

HENRYK URBANEK

KWAS DEZOKSYRYBONUKLEINOWY CHLOROPLASTÓW

Do niedawna powszechnie panował pogląd, że wszystkie kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) komórek, zarówno u zwierząt jak i u roślin, jest zlokalizowany wyłącznie w jądrach, a ściślej — w chromosomach. DNA ten jako materiał genetyczny, z którego zbudowane są znajdujące się w chromosomach geny, kieruje procesami zachodzącymi w całej komórce, determinuje ich charakter, ogranicza ich zmienność. Zgodnie ze współczesnym stanem wiedzy informacja genetyczna zakodowana w odpowiedniej sekwencji nukleotydów w cząsteczkach DNA jest przenoszona za pośrednictwem zsyntetyzowanych pod jego bezpośrednią kontrolą kwasów rybonukleinowych (RNA) do miejsc biosyntezy białka w komórce, gdzie określa sekwencję aminokwasów w tworzących się łańcuchach peptydowych. W ten sposób specyficzność powstających białek w organizmie, a więc i enzymów, jest kontrolowana przez DNA chromosomów. W czasie podziału komórki jądra potomne zachowują informację genetyczną dzięki zdolności cząsteczek DNA do samoreprodukcji. Mutacje mogą powstać wtedy, jeśli jakieś czynniki wewnętrzne lub zewnętrzne wywołają modyfikację w sekwencji nukleotydów w cząsteczkach DNA, w wyniku czego nastąpi biosynteza zmienionego białka.

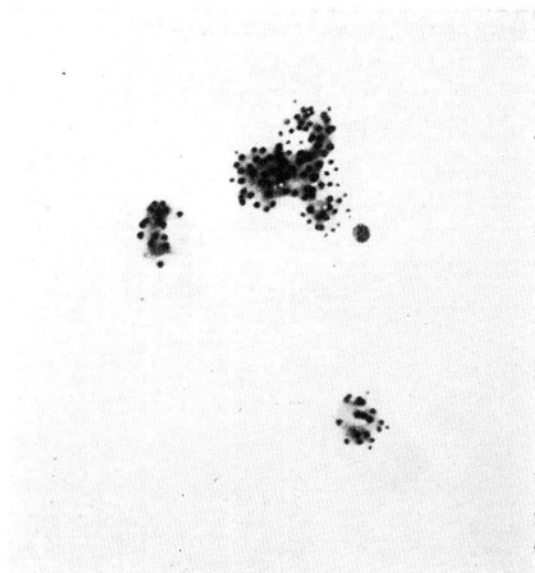
W ostatnich latach zaczęły ukazywać się w literaturze doniesienia, które sugerują, że DNA występuje także w innych strukturach komórkowych, a mianowicie w jąderkach (Mc Leish, 1964), w mitochondriach (Gibor, Granick, 1964) i chloroplastach. W niniejszym artykule zostanie przedstawiony przegląd danych dotyczących obecności DNA w chloroplastach. Chloroplasty są intensywnie badane ze względu na ich centralną rolę w fotosyntezie. Dotąd jednak nie zostało całkowicie wyjaśnione, w jaki sposób te wysokozorganizowane struktury komórkowe są wytwarzane. Według nowszych danych organelle te nie powstają *de novo*, lecz z uprzednio istniejących struktur, które rosną i dzielą się w cytoplazmie komórek roślinnych. Poza tym zaobserwowano, że pewne dziedziczne czynniki rządzące wytwarzaniem i funkcją chloroplastów nie są związane z chromosomowymi genami (Gibor, Granick, 1964). Wynikałoby stąd, że plastydy posiadają genetyczną autonomię, że mają one własną genetyczną informację. Nasuwa się pytanie czy genetyczny aparat chloroplastów jest związany z kwasami nukleinowymi, czy jego

mechanizm funkcjonuje podobnie jak mechanizm podstawowego aparatu dziedzicznego komórki umieszczonego w jądrach. Dla ustalenia tego należy wykazać, że chloroplasty: 1) zawierają DNA, 2) DNA ten replikuje się w nich oraz kieruje syntezą kwasów rybonukleinowych w tych organellach, a przede wszystkim informacyjnego RNA, 3) informacyjny RNA koduje syntezę specyficznych białek chloroplastydowych.

O obecności DNA w wyizolowanych preparatach chloroplastów ze szpinaku i tytoniu donieśli już w 1957 roku Chiba i Sugahara. Stwierdzili oni, że w 1 chloroplaście z liści tytoniu znajduje się około $9,7 \times 10^{-12}$ mg DNAP, podczas gdy w jądrze z liści tytoniu jest $2,4 \times 10^{-10}$ mg DNAP. Według tych autorów DNA chloroplastów w porównaniu z DNA jądrowym trudniej ekstrahuje się kwasem nadchlorowym. Do pełnego wyekstrahowania go z badanych plastydów konieczne było użycie $2N$ $HClO_4$. Liczne prace wykazujące włączanie się specyficznego prekursora DNA — tymidyny — w struktury plastydowe dostarczają dalszych faktów przemawiających za obecnością DNA w chloroplastach. Stwierdzono włączanie się znakowanej tymidyny do chloroplastów *Spirogyra*, *Euglena*, *Nicotiana*, *Clivia*, *Bilbergia* (rys. 1), (Stocking, Gifford, 1959; Sagan, Scher, 1961; Wollgiehn, Mothes, 1963; Olszewska, Mikulska, 1964). Ris i Plaut (1961) używając mikroskopu elektronowego zaobserwowali występowanie w chloroplastach *Chlamydomonas* włókien podobnych do cząsteczek DNA, które ginęły po działaniu dezoksyrybonukleazy (rys. 2).

Dowodem ostatecznie stwierdzającym występowanie DNA w plastydach powinno być otrzymanie go z oczyszczonych preparatów tych organelli. Możliwość jednak zanieczyszczeń tych preparatów jądrami lub fragmentami jądrowymi stwarza główną trudność w rozstrzygnięciu omawianego zagadnienia. Należałoby wówczas oczekiwać, że tego rodzaju zanieczyszczenia będą zależeć od metody użytej do izolowania chloroplastów. Zgodnie z tym Pollard (1964) uważa, że wykrycie przez niego obecności DNA w preparatach chloroplastów otrzymanych ze szpinaku niezależnie od użytej metody izolowania, w pewnym stopniu świadczy na korzyść istnienia DNA związanego z tymi strukturami. O obecności DNA w preparatach chloroplastów otrzymanych ze szpinaku różnymi metodami donieśli także Biggins i Park (1964).

W dalszych badaniach stwierdzono, że DNA wykrywany w plastydach różni się od DNA chromosomów właściwościami fizycznymi i chemicznymi, co poważnie podważyło zastrzeżenia utrzymujące, że jego obecność w omawianych organellach może być spowodowana zanieczyszczeniami pochodzenia jądrowego. Przede wszystkim ultrawierowanie w gradiencie stężeń chlorku cezu DNA z liści szpinaku, buraków, komórek *Chlorella* (Chun i współpr., 1963) *Chlamydomonas* (Sager, Ischida, 1964), *Euglena* (Brawerman, Eisenstadt, 1964) wykazało, że jest on złożony z dużego i małego komponentu, różniącego się między sobą gęstością. Z reguły mały komponent charakteryzuje się niższą gęstością w porównaniu z dużym komponentem. Podczas gdy preparaty DNA otrzymane z całych komórek zawierają nie więcej niż kilka procent małego komponentu, to w DNA otrzymanym



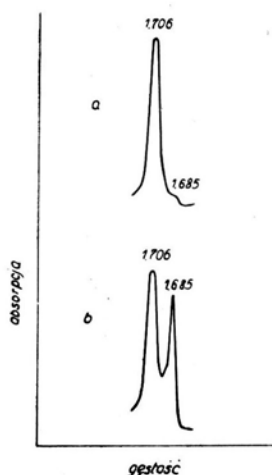
Rys. 1. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Bilbergia* sp. W preparatach poddanych działaniu dezo-ksyrybonukleazy chloroplasty były nieaktywne (według Olszewskiej i Mikulskiej, 1964).



Rys. 2. Miejsca w chloroplastach *Chlamydomonas moewusii* zawierające DNA. CM-zewnętrzna błona chloroplastów, CL — lamelle chloroplastów, R — rybosomy w cytoplazmie. Pow. ok. 110.000 (według Ris i Plaut, 1962)

z oczyszczonych chloroplastów stanowi on kilkadziesiąt procent (rys. 3). Jest on natomiast w ogóle nieobecny w komórkach *Euglena gracilis*, które straciły zdolność do tworzenia chloroplastów (Leff i współpr., 1963). Stąd autorzy utrzymują, że ten mały komponent jest DNA specyficznym dla chloroplastów.

Wielu autorów donosiło o różnicy w składzie nukleotydowym między DNA otrzymanym z chloroplastów i DNA jądrowym. Iwamura (1960) stwierdza, że w wykrytym przez niego w preparatach chloroplastów *Chlorella* DNA znajduje się więcej adeniny i tyminy niż w pozostałym DNA komórki. Kirk (1963a i b) doniósł, że DNA otrzymany z chloroplastów bobu ma stosunek molarny adeniny



Rys. 3. Frakcje DNA z *Euglena gracilis* (hodowanej na świetle) otrzymane za pomocą ultrawiórowania w gradiencie chlorku cezu. a — DNA z całych komórek, b — DNA z chloroplastów. DNA o gęstości 1.685 jest prawdopodobnie komponentem chloroplastów (według Edelman i współpr., 1964).

do guaniny 1,67, podczas gdy odpowiednia wartość dla DNA jądrowego bobu wynosi 1,54. Edelman i współpr. (1964) wykazali u *Euglena* znacznie większą różnicę w składzie nukleotydowym, a mianowicie DNA chloroplastów zawiera według nich około 72% pary zasad adenina + tymina i 28% pary zasad guanina + cytozyna, a DNA jądrowy odpowiednio 50% i 50%. Brawerman i Eisenstadt (1964) donieśli, że DNA chloroplastów *Euglena* nie tylko charakteryzuje się obniżoną zawartością pary zasad guanina — cytozyna, ale także w przeciwieństwie do DNA jądrowego nie wykryto w nim 5-metylocytozyny. Ponadto wykazano dużo szybsze włączanie się ^{32}P w DNA chloroplastów *Chlorella* hodowanej na świetle (Iwamura, 1960 i 1962) oraz w DNA chloroplastów tytoniu w czasie wzrostu liścia (Shipp, Kieras, Kaselkorn, 1965) w porównaniu z DNA jądrowym.

Użycie do badań bezjądrowych fragmentów *Acetabularia mediterranea* całkowicie wykluczyło możliwość zanieczyszczenia preparatów plastydowych jądrami.

Dlatego też Gibor i Izawa (1963) oraz Baltus i Brachet (1963) stwierdzając obecność DNA w chloroplastach wyizolowanych z komórek *Acetabularia*, z których uprzednio usunięto «chirurgicznie» jądra, wyeliminowali wszelkie wątpliwości. Gibor i Izawa (1963) oznaczyli w chloroplastach *Acetabularia* 0,2 μg DNA w stosunku do 1 mg białka i na podstawie tego wyliczyli, że jego ilość przypadająca na 1 plastyd wynosi 6×10^{-16} g, co odpowiada około $1,8 \times 10^4$ nukleotydów. Przyjmując tripletowy typ kodu i podwójnie spiralną budowę DNA ilość ta jest wystarczająca do kodowania syntezy kilkuset różnych białek o przeciętnym ciężarze cząsteczkowym 20 tysięcy. Nieco większą ilość DNA przypadającą na 1 chloroplast u *Euglena*, a mianowicie 1×10^{-14} g wyliczyli Brawerman i Eisenstadt (1964), jest to w przybliżeniu tyle ile zawiera 1 komórka *Escherichia coli*. Dla porównania można jeszcze przytoczyć, że zawartość DNA w diploidalnym jądrze bobu określona przez Rasch i współpr. (1959) wynosi $1,8 \times 10^{-12}$ g. Edelman i współpr. (1964) donieśli, że DNA chloroplastowy u *Euglena* stanowi około 3% całkowitego DNA komórkowego. Autorzy dalej wyliczyli, że jeżeli wszystek DNA danego chloroplastu tworzy jedną cząsteczkę, to jej masa wynosi nie mniej niż $7,2 \times 10^8$, co stanowi rząd odpowiednich wielkości wykrytych dla DNA jądrowego. Poza tym stwierdzono, że DNA chloroplastów podobnie jak DNA jądrowy posiada dwuspiralną budowę (Chun i współpr., 1963).

Interesująca jest rola i pochodzenie DNA chloroplastów. Czy spełnia on czynną genetyczną funkcję, czy też jest zmagazynowanym materiałem. Jeżeli spełnia genetyczną funkcję, to czy wykonuje to w sposób analogiczny jak DNA jądrowy. Odpowiedź na te pytania pośrednio już otrzymano. Stwierdzono bowiem, że dezyksyrybonukleaza i aktynomycyna D (antybiotyk blokujący syntezę RNA zależną od DNA) hamują włączanie się znakowanego uracylu i urydyny w RNA chloroplastów otrzymanych z bezjądrowych fragmentów *Acetabularia* (Schweiger, Berger, 1964, Kirk 1964, Shephard, 1965). Podobnie wykazano, że aktynomycyna D blokuje także włączanie się znakowanych aminokwasów w białka w preparatach chloroplastów otrzymanych z tejże *Acetabularia* (Goffeau, Brachet, 1965, Shephard, 1965). Badania powyżej przytoczone wyraźnie więc sugerują, że synteza białek w chloroplastach jest kierowana przez RNA tych struktur komórkowych, który jest wytwarzany w nich na matrycy DNA.

Nasuwa się pytanie czy ten genetycznie czynny DNA występujący w plastydach replikuje się w nich i niezależnie od jądra czy też w jądrze. Przede wszystkim wykazano, że DNA w chloroplastach jest metabolicznie aktywny, przy czym włączanie się w niego znakowanych prekursorów jest stymulowane przez światło (Iwamura, 1962, Olszewska, Mikulska, 1965, Shipp i współpr. 1965). Podobnie Janowski (1965) i De Vitry (1965) utrzymują, że w chloroplastach zachodzi synteza DNA. Na uwagę zasługują doświadczenia nad wywołaniem mutacji plastydów u *Euglena* za pomocą naświetlania promieniami UV o długości fali 260 m μ . Mutacyjne działanie ultrafioletu o tej długości fali przypisuje się głównie jego zdolności do wywoływania dimeryzacji tyminy w cząsteczkach DNA (Bollum i Setlow, 1963). Naświetlano mikrowiązką UV oddzielnie cytoplazmę i jądro. Chloroplasty rozwi-

jały się normalnie przy naświetlaniu jądra. Naświetlanie natomiast samej tylko cytoplazmy powoduje nieodwracalne uszkodzenie zielenienia się chloroplastów. Takie zmienione przez UV komórki nie odzyskują nigdy w następnych generacjach zdolności do zielenienia. Zmienione w nich plastydy rozmnażają się z pokolenia na pokolenie z zachowaniem mutacji. Jeżeli DNA cytoplazmy wrażliwy na UV byłby tworzony przez jądro, wtedy można by było oczekiwać, że nowy DNA z jąder powinien zastąpić DNA uszkodzony. Ponieważ obecność nienaświetlonych jąder w komórce nie usuwa mutacyjnych zmian chloroplastów, wnioskuje się, że DNA cytoplazmy, prawdopodobnie chloroplastów, nie jest syntetyzowany w jądrze (Lyman i współpr., 1961, Gibor, Granick, 1964). Ostatnio Shephard (1965) wykazał, że obecność jądra ma mały wpływ na włączanie się tymidyny w DNA i leucyny w białka chloroplastów *Acetabularia* oraz wcale nie wpływa na włączanie się urydyny w RNA tych organelli.

Reasumując można uważać za udowodnione, że chloroplasty zawierają swój własny DNA, który replikuje się w nich, kieruje syntezą RNA, a ten z kolei jest wzorem dla syntezy plastydowych białek. Jest on więc odpowiedzialny przynajmniej częściowo za specyficzne właściwości tych organelli.

Aczkolwiek dowody przedstawione na omawiany temat w literaturze są często pośrednie i nie wszystkie wyniki są przekonujące, w sumie jednak zdecydowanie podtrzymują one hipotezę, że chloroplasty posiadają przynajmniej w pewnym stopniu autonomiczny genetyczny aparat, którego DNA zawiera genetyczną informację niezbędną dla ich reprodukcji. Replikacja plastydów wydaje się więc zachodzić bez kodowania informacji od jądra.

Jaki jest sens biologiczny, aby każdy plastyd posiadał DNA jako swoją własną dziedziczną jednostkę odpowiedzialną za replikację organelli jak również za inne zachodzące w niej procesy biochemiczne. Z jednej więc strony chloroplasty mogą samoodtwarzać się z ich własnym wyspecjalizowanym układem syntetyzującym białka, co zwiększa ich stabilność genetyczną dzięki ograniczeniu mutacji, jakie mogłyby zachodzić przypadkowo na drodze przekazywania informacji z jądra. Z drugiej znów strony mutacje mogą zachodzić pod wpływem różnych czynników niezależnie w DNA każdego chloroplastu i te liczne organelle, które podległy mutacjom, mogą przyspieszać zmiany ewolucyjne.

Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby autonomia chloroplastów była całkowita. Geny jądrowe decydujące o specyfice żywego organizmu mogą sprawować jakąś nadrzędną kontrolę nad aparatem genetycznym plastydów, między innymi za pomocą specyficznych inhibitorów czy aktywatorów. W jakim stopniu autonomia chloroplastów jest ograniczona przez jądro, wykażą dalsze badania *.

Katedra Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

* Pani Doc. W. Potapezyk składam serdeczne podziękowania za szereg cennych uwag.

LITERATURA

- Baltus E., Brachet J., 1963: Presence of deoxyribonucleic acid in the chloroplasts of *Acetabularia mediterranea*. Biochim. Biophys. Acta, 76, 490—492.
- Biggins J., Park R. B., 1964: Nucleic acid content of chloroplasts of spinach isolated by a non-aquiferus technique. Nature, 203, 425—426.
- Bollum F. J., Setlow R. B., 1963: Ultraviolet inactivation of DNA primer activity. Biochim. Biophys. Acta, 68, 599—607.
- Brawerman S., Eisenstadt J. M., 1964: Deoxyribonucleic acid from the chloroplasts of *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta, 91, 477—485.
- Chiba Y., Sugahara K., 1957: The nucleic acid content of chloroplasts isolated from spinach and tobacco leaves. Arch. Biochem., 71, 367—372.
- Chun E. H. L., Vaughan M. H., Rich A., 1963: The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. J. Mol. Biol., 7, 130—141.
- Edelman M., Cowan C. A., Epstein H. T., Schiff J. A., 1964: Studies of chloroplast development in *Euglena*. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 52, 1214—1219.
- Gibor A., Granick S., 1964: Plastids and mitochondria inheritable systems. Science, 145, 890—897.
- Gibor A., Izawa M., 1963: The DNA content of the chloroplasts of *Acetabularia*. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 50, 1164—1169.
- Goffeau A., Brachet J., 1965: Deoxyribonucleic acid — dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate *Acetabularia fragments*. Biochim. Biophys. Acta, 95, 302—313.
- Iwamura T., 1960: Distribution of nucleic acids among subcellular fractions of *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta, 42, 161—163.
- Iwamura T., 1962: Characterization of the turnover of chloroplast deoxyribonucleic acid in *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta, 61, 472—474.
- Janowski M., 1965: Synthèse chloroplastique d'acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*. Biochim. Biophys. Acta, 103, 399—408.
- Kirk J. T. O., 1963a: The deoxyribonucleic acid of broad-bean chloroplasts. Biochem. J., 88, 45P.
- Kirk J. T. O., 1963b: The deoxyribonucleic acid of broad-bean chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 76, 417—424.
- Kirk J. T. O., 1964: DNA-dependent RNA synthesis in chloroplast preparations. Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 393—397.
- Leff J., Mandel M., Epstein H. T., Schiff J. A., 1963: DNA satellites from cells of green and aplastic algae. Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 126—131.
- Lyman H., Epstein H. T., Schiff J. A., 1961: Studies of chloroplast development in *Euglena*, Biochim. Biophys. Acta, 50, 301—309.
- Mc Leish J., 1964: Deoxyribonucleic acid in plant nucleoli. Nature, 204, 36—39.
- Olszewska M. J., Mikulska E., 1964: Etude autoradiographique de l'incorporation de la thymidine ^3H , de l'uridine ^3H et de la phenylalanine ^3H dans les chloroplastes de *Clivia miniata* et *Bilbergia* sp., Experientia, 20, 267—268.
- Olszewska M. J., Mikulska E., 1965: Badania autoradiograficzne nad wpływem światła na włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów w różnych stadiach rozwojowych. Acta Soc. Bot. Poloniae, 34, 225—234.
- Pollard C. J., 1964: The deoxyribonucleic acid content of purified spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 105, 114—119.
- Rasch E., Swift H., Klein R. M., 1959: Nucleoprotein changes in plant tumor growth. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 11—15.
- Ris H., Plaut W., 1962: Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. J. Cell. Biol., 13, 383—391.

- Sagan L., Scher S., 1961: Evidence for cytoplasmic DNA in *Euglena gracilis*. J. Protozool., 8, suppl., 20—22.
- Sager R., Ishida M. R., 1963: Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 50, 725—730.
- Schweiger H. G., Berger S., 1964: DNA-dependent RNA synthesis in chloroplasts of *Acetabularia*. Biochim. Biophys. Acta, 87, 533—535.
- Shephard D. S., 1965: An autoradiographic comparison of the effects of enucleation and actinomycin D on the incorporation of nucleic acid and protein precursors by *Acetabularia* chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 108, 635—643.
- Shipp W. S., Kieras F. J., Haselkorn R., 1965: DNA-associated with tobacco chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 207—213.
- Stocking C. R., Gifford E. M., 1959: Incorporation of thymidine into chloroplasts of *Spirogyra*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1, 159—164.
- Vitry De F., 1965: Étude autoradiographique des effets de l'actinomycine D et de la puromycine. Mise en évidence et rôle du DNA des chloroplastes. Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1375—1397.
- Wollgiehn R., Mothes K., 1963: Über DNS in den Chloroplasten von *Nicotiana rustica*. Naturwiss., 50, 95—96.