne nieodróżnicowanie DNA na fragmenty o większej i mniejszej zawartości GC, w obrębie DNA pochodzącego z jednego gatunku, nie da się wykazać nawet wtedy, jeśli ciężar drobinowy DNA zostanie zredukowany do 600 000. Taki fragment DNA zawiera tylko kilkaset par zasad. Wobec tego nie możemy przyjąć istnienia takiego nadmiaru GC lub AT w postaci informacyjnie pustych obszarów złożonych z jednego typu par zasad. Na tej podstawie łatwiej jest przyjąć, gdy chodzi o niektóre przynajmniej aminokwasy, a szczególnie te, które wykazują brak współzależności, iż odpowiadają im nie te same ugrupowania elementów DNA w zależności od położenia danego gatunku na skali GC.

Są to pierwsze dane doświadczalne uzyskane świadomie w celu popchnięcia naprzód zagadnienia szyfru. Jednak w tej dziedzinie wydaje się, że jeszcze wszystko jest do zrobienia. Na przykład nie można *a priori* wykluczyć możliwości, że nie na każdy aminokwas przypada ta sama ilość zasad w DNA. Taka możliwość ogromnie skomplikowałaby doświadczalne potraktowanie całego zagadnienia.

3. Jądrowe pochodzenie RNA

Pośrednikiem między DNA a białkiem jest kwas rybonukleinowy. Udział kwasu rybonukleinowego (RNA) w syntezie białka został wykazany już 20 lat temu przez Casperssona (1941) i Bracheta (1941). Ostatnie lata przyniosły obfite badania nad strukturą matrycy, która odbija drobiny białka (McQuillen et al. 1959, Tissieres et al. 1960, Cowie et al. 1961). Matryca syntetyzująca białko to kompleks RNA i polipeptydu. Kompleksy te można z bakterii wydzielić (najlepiej zostały one przebadane u *E. coli*), jako tzw. rybosomy czyli ciała zawierające kwas rybonukleinowy. Rybosomy wydzielone z bakterii są różnej wielkości, a stosunek RNA do zawartego w nich białka (polipeptydu) jest stały jak 1:2, to znaczy, że na jeden nukleotyd RNA przypadają dwa aminokwasy. Wagowo RNA stanowi 2/3 substancji rybosomów. Bliższe badania wykazały, że najpierw w komórce powstają małe rybosomy, o jednej drobinie RNA i dwóch łańcuchach polipeptydowych, następnie dwa takie rybosomy łączą się w jeden większy. Kilka kolejnych agregacji i otrzymujemy szereg rybosomów, które się rozróżnia według szybkości sedymentacji w ultrawirówce (Bolton et al. 1959, Aronson et al. 1960).

Rybosomy zostały wydzielone również z materiału roślinnego (Ts'o et al. 1956, 1958), z drożdży (Chao 1957, Osawa i Hotta 1959) i komórek zwierzęcych (Palade 1955, Palade i Siekevitz 1956 a, 1956 b, Sweet et al. 1958). Ostatnio udało się uzyskać syntezę hemoglobiny na rybosomach *in vitro* (Bishop et al. 1960, Dintzis 1961). Również u bakterii udało się wykazać, że β -galaktozydaza pojawia się najpierw na rybosomach, a dopiero potem przechodzi do cytoplazmy (McQuillen et al. 1959, Cowie et al. 1961). Badania nad innymi enzymami rozpuszczalnymi wykazały również, że zanim przejdą one do cytoplazmy, wprawdzie powstają na rybosomach (Aronson et al. 1961).

Caspersson (1950), posługując się utrwalonymi preparatami komórek, stara się udowodnić, że RNA przechodzi z jądra do cytoplazmy, a w szczególności, że jąderko jest pierwszym miejscem syntezy RNA. Casperssonowi później zarzucano, że produkuje artefakty. Późniejsze badania przeprowadzone *in vitro* z izotopami potwierdziły tę hipotezę. Najlepszego dowodu dostarczył Zalokar (1960), który badał inkorporacje znakowanych prekursorów białka i RNA w strzępkach *Neurospora crassa*. Wirując strzępki grzybni udało się łatwo uzyskać rozdzielenie jądra od mitochondriów, cytoplazmy i ergastoplazmy, to znaczy tej części protoplazmy, która skupia rybosomy i jest bardzo bogata w RNA. Jako prekursor RNA służyła trytowana (H^3) urydyna. Tak znakowana urydyna była podawana w pożywce przez 1 do 4 minut. Izotop pojawiał się niezmiennie najpierw we frakcji jądrowej wskazując tym samym na lokalizację nowo powstałego RNA, gdy tymczasem ergastoplazma znacznie bogatsza w RNA nie wykazywała obecności izotopu. Dopiero po ośmiu minutach izotop zaczął się przemieszczać z frakcji jądrowej do frakcji ergastoplazmy. Efekt ten można było najlepiej zauważyć, jeśli grzybnia *Neurospora* pozostawała w pożywce z trytowaną urydyną na przeciąg 1 minuty, a następnie została przeniesiona do zwykłej pożywki bez izotopu. Po przeniesieniu izotop przechodził do cytoplazmy i do ergastoplazmy, w której się na końcu skupiał.

Jeśli na przeciąg 10 do 20 sekund do pożywki podawana była trytowana leucyna jako prekursor białka, to w taki sam sposób można było zaobserwować, że nowo powstałe białko, zawierające promieniotwórczy aminokwas, pojawiło się przede wszystkim w ergastoplazmie, trochę w jądrach a trochę w mitochondriach, natomiast enchylema (cytoplazma z wyłączeniem ergastoplazmy i mitochondriów) nie przejęła izotopu, dopiero później, co wskazuje, że nowo zbudowane białka szybko opuszczają miejsce syntezy i rozchodzą się po cytoplazmie.

W myśl teorii, że RNA służy jako przekaziciel informacji genetycznej z DNA do białka, rozbieżność w składzie chemicznym DNA powinna się odzwierciedlać i w RNA. Tymczasem analizy RNA, jakie przeprowadzono (Belozersky i Spirin 1958), wykazały tylko stosunkowo małe wahania: od 41 do 49 procent zawartości GC. Nie odpowiada to w zupełności rozpiętości zmienności DNA: 25 do 75% zawartości GC. Białka tych organizmów także nie różnią się na tyle, aby to odzwierciedlało tak daleko posunięte zróżnicowanie materiału genetycznego.

W komórce bakteryjnej jest mniej więcej 10 razy więcej RNA niż DNA. Prawie wszystkich RNA to RNA znajdujący się w rybosomach (około 85%). Tym samym analizy Belozersky'ego odzwierciedlają RNA rybosomów. Jest to RNA, który bezpośrednio bierze udział w syntezie białka. Natrafiamy tu na trudność wy tłumaczenia pośrednictwa RNA między materiałem genetycznym (DNA) i białkiem. Jest rzeczą oczywistą, że RNA, który powstaje w jądrze i przenosi informację zawartą w DNA na teren cytoplazmy, powinien mieć skład zbliżony do DNA, jeśli nie taki sam, tymczasem RNA, jaki spotykamy na terenie cytoplazmy tego warunku nie spełnia. Czy wobec tego istnieje RNA taki, który by przenosząc informację zawartą w DNA posiadał ten sam skład co DNA? Istnienie takiego RNA zostało po raz pierwszy wykazane w badaniach nad rozwojem bakteriofaga T2.

4. RNA bakteriofaga T2. Hybrydy DNA-RNA

Volkin i Astrachan (1956a) zakażali bakterie *Escherichia coli* bakteriofagiem T2. Wiadomo, że do wnętrza bakterii przenika tylko DNA bakteriofaga, sam bakteriofag zaś RNA nie posiada w ogóle (Volkin i Astrachan 1956b). W poprzednich badaniach ustalono już, że w bakterii po zakażeniu bakteriofagiem T2 synteza RNA ustaje, za to synteza białka nie ulega przerwaniu (Cohen 1948). Zaistniała paradoksalna sytuacja syntezy nowego białka bez syntezy RNA. Nowym białkiem były składniki okrywy bakteriofaga. Czyżby DNA bakteriofaga bezpośrednio tworzył nowe białka?

Volkin i Astrachan w kilka minut po zakażeniu dodawali do pożywki P^{32} , a następnie po kilku minutach doświadczenie przerywano i ekstrahowano RNA. Spodziewano się znaleźć w ten sposób nowy RNA, jeżeli taki powstaje po przeniknięciu DNA bakteriofaga do komórki. Metoda izotopowa jest co najmniej 1000 razy czulsza niż metody analizy chemicznej na ilość RNA. Dzięki temu można sprawdzić, czy ilość P^{32} w poszczególnych zasadach RNA pozostaje w takim samym stosunku, jak wykazują analiza chemiczna całego RNA w komórce. Gdyby te proporcje okazały się inne dla zasad znaczonej P^{32} , to wtedy można by sądzić, że mamy do czynienia z nowym rodzajem RNA. W opisanym doświadczeniu ilość izotopu w poszczególnych zasadach otrzymanych po hydrolizie zasadowej przypominała swoimi proporcjami skład DNA. Była to więc wskazówka, że po zakażeniu bakterii DNA bakteriofaga T2 produkuje nowy swój własny RNA, który odbija jemu właściwy skład DNA (38% GC), a nie należący do *E. coli* (50% GC). Jak wiemy dzisiaj, bakteriofag T2 po zakażeniu bakterii powoduje w niej syntezę całego szeregu nowych enzymów (do tej pory poznano około dwudziestu) i to w ciągu pierwszych minut po zakażeniu (Flaks Cohen 1959, Flaks et al. 1959, Kornberg et al. 1959).

Odkrycie Volkina i Astrachana wykazało istnienie szybkiej przemiany (turn-over) RNA (Volkin 1958). W trakcie tej przemiany synteza i rozpad RNA równoważą się. Dlatego też nie można było zauważyć powstania nowego rodzaju RNA stosując metody chemiczne. Jest to zrozumiałe obecnie, ponieważ w zakażonej przez T2 bakterii ustaje również synteza rybosomów (Brenner et al. 1961), które przecież skupiają około 85% RNA całej komórki (Bolton et al. 1959).

RNA właściwy dla bakteriofaga T2 został później lepiej przebadany i scharakteryzowany (Nomura et al. 1960) i stało się zupełnie jasne, że jest to nowy RNA, jakiego przedtem w komórce bakterii nie było. Z kolei trzeba się było przekonać czy RNA, który powstaje po zakażeniu przez bakteriofaga T2 i który imituje skład jego DNA, potrafi tworzyć kompleks z materiałem genetycznym, z którego wyszedł. Gdyby bowiem udało się wykazać, że RNA, wydający się być bezpośrednim produktem DNA, potrafi wiązać się w sposób swoisty z tym DNA, czyli potrafiłby wejść z nim w kompleks, to dałoby to podstawy do przypuszczenia, że uszeregowanie zasad RNA uzupełnia zasady azotowe na pewnym obszarze DNA w taki sam sposób jak uzupełniają się oba łańcuchy DNA. W ten sposób udałoby się wykazać, że RNA tego rodzaju, jako pierwszy produkt genowy, jest też bezpośred-

nim odbiciem uszeregowania zasad w genie czyli w pewnym odcinku makromolekuły DNA.

W celu przeprowadzenia tego doświadczenia Hall i Spiegelman (1961) zastosowali metodę opracowaną przez Doty'ego i Marmura (Doty et al. 1960, Marmur Lane 1960). Doty i Marmur zajmowali się termiczną denaturacją DNA. Podgrzewanie roztworu DNA blisko temperatury wrzenia powoduje rozpad DNA. DNA ulega denaturacji. Rozpad DNA jest podłużny: tam, gdzie przedtem były dwa łańcuchy połączone wiązaniami wodorowymi, tworząc w ten sposób wielką i prężną drobinę DNA, teraz pojedyncze łańcuchy, pozbawione wzajemnej spójni na skutek rozpadu wiązań wodorowych, są wiotkie i ich konfiguracja zależy między innymi od prądów termicznych i ruchów Browna cząsteczek wody. Pierwotna organizacja drobin DNA znika przez to zupełnie.

Doty i Marmur badając temperatury topnienia DNA przekonali się, że przy powolnym chłodzeniu (przez wyłączenie ogrzewania łaźni, w której umieszczone są próbki «stopionego» DNA) z jednołańcuchowej mieszaniny drobin DNA, w których wiązania wodorowe uległy zerwaniu na całej długości drobin, otrzymuje się z powrotem całkowite drobinę DNA zbudowane, jak poprzednio, z dwóch łańcuchów. Do tak odtworzonego DNA zastosowano sprawdzian biologiczny. DNA wyekstrahowany z bakterii odpornych na streptomycynę, poddany działaniu temperatury powodującej rozsuniecie się obu łańcuchów, traci zdolność przekazania odporności na streptomycynę do szczepu bakterii uczulonych na działanie streptomycyny. Ten sam nieczynny zdenaturowany preparat DNA podgrzany ponownie i tym razem poddany powolnemu chłodzeniu (trwały preparat jednołańcuchowego DNA otrzymuje się przez szybkie chłodzenie podgotowanego roztworu) odzyskuje zdolność przekazywania cechy odporności na streptomycynę. Aktywność biologiczna takiego preparatu DNA została zatem przywrócona przez to, że dwa łańcuchy DNA, które rozeszły się pod działaniem podwyższonej temperatury, w okresie kiedy temperatura opadała powoli, miały dosyć czasu, aby się w roztworze odnaleźć i z powrotem owinąć jeden naokoło drugiego, odtwarzając w ten sposób pierwotną drobinę DNA z wszystkimi jej właściwościami (Marmur Lane 1960).

DNA i RNA można bardzo skutecznie rozdzielić przy pomocy wirowania w spadku gęstości (vide część I). RNA ma większy ciężar właściwy niż DNA i dlatego skupia się na dnie próbki, DNA natomiast pozostaje w pobliżu menisku. Jeśli DNA znakowany trytem (H^3) zmieszany z RNA znakowanym fosforem (P^{32}) będziemy wirować w odpowiednim spadku gęstości, to otrzymamy wtedy rozdział promieniotwórczości. Posługując się aparatem, który rejestruje dwa różne rodzaje promieniowania równocześnie, możemy przeanalizować wszystkie frakcje, od dna próbki aż do menisku, na zawartość obu izotopów. W opisanych warunkach otrzymamy skupienie P^{32} u dna próbki, a skupienie H^3 przy menisku.

W następującym doświadczeniu usiłowano wykryć czy RNA, który powstaje w komórce bakterii z inicjatywy bakteriofaga T2, utworzy kompleks z jego DNA. DNA znakowany trytem podgrzano do temperatury $95^{\circ}C$ tak, aby cały rozpadł

się na pojedyncze łańcuchy. Następnie cały roztwór szybko ochłodzono w łaźni z lodem, aby zachować jednołańcuchowość DNA. Z kolei tak podgrzany jednołańcuchowy DNA (H^3) zmieszano z RNA (P^{32}) wyizolowanym z bakterii po zakażeniu przez T2. Mieszaninę podgrzano do $65^{\circ}C$, a następnie powoli chłodzono i poddano wirowaniu w spadku gęstości. RNA i DNA zostały rozdzielone według skupienia się promieniotwórczości P^{32} i H^3 . Co jednak dało się zauważyć to małe skupienie promieniotwórczości P^{32} we frakcji DNA. Nałożenie się promieniotwórczości trytu i fosforu wskazywało na obecność hybrydu DNA i RNA.

Z uwagi na sam charakter zastosowanego w doświadczeniu RNA, które było znakowane tylko w ciągu pięciu minut po zakażeniu bakterii, między 3 a 8 minutą, można się było spodziewać nie więcej jak tylko małej ilości, która z DNA będzie się wiązać. Przekonano się również, że reakcja ta jest stechiometryczna, to znaczy, bez względu na proporcje między ilością DNA i RNA w mieszaninie, wyizolowany kompleks posiadał zawsze taką samą ilość DNA (którego jest więcej, ponieważ ciężar jednej drobinę DNA w tych doświadczeniach wynosił około 10 milionów) w stosunku do ilości RNA (tego było mniej, ponieważ ciężar drobinowy RNA w tych doświadczeniach był poniżej miliona) (Hall i Spiegelman 1961).

Hybryd DNA-RNA nie powstawał w tych samych warunkach, jeśli DNA nie był uprzednio podgrzany do temperatury 95° , czyli nie przeszedł w stan rozsunięcia łańcuchów lub jeżeli użyto DNA innego bakteriofaga, na przykład T5, nie mówiąc już o zastosowaniu DNA bakterii. Jest rzeczą znamionną, że T2 i T5 posiadają tę samą ilość GC, jednak RNA pochodzący od bakteriofaga T2 nie łączy się z DNA bakteriofaga T5. Świadczy to dobitnie o różnym uszeregowaniu zasad u obu bakteriofagów wykluczającym homologię między nimi nawet na krótszych odcinkach.

Później udało się wyizolować hybryd DNA-RNA *in vivo* z bakterii zakażonych bakteriofagiem T2. Hybryd DNA-RNA jest odporny na działanie nukleaz: DNazy i RNazy, co wskazuje dobitnie na związek jakościowo różny od samego DNA i samego RNA (Spiegelman et al. 1961).

5. RNA informacyjny a funkcje syntetyczne rybosomów

Na podstawie opisanych doświadczeń widać, że istnieją następujące warunki, które DNA i RNA muszą spełnić, aby przekazanie informacji zostało spełnione. DNA może zrodzić drobinę RNA, która przejmie zawartą w pewnym jego obszarze informację genetyczną tylko wtedy, jeśli podwójny łańcuch DNA na tym obszarze rozsunie się i odsłoni swoje zasady purynowe i pirymidynowe. Prekursory RNA mogą wtedy z tymi zasadami tworzyć wiązania wodorowe i tak powstaje łańcuch RNA, który odbiera z DNA zawartą w nim informację. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* nad syntezą RNA wykazały istnienie enzymu syntetyzującego RNA tylko w obecności DNA. Produkt tej reakcji jest zupełnie podobny do DNA, jeśli chodzi o jego skład zasad (Weiss 1960, Hurwitz et al. 1960, Weiss Nakamoto 1961).

RNA powstający niejako wewnątrz drobiny DNA musi ją następnie opuścić i przejść do cytoplazmy. Ponieważ wiemy, że nie wszystkie geny są sobie równe wielkością — jedne zajmują większy obszar DNA, inne mniejszy — zatem i RNA informacyjny powinien wykazywać zróżnicowanie wielkości. W rzeczy samej udało się wyizolować RNA trzykrotnie większy od tego, jaki otrzymano w pierwszych doświadczeniach z bakteriofagiem T2 (Spiegelman 1961).

Gdzie się kieruje RNA informacyjny wydostawszy się z terenu materiału genetycznego? Oczywiście tam, gdzie odbywa się synteza białek, a więc do rybosomów.

Rybosomy posiadają RNA, którego konfiguracja w roztworze jest równie swobodna jak w połączeniu z polipeptydami, które razem z RNA składają się na rybosomy (Fresco et al. 1960, Zubay Wilkins 1960). Dopiero pod wpływem informacyjnego RNA kwas rybonukleinowy rybosomów kształtuje się w określony sposób według informacji przyniesionej przez ów RNA. Dopiero teraz może być syntetyzowana określona drobina białka. Później, gdy RNA informacyjny odpłynie z rybosomu lub ulegnie rozpadowi nowa drobina informacji, pochodząca z innego genu, może ten sam rybosom uformować w matrycę produkując już teraz inny enzym. Niestalość RNA informacyjnego została wykazana, co stwarza szczególnie trudności w izolowaniu go (Spiegelman 1961, Brenner 1961). Również powiązanie tego RNA z rybosomami jest luźniejsze daleko bardziej niż kwasu rybonukleinowego, który w rybosomach znajduje się siłą rzeczy. Jednym słowem RNA informacyjny jest to typ drobin służących jedynie temu, aby szybko przekazać informację z genów do fabryki białek. Drobiny informacji są również na tyle niestale, że umożliwia to kontrolę syntezy ilości produkowanego białka.

Dzięki tym badaniom odpadła proponowana hipoteza, że gen tworzy jako swój pierwszy produkt odpowiedni rybosom przeznaczony do syntezy jednego określonego rodzaju białka. O losie tej hipotezy zaważyły analizy Belozersky'ego i Spirina wykazujące, że RNA różnych gatunków bakterii nie odzwierciedla składu DNA organizmu, z którego pochodzi. Belozersky i Spirin, analizując całkowity RNA bakterii, w istocie mieli do czynienia z RNA rybosomów. Do tego należy dodać najbardziej dobitny dowód doświadczalny, że w zakażonej przez bakteriofaga komórce, w czasie gdy zachodzi synteza białek bakteriofaga, nie ma syntezy nowych rybosomów (Brenner et al. 1961).

Jeszcze jeden typ doświadczeń doskonale unaocznia tę sytuację. Bakterie rosnące w pożywce pełnej rozmnażają się bardzo szybko i syntetyzują wielką ilość rybosomów. Wzrost bakterii jest wprost proporcjonalny do syntezy rybosomów (Kjeldgaard 1961). Pożywka pełna zawiera wszystkie aminokwasy, liczne związki cukrowe, nukleozydy, witaminy i tym podobne. Związki te są dostępne komórkom w obfitości, wyłączając tym samym syntezę całego szeregu enzymów wewnątrz bakterii (Vogel 1960). Te enzymy są niepotrzebne. Bakterie przeniesione z pożywki pełnej na mineralną z dodatkiem glukozy przestają rosnać na jakiś czas. Nie syntetyzują nowych rybosomów, bo mają ich pod dostatkiem, ale na gwałt potrzebują nowych enzymów. W tym stanie rzeczy DNA wysyła *en masse* RNA informacyjny, który przez pierwsze pół godziny (u *Pseudomonas aeruginosa* nawet całą godzinę) dosko-

nale odbija skład zasad DNA. W miarę upływu czasu, od przeniesienia do nowej pożywki, RNA informacyjny stopniowo zacierą się przez na nowo podjętą syntezę RNA rybosomów (Spiegelman 1961). RNA informacyjny nie stanowi bowiem więcej niż 1% RNA bakterii i dlatego można go wykryć tylko w specjalnych okolicznościach.

Trzeba również zdać sobie sprawę z tego, że nie wszystkie geny mogą być równie czynne. Synteza witaminów będzie wymagała minimalnej ilości drobin enzymów, natomiast synteza aminokwasów będzie wymagała wielu drobin enzymów, gdyż szybka synteza białek w wielu punktach cytoplazmy wymaga szybkiej i równomiernej dostawy wszystkich aminokwasów. Wobec tego synteza enzymów metabolizmu aminokwasów będzie wymagała najprawdopodobniej obfitszej i częstszej interwencji RNA informacyjnego, który musi obsadzić większą ilość rybosomów. W takich warunkach wymknie się nam RNA, który, na przykład, jeden jedyny raz w ciągu okresu między podziałami powoduje syntezę jednej drobinny enzymu związanego, przypuścmy, z którymś z etapów syntezy witaminu B₁₂.

Dla przykładu można porównać wielkość RNA informacyjnego z wielkością genomu jednej bakterii: największa do tej pory wyizolowana drobina RNA, który służy funkcji przekazywania informacji, ma ciężar drobinowy $1,6 \times 10^6$, co odpowiada około 0,01 procent całego genomu komórki bakterii (a raczej jednego jądra) (Spiegelman 1961). Gdyby nie było drobin większych, to DNA jednego jądra byłby w stanie wypuścić około 10 tysięcy drobin RNA informacyjnego, co w zupełności pokrywa zapotrzebowanie komórki na kilka tysięcy enzymów i ich genową kontrolę.

Autor składa serdeczne wyrazy podziękowania dr Marii Knothe, której krytyczny umysł i żywe zainteresowanie były mu niezastąpioną pomocą w opracowaniu tematu.

LITERATURA

1. Aronson A. I., Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., Duerksen J. D., McCarthy B. J., McQuillen K., and Roberts, R. B., 1960. Carnegie Institution Year Book 59, 229.
2. Belozersky A. N. and Spirin A. S., 1958. A correlation between the composition of deoxyribonucleic and ribonucleic acids. Nature 182, 111.
3. Bishop J., Leahy J. and Schweet R., 1960. Formation of the peptide chain of hemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 46, 1030.
4. Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., McCarthy B. J., McQuillen K. and Roberts R. B., 1959. Carnegie Institution Year Book 59, 259.
5. Brachet J. 1941. La détection microchimique et le microdosage des acides pentosenucléiques. Enzymologia 10, 87.
6. Brenner S., Jacob F. and Meselson M., 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature 190, 576.
7. Caspersson T. O., 1941. Studien über Eiweissumsatz der Zelle. Naturwissenschaften 29, 33.
8. Caspersson T. O., 1950. Cell growth and cell function. Norton Co. New York 1950.
9. Chao F. C., 1957. Dissociation of macromolecular protein of yeast. Arch. Biochem. Bioph. 70, 426.

10. Cohen S. S., 1948. The synthesis of bacterial viruses. I. The Synthesis of nucleic acid and protein in *E. coli* B infected with T2r+bacteriophage. *J. Biol. Chem.* 174, 281.
11. Cowie D. B., Spiegelman S., Roberts R. B. and Duerksen J. D., 1961. Ribosome-bound β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47, 114.
12. Crick F. H. C. 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138.
13. Crick F. H. C., Griffith J. S. and Orgel L. E., 1957. Codes without commas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, 416.
14. Dintzis H. M., 1961. Assembly of the peptide chain of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47, 247.
15. Doty P., Marmur J., Eigner J. and Schildkraut C., 1960. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Physical chemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46, 461.
16. Flaks J. G. and Cohen S. S., 1959. Virus-induced acquisition of metabolic function. I. Enzymatic formation of 5-hydroxymethyl-deoxycytidylate. *J. Biol. Chem.* 234, 1501.
17. Flaks J. G., Lichtenstein J. and Cohen S. S., 1959. Virus-induced acquisition of metabolic function. II. Studies on the origin of deoxycytidylate hydroxymethylase of bacteriophage-infected *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 234, 1707.
18. Fresco J. R., Alberts B. M. and Doty P., 1960. Some molecular details of the secondary structure of RNA. *Nature* 188, 98.
19. Gamow G., Rich A. and Yčas M., 1956. The problem of information transfer from the nucleic acids to proteins. *Adv. Biol. Med. Physics* 4, 23.
20. Golomb S. W., Welch L. R. and Delbrück M., 1958. Construction and properties of comma-free codes. *Biol. Medd. Dan. Vid. Selsk.* 23, 1.
21. Hall B. D. and Spiegelman S., 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47, 137.
22. Hurwitz J., Bresler A. and Dinger R., 1960. The enzymatic incorporation of ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect of DNA. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 3, 15.
23. Kjeldgaard N. O., 1961. The kinetics of ribonucleic acid and protein formation in *Salmonella typhimurium* during the transition between different states of balanced growth. *Bioch. Bioph. Acta* 49, 64.
24. Kornberg A., Zimmerman S. B., Kornberg S. R. and Josse J., 1959. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VI. Influence of bacteriophage T2 on the synthetic pathway of host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 45, 772.
25. Marmur J. and Lane D., 1960. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Biological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46, 453.
26. McQuillen K., Roberts R. B. and Britten R. J., 1959. Synthesis of nascent protein by ribosomes in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 45, 1437.
27. Nomura M., Hall B. D. and Spiegelman S., 1960. Characterization of RNA synthesized in *E. coli* after bacteriophage T2 infection. *J. Mol. Biol.* 2, 306.
28. Osawa S. and Hotta Y., 1959. Metabolic stability of ribonucleoprotein particles in growing yeast cells. *Bioch. Bioph. Acta* 34, 284.
29. Palade G., 1955. A small particulate component of the cytoplasm. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 1, 59.
30. Palade G. and Siekevitz P., 1956 a. Liver microsomes. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 2, 171.
31. Palade G. and Siekevitz P., 1956 b. Pancreatic microsomes: an integrated morphological and biochemical study. *J. Biochem. Bioph. Cytol.* 2, 671.
32. Schweet R., Lamfrom H. and Allen E., 1958. The synthesis of hemoglobin in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 44, 1029.
33. Spiegelman S., 1961. The relation of informational RNA to DNA. *Cold Spring Harbor Symposia* 26, w druku.
34. Spiegelman S., Hall B. D. and Storck R., 1961. The occurrence of natural DNA-RNA complexes in *E. coli* infected with T2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47, 1135.
35. Sueoka N., 1961. Correlation between base composition of DNA and amino acid composition of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47, 1141.

36. Sueoka N., Marmur J. and Doty P., 1959. Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. *Nature* 183, 1427.
37. Tissières A., Schlesinger D., and Gros F., 1960. Amino acid incorporation into proteins by *E. coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46, 1450.
38. Tissières A., Watson J. D., Schlesinger D. and Hollingworth B. R., 1959. Ribonucleoprotein particles from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 1, 221.
39. T'so P. O. P., Bonner J., and Winograd J., 1956. Microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings. *J. Bioph. Biochem, Cytol*, 2, 451.
40. Ts'o P. O. P., Bonner J. and Vinograd J., 1958. Structure and properties of microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings. *Bioch. Bioph. Acta* 30, 570.
41. Vogel H. J., 1960. Control by repression. *Symp. Soc. Gen. Physiologists. Control Mechanisms in Cellular Processes*. Ed. D. M. Bonner.
42. Volkin E., 1958. RNA turnover in phage infection. *Proc. IV Int. Congress of Biochemistry* 7, 212.
43. Volkin E. and Astrachan L., 1956 a. Phosphorus incorporation in *E. coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* 2, 149.
44. Volkin E. and Astrachan L. 1956 b. The absence of ribonucleic acid in bacteriophage T2. *Virology* 2, 594.
45. Watson J. D. and Crick F. H. C., 1953. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia* 18, 123.
46. Weiss S. B., 1960. Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolyribonucleotide linkages of ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46, 1020.
47. Weiss S. B. and Nakamoto T., 1961. On the participation of DNA in RNA biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47, 694.
48. Zalokar M., 1960. Sites of protein and ribonucleic acid synthesis in the cell. *Exptl. Cell Research* 19, 559.
49. Zubay G. and Wilkins M. H. F., 1960. X-ray diffraction studies of the structure of ribosomes in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 2, 105.